



UNIVERSIDAD DE BURGOS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

ÁREA DE QUÍMICA FÍSICA

**INTERACCIÓN DE
LIGANDOS ORGÁNICOS Y
COMPLEJOS METÁLICOS
CON ÁCIDOS NUCLEICOS**

TESIS DOCTORAL

Héctor José Lozano Ordóñez

Burgos, 2016



UNIVERSIDAD DE BURGOS

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

La **Dra. Begoña García Ruiz**, Catedrática de Química Física del Departamento de Química de la Universidad de Burgos y la **Dra. Natalia Busto Vázquez**, Investigadora postdoctoral del Departamento de Química de la Universidad de Burgos

CERTIFICAN:

Que la siguiente memoria titulada “**Interacción de ligandos orgánicos y complejos metálicos con ácidos nucleicos**” ha sido realizada por D. Héctor José Lozano Ordóñez, Licenciado en Química, en el Departamento de Química de la Universidad de Burgos bajo su dirección y autoriza su presentación para que sea calificada como Tesis Doctoral con mención de Doctor Internacional.

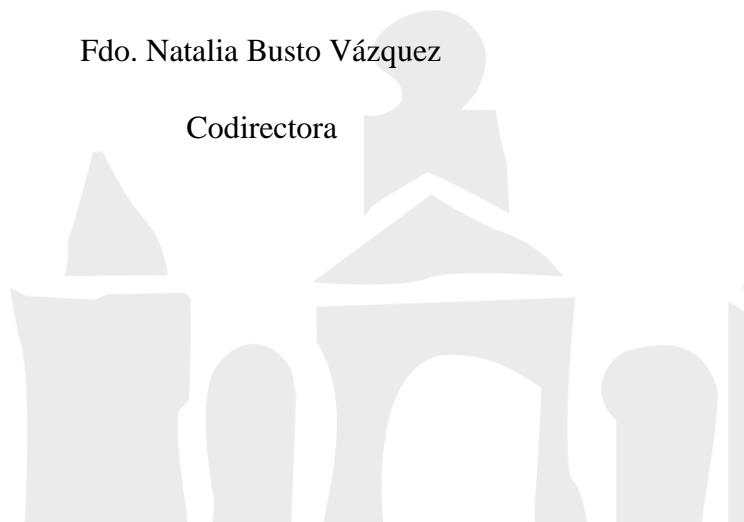
En Burgos, a 24 de agosto de 2016

Fdo. Begoña García Ruiz

Directora

Fdo. Natalia Busto Vázquez

Codirectora



AGRADECIMIENTOS

Esta tesis supone la culminación de una etapa que empezó hace cuatro años, la cual me ha permitido conocer el mundo de la investigación, y aunque lleva mi nombre, han sido muchas personas las que han ayudado a que se haya convertido en una realidad. En las siguientes líneas quiero agradecerles sus aportes.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mi directora de tesis Begoña García Ruiz y a José María Leal Villalba por confiar en mí y darme la oportunidad de conocer este mundo. Gracias por todo el apoyo durante este tiempo y por saber encontrar las respuestas cuando parecían no estar.

A toda mi familia, tanto a los que están como a los que ya no están, y especialmente a mis padres por su apoyo y su paciencia conmigo. Gracias porque nunca han dejado que me faltara nada y por transmitirme que con orgullo y esfuerzo al final todo es posible.

A todos mis amigos, que, aunque nunca hayan entendido muy bien por qué me dedicaba a esto siempre se han preocupado por cómo estaba yendo todo.

A mis compañeros de licenciatura, con los que empecé mi formación, por todas las horas que pasamos juntos durante esos años y por el excelente grupo de compañeros que llegamos a formar.

A los profesores Gustavo Espino de la Universidad de Burgos y James A. Platts de la Universidad de Cardiff por acogerme en sus laboratorios y abrirme las puertas de un campo de investigación nuevo para mí. Gracias por su dedicación y paciencia. Gracias también a mi colonia española en Cardiff: Mireia, Raúl y Adrián, por convertir esa estancia en una de las mejores experiencias de mi vida.

A mis compañeros de laboratorio, mi segunda familia. Gracias a Jesús por compañerismo, a Matteo por los momentos vividos tanto dentro como fuera del laboratorio. A Javi por revolucionar el laboratorio e inundarlo con alegría. Gracias a Ana Rosa por su bondad y el cuidado que tiene hacia todos sus compañeros y a Cristina simplemente por ser como es y alegrarnos cada día. Una de las cosas que más valoro de la realización de esta tesis doctoral es haber estado cuatro años trabajando entre amigos.

Quiero cerrar estos agradecimientos con unas últimas líneas dedicadas a mi codirectora, compañera y amiga Natalia Busto. Gracias por todos tus consejos durante este tiempo. Gracias por preocuparte por mí cada día tanto a nivel profesional como personal. Gracias por no haberme fallado nunca, ser dura cuando era necesario y por levantarme cuando me caía. Podría seguir llenando líneas de agradecimiento hacia ella, pero ambos sabemos que no es necesario y además, nunca conseguiría hacer justicia a todo lo que la debo.

La curiosidad no mató al gato,

le permitió vivir muchas vidas

Anónimo

ÍNDICE

PRÓLOGO	3
CAPÍTULO I	9
INFORME BIBLIOGRÁFICO	11
I.1. DE LA NUCLEINA AL ADN	11
I.2. EL DESCUBRIMIENTO DEL ARN.....	12
I.3. ESTRUCTURA PRIMARIA DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS	13
I.4. PROPIEDADES QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS DE NUCLEÓTIDOS Y POLINUCLEÓTIDOS.....	17
I.5. ESTRUCTURA SECUNDARIA.	18
I.6. ESTRUCTURA TERCIARIA DE ADN Y ARN	29
I.7. INTERACCIONES LIGANDO-POLINUCLEÓTIDO	30
CAPÍTULO II	37
INSTRUMENTACIÓN Y MÉTODOS EXPERIMENTALES	39
II.1. SÍNTESIS DE LOS COMPLEJOS INORGÁNICOS.....	39
II.2. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	39
II.3. MICROANÁLISIS ELEMENTAL (CHNS).....	40
II.4. ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	40
II.5. MEDIDAS DE PH	40
II.6. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN UV-VIS Y FLUORESCENCIA	41
II.7. DICROÍSMO CIRCULAR.....	42
II.8. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC).....	42
II.9. VISCOSIDAD.....	43
II.10. RELAJACIÓN POR SALTO DE TEMPERATURA (T-JUMP).....	44
II.11. ENSAYOS DE BIOLUMINISCENCIA	45
II.12. INTERACCIÓN LIGANDO/POLINUCLEÓTIDO	45
CAPÍTULO III	59
MÉTODOS COMPUTACIONALES	61
III.1. MODELOS TEÓRICOS	62
III.2. BASES DE CÁLCULO	74

III.3. TRATAMIENTO DEL DISOLVENTE.....	78
III.4. INSTRUMENTACIÓN	79
CAPÍTULO IV.....	81
INTERACCIÓN DE TIONINA CON ARN DE TRIPLE, DOBLE Y HÉLICE SENCILLA. J. PHYS. CHEM. B 117, 38–48 (2013).....	83
CAPÍTULO V.....	99
ESTABILIZACIÓN DE DISOLUCIONES DE AL(III) POR COMPLEJACIÓN CON ÁCIDO CACODÍLICO. PHYS. CHEM. CHEM. PHYS. 17, 29803–13 (2015)	101
CAPÍTULO VI.....	125
INTERACCIÓN DE COMPLEJOS DERIVADOS DE ALUMINIO CON ADN Y ARN A DIFERENTES PHs	127
VI.1. ABSTRACT.....	128
VI.2. INTRODUCTION.....	128
VI.3. MATERIALS AND METHODS.....	129
VI.4. RESULTS AND DISCUSSION.....	130
VI.5. CONCLUSIONS.....	140
CAPÍTULO VII.....	143
EFFECTO EN EL ADN Y ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE DERIVADOS DE QUINONA Y SUS CORRESPONDIENTES COMPLEJOS DINUCLEARES DE RU(II).....	145
VII.1. ABSTRACT.....	147
VII.2. INTRODUCTION.....	147
VII.3. MATERIALS AND METHODS	150
VII.4. RESULTS AND DISCUSSION.....	153
VII.5. CONCLUSIONS.....	174
VII.6. SUPPORTING INFORMATION.....	175
CONCLUSIONES GENERALES.....	183
BIBLIOGRAFÍA.....	187

Prólogo

Prólogo

La Química-Física comprende el estudio de los procesos químicos que gobiernan las propiedades y comportamiento de los sistemas químicos tanto a nivel microscópico como macroscópico. Para ello, se sirve de distintas áreas de estudio como termodinámica, cinética y química cuántica que nos han permitido calcular los parámetros termodinámicos y caracterizar los mecanismos de la reacción entre distintos ligandos orgánicos e inorgánicos con macromoléculas orgánicas, ADN y ARN. Las técnicas experimentales empleadas han sido espectrométricas (absorbancia, fluorescencia y dicroísmo circular), calorimétricas (calorimetría diferencial de barrido) y viscosimetría. Cabe resaltar la técnica de T-Jump que permite seguir reacciones con tiempos de relajación del orden de microsegundos. Asimismo, se han empleado técnicas de RMN y análisis elemental, para la caracterización de los complejos de síntesis. La síntesis de los complejos metálicos se ha llevado a cabo en colaboración con el Prof. Gustavo Espino, del área de Química Inorgánica de la Universidad de Burgos.

Mediante la Química Computacional, pueden estimarse propiedades físicas y espectroscópicas, así como energías y estudios de reactividad. Una de las ventajas más importantes de esta rama de la química es que con los conocimientos adecuados, es accesible a toda la comunidad científica. Existen varias formas de aplicar la Química computacional. La primera, consiste en realizar los cálculos antes de la síntesis o estudio de las propiedades de un sistema químico para ayudar a prever y orientar al investigador antes de realizar el trabajo experimental. La segunda forma, y la empleada en esta tesis, como complemento a resultados experimentales ya obtenidos, aportando un enfoque distinto, e incluso en algunos casos, permitiendo análisis que experimentalmente no serían posibles. Los estudios computacionales se iniciaron a raíz de la estancia del doctorando en la Universidad de Cardiff bajo la tutela del Prof. James A. Platts, de la Escuela de Química de la Universidad de Cardiff.

Los estudios biológicos han sido realizados por encargo en la Universidad de Santiago de Compostela.

Desde el descubrimiento de la importancia biológica de los ácidos nucleicos se han llevado a cabo numerosas investigaciones centradas en nuevas sustancias que puedan actuar como agentes anticancerígenos que afecten a los procesos de replicación, transcripción y traducción. En este sentido, la investigación acerca del mecanismo por el que una sustancia interacciona con ADN o ARN es esencial, y constituye el primer paso en la lucha contra el cáncer. Existen tres mecanismos a través de los cuales una molécula puede interaccionar con ADN: mediante control de los factores de transcripción, por unión de la molécula a la proteína que luego se unirá al ADN, por unión a una molécula de ARN y posterior formación de un híbrido ARN–ADN que está involucrado en los procesos de transcripción, y por último las estudiadas en esta tesis, por interacción directa con el ADN o el ARN.

El objetivo de esta tesis doctoral es el estudio del modo de interacción de ligandos de interés biológico, orgánicos e inorgánicos conteniendo metales de transición, con ADN y ARN. Algunos de los ligandos son comerciales y otros han sido sintetizados en el grupo.

En el caso de los ligandos orgánicos, en el capítulo IV se ha estudiado la interacción de Tionina con ARN en doble y triple hélice, así como en hélice sencilla. Además, en el capítulo VII se estudia la interacción de Naphthazarin y Quinizarin con ADN. Estos tres compuestos orgánicos interaccionan con los polinucleótidos dando un enlace de tipo intercalativo, en el cual se insertan parcialmente entre dos pares de bases consecutivos. La afinidad de Tionina por la doble hélice de ARN es tal, que provoca una desnaturalización de la triple hélice de ARN para permanecer intercalada en la doble hélice de ARN resultante. En el caso de Naphthazarin y Quinizarin, el grado de intercalación es mayor para el primero, pero el segundo muestra mayor afinidad por el ADN. La intercalación es un proceso reversible que induce cambios conformacionales en la estructura de ARN y ADN, llegándose a inhibir los procesos en los que estos forman parte.

El tipo de enlace al ADN de Naphthazarin y Quinizarin difiere notablemente del tipo de enlace que dan sus correspondientes derivados dinucleares de Ru(II) que usan a estos ligandos como puente entre los centros metálicos y que se encuentran descritos en el capítulo VII. Los derivados de Ru(II) enlazan irreversiblemente con el ADN por unión de cada átomo de Rutenio al N7 de dos moléculas de Guanina

consecutivas mediante crosslinking intercatenario. Este tipo de enlace también inhibe los procesos biológicos en los que el ADN tiene presencia, habiéndose obtenido que ambos derivados mejoran la selectividad frente a células tumorales comparado con los ligandos orgánicos libres.

En colaboración con el grupo del Prof. Fernando Secco, de la Universidad de Pisa, con el que llevamos trabajando desde el año 1996, hemos estudiado en el capítulo V, la complejación de $\text{Al}(\text{ClO}_4)_3$ con ácido cacodílico (Cac), siendo capaz de solubilizar el Aluminio a valores de pH superiores a 4, donde este metal precipita. La cantidad y tipos de complejos formados entre Aluminio y ácido cacodílico depende del pH, siendo los complejos más representativos los formados a $\text{pH} = 7$ ($\text{Al}_{13}\text{Cac}_x$) y 5 (Al_2Cac_2). El capítulo VI detalla la interacción de estos dos complejos con ADN y ARN. Se ha obtenido una interacción mediante enlace covalente entre Al_2Cac_2 con ADN y ARN. Sin embargo, a $\text{pH} = 7$ el complejo $\text{Al}_{13}\text{Cac}_x$ interacciona con los polinucleótidos mediante unión externa, la cual supone una interacción electrostática entre el complejo y los grupos fosfato de los polinucleótidos.

Además de los trabajos descritos, el doctorando también ha contribuido tanto experimentalmente como con simulaciones teóricas en los siguientes artículos:

“Anticancer Activity and DNA Binding of a Bifunctional Ru(II) Arene Aqua-Complex with the 2,4-Diamino-6-(2-pyridyl)-1,3,5-triazine Ligand” (*Inorg. Chem.* 52, 9962–74 (2013)). En esta publicación se describe la síntesis y caracterización del complejo de Ru y el estudio frente al ADN. Los resultados indican que se forma un complejo bifuncional intercalado-covalente; en primer lugar, se produce intercalación del complejo para, a continuación, formar un enlace covalente entre el centro metálico y el N7 de la Guanina. En cuanto a la actividad antiproliferativa el complejo es más activo que el cisplatino en la línea celular A2780cis, es dependiente del pH y presenta selectividad en la línea A2780.

“Recognition of duplex RNA by a thiosemicarbazonatocopper(II) complex. Relevant noncovalent interactions both in solid state and in solution” (*Dalton. Trans.*, en revisión). En este trabajo se recoge el estudio de la interacción del complejo $[\text{CuL}]^+$, donde L es el ligando Piridina-2-carbaldehído-

tiosemicarbazona, con ARN. El estudio ha sido realizado experimentalmente y con simulaciones teóricas (DFT), obteniéndose un enlace de tipo intercalativo a bajas concentraciones de ligando, en el cual además de las interacciones de stacking entre el ligando y los pares de bases, se establecen interacciones de Hidrógeno que contribuyen al fortalecimiento de la interacción. Hemos comprobado que este tipo de interacción no se da en el caso de ADN por lo que la especificidad hacia ARN es de gran interés desde el punto de vista biológico.

Capítulo I

Informe Bibliográfico

I. Informe Bibliográfico

I.1. De la nucleína al ADN

Los ácidos nucleicos son los responsables de la transmisión de la información genética y por tanto de la herencia genética. El estudio de la transmisión genética se remonta a 1865 cuando Gregor Mendel¹ descubrió que era posible predecir la transmisión de rasgos genéticos a partir de sus estudios con guisantes, dando lugar a las tres leyes de Mendel. En 1866 Ernst Haeckel² propuso que la responsabilidad de la transmisión de la herencia genética residía en moléculas en el interior del núcleo celular. Sin embargo, no fue hasta tres años más tarde, en 1869, cuando Friedrich Miescher, consiguió aislar el ADN, al cual denominó nucleína. Su hallazgo surgió a raíz de sus estudios con el objetivo de clarificar la base de la vida celular. Inicialmente, centró sus estudios en linfocitos, pero debido a la dificultad de purificar los productos aislados y el bajo rendimiento obtenido, orientó sus estudios hacia el análisis del pus.³ Durante sus estudios comprobó la aparición de un precipitado en medio ácido, pero capaz de ser solubilizado al basificar el medio. Tras desarrollar varios protocolos para la separación de esta sustancia del medio, los ensayos de solubilidad, digestibilidad y análisis elementales realizados, concluyeron que esta nueva sustancia, con alto contenido en Nitrógeno y Fósforo, era diferente a cualquier proteína antes descrita. Los resultados obtenidos fueron dados a conocer en 1871, lo que provocó que la comunidad científica buscara la nucleína en otros tipos de células, incluido el propio Miescher, que suponiendo que podría ser una fuente potente de nucleína, dedicó su investigación al análisis del espermatozoide del salmón. Entre los años 1884-1885, Oscar Hertwig, Albrecht von Kfliker, Eduard Strasburger, y August Weismann demostraron que el núcleo celular contiene la base para la transmisión de la herencia genética. La popularidad de la nucleína disminuyó en décadas posteriores, debido al enfoque de su descubridor en otros proyectos, así como la creencia de la comunidad científica de que si las proteínas constaban de 20 aminoácidos, mientras que la nucleína constaba de sólo cuatro nucleótidos,⁴ la transmisión de la información genética tenía que ser debida a las proteínas. Sin embargo, en 1944, Avery, McLeod y McCarty demostraron, mediante inyección de distintos neumococos sobre ratones, que el “factor de transformación” en los procesos

biológicos era el ácido desoxirribonucleico y no las proteínas.⁵ Casi de forma paralela, en 1952, Hershey y Chase, en sus trabajos con virus demostraron, mediante marcaje isotópico, que era el ADN el que infectaba a las bacterias.⁶ En 1953 Rosalind Franklin obtuvo las primeras imágenes de difracción de rayos X del ADN⁷ y ese mismo año, Watson y Crick⁸ descifraron la estructura del ADN permitiendo así el conocimiento de su funcionamiento, propuesto por Francis Crick, y que constituye el dogma central de la biología molecular (Figura I.1), en el que, el ADN es leído y duplicado, para posteriormente transcribirse al ARN, y por último ser traducido en las proteínas. Este hecho abrió una nueva disciplina de estudio en la que se han realizado numerosos avances, culminando en 2001, como último avance más importante, con la resolución completa del genoma humano.

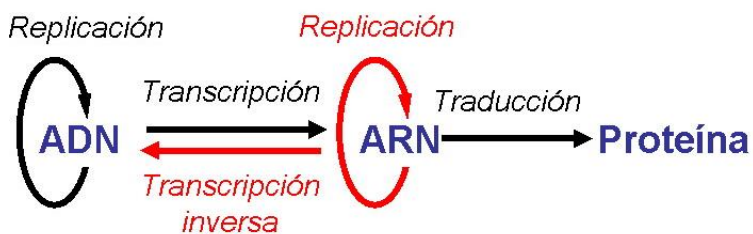


Figura I.1. Dogma central de la biología molecular propuesto por Crick.

I.2. El descubrimiento del ARN

Cuando Meischer descubrió la nucleína, no sólo había encontrado el ADN, sino también el ARN. La primera distinción entre estas dos moléculas surgió al analizar los ácidos nucleicos en diferentes tejidos, observándose que uno de ellos tenía preferencia por los medios alcalinos debido a un grupo hidroxilo presente en las ribosas. Inicialmente se creía que sólo uno de estos ácidos estaba presente, dependiendo del tipo de célula analizada. Investigaciones posteriores demostraron que ambos ácidos nucleicos estaban presentes en las células, distinguiéndose porque uno contenía D-ribosa y el otro D-desoxirribosa, adoptando desde ese momento los nombres de ARN y ADN respectivamente. Posteriormente se demostró que el ARN comparte 3 bases nitrogenadas con el ADN: Guanina, Citosina y Timina, mientras que poseía una propia (Uracilo) y se identificaron los tipos de ARN empleados en la síntesis de proteínas. Se catalogaron los ARN mensajero (ARNm) como portador de información genética, ARN de transferencia (ARNt), actuando como un vínculo físico entre ARNm y proteínas, y ARN

ribosómico (ARNr) presente en los ribosomas para la síntesis de proteínas. El mecanismo de síntesis del ARN fue descubierto por Severo Ochoa, lo que le valió el premio Nobel de medicina en 1959. En 1967, Carl Woese probó el poder catalítico del ADN y sugirió su hipótesis del mundo ARN en la que las primeras formas de vida podrían haber utilizado ARN como portador de la información genética.⁹ Desde esa fecha, hasta la actualidad, se ha conseguido determinar la primera secuencia de nucleótidos completa de un genoma de ARN (Walter Fries, 1976) así como la determinación por rayos X de la estructura del ARN.

I.3. Estructura primaria de los ácidos nucleicos

Denominados así tras el descubrimiento de Richard Altmann, en 1889, de su carácter ácido, los ácidos nucleicos son moléculas poliméricas, constituidas por monómeros denominados nucleótidos. Cada nucleótido se compone de 3 subunidades: una base nitrogenada, una pentosa (ribosa o desoxirribosa) y un grupo fosfato. Las bases nitrogenadas están formadas por derivados de pirimidina y purina y su unión a la pentosa da lugar a una subunidad denominada nucleósido. Las bases nitrogenadas, representadas en la Figura I.2, en el ADN son Adenina (A), Guanina (G), Citosina (C) y Timina (T), mientras que en el ARN se sustituye la presencia de Timina por Uracilo (U).

Las bases nitrogenadas tienen un carácter débilmente básico y los valores de la constante de disociación ácida, K_a , hacen que, bajo condiciones fisiológicas, los grupos básicos se encuentren desprotonados. La modificación química de estas bases mediante, entre otras reacciones, desaminación o alquilación, supone una modificación del material genético, que puede traducirse en mutaciones.

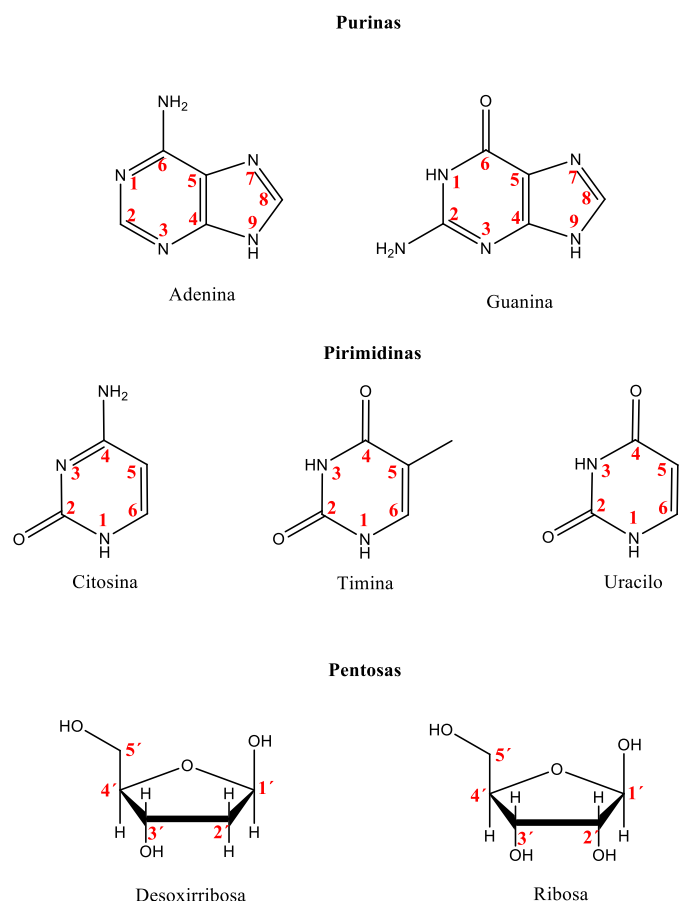


Figura I.2. Estructura y numeración de las bases nitrogenadas y las pentosas del ADN y ARN.

Las bases nitrogenadas presentan tautomería, en concreto presentan isomería entre formas cetoenólicas, donde los oxígenos pueden encontrarse bien como carbonilos (forma ceto, $R-C=O$) o como hidroxilo (forma enol, $R-C-OH$), y los nitrógenos están en equilibrio entre la forma aldimino ($R-NH_2$) o cetimino ($R=NH$) (Figura I.3).

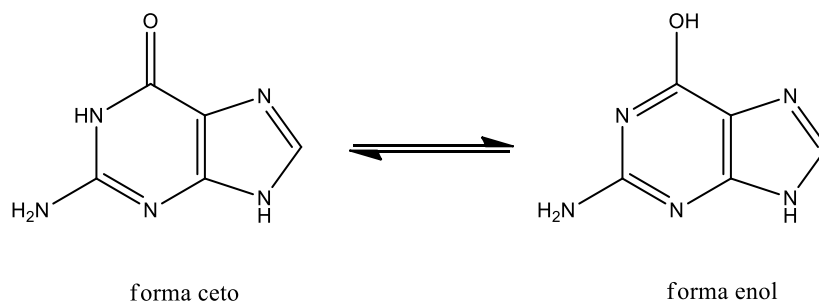


Figura I.3. Equilibrio de tautomería para la Guanina.

La unión de las bases nitrogenadas a las pentosas ocurre a través del carbono 1' de las pentosas por un enlace N- β -glucosídico, en el que se produce pérdida de

una molécula de agua (OH de la pentosa y un Hidrógeno de la base) para dar los correspondientes nucleósidos (en el caso de las purinas, el enlace es N9-C1' y en las pirimidinas es N1-C1'). En comparación con la base nitrogenada libre, los nucleósidos presentan un importante aumento de la solubilidad en agua y la pentosa permite la cuantificación de los ácidos nucleicos mediante deshidratación del anillo furanósico (reacción de orcinol y reacción de difenilamina). Los nucleótidos, se forman tras la esterificación de los grupos OH, con un ortofosfato, Figura I.4, de los carbonos C5' o C3' de los desoxiribonucleósidos o de los C5', C3' ó C2' de los ribonucleósidos.

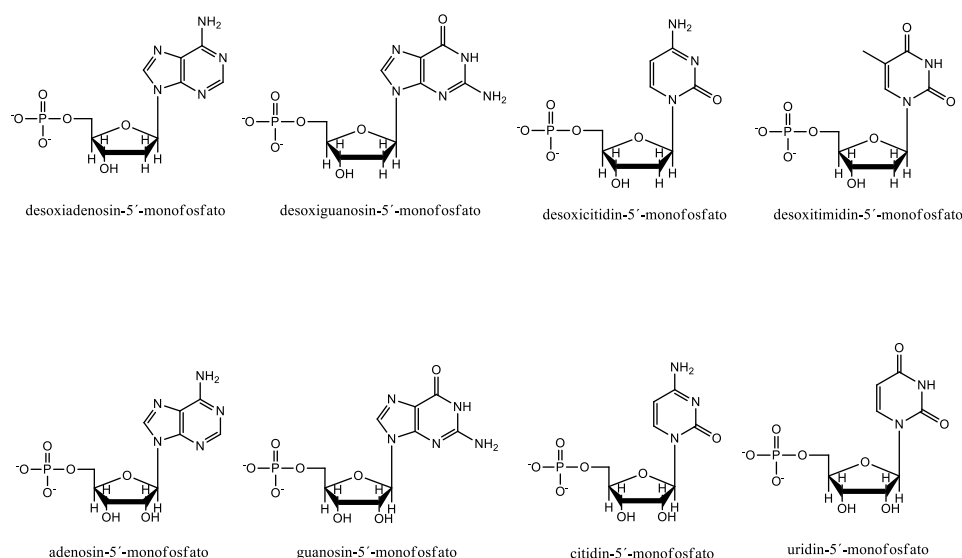


Figura I.4. Estructura de los desoxiribonucleótidos y ribonucleótidos.

La estructura primaria da cuenta de la secuencia en la que están unidos los nucleótidos. El ácido ortofosfórico de un nucleótido y el grupo hidroxilo del siguiente pueden reaccionar para dar un enlace tipo éster. Tanto en el caso de desoxiribonucleótidos como ribonucleótidos la esterificación se produce entre el carbono 5' de un nucleótido y el carbono 3' del siguiente, tal como se muestra en la Figura I.5.

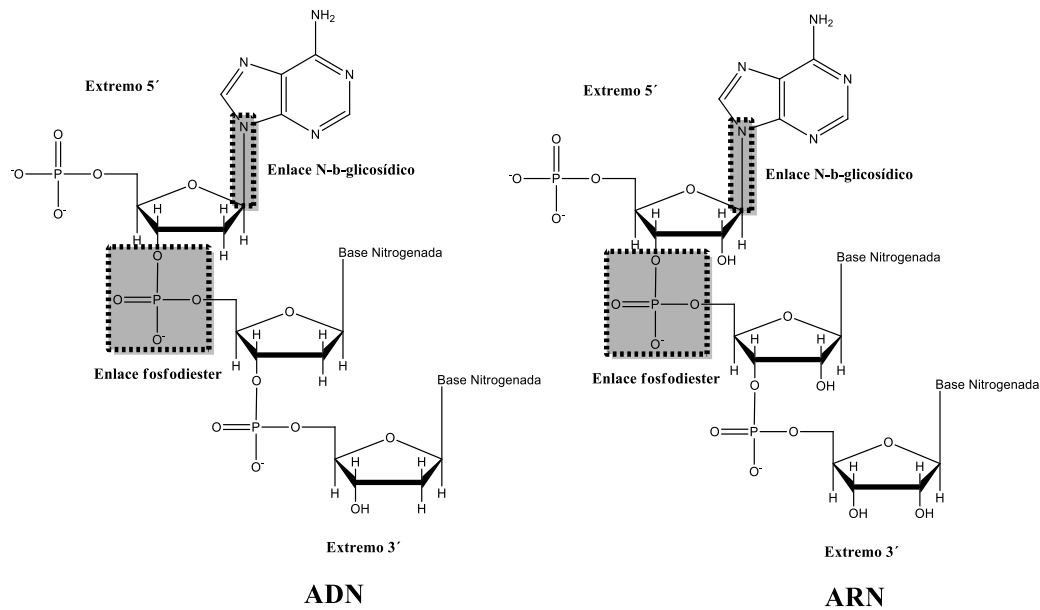


Figura I.5. Estructura general de la secuencia de nucleótidos del ADN y ARN.

La unión progresiva de nucleótidos da lugar a los polinucleótidos. En el caso del ADN y ARN, el enlace entre las subunidades es siempre C5'-C3'. Se establece así, tras la formación del polinucleótido, un extremo 5' y otro 3'; por convenio los polinucleótidos se leen en este sentido. El anillo de la pentosa no es completamente plano, por lo que pueden darse distintas conformaciones del azúcar. Existen 7 enlaces capaces de rotar dentro de un nucleótido; el enlace entre la base nitrogenada y el C1' de la pentosa determina dos tipos de configuraciones, mostradas en la Figura I.6, una en la que la base se encuentra del mismo lado que la pentosa (conformación *syn*) y otra si está en el lado contrario (conformación *anti*).

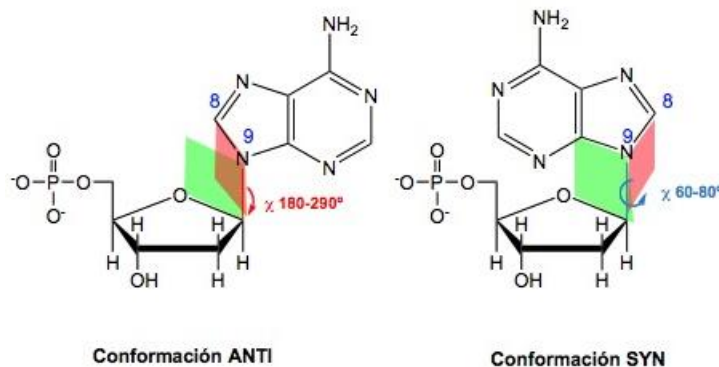


Figura I.6. Conformaciones *anti* y *syn* para el nucleótido de Adenina.

Además, tal como se muestra en la Figura I.7, los C2' o C3' pueden encontrarse en el mismo plano que el resto de los átomos de la pentosa

(conformación *exo*), o por encima de los mismos, del mismo lado que el C5' (conformación *endo*). Por último, los enlaces C5' - O - P de estos nucleótidos pueden rotar libremente, siendo esta flexibilidad la responsable de que el ADN pueda adoptar una conformación de doble hélice.

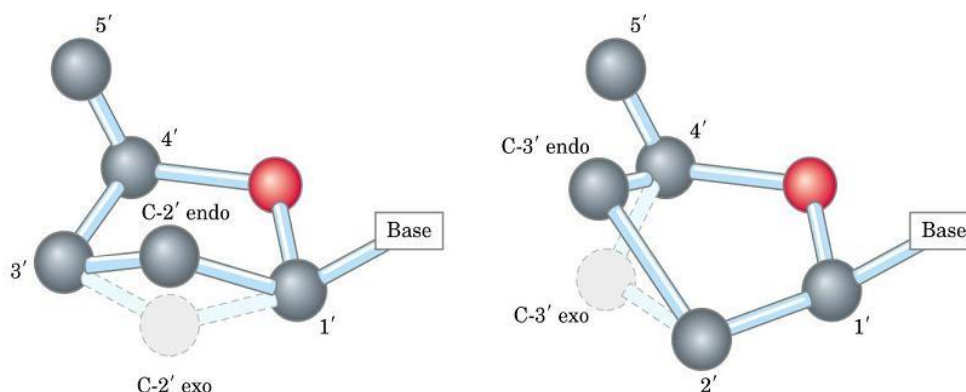


Figura I.7. Conformaciones *endo* y *exo* de las pentosas.

I.4. Propiedades químicas y biológicas de nucleótidos y polinucleótidos

I.4.1. Nucleótidos

Todos los nucleótidos presentan carácter ácido debido a las cargas negativas de los fosfatos. Tanto en medio intracelular como extracelular, el grupo fosfato aumenta la solubilidad en agua. El espectro de absorción UV-Vis de los nucleótidos es característico y puede observarse en la Figura I.8, no obstante, en el caso del ADN y ARN, al poseer una gran cantidad y variedad de nucleótidos, su espectro UV-Vis se caracteriza por tener una banda centrada en 260nm. Los nucleótidos pueden separarse fácilmente por cromatografía, especialmente HPLC.

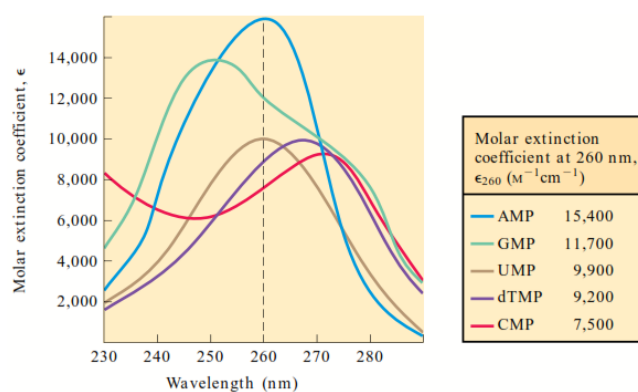


Figura I.8. Espectros de absorción de los nucleótidos.

La configuración de alta de energía de los nucleótidos provoca que su hidrólisis libere gran cantidad de energía. En este sentido el ATP (adenosin-5'-trifosfato) es la molécula encargada de almacenar energía por parte de las células.

Los nucleótidos actúan como coenzimas en procesos biológicos, y son los encargados del transporte electrónico cuando se encuentran como Nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+), Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP^+), Flavín mononucleótido (FMN) y Flavín adenina dinucleótido (FAD).

Los nucleótidos cíclicos actúan como mensajeros intracelulares en neuronas y neurotransmisores.

1.4.2. Polinucleótidos

Al igual que hacen sus monómeros, los polinucleótidos también absorben la luz ultravioleta; esto permite su cuantificación, así como la medida de su grado de pureza, entendida como ausencia de proteínas. Puesto que estas últimas absorben a 280nm, es la relación A_{260}/A_{280} la que da cuenta del grado de pureza.

La absorbancia de los polinucleótidos a 260 nm también se emplea en estudios de desnaturalización térmica. Al aumentar la temperatura los polinucleótidos se desnaturalizan y la absorbancia aumenta. Esto es debido a que, en su forma nativa, los nucleótidos constituyentes del polinucleótido presentan un efecto hipocrómico debido a las interacciones de apilamiento (stacking) entre pares de bases consecutivas.

Los ácidos fuertes son capaces de hidrolizar completamente al ADN y al ARN, sin embargo, en presencia de bases, únicamente el ARN es hidrolizado. Esto se traduce en una mayor estabilidad del ADN desde el punto de vista reactivo.

I.5. Estructura secundaria

La estructura secundaria de los polinucleótidos da cuenta de la distribución espacial de la secuencia de nucleótidos próximos entre sí.

1.5.1. Estructura secundaria del ADN (B-ADN)

La determinación de la estructura tridimensional del ADN fue posible gracias a los experimentos previos de difracción de rayos X realizados por Rosalind Franklin, así como los resultados de los experimentos de Erwin Chargaff acerca de la composición cuantitativa del ADN que establecen que:

1. La composición en bases nitrogenadas del ADN varía de unas especies a otras.
2. Dentro de una misma especie la composición en bases nitrogenadas se mantiene constante, independientemente del tejido analizado.
3. Para una misma especie la proporción molar de purinas y pirimidinas es la misma, esto es; $A + G = C + T$.
4. En el ADN la proporción molar de Adenina es igual a la de Timina ($A = T$), y la proporción molar de Guanina es igual a la de Citosina ($G = C$).

Las conclusiones 3 y 4 se conocen como reglas de Chargaff¹⁰ y a partir de estos datos, Watson y Crick postularon el modelo de doble hélice de ADN. En esta estructura, dos cadenas helicoidales de polinucleótidos se enrollan alrededor del mismo eje longitudinal, dando lugar a una doble hélice dextrógira y plectonémica (no pueden separarse las dos hebras sin ser desenrolladas primero). La disposición de las cadenas es antiparalela, de tal forma que los extremos 5'-3' de cada hebra están invertidos. El esqueleto está constituido por la ribosa y los grupos fosfatos, que quedan orientados hacia el exterior, de tal forma que las cargas de los fosfatos (dispuestos en conformación tetraédrica) se encuentran interaccionando con el agua circundante. El enlace β -glicosídico está en conformación anti y la desoxirribosa en su forma furanósica, con el C2' en conformación endo.

Dentro de la hélice las bases nitrogenadas son prácticamente planas, están apiladas (la distancia media entre los planos de una base nitrogenada y la consecutiva es de 3.4 Å) y el plano en el que están contenidas es perpendicular al eje longitudinal. Cada base nitrogenada de una de las hebras se encuentra casi coplanar a la base complementaria de la otra, produciéndose siempre una interacción entre una purina y una pirimidina (Adenina con Timina y Guanina con Citosina) de la otra cadena, interaccionando entre ellas mediante puentes de

hidrógeno (Figura I.9). Estos, junto con las interacciones de apilamiento o de stacking de las bases, son las interacciones responsables de la estabilidad de la doble hélice. La unión Guanina–Citosina es más fuerte que la Adenina–Timina debido a que presenta tres enlaces por puente de hidrógeno, por dos del último par de bases¹¹.

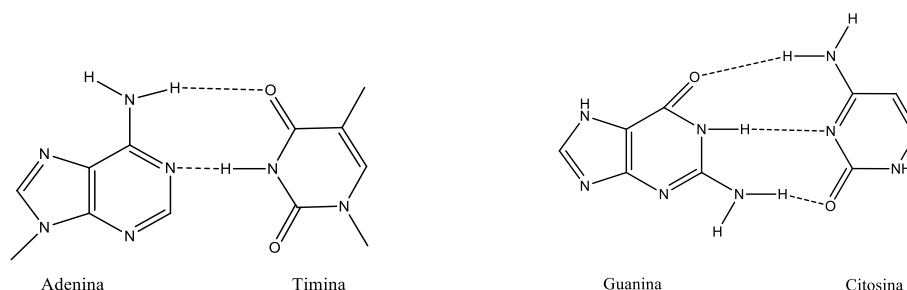


Figura I.9. Interacciones por puentes de Hidrógeno de Watson y Crick que se establecen entre los pares Adenina-Timina y Guanina-Citosina.

El hecho de que el enlace β -Glicosídico entre el azúcar y la base nitrogenada no se encuentre diametralmente opuesto al de la base complementaria de la otra cadena, provoca la aparición de surco mayor de más de 180° y un surco menor de menos de 180° como se muestra en la Figura I.10. Con todos estos elementos, la conformación final del ADN en esta forma (forma B-ADN) deja a los pares de bases con un giro de 36° respecto al anterior y con una anchura de los surcos de 22 \AA y 12 \AA para los surcos mayor y menor respectivamente. Entre ambos surcos se produce una vuelta completa de rosca cada 10 pares de bases y la anchura de la hélice es de 20 \AA .

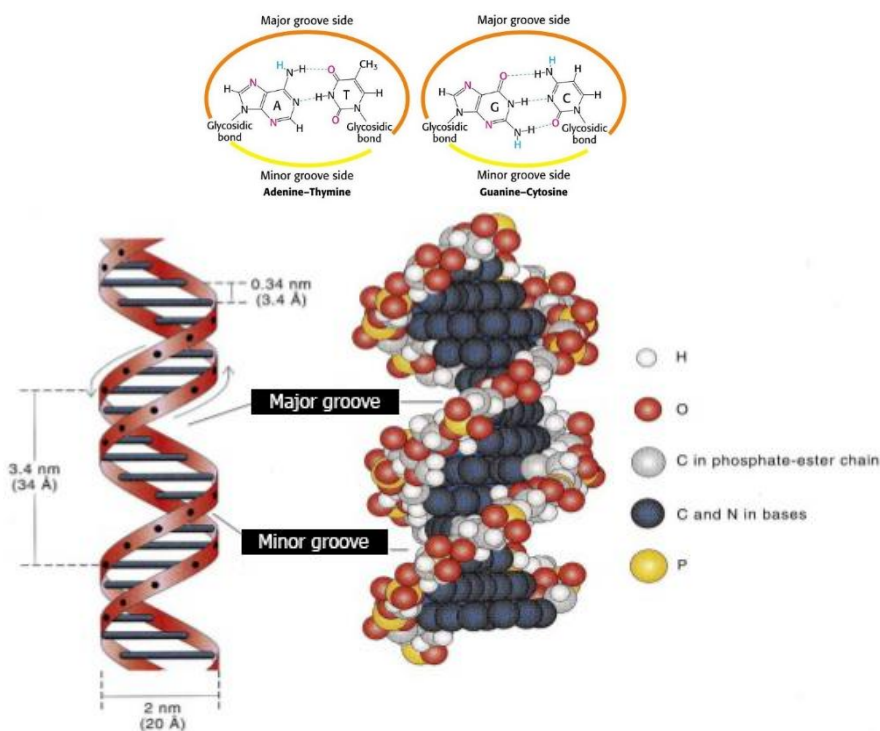


Figura I.10. Estructura en doble hélice del B-ADN y formación de los surcos mayor y menor como consecuencia del enlace β -Glicosídico.

1.5.2. Otras estructuras secundarias del ADN

La forma B del ADN es la estructura más habitual en la que se encuentra la doble hélice en condiciones fisiológicas. Sin embargo, existen otras formas no canónicas como la forma A, forma C y forma Z, así como organizaciones en estructuras de triples y cuádruplex hélices.

A-ADN

Esta forma aparece sobretodo en disoluciones con poco contenido acuoso o cuando se forman complejos del tipo ADN-proteína. Al igual que en la forma B, la hélice también es dextrógira y antiparalela, pero el anillo furanósico está en conformación 3'endo, lo que provoca que las bases se aparen hacia el exterior de la hélice. En comparación con la forma B, el surco mayor se vuelve más profundo en la forma A, mientras que el surco menor es más superficial, dando lugar a una estructura mucho más ancha que tiene 11 pares de bases por cada vuelta de rosca y es más rígida que la conformación B. Porschke y colaboradores¹² demostraron que se produce una transición de B-ADN a A-ADN cuando la humedad relativa desciende al 80%. La estructura tipo A es la presente en la triple hélice de ADN y

en los ARN de doble hélice debido a que el grupo hidroxilo extra de la pentosa dificulta que se forme otra conformación. Se necesitan al menos cuatro pares de bases para obtener una conformación A, aunque también es posible que dentro de una conformación B algunas regiones localizadas posean una conformación A.

Z-ADN

La forma Z del ADN supone un cambio estructural mucho más radical que la forma A. Ésta hélice invierte la orientación del enrollamiento y pasa a ser levógira, el apareamiento entre bases se produce de la misma forma que en el modelo de Watson y Crick para la forma B, pero los planos en los que estas se encuentran contenidos no son perpendiculares al eje longitudinal de la hélice, adquiriendo diferentes grados de inclinación. El enlace β -glicosídico entre las pentosas y las bases se alterna entre una conformación *syn* en purinas y una conformación *anti* en pirimidinas, lo cual confiere a este ADN una estructura en zigzag de la cual toma el nombre. El Z-ADN contiene 12 pares de bases por cada vuelta de rosca y es más estrecho y alargado que las dos formas descritas anteriormente. El surco mayor es completamente plano mientras que el menor es profundo y estrecho. Es posible obtener un transición de B-ADN a Z-ADN cuando se opera en presencia de etanol¹³ o a altas concentraciones salinas,¹⁴ debido a la neutralización de los grupos fosfato.¹⁵ En sistemas procariotas se ha demostrado la existencia de la forma Z en *E.Coli*¹⁶ y en sistemas eucariotas se forma como consecuencia de la ARN-polimerasa y posterior proceso de transcripción del ADN.¹⁷ La Figura I.11 muestra las conformaciones de los tipos de ADN descritos cuyos parámetros estructurales más importantes se encuentran recogidos en la Tabla I.1.

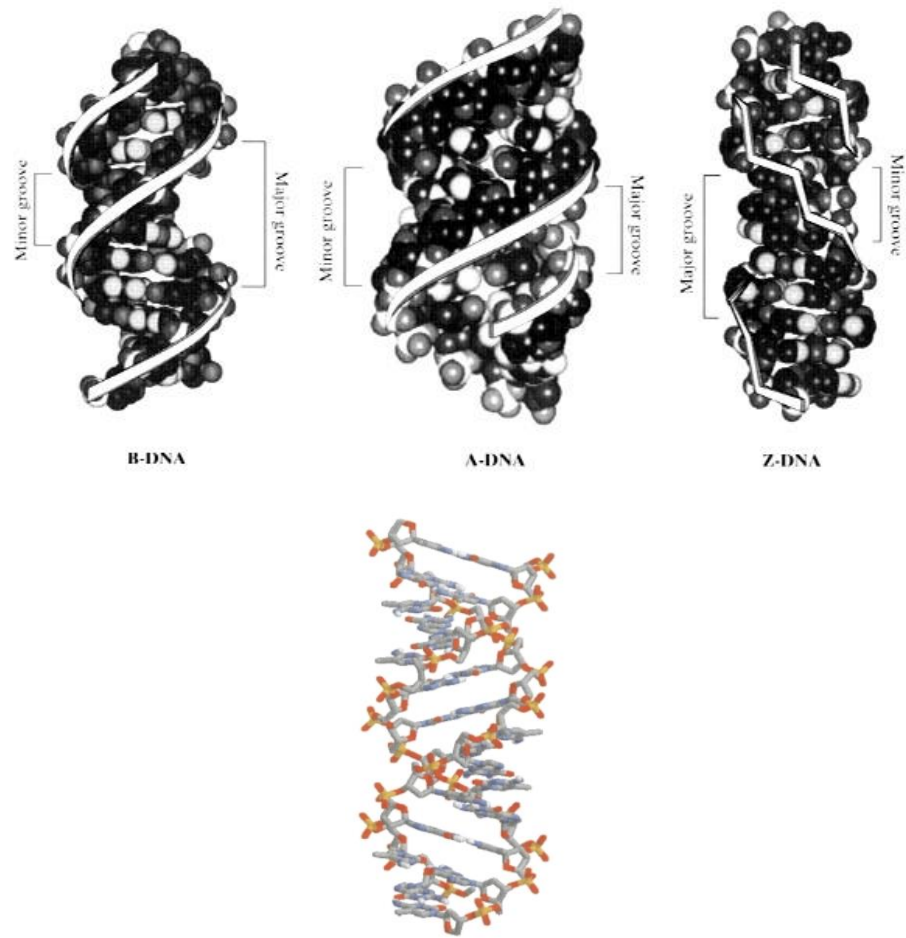


Figura I.11. Estructura del B-ADN, A-ADN y Z-ADN (arriba) y del C-ADN (debajo).

Tabla I.1. Parámetros más representativos de la doble hélice de ADN en sus formas A, B y Z.

Parámetro	A-ADN	B-ADN	Z-ADN
Sentido de la hélice	Dextrógira	Dextrógira	Levógira
Pares de base por vuelta de rosca	11	10	12
Unidad repetida	1	1	2
Distancia entre pares de bases*	2.6 Å	3.4 Å	3.7 Å
Inclinación**	20°	6°	7°
Paso de rosca de la hélice	28 Å	34 Å	45 Å
Rotación por par de base	33	36	60/dímero
Diámetro de hélice	11	10	12
Conformación de la pentosa	C3'-endo	C2'-endo	Purinas: C3'-endo Pirimidinas: C2'-endo
Conformación del enlace β-glicosídico	Anti	Anti	Purinas: syn Pirimidinas: anti
Surco mayor	Estrecho y profundo	Ancho y profundo	Plano
Surco menor	Ancho y superficial	Estrecho y profundo	Estrecho y profundo

*Consecutivas en la misma cadena.

**Respecto al eje longitudinal.

C-ADN

Esta conformación no ha sido encontrada como tal en sistemas biológicos, sin embargo, sí se ha obtenido en experimentos “in vitro” y ha sido caracterizada por resonancia magnética nuclear. En presencia de iones Magnesio o Litio, se inhibe la transición de la forma B → A, dando lugar una transición B → C o B → Z.¹⁴ La forma C del ADN consiste en una doble hélice en la que los nucleótidos de una

sección del mismo, en lugar de encontrarse en la forma canónica descrita en la forma B (nucleótidos tipo BI), en la que los grupos fosfatos se encuentran en una posición simétrica respecto a los dos surcos, pasan a una conformación BII en la que se orientan hacia el surco menor¹⁸ (Figura I.11). La estructura resultante es menos estable que la forma B pura.

Triples Hélices

Las primeras evidencias de una triple hélice surgieron cuatro años después de la resolución de la estructura de doble hélice, cuando Felsenfeld, Davies y Rich la sintetizaron al mezclar hebras simples de ácido poliuridílico y ácido poliadenílico en proporción 2:1.¹⁹ De los resultados obtenidos se dedujo que la hebra extra de ácido poliuridílico interaccionaban con los átomos N6 y N7 de la Adenina.²⁰

En la triple hélice, la tercera hebra, también conocida oligonucleótido formador de triplex o TFO, se sitúa en el surco mayor, las interacciones de hidrógeno del modelo de Watson y Crick se mantienen para la doble hélice inicial, mientras que la tercera hebra se une a través de nuevas interacciones de hidrógeno denominadas apareamientos de Hoogsteen, consistentes en puentes de hidrógeno en los que intervienen los átomos N7, N6 y O6 de las purinas (Figura I.12).

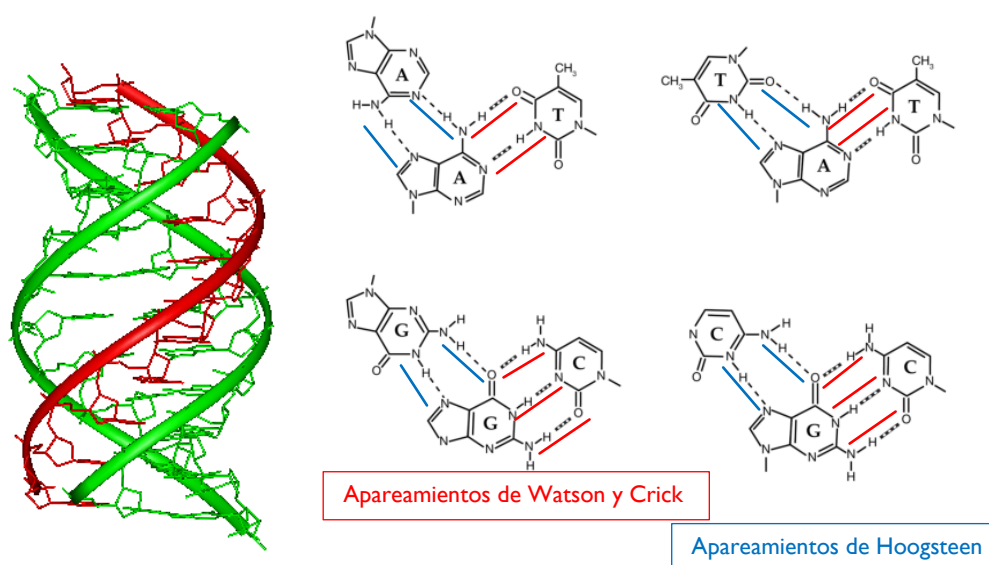


Figura I.12. Estructura de la triple hélice de ADN e interacciones entre las bases dentro de ella.

En función de donde provenga la tercera hebra, las triples hélices se clasifican en triples hélices intermoleculares o intramoleculares.²¹ Las primeras se

originan cuando la tercera hebra proviene de otra cadena de ADN, mediante la reacción representada en la Figura I.13. Esta unión puede darse en base a dos modelos distintos. En el modelo polipirimidina, esta cadena (Y) se une con la misma orientación de forma paralela a la cadena de purinas (R), los tripletes formados son del tipo Y:RY, y en concreto son C⁺:G-C y T:A-T. En el otro modelo, el polipuridínico, la unión de la tercera hebra, rica en purinas, se hace de forma antiparalela, los tripletes formados son del tipo R:YR (G:G-C, A:A-T y T:A-T) interaccionando mediante apareamientos de Hoogsteen inversos²² en secuencias de homopurinas y homopiridinas.^{23,24} Es necesario una distribución de purinas o pirimidinas consecutivas ya que de lo contrario se produce un intercambio de cadenas entre dos dobles hélices, con pérdida de las interacciones por apilamiento, con la consecuente pérdida de estabilidad energética. Aunque la cinética de formación de una triple hélice es más lenta que la de formación de la doble hélice, la triple hebra es más estable. Se necesitan como mínimo 10 pares de bases para obtener una hélice consistente en condiciones fisiológicas.

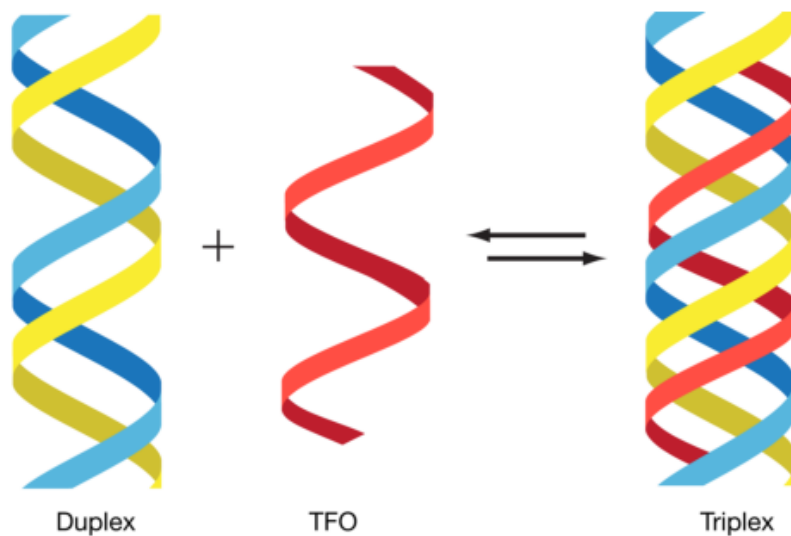


Figura I.13. Reacción de formación de una triple hélice intermolecular.

En las triples hélices intramoleculares, la tercera hebra está proporcionada por una de las hebras de la misma doble hélice, que se repliega, dejando una hebra en el surco mayor y la otra libre, tal como se esquematiza en la Figura I.14. La Tabla I.2²⁵ muestra una comparativa de diversos parámetros estructurales.

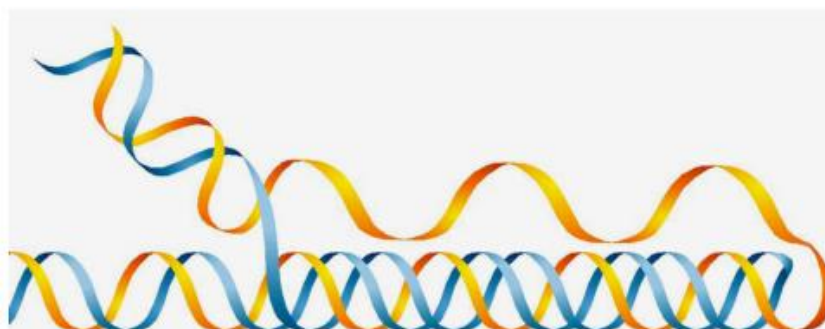


Figura I.14. Formación de una triple hélice intramolecular.

Tabla I.2. Selección de parámetros obtenidos por difracción de rayos X y RMN para triples hélices (Y:RY y R:YR) y para ADN (A-ADN y B-ADN).

Parámetro	Triple Hélice				A-ADN	B-ADN
	Y:RY		R:YR			
	Rayos X	RMN	Rayos X	RMN		
Separación bases	3.3 Å	3.4 Å	-	3.6 Å	2.6 Å	3.4 Å
Rotación de la Hélice	31°	31°	-	30°	33°	36°
Desplazamiento axial	-2.5 Å	-1.9 Å	-	-1.9 Å	-5.3 Å	-0.7 Å
Enlace β-glicosídico	Anti	Anti	-	Anti	Anti	Anti
Conformación de la pentosa	C2'endo	C2'endo	-	C2'endo	C3'endo	C2'endo

Cuádruplex hélices

En 1910, Bang, descubrió que también son posibles las agrupaciones de cuatro hebras de ADN para una cuádruple hélice o G-quadruplex.²⁶ Estas estructuras se forman en segmentos ricos en Guanina, en las que cuatro moléculas interaccionan mediante apareamientos de Hoogsteen para dar un cuarteto o tetrada,²⁷ como se muestra en la Figura I.15. En el interior del mismo se sitúa un centro metálico monocatiónico que estabiliza la cadena al disminuir la repulsión entre los oxígenos de las Guaninas siendo dicha estabilidad fuertemente

dependiente de la estequiometría y empaquetamiento,²⁸ así como del tipo de catión²⁹. Dentro de los sistemas biológicos, estas estructuras cobran especial importancia en el mantenimiento de los telómeros (segmentos terminales de los cromosomas ricos en Guanina y relacionados con el cáncer), así como en procesos de regulación genética,³⁰ transcripción,³¹ replicación,³² meiosis³³ y recombinación.³⁴

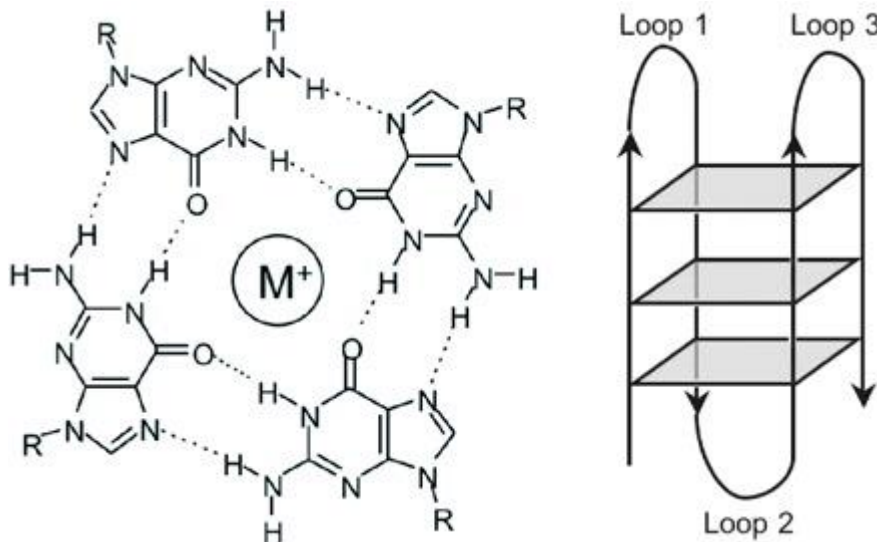


Figura I.15. Cuádruplex hélice.

1.5.3. Estructura secundaria del ARN

La estructura secundaria del ARN se suele corresponder con una hebra sencilla helicoidal dextrógira dentro de la cual se forman interacciones entre pares de bases. Al contrario que en el ADN, la hélice sencilla permite que las interacciones que se dan sean más complejas y variadas. De hecho, el grupo hidroxilo extra de la pentosa contribuye a ello, y como se ha citado anteriormente, impide que el ARN pueda adquirir la conformación B.

Dentro del ARN pueden formarse apareamientos entre bases nitrogenadas complementarias (Adenia–Uracilo y Guanina–Citosina) por plegamiento de la hebra, de la misma forma que ocurre en el ADN. En determinadas ocasiones estos apareamientos dan lugar a estructuras locales especiales. Una de ellas son los hairpins, que se producen cuando en una zona en la que se encuentran pares de bases acopladas aparece una zona en la que se encuentran libres, dando lugar a bucles dentro de la cadena como muestra la Figura I.16. Los hairpins se generan

por acción de las ARN polimerasas y en ellos se da lugar la regulación de genes.³⁵ También pueden originarse pseudonudos, que son estructuras en las que solo una parte del hairpin está apareado. Los pseudonudos más característicos son los del tipo H, que se producen cuando las bases de un hairpin interactúan con otras situadas por fuera de este. Estos pseudonudos intervienen en procesos catalíticos³⁶⁻³⁹, así como en la expresión génica en virus.⁴⁰⁻⁴³

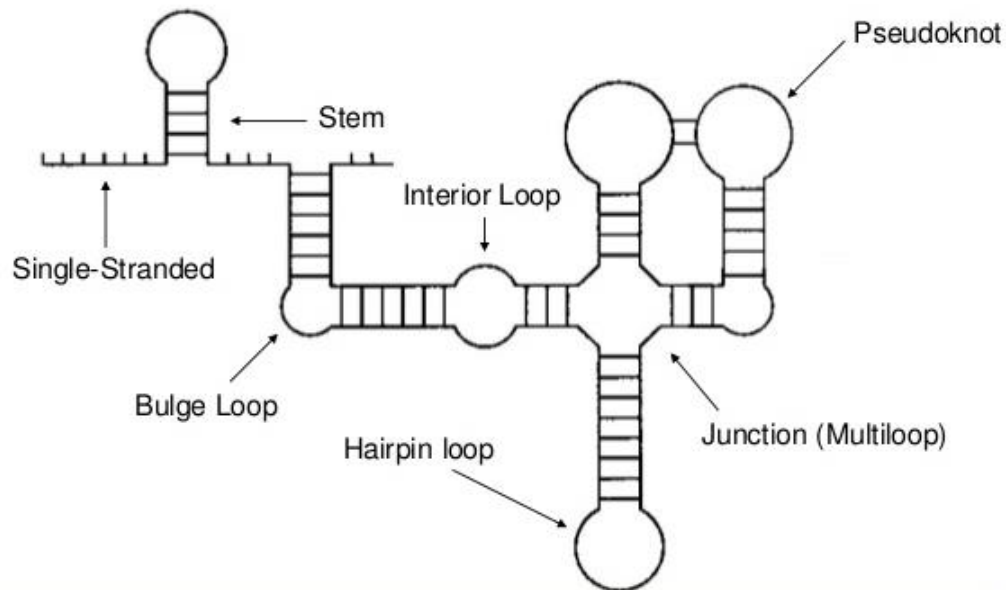


Figura I.16. Estructura secundaria del ARN y posibles estructuras dentro de ella.

Al igual que ocurría en ADN, es posible obtener una triple hélice de ARN cuando una hebra sencilla se entrelaza con una doble hélice de ARN. La inserción de la cadena puede darse a través del surco mayor o el surco menor⁴⁴ y su estabilización también se produce por medio de los apareamientos de Hoogsteen, ayudando a estabilizar la estructura terciaria.⁴⁵ La formación de estas estructuras tiene gran influencia en la acción de la ARN-transferasa⁴⁶ así como en el virus de inmunodeficiencia humana.⁴⁷

I.6. Estructura terciaria de ADN y ARN

Tanto ADN como ARN son capaces de adoptar estructuras superiores, relacionadas con su almacenamiento, disponibilidad y función en el medio celular. El ADN de células procariotas y algunos virus suelen adquirir una estructura superior en la que doble hélice se encuentra enrollada sobre si misma dando lugar a los cromosomas. Para células eucariotas la compactación tiene lugar por

empaquetamiento del ADN al unirse a proteínas. Según su función, en células procariotas y eucariotas existen varias formas de ARN.

I.7. Interacciones Ligando-polinucleótido

Debido a la importancia tanto del ADN como del ARN, el estudio de la interacción con ligandos que puedan modificar su estructura es una de las estrategias más usadas en la investigación anticáncer.⁴⁸ Estos ligandos pueden modificar los procesos de replicación, transcripción o traducción, que puedan afectar al crecimiento celular. En esta tesis doctoral se ha estudiado la interacción directa con ácidos nucleicos, la cual puede darse mediante uniones covalentes y no covalentes. En general, se requiere que una molécula que vaya a interactuar con ARN tenga poca afinidad por ADN.⁴⁹

I.7.1. Unión covalente

Los compuestos tanto con grupos funcionales electrofílicos, como nucleofílicos, son capaces de unirse covalentemente a los nucleótidos del ADN. Este modo de enlace es irreversible e inhibe los procesos de replicación del ADN por lo que está relacionado con la muerte celular.⁵⁰ Existe también la posibilidad de que el ligando se una al ADN por dos o más puntos en un enlace de tipo “cross-linking” (entrecruzamiento de hebra), que puede darse dentro de la misma hebra (intracatenario) o entre dos hebras distintas (intercadenario), impidiendo la replicación del ADN al no poderse separar las cadenas. Un ejemplo de cross-linker es la mitomicina y el cisplatino. Por último, este modo de enlace en el ADN se da en las reacciones de alquilación de las bases nitrogenadas, siendo esta una técnica empleada en la terapia anticáncer.

Algunos ejemplos de compuestos que se unen covalentemente al ADN son el busulfan⁵¹, las mostazas de Nitrógeno (Melfalan,⁵² Ifosfamida,⁵³ Clorambucil,⁵⁴ etc) empleadas en el tratamiento de la enfermedad de Hodgkins,⁵⁵ leucemia y diversos tipos de cáncer. Uno de los más famosos, es el cisplatino,⁵⁶ que ha sido ampliamente utilizado en quimioterapia, capaz de unirse a dos N7 de dos Guaninas consecutivas de la misma cadena, aunque debido a su toxicidad durante los últimos años está siendo sustituido por Oxaliplatino,⁵⁷ así como por derivados de Rutenio, Oro⁵⁸ e Iridio.⁵⁹

1.7.2. Interacciones no covalentes

Estas interacciones inducen cambios conformacionales en el ADN de tal forma que se inhiben los procesos en los que el ADN forma parte en el medio celular, y pueden llegar incluso a romperlo. La interacción no covalente es un proceso reversible y se considera menos citotóxica que la covalente. Dentro de esta clasificación, las interacciones no covalentes se dividen en: unión externa, unión al surco e intercalación.

Unión externa

Es una interacción de tipo electrostática entre el esqueleto del ADN, cargado negativamente y un ligando generalmente catiónico. Esta interacción es poco específica y supone el primer tipo de interacción que una molécula tiene con el ADN antes de evolucionar hacia otro tipo de enlace; el resto de interacciones no covalentes también pueden coexistir con esta.

Esta interacción electrostática suele darse cuando los ligandos forman agregados de orden superior, al acercarse al esqueleto del ADN o ARN para reducir la repulsión de cargas ligando-ligando. La magnitud de la interacción decrece fuertemente al aumentar la fuerza iónica del medio debido a la saturación de los grupos fosfato.

Se ha comprobado que la mayoría de cationes, como Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , son capaces de producir interacción electrostática con el ADN.^{60,61}

Unión al surco

En este enlace el ligando interacciona con el ADN colocándose en uno de los surcos y quedando unido a él mediante interacciones electrostáticas con los grupos fosfato, interacciones de Van der Waals y puentes de Hidrógeno con las bases nitrogenadas. Las moléculas que dan este tipo de enlace suelen tener anillos aromáticos junto con átomos con facilidad de torsión,⁶² de tal forma que pueden curvarse para acomodarse dentro de los surcos, además, poseen grupos polares que les permiten formar puentes de Hidrógeno. Dado que la secuencia de bases en el surco mayor y menor es diferente, los ligandos que se unen al surco ofrecen una interacción selectiva característica y de gran interés en la terapia anticancerígena.⁶³

Las moléculas grandes, como las proteínas, tienden a interactuar a través del surco mayor, pudiendo incluso generar triples hélices mientras que las más pequeñas se unen al surco menor,^{64,65} teniendo afinidad por las secuencias ricas en Adenina-Timina.^{66,67} El surco menor es más estrecho y plano, lo cual favorece las interacciones de Van de Waals y evitan impedimentos estéricos.

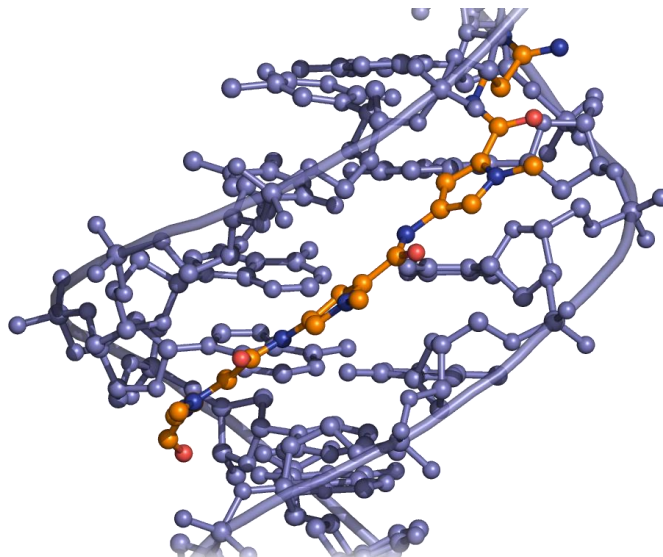


Figura I.17. Unión ADN-Ligando a través del surco.

Debido a la gran superficie de contacto entre el ligando y el polinucleótido en este tipo de interacción se favorece un gran número de interacciones, lo que se traduce en una mayor afinidad y por tanto en mayores constantes de enlace que para el resto de uniones. Así, las constantes de equilibrio de ligandos que interactúan por unión al surco tanto de productos naturales (como Netropsina y Distamicina) como productos sintéticos tales como Pentamidina, Hoechst 33528 y DAPI se encuentran dentro en un amplio rango entre 10^6 M^{-1} y 10^9 M^{-1} .⁶⁸⁻⁷³ Las cinéticas de asociación de estos complejos suelen estar determinadas por dos procesos, en el primero se produce una aproximación y un primer enlace del compuesto a la molécula de ADN o ARN en un proceso controlado por difusión.⁷⁴ En el segundo, se producen cambios conformacionales en el ADN⁷⁵ que permiten la formación de enlaces con la molécula de interés. Por el contrario, el proceso de disociación, suele seguir una cinética de primer orden, y es un proceso más lento que el de asociación.⁷⁶ La Figura I.18 muestra un ejemplo del equilibrio de asociación/disociación.

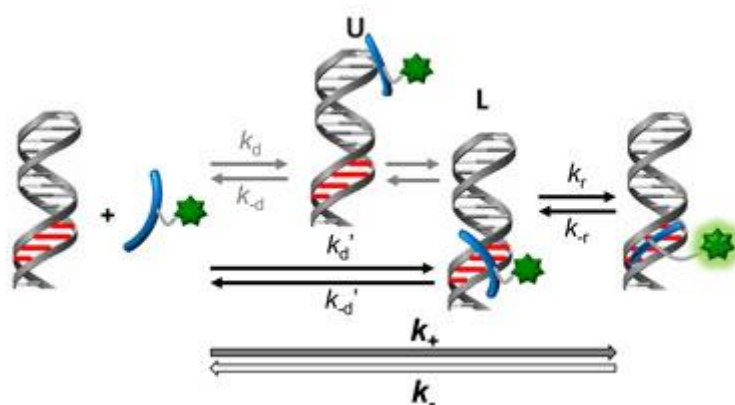


Figura I.18. Esquema de reacción para los procesos de asociación y disociación en una unión al surco en el que en una etapa intermedia se produce la aproximación del ligando a la hélice (U), posteriormente el ligando reconoce la zona del polinucleótido a la que puede unirse (L) y acaba insertándose en el surco.

Intercalación

La intercalación supone la inserción total o parcial de un compuesto entre dos pares de bases consecutivos de la doble hélice de ADN o ARN. Los ligandos que dan este tipo de interacción suelen ser compuestos aromáticos planos y multicíclicos en los que tienen cabida grupos funcionales laterales. Su tamaño es, en general, menor que el de los compuestos que interaccionan por unión al surco. Como se ha descrito anteriormente, los ligandos catiónicos tienen preferencia para interaccionar con los polinucleótidos, además la unión está favorecida si el intercalador contiene heteroátomos debido a la inducción de carácter polar ligando, que facilita la entrada en la doble hélice. Las interacciones π - π entre los anillos del cromóforo y los de las bases nitrogenadas gobiernan este tipo de enlace.

Este tipo de interacción es la que más modifica la estructura del polinucleótido, puesto que la intercalación de la molécula supone separación de los pares de bases contiguos, lo que produce un alargamiento de la hélice en su eje longitudinal (Figura I.19) así como una disminución del ángulo de rotación de la hélice que se traduce en un desenrollamiento o proceso de unwinding.⁷⁷ Así, se produce una modificación del entorno cercano al par de bases donde se produce la intercalación que impide una posterior intercalación de otra molécula de ligando cerca de esa zona (principio de exclusión de vecinos).⁷⁸ Las constantes de enlace para este modo de interacción son, generalmente, más pequeñas que para la unión

al surco (10^4 - 10^6 M⁻¹) teniendo preferencia por los pares de bases Guanina-Citosina⁷⁹ aunque puede darse en secuencias Adenina-Timina,⁸⁰ esto implica que su especificidad es menor que la de la unión al surco. A menudo, los agentes intercalantes son capaces de inhibir enzimas relacionadas con el mantenimiento y función de los ácidos nucleicos, como las Topoisomerasas I y II.⁸¹

Las primeras evidencias de este modo de enlace surgieron en el año 1961 cuando Lerman⁸² propuso la intercalación como mecanismo de interacción entre ADN y acridinas. Desde entonces, numerosos estudios reportan la intercalación como modo de interacción con ADN. Dentro de ellos, los agentes intercalantes típicos son las acridinas,⁸³ el bromuro de etidio,⁸⁴ cianinas⁸⁵ y las antraciclinas,⁸⁶ representadas en la Figura I.20. Al igual que para la unión al surco, la intercalación también puede darse en dos etapas. Las constantes de velocidad de estos procesos pueden llegar a ser del orden de 10^7 s⁻¹ como en el caso de la interacción de ACMA con ADN.⁸⁷ Actualmente, también se conocen los bisintercaladores (Figura I.21), como el TOTO⁸⁸ o la Tiocoralina,⁸⁹ moléculas que constan de dos grupos cromóforos capaces de intercalarse en distintas regiones del polinucleótido y que están unidos entre sí por una cadena que tras la interacción queda en el exterior de la molécula diana.

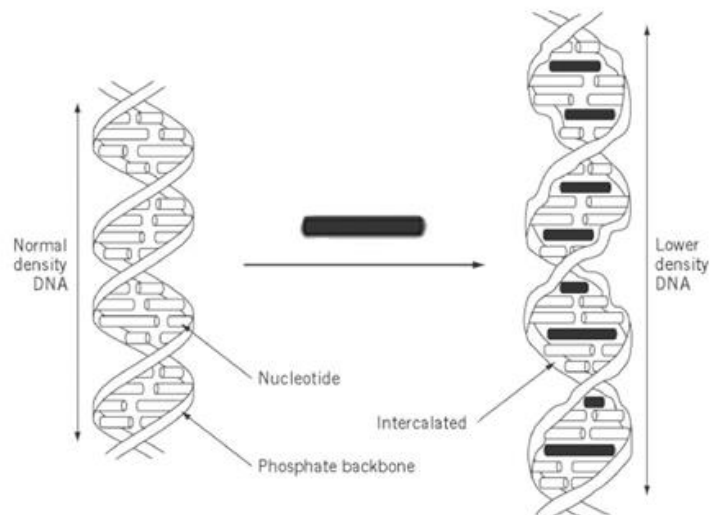


Figura I.19. Alargamiento de la doble hélice de ADN por intercalación.

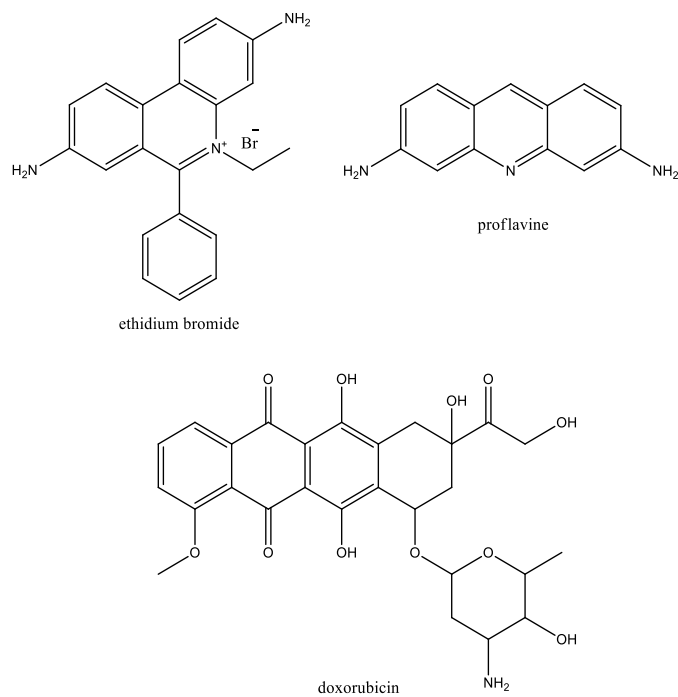


Figura I.20. Ejemplos de intercaladores clásicos: Bromuro de etidio, Proflavina (acridina) y Doxorubicina (antraciclina).

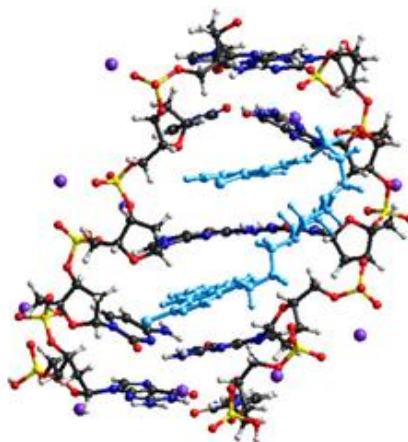


Figura I.21. Complejo derivado de Piperazina bisintercalado.

Capítulo II

Instrumentación y métodos experimentales

II. Instrumentación y métodos experimentales

En este capítulo se describen las técnicas de síntesis, procedimientos experimentales, modelos de análisis e instrumentación empleados para la determinación de las propiedades químico-físicas y biológicas de los sistemas estudiados en esta tesis. El procedimiento experimental seguido en cada técnica será descrito de forma general. Las condiciones y metodología específicas serán descritas individualmente en los capítulos correspondientes.

II.1. Síntesis de los complejos inorgánicos

Los procedimientos de síntesis han sido llevados a cabo íntegramente en el área de Química Inorgánica de la Universidad de Burgos y han sido aplicados a la síntesis de complejos de Ru(II). Todas las operaciones han sido llevadas a cabo bajo atmósfera inerte de Nitrógeno para evitar procesos oxidativos durante la síntesis.

Se han sintetizado dos compuestos dinucleares de Rutenio, mediante una adaptación de la síntesis original,^{90,91} con fórmula general $[(p\text{-cimeno})_2\text{Ru}_2(\text{OO}\cap\text{OO})(\text{Cl})_2]$, donde $\text{OO}\cap\text{OO}$ hace referencia al ligando puente entre los dos centros metálicos. El esquema de trabajo seguido consiste en introducir el precursor $[\text{Ru}(p\text{-cimeno})\text{Cl}_2]_2$ y el ligando puente, con el disolvente correspondiente, en un matraz Schlenk. A continuación, se añade base para provocar la desprotonación de los ligandos puente. La mezcla resultante se deja reaccionando durante 16 horas a reflujo, tras lo cual se obtiene un precipitado que es lavado y secado, obteniéndose el producto final.

II.2. Resonancia Magnética Nuclear

II.2.1. Instrumentación

Las medidas de RMN han sido realizados con un espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear Varian Unity Inova 400 MHz capaz de trabajar a una frecuencia nominal para el núcleo de protón de 400 MHz y que corresponde a un campo magnético de 9.4 Teslas. Este equipo permite obtener el espectro de RMN de todos aquellos núcleos comprendidos en el intervalo $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ - ^{31}P , dentro del rango de temperaturas $-80\text{ }^\circ\text{C}$ hasta $+120\text{ }^\circ\text{C}$, con una resolución de $0.1\text{ }^\circ\text{C}$. También cuenta con una sonda para el estudio de núcleos de ^{27}Al . Posee una unidad de

gradientes PERFORMA II, además del software necesario para la adquisición y procesamiento de datos.

II.3. Microanálisis elemental (CHNS)

II.3.1. Instrumentación

El equipo de análisis elemental se compone de un analizador LECO CHNS-932 y VTF-900 dotado de un inductor de muestras automático con capacidad para 50 muestras. Además, una ultramicrobalanza SARTORIUS M2P (precisión ± 0.001 mg) conectada en línea con el equipo que se encarga del procesado de los datos del analizador. Para el análisis del contenido en Oxígeno se ha utilizado un horno Leco VTF-900.

II.3.2. Procedimiento experimental

Los ensayos se realizaron en el Parque Científico Tecnológico de la Universidad de Burgos. La preparación de la muestra sólo requiere 5mg de muestra seca. Se realizó la determinación cuantitativa (porcentaje en peso) de Carbono, Hidrógeno, Nitrógeno, Azufre, y Oxígeno.

II.4. Espectrometría de masas

II.4.1. Instrumentación y procedimiento experimental

Se ha utilizado un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (MS-TOF) Bruker Maxis Impact con acoplamiento con cromatógrafo de líquidos Waters Acquity (UPLC-MS-TOF) utilizando electrospray (ESI) como fuente de ionización. Este equipo ha sido utilizado en el estudio de la complejación de Aluminio con Cacodilato Sódico, para ello se han preparado muestras 0.2mM de complejos a distintos pHs.

II.5. Medidas de pH

Las medidas de pH se han llevado a cabo con un pH-metro Metrohm (Herisau, Suiza) equipado con un microelectrodo de vidrio, un electrodo de referencia y un puente salino de KCl (3M). Los ajustes de pH han sido realizados añadiendo NaOH y HCl en los sistemas sin Cloro y con HClO₄ en los sistemas que contienen Cloro.

II.6. Espectroscopía de absorción UV-Vis y fluorescencia

II.6.1. Instrumentación

Las medidas de absorbancia se han realizado con un espectrofotómetro UV-Vis de haz simple, modelo Hewlett-Packard 8453A (Agilent Technologies, Palo Alto, California), equipado con un detector fotodiodo-array y un sistema Peltier termostatazador, modelo HP-89090A con precisión de $\pm 0.1^\circ\text{C}$. El equipo cuenta con una lámpara de Tungsteno para las mediciones en la región del Visible y una lámpara de Xenon para la región Ultravioleta. El equipo puede registrar la absorbancia en un rango de longitudes de onda desde 190 a 1100 nm, con una exactitud de $\pm 2\text{nm}$ y una reproducibilidad de 0.05 nm. Las muestras han sido medidas en cubetas de cuarzo suprasil de alta precisión (Hellma, Mülheim, Alemania) con 1 cm de camino óptico.

Las medidas de fluorescencia han sido realizadas en un espectrofluorímetro Shimadzu Corporation RF-5301PC, con lámpara de Xenon de 150W para el rango UV-Vis. El equipo puede registrar tanto espectros de emisión como de excitación. El control de temperatura se realiza mediante un baño termostatazado externo Julabo, con precisión de $\pm 0.1^\circ\text{C}$. Las medidas han sido realizadas introduciendo las muestras en cubetas de fluorescencia de alta precisión (Hellma, Mülheim, Alemania) con un camino óptico de 1 cm.

II.6.2. Procedimiento experimental

El seguimiento de una reacción por absorbancia o fluorescencia, se realiza añadiendo distinta cantidad de polinucleótido sobre el ligando contenido en una cubeta y registrando los espectros a cada relación ligando/polinucleótido. Los datos son analizados de acuerdo a los modelos que se describirán en el apartado II.12. En el estudio cinético se registra la absorbancia frente al tiempo a diferentes relaciones ligando/polinucleótido. Por último, en el estudio de desnaturalizaciones de ADN y ARN, se registra la absorbancia a una longitud de onda determinada, en un rango de temperaturas determinado y a diferentes relaciones ligando/polinucleótido. Para los experimentos de desactivación de la fluorescencia (Quenching), una vez elegida la longitud de onda de excitación, se añaden cantidades crecientes de desactivador sobre la disolución conteniendo ligando/polinucleótido a una relación dada.

II.7. Dicroísmo circular

II.7.1. Instrumentación

Las medidas de dicroísmo circular se han llevado a cabo en un equipo modular MOS-450 BioLogic (Claix, Francia) equipado con lámpara de arco de Xenon que emite luz linealmente polarizada. El instrumento cuenta con un modulador electroóptico, consistente en un cristal sometido a un campo eléctrico alterno, que determina la componente que se transmite, L (izquierda) o R (derecha), dando lugar a luz polarizada levógira o dextrógira respectivamente, que se alterna con una frecuencia de 50kHz. Esta luz atraviesa la muestra y un fotomultiplicador recoge la señal que es transmitida a un ordenador, donde es transformada en señal de dicroísmo circular. La temperatura de trabajo se controla mediante un baño termostatzado externo Julabo con precisión de $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$. La velocidad de barrido elegida en todos los experimentos ha sido de 2 nm/s. Las muestras se colocan en celdas de cuarzo Suprasil de alta precisión (Hellma, Mülheim, Alemania) con 1cm de camino óptico.

II.7.2. Procedimiento experimental

En primer lugar, se registran los espectros del disolvente, que se utiliza como blanco, y del ligando, para comprobar si es ópticamente activo. A continuación, sobre una disolución de volumen y concentración conocidos de polinucleótido se añaden cantidades crecientes de ligando, registrando el espectrograma para cada adición. La elipticidad a cada longitud de onda se transforma en elipticidad molar. El proceso se repite a cada C_D/C_P .

II.8. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

II.8.1. Instrumentación

Se ha empleado un calorímetro nano DSC (TA Instruments, New Castle, USA) que permite trabajar en un rango de temperaturas entre -10 y 130°C , con velocidades de barrido comprendidas entre 0 y $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y presiones entre 1 y 6 atmósferas. Las celdas del calorímetro son capilares continuos de platino de $300\ \mu\text{L}$ de volumen. Todas las muestras son desgasificadas en una unidad de desgasificación previamente a su utilización.

II.8.2. Procedimiento experimental

Se desgasifica una disolución de ligando libre, polinucleótido libre o sistema ligando/polinucleótido de volumen y concentración conocidas, durante 30 minutos (en dos tandas de 15 minutos entre las cuales se eliminan las burbujas de la disolución). A continuación, se inyecta la disolución en la celda de la muestra, mientras que la celda de referencia se llena con disolvente. Se registra el flujo de calor en función de la temperatura, una vez fijada la presión y la velocidad de barrido. Cada termograma se corrige con la línea base constituida por el disolvente.

II.9. Viscosidad

II.9.1. Instrumentación y procedimiento experimental

Las medidas de viscosidad relativa se han realizado con un viscosímetro capilar Ubbelohde (Schott-Instruments, Mainz, Alemania) en el cual se mide el tiempo que la disolución o el disolvente tarda en atravesar la esfera de medida. Todas las medidas de viscosidad han sido realizadas en un baño termostatzado Julabo con una precisión de $\pm 0.1^\circ\text{C}$.

La viscosidad relativa (η/η_0), está relacionada con el tiempo de caída por la, ecuación [2.1] donde η es la viscosidad del polinucleótido en presencia de ligando y η_0 es la viscosidad del polinucleótido libre:

$$\frac{\eta}{\eta_0} = \frac{t - t_0}{t_p - t} \quad [2.1]$$

t , t_p y t_0 son los tiempos de caída del disolvente, la disolución de polinucleótido libre y la disolución del polinucleótido con el ligando, respectivamente.

La viscosidad depende del tamaño y forma de la macromolécula en disolución. Cuando se trabaja con macromoléculas con una relación axial elevada como el ADN, ARN y sus derivados sintéticos, estas tienden a orientar su eje axial paralelo a la dirección del flujo de corriente. Así, con esta técnica se puede estudiar la intercalación de un ligando en un polinucleótido que se traduce en un aumento de la relación η/η_0 y de la longitud de contorno relativa (L/L_0) dependiente de la

relación de concentraciones entre el ligando y el polinucleótido, C_D/C_P mediante la ecuación [2.2],⁹² siendo β la pendiente de la recta que da una idea de la magnitud de la intercalación.

$$\frac{L}{L_0} = \sqrt[3]{\frac{\eta}{\eta_0}} = 1 + \beta \frac{C_D}{C_P} \quad [2.2]$$

II.10. Relajación por salto de temperatura (T-Jump)

II.10.1. Instrumentación

La relajación por salto de temperatura se ha llevado a cabo con el equipo fabricado de acuerdo al prototipo de Riegler.⁹³ La fuente de luz es una lámpara de Tungsteno y la señal es recogida por un fotodiodo. La capacidad del condensador es de 50 nF y el equipo está calibrado para que una descarga de 30 kV, produzca un salto de temperatura de 3.2 °C (desde 21.8 hasta 25 °C). La relajación tras la descarga se sigue mediante los cambios de absorbancia o fluorescencia, que son transformados en señales eléctricas recogidas por un osciloscopio Agilent 54622A (Santa Clara, CA). El equipo está termostatizado con un baño externo Julabo con precisión de ± 0.1 °C. La celda utilizada es apta tanto para las medidas en absorbancia como fluorescencia, tiene una capacidad aproximada de 1 mL y posee dos electrodos de oro a través de los cuales se realiza la descarga.

II.10.2. Procedimiento experimental

Se ha utilizado la detección por fluorescencia. Se introduce una disolución de sistema ligando/polinucleótido en el interior de la celda de T-Jump asegurando que la disolución esté en contacto con los electrodos de oro para que se pueda producir la descarga. Para cada relación ligando/polinucleótido se realizan al menos siete medidas, dejando pasar cinco minutos entre cada descarga para que la disolución recupere la temperatura inicial. Las curvas obtenidas para cada concentración son acumuladas y ajustadas para determinar sus constantes de velocidad.

II.11. Ensayos de bioluminiscencia

II.11.1. Instrumentación

Los ensayos de bioluminiscencia han sido realizados en un lector de placas modelo EnSpire (Perkin Elmer) perteneciente a la Plataforma de screening de fármacos de la Universidad de Santiago de Compostela con una amplitud de espectro de 250 – 1000 nm en absorbancia y 230 – 850 nm en fluorescencia. Las placas utilizadas tienen una capacidad de 96 pocillos.

II.12. Interacción ligando/polinucleótido

II.12.1. Cálculo de constantes de equilibrio

Las constantes de equilibrio han sido determinadas mediante espectroscopía de absorción UV-Vis y fluorescencia.

Los modelos que se describen a continuación consideran la interacción entre un ligando D y un polinucleótido P que reaccionan dando un complejo ligando/polinucleótido PD, en el equilibrio.



Los modelos teóricos utilizados para el cálculo de la constante de equilibrio han sido los siguientes:

Ecuación de Hildebrand & Benesi simple

Dada la ecuación [2.3], la constante de equilibrio K viene expresada a través de la ecuación [2.4].

$$K = \frac{[PD]}{[P][D]} \quad [2.4]$$

Donde [D], [P] y [PD] son las concentraciones en el equilibrio de D, P y PD respectivamente. Por tanto, la concentración analítica de D se expresa como:

$$C_D = [D] + [PD] \quad [2.5]$$

Sustituyendo [2.5] en [2.4] y reordenando, se obtiene:

$$\frac{1}{K} = \frac{(C_D - [PD])[P]}{[PD]} \quad [2.6]$$

Que puede reescribirse como:

$$\frac{C_D}{[PD]} = 1 + \frac{1}{K[P]} \quad [2.7]$$

Teniendo en cuenta la ecuación [2.8] y sustituyendo en la ecuación [2.5] se obtiene la ecuación [2.9].

$$A = \varepsilon_D[D] + \varepsilon_{PD}[PD] \quad [2.8]$$

$$A - \varepsilon_D C_D = (\varepsilon_{PD} - \varepsilon_D)[PD] \quad [2.9]$$

Si definimos ΔA y $\Delta \varepsilon$ según las ecuaciones [2.10] y [2.11] respectivamente y lo sustituimos en [2.9] se obtiene la ecuación [2.12]:

$$\Delta A = A - \varepsilon_D C_D \quad [2.10]$$

$$\Delta \varepsilon = \varepsilon_{PD} - \varepsilon_D \quad [2.11]$$

$$[PD] = \frac{\Delta A}{\Delta \varepsilon} \quad [2.12]$$

Por último, la sustitución de [2.12] en [2.7] resulta en la Ecuación de Hildebrand & Benesi simplificada, aplicable cuando C_P es al menos 10 veces mayor que C_D y aplicando la aproximación $[P] = C_P$.

$$\frac{C_D}{\Delta A} = \frac{1}{\Delta \varepsilon} + \frac{1}{\Delta \varepsilon K [P]} \quad [2.13]$$

Al representar $C_D/\Delta A$ frente al $1/[P]$ se obtiene una recta de cuya ordenada en el origen se calcula $\Delta \varepsilon$ y de la pendiente el valor de K .

Ecuación Mononuclear

La ecuación mononuclear es la ecuación de una curva obtenida tras realizar la inversa de la ecuación de Hildebrand & Benesi simplificada:

$$\frac{\Delta A}{C_D} = \frac{\Delta \varepsilon K C_P}{1 + K C_P} \quad [2.14]$$

Ecuación de Hildebrand & Benesi completa

La concentración total de polinucleótido P se expresa como:

$$C_P = [P] + [PD] \quad [2.15]$$

A partir de esta ecuación y la [2.5], que define la concentración total de ligando, la constante de equilibrio definida en [2.4] se expresa como:

$$K = \frac{[PD]}{(C_P - [PD])(C_D - [PD])} \quad [2.16]$$

La ecuación de Hildebrand & Benesi en su forma completa⁹⁴ se obtiene tras sustituir [2.16] en [2.12]:

$$\frac{C_D C_P}{\Delta A} + \frac{\Delta A}{\Delta \varepsilon^2} = \frac{1}{\Delta \varepsilon K} + \frac{C_P + C_D}{\Delta \varepsilon} \quad [2.17]$$

La estimación de la constante de equilibrio se calcula a través de un método iterativo en el que tras un aplicar un valor inicial de $\Delta \varepsilon$, la representación de $(C_D/C_P/\Delta A + \Delta A/\Delta \varepsilon^2)$ conduce a un valor de K y un valor iterado de $\Delta \varepsilon$ obtenidos a partir de la pendiente y de la ordenada en el origen. Con ese nuevo valor $\Delta \varepsilon$ de se repite el proceso hasta lograr la convergencia.

Ecuación de Mc Ghee & Von Hippel

Para la obtención de esta ecuación se tiene en cuenta el número de sitios n, definido como el número de pares de bases ocupadas por cada molécula de ligando. En este caso el número de sitios disponibles S y su concentración, [S], es distinta

de la concentración de polinucleótido [P], por lo que la reacción de complejación se reescribe en función de S.



La concentración de [S] se puede relacionar con C_P a través de la ecuación propuesta por Mc Ghee & Von Hippel,⁹⁵ mediante una función dependiente del grado de saturación del polinucleótido:

$$f(r) = \frac{[1 + nr]^n}{[1 + (n - 1)r]^{n-1}} = \frac{[S]}{C_P} \quad [2.19]$$

Donde r se define como:

$$r = \frac{[DS]}{C_P} = \frac{\Delta A}{\Delta \varepsilon C_P} \quad [2.20]$$

Tras sustituir [2.19] en [2.13] se obtiene la ecuación de Mc Ghee & Von Hippel:

$$\frac{C_D}{\Delta A} = \frac{1}{\Delta \varepsilon} + \frac{1}{\Delta \varepsilon K C_P f(r)} \quad [2.21]$$

Ecuación de Scatchard

Para la deducción de la ecuación de Scatchard se añade el parámetro B, que da cuenta del número de sitios de enlace. La concentración total de sitios se define como:

$$[S]_0 = B C_P \quad [2.22]$$

Asumiendo que los sitios son independientes entre sí y además están saturados, $[S]_0$ se puede expresar como:

$$[S]_0 = [S] + [DS] \quad [2.23]$$

Sustituyendo [2.23] en [2.22] se obtiene:

$$B C_P = [S] + [DS] \quad [2.24]$$

La constante de enlace de Scatchard, K_{SC} , se define de la misma forma que una constante de equilibrio convencional:

$$K_{SC} = \frac{[DS]}{[D][S]} \quad [2.25]$$

Si en la ecuación [2.24] se sustituye [DS] por r (ecuación [2.20]) se tiene:

$$BC_P = [S] + rC_P \quad [2.26]$$

Despejando [S]:

$$[S] = C_P(B - r) \quad [2.27]$$

Finalmente, al introducir las ecuaciones [2.20] y [2.27] en [2.25] se deduce la ecuación de Scatchard.⁹⁶

$$\frac{r}{[D]} = K_{SC}B - K_{SC}r \quad [2.28]$$

La representación de $r/[D]$ frente a r permite obtener K_{SC} de la pendiente y B de la ordenada en el origen. La aplicación de dicha ecuación no se puede realizar en todo el rango de concentraciones al no cumplirse la suposición de independencia de los sitios. B se relaciona con el tamaño de sitio a través de la ecuación [2.29]:

$$n = \frac{1 + 1/B}{2} \quad [2.29]$$

II.12.2. Desactivación de fluorescencia o Quenching

El quenching es un proceso mediante el cual la fluorescencia de un sistema disminuye por efecto de un desactivador o quencher. Existen dos tipos de quenching: dinámico y estático y en ambos se requiere que el fluoróforo y el quencher estén en contacto.

La fluorescencia disminuye por colisiones con el quencher de acuerdo con la ecuación de Stern-Volmer, ecuación [2.30], donde F_0 y F son las intensidades de fluorescencia en ausencia y presencia de quencher respectivamente, k_q es la constante bimolecular de quenching y τ_0 es el tiempo de vida del fluoróforo. El

producto de k_q y τ_0 nos da la constante de Stern-Volmer K_D para el quenching dinámico. $[Q]$ es la concentración de quencher.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q\tau_0[Q] = 1 + K_D[Q] \quad [2.30]$$

En un proceso de quenching estático, se forma un complejo entre el fluoróforo F y el quencher Q, de forma que el sistema resultante FQ no es fluorescente.

El proceso de formación de un complejo entre un quencher y un fluoróforo es similar a los descritos anteriormente para la formación de complejos entre ligandos y polinucleótidos y puede representarse de acuerdo a la ecuación [2.31]



Por tanto, la constante de equilibrio se expresa como:

$$K_S = \frac{[FQ]}{[F][Q]} \quad [2.32]$$

La concentración de fluoróforo es:

$$[F]_0 = [F] + [FQ] \quad [2.33]$$

Por lo que la constante de Quenching estático puede ser reescrita como:

$$K_S = \frac{[F]_0}{[F][Q]} - \frac{1}{[Q]} \quad [2.34]$$

Reordenando la ecuación anterior se obtiene una expresión formalmente idéntica a la obtenida para el quenching dinámico.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_S[Q] \quad [2.35]$$

En muchos sistemas se da una combinación de quenching dinámico y estático. Cuando esto ocurre, la ecuación de Stern-Volmer deja de ser una recta a las relaciones F_0/F más altas, curvándose hacia el eje de ordenadas. En la Figura

II.1 se describe esquemáticamente el proceso combinado de quenching estático y dinámico.

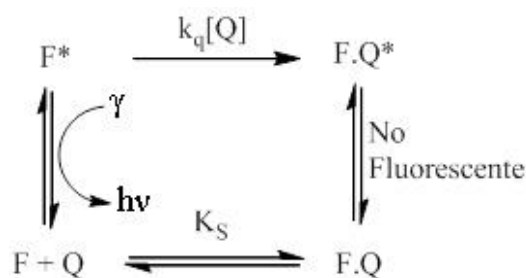


Figura II.1. Quenching dinámico y estático combinados.

Para este proceso, la ecuación de Stern-Volmer queda modificada de la siguiente forma:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + (K_D + K_S)[Q] + K_D K_S [Q]^2 = 1 + K_{ap}[Q] \quad [2.36]$$

Donde:

$$K_{ap} = \left(\frac{F_0}{F} - 1 \right) \frac{1}{[Q]} = (K_D + K_S) + K_D K_S [Q] \quad [2.37]$$

El cálculo de K_{ap} se realiza para cada concentración de quencher. La representación K_{ap} frente a $[Q]$, conduce a una recta de cuya ordenada y pendiente se pueden obtener K_D y K_S .

II.12.3. Dicroísmo circular

En un experimento de dicroísmo circular se hace incidir sobre una muestra un haz de luz circularmente polarizada (LCP), polarizada tanto a la izquierda (LLCP) como a la derecha (RLCP). La Figura II.2 muestra una representación de luz linealmente polarizada y circularmente polarizada.

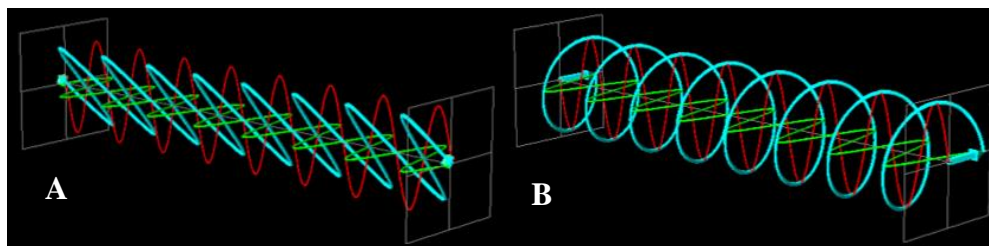


Figura II.2. (A) Luz linealmente polarizada (azul) como la resultante de las componentes vertical (rojo) y horizontal (azul) en fase y a 90° . (B) Luz circularmente polarizada (azul) resultante de la pérdida de fase de las componentes vertical y horizontal.

En un experimento de dicroísmo circular es necesario operar con moléculas quirales (moléculas tales que sus imágenes especulares no son superponibles), ópticamente activas. Se define el dicroísmo circular, $\Delta\varepsilon$, como la diferencia entre la absorción de luz circularmente polarizada a la izquierda y a la derecha. Cuando un haz de LCP incide sobre una molécula activa, los haces circularmente polarizados hacia izquierda y derecha no presentan ni la misma longitud de onda, ni la misma absorbancia. Teniendo en cuenta la ley de Lambert-Beer, se puede expresar el dicroísmo circular como la diferencia entre el coeficiente de extinción molar del haz circularmente polarizado hacia izquierda (ε_L) y derecha (ε_D), de acuerdo a la ecuación [2.38].

$$\Delta A = A_L - A_R = (\varepsilon_L - \varepsilon_R) \cdot c \cdot l = \Delta\varepsilon \cdot c \cdot l \quad [2.38]$$

Esta expresión se cumple siempre que las dimensiones de la partícula en disolución sean mucho menores que la longitud de onda de la luz incidente. Si el tamaño de la partícula es similar a la longitud de onda, comienzan a aparecer fenómenos de scattering. Cuando el tamaño de partícula supera al de la longitud de onda se produce un efecto de resonancia interna.

Cuando se trabaja en dicroísmo circular la elipticidad es generalmente la magnitud más utilizada en el análisis de los resultados. Al irradiar una muestra con LCP, las dos componentes, LLCP y RCLP, cada una con sus intensidades, se encuentran perfectamente polarizadas circularmente. Tras atravesar la muestra, debido a las diferencias entre ε_L y ε_D , el haz se transforma en luz elípticamente polarizada como muestra la Figura II.3.

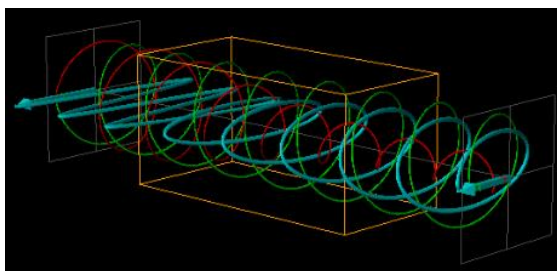


Figura II.3. Luz elípticamente polarizada (azul) tras atravesar la muestra (poliedro naranja).

Cuando los vectores eléctricos de las dos componentes se encuentran en la misma dirección, su suma es el semieje mayor de la elipse formada. Por el contrario, cuando están en direcciones opuestas, su diferencia es el semieje menor de la elipse. La elipticidad es la relación entre el semieje mayor y menor que a su vez es la tangente del ángulo⁹⁷ (Figura II.4).

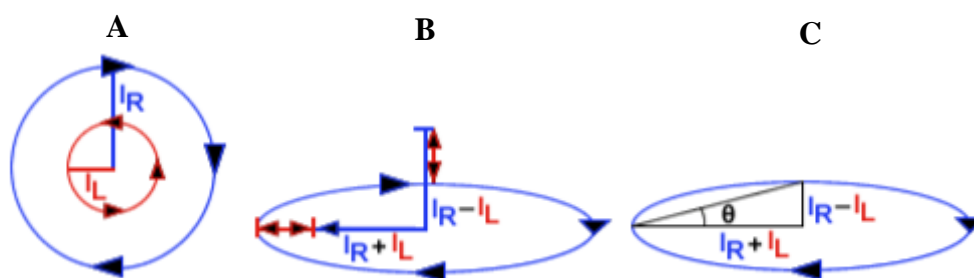


Figura II.4. (A) Luz circularmente polarizada a izquierda con intensidad I_L y a la derecha con intensidad I_R antes de alcanzar la muestra. (B) Luz elípticamente polarizada resultante de la interacción con la muestra, donde están representados los semiejes mayor $I_R + I_L$, y menor, $I_R - I_L$. (C) Representación geométrica de la elipticidad θ .

La elipticidad θ se encuentra expresado en radianes, pero dado que su valor suele ser pequeño, puede ser transformado en grados de acuerdo a la ecuación [2.39]:

$$\theta(\text{deg}) = 180 \cdot \ln 10 \cdot \frac{\Delta A}{4\pi} = 32.98\Delta A \quad [2.39]$$

Donde ΔA es la diferencia de absorbancia entre la luz circularmente polarizada a izquierda y derecha. La elipticidad es proporcional al dicroísmo circular, sin embargo, comúnmente se suele transformar este parámetro en elipticidad molar, $[\theta]$, para eliminar la dependencia de la ecuación anterior con la concentración de la muestra y del camino óptico:

$$[\theta] = \frac{100\theta}{c \cdot l} \quad [2.40]$$

Sustituyendo las ecuaciones [2.38] y [2.39] en la ecuación [2.40] se obtiene la dependencia lineal entre dicroísmo circular y elipticidad molar:

$$[\theta] = 3298\Delta\varepsilon \quad [2.41]$$

Tanto ADN como ARN presentan absorción tanto en la zona de ultravioleta lejano (180 -250 nm) como cercano (250 – 340 nm). La estructura secundaria es muy sensible en cuanto al espectro de dicroísmo circular que presentan. Las bases nitrogenadas son planas y por sí mismas no presentan espectros de dicroísmo circular, sin embargo, la unión al azúcar modifica el entorno haciendo que adquieran actividad óptica, presentando pequeñas bandas de dicroísmo circular en el caso de mononucleótidos e importantes cambios en el caso de los polinucleótidos. Además, las interacciones de stacking entre las bases, así como las interacciones de Coulomb influyen también en las bandas de los polinucleótidos. Esto permite que la estructura secundaria de hélices sencillas, dobles o triples de polinucleótidos sea identificable con esta técnica,⁹⁸ siendo capaz de distinguir incluso entre hélices levógiras y dextrógiras. Tanto el pH como la concentración salina de la muestra también tienen una influencia significativa en los espectros.⁹⁹

Los ligandos utilizados en este trabajo son aquirales, pero unidos a los polinucleótidos pueden darse dos situaciones, o las dos a la vez:

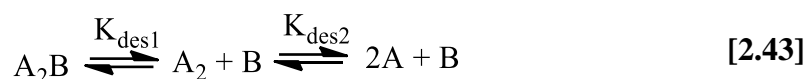
- 1) Modificación de las bandas propias del polinucleótido.
- 2) Aparición de nuevas bandas de dicroísmo circular en la región donde el ligando absorbe (dicroísmo circular inducido).

Ambos procesos implican cambios conformacionales en la estructura del polinucleótido. La intensidad y signo de las nuevas bandas están relacionadas con el tipo de enlace polinucleótido/ligando.¹⁰⁰

II.12.4. *Desnaturalización térmica o melting*

La desnaturalización térmica es el proceso mediante el cual, por acción de la temperatura una hélice de polinucleótido se separa en hebras sencillas. Las

ecuaciones [2.42] y [2.43] representan los procesos de desnaturalización de dobles y triples hélices respectivamente. Este proceso es debido a la ruptura de las interacciones de stacking entre las bases de una misma cadena, y de las asociaciones por puente de hidrógeno entre bases complementarias.



La temperatura a la que ocurre la desnaturalización se conoce como temperatura de desnaturalización o melting, T_m , definida como la temperatura a la cual la mitad del polinucleótido se ha desnaturalizado. Se han empleado dos técnicas para el cálculo de T_m así como los parámetros termodinámicos entalpía, entropía y energía libre: calorimetría diferencial de barrido y espectroscopía UV-Vis.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

En un experimento de DSC se registra la variación de capacidad calorífica en función del tiempo. Solo existe flujo de calor cuando hay una diferencia de capacidad calorífica entre la disolución y el disolvente. El DSC se ha utilizado para estudios de estabilidad de polinucleótidos frente a un ligando, determinando la capacidad calorífica C_p y en consecuencia los cambios en la entalpía H , entropía y energía libre de Gibbs.¹⁰¹ El flujo de calor entre muestra y referencia directamente relacionada con la diferencia de la capacidad calorífica entre ellas¹⁰² mediante la ecuación [2.44]:

$$C_p = \frac{\Delta Q}{\Delta t} \left(\frac{10^{-6}}{v_{bar}[P]V} \right) \quad [2.44]$$

Donde $\Delta Q/\Delta t$ es el flujo de calor, v_{bar} es la velocidad de barrido, $[P]$ la concentración de polinucleótido y V el volumen de la disolución. A partir de la capacidad calorífica se puede calcular la variación de entalpía y entropía del proceso de desnaturalización mediante las ecuaciones [2.45] y [2.46] respectivamente.

$$\Delta H = \int_{T_1}^{T_2} C_p dT \quad [2.45]$$

$$\Delta S = \int_{T_1}^{T_2} \frac{C_p}{T} dT \quad [2.46]$$

Desnaturalización térmica por absorción UV-Vis

Mediante el seguimiento de la absorbancia en función de la temperatura es posible estudiar estos procesos de desnaturalización. La absorbancia aumenta durante el proceso de desnaturalización y la representación de la absorbancia frente a la temperatura, de un polinucleótido o de un sistema ligando/polinucleótido conduce a una curva sigmoidea creciente, de cuyo punto de inflexión se obtiene el valor de T_m .

II.12.5. Estudios cinéticos

Los procedimientos y técnicas utilizados son diferentes según la reacción sea lenta o rápida.

Reacciones lentas. Se han estudiado registrando la absorbancia en función del tiempo ajustando los datos a ecuaciones monoexponenciales, [2.47], o biexponenciales, [2.48], dependiendo si la reacción transcurre en una o dos etapas. A representa la variable dependiente, A_0 es el valor del término independiente. A_1 y A_2 son las amplitudes de la curva para el primer y segundo proceso observados respectivamente, k_1 y k_2 son las constantes cinéticas de los procesos 1 y 2.

$$A = A_0 + A_1 e^{-k_1 t} \quad [2.47]$$

$$A = A_0 + A_1 e^{-k_1 t} + A_2 e^{-k_2 t} \quad [2.48]$$

Reacciones rápidas. Se han estudiado a través de relajación por salto de temperatura (T-Jump), válido para reacciones que ocurren entre microsegundos y 0.1 segundos. Se modifica el equilibrio del sistema tras un cambio repentino de temperatura tras el cual la reacción sufre un proceso de reajuste a unas nuevas condiciones de equilibrio Figura II.5. Por lo tanto, solo es aplicable a sistemas en

equilibrio, es decir, con una constante de formación, k_f , y otra, k_d , de disociación¹⁰³ (ecuación [2.49]).

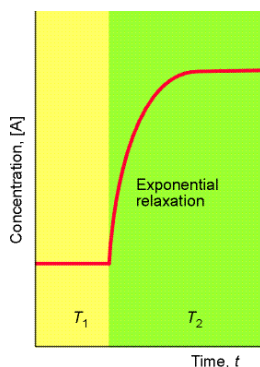


Figura II.5. Proceso de relajación de un sistema tras pasar de una temperatura T_1 a una T_2 .

Esta técnica fue desarrollada por Manfred Eigen en la década de 1960, en ella el aumento de temperatura de una disolución que contiene el sistema objeto de estudio, se origina gracias a la descarga rápida de un condensador. A lo largo del trabajo los mecanismos encontrados son los representados en las ecuaciones [2.49] y [2.51].



El cociente entre k_f y k_d es la constante aparente de equilibrio K_{ap} y el comportamiento cinético puede expresarse como:

$$\frac{1}{\tau} = k_d + k_f([D] + [P]) \quad [2.50]$$

La representación de $1/\tau$ frente a $[D] + [P]$ conduce a una recta de cuya ordenada se obtiene la constante de disociación, k_d , y de la ordenada, la constante de formación, k_f .

En el caso de un mecanismo en dos etapas, en las que se forman los complejos DS_I y DS_{II} , siendo el primero intermediario del segundo de acuerdo a la reacción:



El comportamiento cinético se expresa como:

$$\frac{1}{\tau} = \frac{K_1 k_2 F(C)}{1 + K_1 F(C)} + k_{-2} \quad [2.52]$$

Siendo $K_1 = k_1/k_{-1}$ y $K_2 = k_2/k_{-2}$, con una constante global $K = K_1(1 + K_2)$ y $F(C)$ es una función dependiente de la concentración de reactivos y productos.¹⁰⁴

Capítulo III

Métodos computacionales

III. Métodos computacionales

En la realización de esta tesis, se ha empleado la química computacional como soporte a los datos experimentales. Esta disciplina permite la predicción de propiedades (energía, reactividad, propiedades físicas, espectroscópicas, etc) de los sistemas químicos. Se han empleado métodos semiempíricos para la obtención de resultados preliminares a partir de los cuales aumentar el nivel de teoría con métodos *ab initio* y esencialmente, con métodos DFT (incluyendo la aproximación ONIOM). Además, se ha empleado la mecánica molecular en aquellas partes de los sistemas donde para reducir el coste computacional de cálculo se ha bajado el nivel de teoría.

El objetivo del estudio computacional se basa en la búsqueda de un mínimo de la superficie de energía potencial (PES), que es una representación de la energía del sistema en función de una, o como en el caso de la Figura III.1, tres coordenadas.

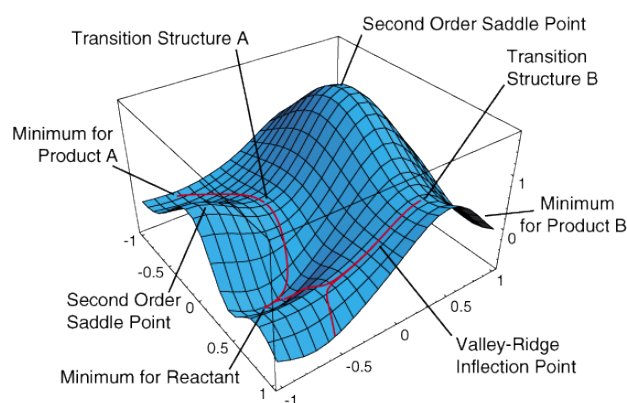


Figura III.1 Ejemplo de superficie de energía potencial.

Para un sistema dado, cada punto de la superficie de energía potencial se corresponde con una configuración distinta del mismo. Las simulaciones teóricas buscan encontrar mínimos de energía (puntos tal que al desplazarnos en cualquier dirección a partir de ese punto la energía aumenta), para obtener las conformaciones más estables. Existen también puntos en los que la energía es mínima en todas las direcciones salvo en una, conocidos como puntos silla, por traducción directa del inglés (saddle points¹⁰⁵). La localización de estos puntos se realiza a través de la optimización de la geometría del sistema, recorriendo la PES y buscando el mínimo de energía. En un mínimo de energía la derivada se anula (el gradiente es 0). A partir de las segundas derivadas se calculan las frecuencias y se puede determinar

si estamos ante un mínimo de energía (todas las frecuencias son positivas), o una silla si al menos una de las frecuencias es negativa.

La ejecución de una simulación teórica se hace en función de un modelo químico, que se define como un modelo de cálculo que puede ser aplicado uniformemente con independencia del tipo y tamaño de sistema¹⁰⁵ y que se compone de un modelo teórico y de un juego de bases.

III.1. Modelos Teóricos

En la realización de este trabajo, se han empleado cuatro tipos de modelos: Mecánica molecular, Semi-empírico, DFT y QM/MM.

III.1.1. Mecánica Molecular

Con el objetivo de disminuir el tiempo de cálculo, la mecánica molecular ha sido empleada para el cálculo conjunto con métodos DFT en los sistemas ligando/polinucleótido aplicándolo sobre los átomos lejanos a donde se produce dicha interacción. Éste método se basa en el uso de las leyes físicas clásicas, considerando a las moléculas como átomos unidos entre sí, parametrizando los fenómenos cuánticos. El coste computacional de la mecánica molecular es muy bajo y puede emplearse en sistemas en los que haya miles de átomos, sin embargo, es un método muy específico que sólo presentan buenos resultados para los sistemas para los que haya sido parametrizado previamente. Además, puesto que se obvian los efectos electrónicos, la mecánica molecular no es fiable en procesos de formación o ruptura de enlace.

En mecánica molecular la energía total (E_{total}) del sistema se expresa de acuerdo a un sumatorio de energías definido mediante la ecuación [3.1]:

$$E_{total} = E_{str} + E_{bend} + E_{tors} + E_{vdw} + E_{el} + E_{cross} \quad [3.1]$$

Donde E_{str} es la energía debida a los enlaces entre un átomo A y otro átomo B, E_{bend} es la energía debida a la deformación del ángulo de enlace formado por tres átomos unidos A-B-C, E_{tors} es la energía debida a la deformación del ángulo diedro cuando se tiene una estructura tipo A-B-C-D, o en el caso de átomos sustituidos es la energía debida a la hibridación que hace que el átomo salga del plano en el que

estaba contenido, E_{vdw} es la energía debida a las interacciones de van de Waals, E_{el} es la energía provocada por las interacciones electrostáticas entre dos átomos y E_{cross} es la energía que surge debida al acoplamiento de todas las energías anteriores.

Las ecuaciones que definen cada una de las energías que componen el potencial total generalmente están parametrizadas en función de un sistema concreto. En nuestro caso, la parametrización se ha realizado aplicando un potencial desarrollado por Cornell y colaboradores,¹⁰⁶ específico para ácidos nucleicos y conocido como AMBER94.

AMBER94

Este potencial es minimalista y se basa en la mecánica clásica; se define con el potencial de enlace, angular y dihédrico y una combinación de las interacciones de Van de Waals y electrostáticas, ecuación [3.2]:

$$\begin{aligned}
 E_{total} = & \sum_{enlaces} K_r (r - r_{eq})^2 + \sum_{ángulos} K_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 \\
 & + \sum_{dihedros} \frac{V_n}{2} [1 + \cos(n\phi - \gamma)] \\
 & + \sum_{i < j} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^6} + \frac{q_i q_j}{\epsilon R_{ij}} \right]
 \end{aligned} \tag{3.2}$$

El primer término es la energía de la interacción debida a la vibración de los átomos unidos covalentemente. K_r es la constante para la energía de enlace, r es la distancia de enlace entre dos átomos, r_{eq} es la distancia de equilibrio.

El segundo término es la energía debida la flexión de los ángulos formados por tres átomos unidos covalentemente, K_θ , θ y θ_{eq} son la constante, ángulo de enlace y ángulo de equilibrio respectivamente.

El tercer término es el correspondiente a la energía de los ángulos dihedros, donde V_n son coeficientes de Fourier debido a interacciones dipolo-dipolo, interacciones de Van de Waals, impedimentos estéricos, conjugación de enlaces, etc., n es la fase, ϕ es el eje de rotación y γ es el ángulo diedro.

El último término aglutina las interacciones de Van der Waals (en un potencial de Lennard-Jones) y las electrostáticas. Dados los átomos i y j , A_{ij} y B_{ij}

controlan la posición y profundidad del potencial, R_{ij} es la distancia entre los átomos i y j , q_i y q_j son las cargas de dichos átomos y ϵ es la constante dieléctrica efectiva.

La parametrización de este potencial se realiza para cada uno de sus términos en función del ácido nucleico con el que se trabaje, así se tiene en cuenta el tipo de átomo presente en el sistema; la determinación del tipo de átomo depende de la hibridación del mismo, así como del tipo de átomos a los que esté unido. Para los distintos potenciales que componen la energía total, AMBER contiene parametrizaciones realizadas a partir de Rayos X o análisis vibracionales con posterior optimización mediante cálculos DFT. La Figura III.2 muestra el tipo de átomo y las cargas que este potencial atribuye al esqueleto y las bases nitrogenadas del ADN.

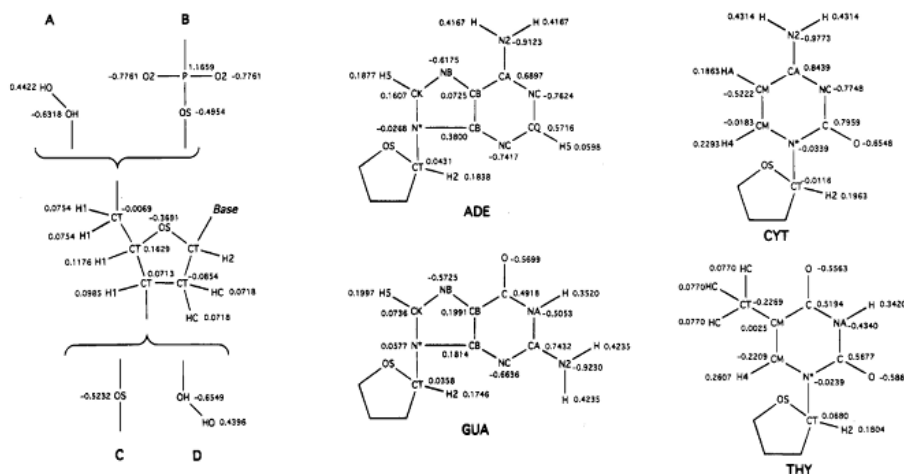


Figura III.2. Asignación en AMBER del tipo de átomo y su carga para el ADN.

III.1.2. Métodos semiempíricos

Como en la mecánica clásica, los métodos semiempíricos están parametrizados en función de valores experimentales para un átomo dado, e incluyen las leyes de la mecánica cuántica para dar una solución aproximada de la ecuación de Schrödinger.

Se aplican para sistemas grandes o como primera aproximación para cálculos más avanzados. En general, los métodos semiempíricos están enfocados a moléculas orgánicas simples. Los métodos semiempíricos suponen una simplificación de los métodos Hartree-Fock (consistentes en aproximaciones a la ecuación de Schrödinger). El coste computacional queda reducido debido a la

disminución del número de integrales y para ello tratan sólo los electrones de valencia. Además, no tienen en cuenta el solapamiento de orbitales atómicos y las bases utilizadas para el cálculo están reducidas únicamente a los electrones de valencia de cada átomo.

PM6-DH2

Este método está basado en el PM6 (Parametrization Method 6) original, e incluye una corrección para las fuerzas de dispersión (D), así como para los enlaces de hidrógeno (H2). Se emplea para la obtención de geometrías iniciales o para cálculos a través de geometrías que ya han sido optimizadas con un nivel de teoría alto.

La parametrización PM6 está basada en los métodos de parametrización previos AM1¹⁰⁷ y PM3¹⁰⁸, e incluye cambios respecto al procedimiento para el cálculo de la entalpía de formación, incluye 9.000 especies de referencia nuevas frente a las 800 de PM3, realiza correcciones en el cálculo de los niveles de energía atómicos, así como en las interacciones núcleo-núcleo y en los orbitales d de los elementos principales y correcciones específicas para los enlaces O-H, N-H, C-C y Si-O.¹⁰⁹

La corrección para la dispersión consiste en esencia en las fuerzas de dispersión de London y se encuentra separada de los cálculos de mecánica cuántica, por lo que su implementación en el método PM6 es sencilla, describiéndose con la ecuación [3.3].¹¹⁰

$$\sum E_{dis} = - \sum f_{damp}(r_{ij}R_{ij}^0) C_{6ij}r_{ij}^{-6} \quad [3.3]$$

Donde f_{damp} es una función de “damping” para el control de las interacciones de dispersión, r_{ij} es la distancia entre los átomos i y j , R_{ij}^0 son los radios de van der Waals para los átomos i y j , y C_{6ij} es un coeficiente de dispersión. En cuanto a la corrección de los enlaces de hidrógeno, esta viene determinada en función de cuatro coordenadas internas, de acuerdo a la Figura III.3, la distancia de enlace que implica al hidrógeno (r), el ángulo entre A-H-D (Θ), el ángulo entre R1-A-H (Φ) y el ángulo entre -R2-A-H (Ψ).¹¹¹

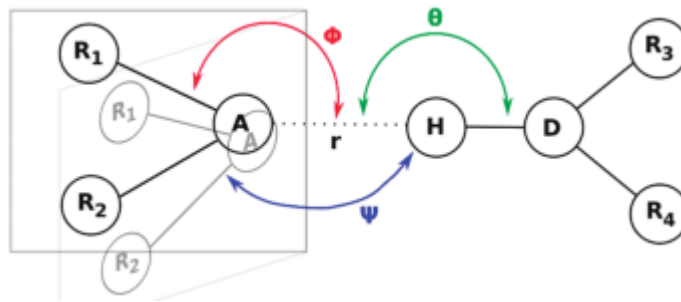


Figura III.3. Representación de las coordenadas internas utilizadas para la corrección de la energía debida a enlaces de Hidrógeno.

Así, la corrección debida a los enlaces de Hidrógeno, $E_{\text{H-bond}}$, toma la forma de la ecuación [3.4]:

$$E_{\text{H-bond}} = \left[a \frac{q_A q_H}{r^b} + cd^{\gamma} \right] \cos(\theta) \cos(\phi) \cos(\psi) \quad [3.4]$$

Donde q_A y q_H son las cargas sobre el átomo A y el átomo de Hidrógeno respectivamente y a , b , c y d son parámetros en función del sistema.

III.1.3. Teoría del funcional de la densidad (DFT)

Los métodos DFT surgieron como alternativa a los métodos *ab initio*, que están estrictamente basados en las leyes de la mecánica cuántica, prescindiendo de cualquier parámetro experimental y cuyas únicas constantes empleadas son la velocidad de la luz, la constante de Planck y las masas y cargas de electrones y núcleos.

En la teoría del funcional de la densidad se incorpora el comportamiento de los electrones cuando otros electrones están en movimiento (correlación electrónica) y se forman pares de electrones con espines opuestos. Así, solo con un ligero aumento del coste computacional se logra una precisión en el cálculo mucho mayor que la de los métodos Hartree-Fock (el más básico de los métodos *ab initio*).

En DFT, la energía del sistema se computa particionándola en las distintas energías que la componen: energía cinética E_T , energía debida a la atracción electrón-núcleo y la repulsión núcleo-núcleo E_V , repulsión electrón-electrón E_J y el término que da cuenta de los fenómenos de intercambio y correlación electrónica E_{XC} :

$$E = E_T + E_V + E_J + E_{XC} \quad [3.5]$$

Este método incluye las interacciones electrón-electrón no consideradas por los restantes términos. En 1964 Hohenberg y Kohn¹¹² demostraron con sus teoremas que todas estas energías son directamente proporcionales a la densidad electrónica ρ , en lugar de a una función electrónica como en la teoría propuesta por Hartree-Fock, dando lugar al nombre de DFT por lo que la ecuación [3.5] puede ser reescrita como un funcional (una función de una función) de la densidad:

$$E[\rho] = E_T[\rho] + E_V[\rho] + E_J[\rho] + E_{XC}[\rho] \quad [3.6]$$

En 1965, Kohn y Sham¹¹³ consiguieron simplificar el cálculo de dicha energía asumiendo que los electrones del sistema no interaccionaban entre ellos. Esta simplificación hace que la energía cinética calculada no sea la exacta, sin embargo, el error cometido es pequeño. Así, formularon que el funcional de la densidad puede ser escrito como la suma de las energías cinéticas más la interacción electrón-electrón.

$$F[\rho] = E_T[\rho] + E_{Vee}[\rho] \quad [3.7]$$

Cuando se considera un entorno con electrones no interaccionantes, la energía cinética se define como E_{Ts} . Si además se reducen las interacciones electrónicas a la interacción Coulómbica, la energía restante debida a la interacción de los átomos pasa a formar parte del potencial de intercambio y correlación de acuerdo a la ecuación [3.8].

$$F[\rho] = E_{Ts}[\rho] + E_J[\rho] + E_{XC}[\rho] \quad [3.8]$$

Combinando las ecuaciones [3.7] y [3.8] se obtiene:

$$E_{XC}[\rho] = (E_T[\rho] - E_{Ts}[\rho]) + (E_{Vee}[\rho] - E_J[\rho]) \quad [3.9]$$

El primer término de la ecuación anterior puede considerarse como la energía de correlación cinética E_C , y el segundo, contiene la energía de intercambio

E_X , que es la que más contribuye a E_{XC} . Agrupando los términos de la ecuación [3.9] la energía de intercambio y correlación se resume como:

$$E_{XC}[\rho] = E_C + E_X \quad [3.10]$$

El potencial de correlación e intercambio es la única contribución a la energía que no se calcula exactamente, este potencial es universal, único y válido para todos los sistemas. La formulación exacta del mismo conduciría al cálculo de su energía exacta, pero no ha sido realizada. En su lugar, se formulan funcionales aproximados para la energía de intercambio y correlación.

Aproximación de la densidad local (LDA)

En este modelo se asume que la densidad local puede ser tratada como un gas uniforme, donde la energía en un determinado punto solo depende de ρ . La energía de intercambio puede ser calculada con la ecuación de Dirac, que define la energía a través de la ecuación [3.11] y cuya integración calcula la densidad de energía (cantidad de energía por partícula, ε) como se muestra en la ecuación [3.12], estando el parámetro C_X definido en la ecuación [3.13].

$$E_X^{LDA}[\rho] = -C_X \int \rho^{4/3}(r) dr \quad [3.11]$$

$$\varepsilon_X^{LDA}[\rho] = -C_X \rho^{1/3} \quad [3.12]$$

con:

$$C_X = \frac{3}{4} \left(\frac{3}{\pi} \right)^{1/3} \quad [3.13]$$

En la mayoría de los casos la densidad electrónica es diferente para los electrones con el mismo espín que para los de espín opuesto. Esta diferenciación da lugar a una aproximación más precisa conocida como Local Spin Density Approximation o LSDA. En ella, la energía viene dada por la suma de los dos tipos de densidades elevadas a una potencia de 4/3:

$$E_X^{LSDA}[\rho] = -2^{1/3} C_X \int [\rho_\alpha^{4/3} + \rho_\beta^{4/3}] dr \quad [3.14]$$

$$\varepsilon_X^{LSDA}[\rho] = -2^{1/3} C_X \left[\rho_\alpha^{1/3} + \rho_\beta^{1/3} \right] \quad [3.15]$$

Esta energía puede ser expresada en función de la polarización, ζ , definida como la diferencia normalizada entre ρ_α y ρ_β :

$$\zeta = \frac{\rho_\alpha - \rho_\beta}{\rho_\alpha + \rho_\beta} \quad [3.16]$$

$$\varepsilon_X^{LSDA}[\rho] = -2^{1/3} C_X \rho^{1/3} \left[(1 + \zeta)^{4/3} + (1 - \zeta)^{4/3} \right] \quad [3.17]$$

Existe otro método propuesto por Slater en 1951 en el que se descarta la energía de correlación y solo se considera la de intercambio (método X_α).

$$\varepsilon_{X_\alpha} = -\frac{3}{2} \alpha C_X \rho^{1/3} \quad [3.18]$$

Para la estimación de la energía de correlación, uno de los métodos más utilizados y que ofrece un ajuste muy preciso a la realidad, es el propuesto por Vosko, Wilk y Nusair¹¹⁴ (VWN), ecuación [3.19], que describe la energía entre los valores que puede tomar la polarización (0 y 1) y sustituye la densidad electrónica por el radio efectivo (r_s), definido como el radio en el cual exactamente un electrón está contenido en el volumen de una esfera definida por ese radio y que contiene la misma densidad electrónica.

$$\begin{aligned} \varepsilon_C^{VWN}(r_s) = \frac{A}{2} \left\{ \ln \frac{r_s}{r_s + b\sqrt{r_s} + c} \right. \\ + \frac{2b}{\sqrt{4c - b^2}} \tan^{-1} \left(\frac{\sqrt{4c - b^2}}{2\sqrt{r_s} + b} \right) \\ - \frac{bx_0}{x_0^2 + bx_0 + c} \left\{ \ln \left[\frac{(\sqrt{r_s} - x_0)^2}{r_s + b\sqrt{r_s} + c} \right] \right. \\ \left. \left. + \frac{2(b - 2x_0)}{\sqrt{4c - b^2}} \tan^{-1} \left(\frac{\sqrt{4c - b^2}}{2\sqrt{r_s} + b} \right) \right\} \right\} \quad [3.19] \end{aligned}$$

$$r_s(r) = \left(\frac{3}{4\pi\rho(r)} \right)^{1/3} \quad [3.20]$$

Donde A, b, c y x_0 son diferentes contantes empíricas. En general, con LSDA se obtiene un defecto de energía de un 10%.

Aproximación de corrección del gradiente (CGA)

Este método supone una mejora sobre el LSDA; se considera que la densidad electrónica no es uniforme por lo que la energía no depende solo de la densidad electrónica, sino también del gradiente. En general, estos funcionales se construyen añadiendo un término adicional al funcional LDA o LSDA, ya sea para la correlación o el intercambio, con la forma general:

$$\varepsilon_{x/c}^{CGA}[\rho(r)] = \varepsilon_{x/c}^{LSDA/LDA}[\rho(r)] + \Delta\varepsilon_{x/c} \left[\frac{|\nabla\rho(r)|}{\rho^{4/3}(r)} \right] \quad [3.21]$$

Uno de los funcionales más empleados para la energía de intercambio y en el que, se basa uno de los funcionales híbridos que se ha utilizado en esta tesis, es el funcional descrito por Becke¹¹⁵ (B) en 1988, ecuación [3.22], que corrige el potencial LDA implementando una corrección para el decaimiento asintótico de la densidad energética a medida que la distancia al electrón aumenta.

$$\varepsilon_x^B = \varepsilon_x^{LDA} - \beta\rho^{1/3} \frac{x^2}{1 + 6\beta \sinh^{-1} x} \quad [3.22]$$

Siendo β un parámetro de ajuste basado en datos atómicos y x definido como:

$$x = \frac{|\nabla\rho|}{\rho^{4/3}} \quad [3.23]$$

Para la energía de correlación uno de los funcionales más utilizados es el desarrollado por Lee, Yang y Parr (LYP)¹¹⁶ que está formulado como:

$$\begin{aligned} \varepsilon_C^{LYP} = & -a \frac{\gamma}{(1 + d\rho^{-1/3})} \\ & - ab \frac{\gamma e^{-c\rho^{1/3}}}{9 \left(1 + d\rho^{-\frac{1}{3}}\right) \rho^{8/3}} \left[18(2^{2/3})C_F \left(\rho_\alpha^{8/3} + \rho_\beta^{8/3}\right) \right. \\ & \left. - 18\rho t_W + \rho_\alpha(2t_W^\alpha + \nabla^2 \rho_\alpha) + \rho_\beta(2t_W^\beta + \nabla^2 \rho_\beta) \right] \end{aligned} \quad [3.24]$$

Siendo a, b, c y d parámetros resultantes del ajuste de datos para el átomo de Helio, y γ :

$$\gamma = 2 \left[1 - \frac{\rho_\alpha^2 + \rho_\beta^2}{\rho^2} \right] \quad [3.25]$$

t_W se conoce como la energía cinética local de Weizsacker.¹¹⁷

$$t_W^{\alpha/\beta} = \frac{1}{8} \left(\frac{|\nabla \rho_{\alpha/\beta}|^2}{\rho_{\alpha/\beta}} - \nabla^2 \rho_{\alpha/\beta} \right) \quad [3.26]$$

Aproximación de métodos híbridos (de conexión adiabática)

Los métodos híbridos han sido los empleados en esta tesis doctoral y son una combinación entre el potencial exacto de la teoría de Hartree-Fock con los potenciales de correlación e intercambio. Suponen una combinación entre el cálculo del potencial considerando la interacción entre electrones, así como la no interacción electrónica que se ha descrito anteriormente. Esta combinación se hace a través de la fórmula de corrección adiabática (ACF).¹¹⁸

$$E_{XC} = \int_0^1 \langle \psi_\lambda | V_{xc}(\lambda) | \psi_\lambda \rangle d\lambda \quad [3.27]$$

Donde V_{XC} es el potencial de correlación e intercambio, λ es un valor entre 0 y 1 ψ_λ es la función de onda en el estado λ . Suponiendo una variación lineal de V_{XC} con λ , la integral se expresa como el valor medio entre los dos límites para los que la integral está definida:

$$E_{XC} \approx \frac{1}{2} \langle \psi_0 | V_{xc}(0) | \psi_0 \rangle + \frac{1}{2} \langle \psi_1 | V_{xc}(1) | \psi_1 \rangle \quad [3.28]$$

λ es el término encargado de “activar o desactivar” la interacción entre electrones, cuando $\lambda = 0$ los electrones son no interaccionantes y no hay, por tanto, energía de correlación, sólo de intercambio. En este estado la energía calculada coincide exactamente con la de Hartree-Fock. Por el contrario, para $\lambda = 1$, todos los electrones son interaccionantes y el segundo término de la ecuación permanece desconocido. Es en este punto donde se definen los funcionales híbridos:

B3LYP (Becke, 3-parameter, Lee-Yang-Parr functional)

Este funcional es un híbrido entre la energía exacta de Hartree-Fock y LSDA.¹¹⁹ Inicialmente, en el trabajo publicado por Becke,¹²⁰ se utilizó en su formulación el funcional para correlación de Perdew y Wang (PW).^{121,122} Este modelo fue reemplazado por otro que incluye el funcional LYP, (ecuación [3.24]) junto con el funcional VWN para la correlación local, de tal forma que existe una diferenciación entre los coeficientes de correlación locales y debidos al gradiente, tomando el funcional la forma que refleja la ecuación [3.29].

$$E_{XC}^{B3LYP} = (1 - a_0)E_X^{LSDA} + a_0E_X^{HF} + a_x\Delta E_X^B + a_cE_C^{LYP} + (1 - a_0)E_C^{VWN} \quad [3.29]$$

siendo a_0 , a_x y a_c coeficientes obtenidos a través de cálculos experimentales de calores de formación de moléculas pequeñas. El término 3 del nombre B3LYP se corresponde con los funcionales VWN, LSDA y la energía de Hartree-Fock (E_X^{HF}).

El funcional B3LYP junto con el juego de bases 6-31G(d), que se describirá más adelante, constituye uno de los modelos químicos más utilizados por la relación precisión/coste computacional que presenta, y sirve como punto de partida para cálculos computacionales más avanzados. Aunque el funcional B3LYP ha tenido buenos resultados en la optimización de estructuras moleculares, así como en el cálculo de frecuencias de vibración, su uso no es recomendable para la estimación de propiedades termoquímicas.¹²³

M06-2X

Este funcional, creado en 2006, es no local, contiene dos términos para el proceso de intercambio y está parametrizado para átomos no metálicos. Se define de acuerdo a la ecuación [3.30]:

$$E_{XC}^{M06-2X} = \frac{X}{100} E_X^{HF} + \left(1 - \frac{X}{100}\right) E_X^{M06-2X} + E_X^{M06-2X} \quad [3.30]$$

Donde X es el porcentaje de intercambio de Hartree-Fock, y E_X^{M06-2X} y E_C^{M06-2X} son las energías de intercambio y correlación del funcional M06-2X respectivamente y se encuentran definidos en la publicación original del funcional.¹²⁴

M06-2X es aplicable para el tratamiento termoquímico y cinético de los átomos de los grupos principales de la tabla periódica, así como para el tratamiento de interacciones no covalentes como son las interacciones por puente de Hidrógeno. $\omega B97X-D$

Este funcional pertenece a los llamados funcionales DFT-D, que incorporan correcciones empíricas para la dispersión. Fue publicado en 2008 por Chai y Head-Gordon¹²⁵ y tiene la forma:

$$E^{\omega 97X-D} = E^{\omega 97X} + E_{disp} \quad [3.31]$$

$E^{\omega 97X}$ es un funcional definido por los mismo autores¹²⁶ como:

$$E_{XC}^{\omega 97X} = E_X^{LR-HF} + c_X E_X^{SR-HF} + E_X^{SR-B97} + E_C^{B97} \quad [3.32]$$

Donde LR y SR se refieren a funcionales de intercambio con correcciones de las interacciones de largo alcance y corto alcance respectivamente, c_X es un coeficiente y B97 hace referencia al funcional desarrollado por Becke¹²⁷ en 1997 y que para el proceso de intercambio ha sido alterado con modificaciones para las interacciones de corto alcance (SR-B97).

E_{disp} es la energía de dispersión, que se incluye como un término de corrección empírico en la ecuación [3.31] definida por la ecuación [3.33].

$$E_{disp} = - \sum_{i=1}^{Nat-1} \sum_{j=i+1}^{Nat} \frac{C_6^{ij}}{R_{ij}^6} f_{damp}(R_{ij}) \quad [3.33]$$

siendo N_{at} el número de átomos del sistema, C_6^{ij} es el coeficiente de dispersión por cada par atómico ij , y R_{ij} la distancia interatómica. La función de damping viene definida por la ecuación [3.34].

$$f_{damp} = \frac{1}{1 + a(R_{ij}/R_r)^{-12}} \quad [3.34]$$

R_r es la suma de los radios de Van der Waals para cada par atómico ij y a es un parámetro no lineal que controla la magnitud de las correcciones de la dispersión.

Este funcional incorpora correcciones para las interacciones de largo alcance, lo que hace que sea aplicable al estudio de proteínas y polinucleótidos. Su precisión es la más alta de todos los modelos teóricos descritos anteriormente, habiéndose obtenido resultados mejores que con B3LYP o los de tipo M06.¹²⁸

III.1.4. QM/MM (ONIOM)

En sistemas complejos y con un gran número de átomos, como son las proteínas y los ácidos nucleicos, el uso de la mecánica cuántica, aunque sea a un nivel bajo de teoría, supone un coste computacional elevado, especialmente cuando sólo interesa el estudio en una zona muy concreta del sistema. Como alternativa se utilizan cálculos híbridos que combinan la exactitud de la mecánica cuántica (QM) con la rapidez de la mecánica molecular (MM).¹²⁹ En este trabajo, el sistema elegido para aplicar la combinación QM/MM ha sido ONIOM¹³⁰⁻¹³² (Our n-layered integrated molecular orbital and molecular mechanics), que está basado en un sistema de capas en el que cada una representa un nivel de teoría. Aunque pueden utilizarse varias capas, en los cálculos realizados en esta tesis se han empleado dos: la alta, que es la más pequeña y en la que se incluyen las partes del sistema de mayor interés, tratadas con mecánica cuántica. La baja, aquella estudiada con mecánica molecular y que supone el entorno en el que se encuentra la capa alta. En la frontera entre átomos unidos entre sí, pero pertenecientes a distintas capas el cálculo se realiza sustituyendo, en cada caso, uno de los átomos por Hidrógeno.

III.2. Bases de cálculo

Las bases de cálculo son conjuntos de funciones matemáticas que representan los orbitales moleculares mediante combinación lineal de estas. Se

basan en sustituir la función de onda desconocida de la que se obtendría la solución exacta de la ecuación de Schrödinger, que resulta desconocida, por un grupo de funciones conocidas, tal que, si su número se expandiera hasta el infinito, serían también solución exacta, pero su coste computacional sería muy alto. Así, se trabaja con un número finito de bases en el que las componentes de los orbitales moleculares solo están definidos a lo largo de las coordenadas que el juego de bases defina. Cuanto menor es el juego de bases peor es la correspondencia con la energía calculada y, cuanto más capaz sea cada base de reproducir la función desconocida, menos bases serán necesarias para alcanzar el nivel de exactitud deseado.

Existen dos tipos de bases, las de orbitales tipo Slater (STO)¹³³ y las de tipo Gaussiano (GTO)¹³⁴ que son las utilizadas en esta tesis y que en términos tanto de coordenadas esféricas como radiales, se expresan con las formas:

$$\chi_{\zeta,n,l,m}(r, \theta, \varphi) = NY_{l,m}(\theta, \varphi)r^{(2n-2-l)}e^{-\zeta r^2} \quad [3.35]$$

$$\chi_{\zeta,l_x,l_y,l_z}(x, y, z) = Nx^{l_x}y^{l_y}z^{l_z}e^{-\zeta r^2} \quad [3.36]$$

N es una constante de normalización, $Y_{l,m}$ son funciones esféricas armónicas, l_x , l_y y l_z son valores tal que su suma determina el tipo de orbital ($l_x + l_y + l_z = 0$ es un orbital s, $l_x + l_y + l_z = 1$ es un orbital p y $l_x + l_y + l_z = 2$ es un orbital d), r es la distancia electrón-núcleo y ζ es una constante relacionada con la carga efectiva del núcleo. Cada una de estas funciones, se denominan funciones primitivas Gaussianas (PGTO) y el conjunto y tipo de ellas define el juego de bases. El número más pequeño de funciones posibles para definir un sistema se denomina juego de bases mínimo, y se emplean en la obtención de resultados cualitativos de moléculas grandes.

Unas mejoras en el uso de juegos de bases son las llamadas bases doble zeta (DZ), consistentes en doblar el número de funciones para cada orbital, siendo una función más compacta (la más interna) y otra más difusa (la más externa), como se muestra en la Figura III.4. Así, por ejemplo, para el orbital 1s se tendría también la función para $1s'$, de forma que se consigue una mejor descripción de los orbitales puesto que dependiendo del sistema estudiado, la distribución de electrones es diferente en cada dirección del eje de coordenadas. Existe una variación de las bases

DZ, denominada bases de valencia dividida (también llamadas bases doble zeta de valencia, VDZ) en el que solo se doblan las funciones para los orbitales de valencia, e incluso existen las bases triple Z y cuádruple Z que triplican y cuadruplican el número de PTGO respectivamente.

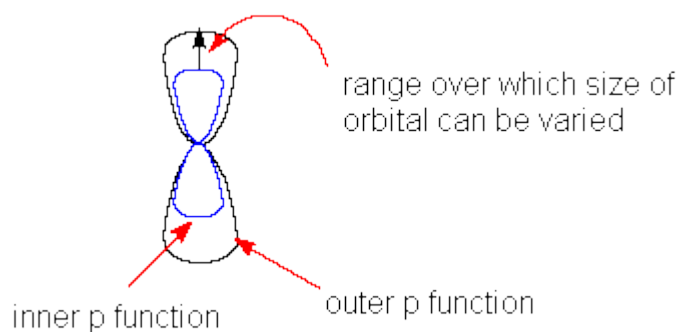


Figura III.4. Ejemplo de las funciones compacta y difusa en un juego de bases de valencia dividida.

Dada la pobreza de los PGTO para describir los sistemas en las inmediaciones del núcleo en comparación del coste computacional que requieren, pueden realizarse combinaciones lineales de funciones primitivas agrupándolas bajo un mismo coeficiente de contracción, lo cual resulta en la disminución del número de funciones empleadas y del tiempo de cálculo. Estas funciones son conocidas como GTO contraídas (CGTO) y cada uno de ellas se genera a través de la ecuación [3.37]:

$$\chi(CGTO) = \sum_i^k a_i \chi_i(PTGO) \quad [3.37]$$

donde i y k definen el grado de contracción, es decir el número de PTGO usadas para la contracción y a_i es el coeficiente de contracción que indica qué porcentaje de cada función primitiva participa del CTGO final.

La variedad de juegos de bases, así como su clasificación es muy amplia y su utilización depende del sistema que se esté estudiando. A continuación, se detallan los juegos de bases utilizados en esta tesis.

III.2.1. 6-31G

Fue creada por Pople y colaboradores¹³⁵ en 1972 y forma parte de uno de los llamados juegos de bases de Pople. Es un juego de bases tipo Gaussiano de fórmula general $k-nlmG$. Son un tipo de juegos de bases de valencia dividida, donde k representa el número de PTGO empleadas para describir los orbitales del núcleo y nlm indica el número de funciones en las que se han dividido los orbitales de valencia y cuantas PTGO se usan para su representación. Así en 6-31G los orbitales del núcleo son una contracción de seis PTGO, la parte interna de los orbitales de valencia es una contracción de tres PTGO y la parte externa está representada por un PTGO.

III.2.2. 6-31G(d)

Este juego de bases es igual a la anterior, con la inclusión de 6 funciones Gaussianas para representar la polarización, que en la nomenclatura de los juegos de bases se denota indistintamente por d o $*$. En los juegos de bases de valencia dividida las funciones compactas y densas permiten un cambio del tamaño del orbital pero no de su forma. Esto se corrige con la inclusión de funciones de polarización (Figura III.5) que añaden orbitales con momentos angulares más allá del que los átomos necesitan para ser definidos en el estado fundamental. En concreto 6-31G(d) incluye funciones d para los átomos pesados.¹³⁶

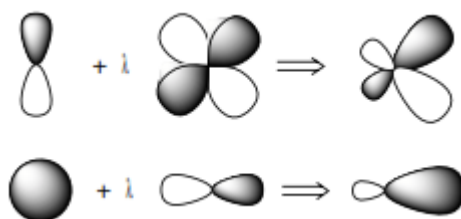


Figura III.5. La adición de funciones d a orbitales p (arriba) y de funciones p a orbitales s (abajo) modifica la forma de estos.

III.2.3. LANL2DZ

Este juego fue desarrollado por Way y Had¹³⁷⁻¹³⁹ en 1985 y pertenecen al tipo de juegos de bases de potencial efectivo en el núcleo (ECP).^{140,141} La creación

de este potencial efectivo, o pseudopotencial, se emplea cuando se trabaja con átomos pesados, ya que el gran número de electrones que poseen hace que el número de funciones necesarias para describirlos sea muy elevado y por consiguiente, su coste computacional sea inviable. En general, para un átomo, son los electrones de valencia los que más interesan para describir el sistema, sin embargo, no pueden obviarse el resto de electrones de las capas internas, de otra forma, la descripción de los orbitales de la capa de valencia no sería correcta. Así, los electrones de las capas internas son tratados con una única función, con la forma:

$$U_{\text{ECP}}(r) = \sum_i a_i r^{n_i} e^{-\alpha_i r^2} \quad [3.38]$$

donde a_i , n_i y α_i dependen de los orbitales a los que hagan referencia y son determinados por ajuste de mínimos cuadrados.

III.3. Tratamiento del disolvente

Todos los cálculos teóricos de esta tesis doctoral han sido realizados simulando agua como disolvente. Dado que la consideración de todas las moléculas de agua del disolvente es computacionalmente impracticable, en esta tesis se ha seguido el denominado modelo continuo polarizable (PCM) creado por Tomasi y colaboradores.¹⁴² En este modelo se considera al disolvente como un medio homogéneamente polarizable en el que el soluto ocupa una cavidad del mismo y está formado por átomos que son representados por esferas de van de Waals con cargas puntuales que generan dipolos eléctricos, que a su vez genera un dipolo en el disolvente, resultando un campo eléctrico que vuelve a interactuar con el soluto. La generación de estos dipolos crea un espacio que el disolvente no es capaz de atravesar (SES) y un espacio que sí es accesible al disolvente (SAS). La Figura III.6 muestra un esquema del modelo PCM.

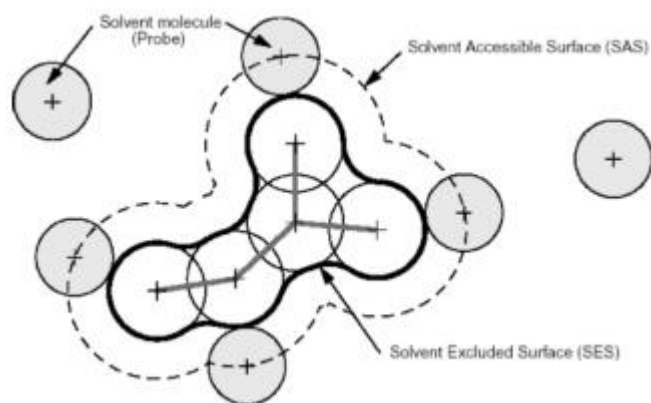


Figura III.6. Representación del modelo PCM de Tomasi y colaboradores.

III.4. Instrumentación

Los cálculos computacionales realizados en esta tesis han sido realizados tanto en la Universidad de Cardiff como en la Universidad de Burgos.

III.4.1. Supercomputador de la Universidad de Cardiff (Raven)

El equipo de cálculo está basado en Linux y consta de 2048 núcleos de procesadores Intel Sandy Bridge (2,6GHz/ 4GB por núcleo/ 8 núcleos por procesador) actuando como principal partición paralela MPI. Adicionalmente tiene 864 núcleos de procesadores Intel Westmere (2,8 GHz/ 3GB por núcleo/ 6 núcleos por procesador) colocados en serie y actuando como sistema de procesamiento secundario. Está configurado con 8+TB de memoria total con 50TB de almacenamiento paralelo con el sistema de archivos Lustre, así como 100TB de almacenamiento NFS para almacenamientos más prolongados en el tiempo. Los nodos están interconectados con la tecnología InfiniBand QDR (40Gbps/ 1,2 μ s de latencia).

III.4.2. Supercomputador de la Universidad de Burgos

El centro de supercomputación consta de un Clúster Xeon de 32 bits, formado por 32 nodos con 4 núcleos cada uno de ellos. El sistema operativo utilizado es RocksCluster 5.3 basado en CentOS 5.6. Además, está conformado por varios equipos que suman un total de 16 procesadores Itanium 2, 64 Intel Xeon a 1.3GHz cada uno y 10TB de capacidad de almacenamiento total.

Capítulo IV
Interacción de Tionina con
ARN de Triple, Doble y
Hélice sencilla

IV. Interacción de Tionina con ARN de Triple, Doble y hélice sencilla. *J. Phys. Chem. B* 117, 38–48 (2013)

En este capítulo se describe el modo de interacción del ligando Tionina con ARN en triple hélice, poly(rA)·2poly(rU), en doble hélice, poly(rA)·poly(rU), y en hélice sencilla, poly(rU).

El ligando Tionina es un derivado de la acridina. Este grupo de compuestos orgánicos actúan como agentes intercalantes⁸² o como Groove binders¹⁴³ frente al ADN pero su comportamiento frente a ARN es poco conocido. Tionina presenta una estructura completamente plana, con dos grupos amino entre los carbonos C3 y C7 y es monocatiónico en condiciones fisiológicas, características ambas que le confieren el carácter de agente modelo para el estudio de su interacción con polinucleótidos. La importancia del estudio de la interacción de ligandos con ARN radica en el papel que juega en diversos procesos biológicos como la transcripción, la traducción (síntesis de proteínas) y como catalizador de reacciones celulares.¹⁴⁴ El estudio “in vitro” de la interacción de ligandos y moléculas análogas al ARN como son el poly(rA)·poly(rU), poly(rA)·2poly(rU) y poly(rU) permite predecir su potencial uso como agente antitumoral. Puesto que Tionina intercala en ADN,¹⁴⁵ el estudio con ARN nos ha permitido comparar su comportamiento y afinidad por estos dos tipos de sistemas biológicos.

El estudio se ha realizado desde puntos de vista cinético y termodinámico. En cuanto al estudio termodinámico se han utilizado técnicas de espectroscopía de absorbancia, fluorescencia, dicroísmo circular, calorimetría diferencial de barrido (DSC) y viscosimetría. La reactividad y el mecanismo de reacción se estudió con la técnica de relajación por salto de temperatura (T-Jump).

Los resultados de este capítulo muestran que el tipo de interacción de Tionina depende del tipo de ARN y de la fuerza iónica. A $I = 0.1M$, se intercala parcialmente entre secuencias Adenina-Uracilo de la doble hélice mientras que en la triple hélice se une al surco menor al estar el surco mayor ocupado por la segunda hebra de poly(rU). La afinidad de Tionina es mayor por la doble que por la triple

hélice. La Figura IV.1 muestra el complejo de unión al surco Tionina/poly(rA)·2poly(rU). La mayor afinidad de Tionina por poly(rA)·poly(rU) provoca que la hebra de poly(rU) unida en poly(rA)·2poly(rU) por enlaces Hoogsteen se separe generando el complejo externo Tionina/poly(rU) más el intercalado Tionina/ poly(rA)·poly(rU). Este proceso es poco frecuente ya que coincide con la desnaturalización de la triple hélice a 25 °C, mientras que en general, la desnaturalización es un proceso asociado al aumento de temperatura. Es decir, la desnaturalización del complejo Tionina/poly(rA)·2poly(rU) difiere de los procesos de desnaturalización clásicos que ocurren al calentar la muestra a temperatura superior a la de desnaturalización térmica o melting T_m . Ésta depende fuertemente del sistema y de la fuerza iónica, pero en sistemas conteniendo ADN o ARN es muy superior a 25 °C.

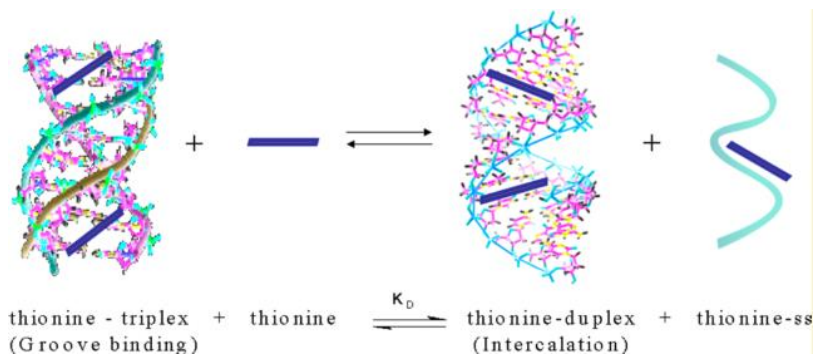


Figura IV.1. Mecanismo de desnaturalización isotérmica del complejo Tionina/poly(rA)·2poly(rU).

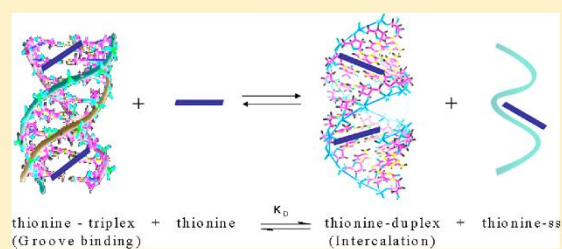
Interaction of Thionine with Triple-, Double-, and Single-Stranded RNAs

Héctor J. Lozano, Begonia García,* Natalia Busto, and José M. Leal

Chemistry Department, University of Burgos, 09001 Burgos, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: The interaction of thionine with triple, double, and single RNA helices has been fully characterized by thermodynamic and kinetic methods. The nature of the interaction of thionine with the synthetic polynucleotides poly(rU), poly(rA)·poly(rU), and poly(rA)·2poly(rU) has been studied at pH = 7.0 and 25 °C by UV absorbance, fluorescence, circular dichroism spectroscopy, viscometry, differential scanning calorimetry, and T-jump kinetic measurements. The results show that at $I = 0.1$ M thionine binds to a single poly(rU) strand, destabilizes the poly(rA)·2poly(rU) triplex by external binding, and intercalates into poly(rA)·poly(rU) with similar affinity to the thionine/DNA intercalated complex (Paul, P.; Kumar, G. S. J. *Fluoresc.* 2012, 22, 71–80). On the other hand, the differential scanning calorimetry measurements performed with thionine display a point in which the heat capacity remains unaltered, revealing the equilibrium of isothermal denaturation: thionine/poly(rA)·2poly(rU) + thionine \rightleftharpoons thionine/poly(rA)·poly(rU) + thionine/poly(rU), an outcome supported by the other techniques used. The denaturation equilibrium constant, K_D (25 °C) = 522 M^{-1} , was evaluated from the affinity with the single, duplex, and triplex RNA.



1. INTRODUCTION

The biological activity of acridine derivatives as mutagens, antimicrobial, antimalarial, or bactericide agents is related to their nucleic acids binding properties.² Thionine (3,7-diamino-5-phenothiazinium), Figure 1, a fully planar tricyclic heter-

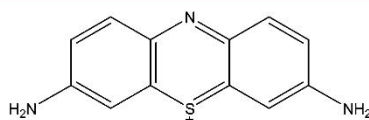


Figure 1. Thionine (3,7-diamino-5-phenothiazinium).

oatomic derivative with two amine groups at the C3 and C7 sites,³ is monocationic under physiological conditions, and it has been studied because of its intercalative binding with DNA.

Thionine has been used to induce photodynamic inactivation of bladder cancer cells, *Escherichia coli*, and *Saccharomyces cerevisiae*.⁴ Previous studies have revealed mutagenic activity in eukaryotic cells,⁵ demonstrating also potential cytotoxic and genotoxic activity in prokaryotic cells and photoinduced mutagenic action upon binding to DNA.⁶ The biological activity of thionine has also been employed in graphene-based immunosensors.⁷ Thionine interacts with double-stranded DNA and, to less extent, with single-stranded DNA via intercalation,^{1,8} showing a pronounced preference for the alternating GC sequences followed by the polyG-polyC sequences.⁹ Recently, theoretical analyses of the binding of thionine with *Clostridium perfringens* (CP) DNA duplex have been reported

to explain the melting behavior and heat capacity of this system. Growing interest has emerged in polynucleotide structures different from typical double helices, which may play important roles in biology; in this regard, thionine has been shown to bind quadruplex structures via external stacking.¹⁰ These and other interesting properties of thionine are explained by the molecular features of its interaction with nucleic acids. The elucidation of the molecular aspects of the interaction of aromatic molecules with DNA and RNA has been the subject of investigation since the discovery of these structures. Despite all these studies, little is known about the thionine binding to RNA.

RNA is involved in a number of processes in the regulation of gene expression and can adopt numerous structures and conformations, displaying several cell functions and consequently providing specific binding sites for small molecules.^{11,12} These conformations offer attractive potential targets for drugs able to bind specifically to such structures and can inhibit the viral transcription.¹³

To gain a better knowledge of RNA-based small-molecule therapeutics, a detailed study of the drug interaction to various RNA conformations, single-, double-, and triple-stranded, is undertaken here. The homopolymer poly(rA)·poly(rU) consists of two poly(rA) and poly(rU) attached chains to give a secondary structure with an endo fold at C3 of furanose rings.¹⁴

Received: August 7, 2012

Revised: November 28, 2012

Published: December 3, 2012

Its interaction with different ligands has relevance in the research of both the alteration of protein synthesis¹⁵ and the potential use as biological agent in the anticancer and antiviral therapy.

Triple helices have received a deal of attention as potential tools to control the gene expression^{16,17} and represent attractive targets for antisense¹⁸ and antigene-based¹⁹ therapeutic strategies. Stabilization of triple-helical structures can be attained by intercalators,^{13,20,21} especially covalently linked to the third strand,^{22,23} whereas intercalators not covalently linked can either stabilize²⁴ or destabilize²⁵ triple-helix structures. The poly(rA)·2poly(rU) RNA triplex helix is essentially a poly(rA)·poly(rU) double helix with a poly(rU) chain inserted into the major groove and was first reported by Felsenfeld et al. in 1957.²⁶ The adenine groups of the third strand bind uracil groups in the same way as in viral genomes and mRNA.¹⁴ It has been reported that poly(rA)·2poly(rU) becomes destabilized upon addition of ethidium bromide (EB) to such an extent that, at high dye-to-polymer ratio, the triple-strand structure can be destroyed.²⁷ A minor destabilizing effect was observed with proflavine, in which the binding is intercalative at low dye-to-polymer ratio, whereas the external binding dominates at high ratio.²⁸ We have reported earlier new aspects on the interaction of the antibiotic coralyne, which induces the formation of triple helix in poly(rA)·poly(rU).²⁹ Comparison of the binding of the same drugs with duplex and triplex reveals that insertion of the third strand into the major groove plays a key role in the kinetic and thermodynamic behavior. In general, the activity of the dye is the result of a set of variables such as dye geometry or protons adjacent to polynucleotide chains and functional groups.³⁰ The behavior of thionine with different synthetic RNA conformations (poly(rU), poly(rA)·poly(rU), and poly(rA)·2poly(rU)) is studied here to determine whether thionine selectively recognizes the RNA conformation and to learn the interactional affinity and the underlying mechanism of binding. Attention is focused on the characterization of the binding processes and conformational changes induced by thionine using a combination of static and dynamic methods.

2. MATERIALS AND METHODS

Thionine acetate, poly(rA)·poly(rU), and poly(rU) were purchased from Sigma-Aldrich. Doubly distilled water from a Millipore Q apparatus (APS, Los Angeles, California) was used. Stock solutions were prepared in [NaCl] = 0.01 or 0.1 M, using 2.5×10^{-3} M sodium cacodylate [$(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2\text{Na}$] as a buffer to maintain the pH at 7.0. The polynucleotide concentration was evaluated spectrophotometrically at $\lambda = 260$ nm using $\epsilon = 14\,900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for poly(rA)·poly(rU) and $\epsilon = 8900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for poly(rU).³¹ Poly(rA)·2poly(rU) was prepared by mixing equimolar amounts of poly(rA)·poly(rU) and poly(rU) and incubating the mixture at 25 °C for 24 h, a time range in which the triple helix is formed. The polynucleotide concentration, C_p , is expressed in molarity of base pairs for poly(rA)·poly(rU) and base triplets for poly(rA)·2poly(rU). The thionine concentration is denoted as C_D . pH measurements were carried out with a Metrohm 16 DMS Titrimo pH meter, fitted with a combined glass electrode with a 3 M KCl solution as a liquid junction.

Spectrophotometric measurements were performed with a Hewlett-Packard 8453A (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) photodiode array spectrophotometer with a Peltier temperature control system. Titrations were carried out by adding increasing amounts of polynucleotide solutions to the thionine solution in

the cell. The sample was not illuminated during the equilibration period. Titrations were performed at 25 °C and analyzed at $\lambda = 600$ nm. The data were corrected for dilution (C_D^0/C_D). Thermal denaturation studies were carried out by heating the dye/polynucleotide solution from 20 to 90 °C at 0.2 °C/min scan rate. The system was allowed to equilibrate for at least 1 min before measurements.

Spectrofluorimetric measurements: fluorescence titrations were performed on a Shimadzu Corporation RF-5301PC spectrofluorometer (Duisburg, Germany) at $\lambda_{\text{ex}} = 565$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 620$ nm. The titrations were carried out as described for absorbance titrations. Fluorescence quenching measurements were obtained using $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 1×10^{-2} M as a quencher. Measurements were performed by adding increasing amounts of $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ solution directly to the cell containing the dye and dye/polynucleotide system.

Differential scanning calorimetry (DSC): thermal denaturation studies were performed with a nano DSC (TA Instruments, Newcastle, U.S.A.). Cells were 300 μL platinum capillary tubes. Measurements were performed by heating the dye/polynucleotide system from 20 to 90 °C, at 1 °C/min scan rate and 3 atm pressure.

Circular dichroism (CD) measurements were performed with a MOS-450 biological spectrophotometer (Bio-Logic SAS, Claix, France) fitted out with a 1.0 cm path length cell. Titrations were carried out at 25 °C by adding increasing amounts of the dye to the polynucleotide solution. Spectrograms were obtained in the 200–800 nm range at 2 nm/s speed. CD thermal stability measurements were carried out in the 30–80 °C range; the system was allowed to stabilize for 5 min at the working temperature. Molar ellipticity ($\text{deg M}_{\text{BP}}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) was calculated using $[\theta] = 100\theta/C_p l$, where C_p is the polynucleotide concentration (M_{BP}) and l is the cell light path (cm).

Viscosity measurements were performed using a Micro-Ubbelohde viscometer whose temperature was controlled by an external thermostat (25 ± 0.1 °C). The viscosity data were analyzed using $\eta/\eta_0 = (t - t_0)/(t_{\text{DNA}} - t_0)$, where t_0 and t_{DNA} are the solvent and polynucleotide solution flow times, respectively, whereas t is the flow time of the thionine and DNA mixture. Mean values of replicated measurements were used to evaluate the sample viscosity, η , and that of DNA alone, η_0 .³²

Kinetics experiments were carried out using a Dialog T-jump instrument in the fluorescence mode ($\lambda_{\text{exc}} = 565$ nm and $\lambda_{\text{emi}} = 620$ nm). To minimize thionine photobleaching, the sample was illuminated only during the short time period needed for measurements. The dependence rate on the reactants concentration has been investigated by varying both thionine and polynucleotide concentrations. The kinetic curves were collected by an Agilent DSO6032A (Palo Alto, CA) storage oscilloscope, transferred to a computer, and analyzed with the fitting package by Jandel (AISN software, Mapleton, OR). Each shot was repeated at least eight times, and the resulting relaxation curves were achieved by accumulation.

3. RESULTS

3.1. Equilibria. The binding of thionine to the three RNA structures used can be represented by the apparent reaction 1:



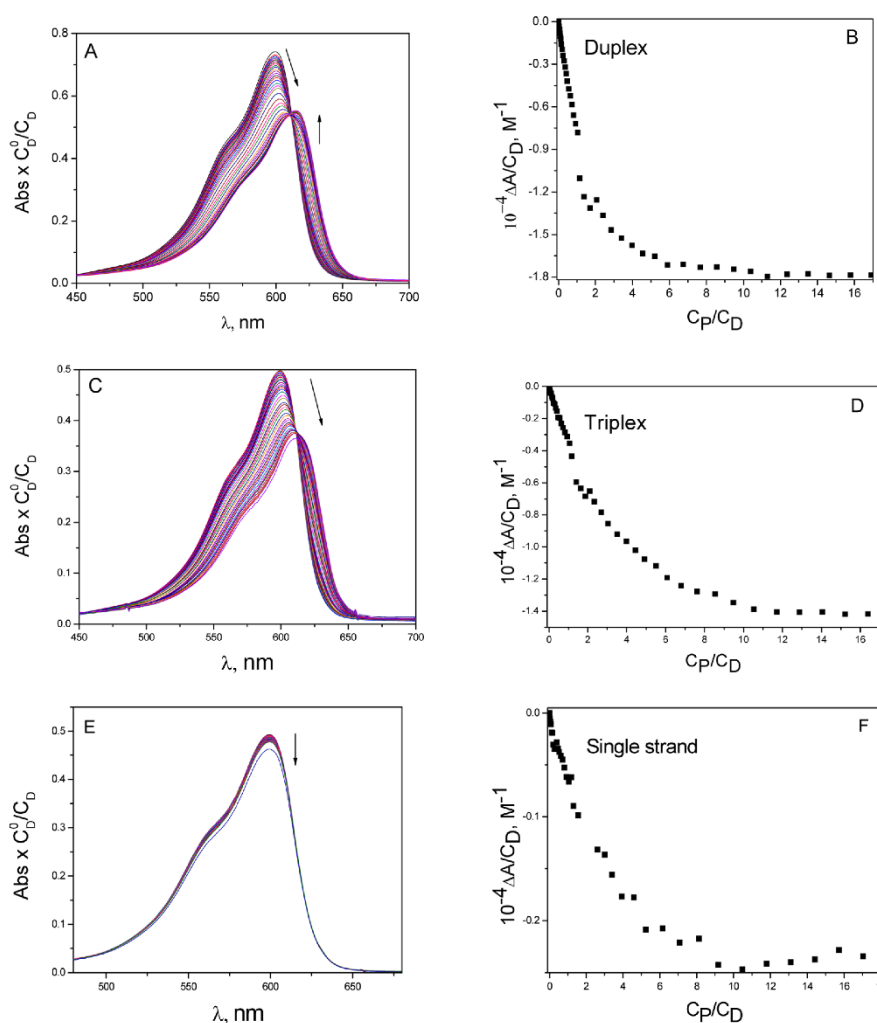


Figure 2. Absorbance spectra corrected by dilution (C_D^0/C_D) and binding isotherms for the titration of thionine with duplex (A and B), $C_D^0 = 1.37 \times 10^{-5}$ M, triplex (C and D), $C_D^0 = 1.22 \times 10^{-5}$ M, and single strand (E and F), $C_D^0 = 1.22 \times 10^{-5}$ M. $\lambda_{\max} = 600$ nm, $I = 0.1$ M (NaCl), pH = 7.0, and $T = 25$ °C.

where P denotes the poly(rU) (single strand, ss), poly(rA)·poly(rU) (duplex), and poly(rA)·2poly(rU) (triplex) polynucleotide free sites, D stands for free thionine, and PD is the complex formed. The equilibrium concentrations will be denoted as [P], [D], and [PD], respectively.

The spectra and binding isotherms for thionine–duplex, thionine–triplex, and thionine–ss are shown in Figure 2A–F. The curves are monophasic at $I = 0.1$ M. The spectra recorded during the titration of thionine by triplex (Figure 2C) was similar to that described for the titration of thionine by duplex (Figure 2A); a decrease in absorbance intensity at 600 nm, an isosbestic point at 610 nm, and a 12 nm bathochromic shift are observed. Even fewer spectral changes were observed for thionine–ss, with only a hypochromic effect at 600 nm devoid of isosbestic point (Figure 2E).

At the lowest ionic strength used, $I = 0.01$ M, two different processes were observed as the C_P/C_D ratio was raised (Supporting Information Figure 1SI). When the ionic strength

was increased up to 1 M (data not shown), the salt effect makes the data analysis difficult, as long as ionic strength clearly affects the interaction of thionine with double-stranded RNA, indicating the significance of electrostatic interactions; electrostatics plays a key role in the intercalation of cationic ligands.^{33,34}

For all the systems studied, the interaction could be represented by reaction 1, except for thionine–duplex at $I = 0.01$ M (Supporting Information Figure 1SI). In this case, a more precise analysis of the biphasic isotherm was unfeasible, even after splitting the isotherm into two realms: a first from $C_P/C_D = 0$ –1.0, showing a decrease in absorbance intensity at $\lambda = 600$ nm, and a second from $C_P/C_D = 1.0$ –11, in which a hyperchromic effect is observed. The CD spectral curves displayed two types of complex species (see below), intercalated and external, corresponding to each realm.

The fluorescence spectra for thionine–duplex and thionine–triplex are collected in Supporting Information Figure 2SI along

Table 1. Binding Constants and Site-Size Parameter, n , Obtained for Thionine–Duplex, Thionine–Triplex, and Thionine–ss with Eq 2^a

thionine–duplex			thionine–triplex			thionine–ss	
n	$10^{-5} \times K_{app} M^{-1b}$	$10^{-5} \times K_{app} M^{-1c}$	n	$10^{-4} \times K_{app} M^{-1b}$	$10^{-3} \times K_{app} M^{-1c}$	n	$10^{-5} \times K_{app} M^{-1b}$
1	1.2 ± 0.15	1.1 ± 0.02	2	3.7 ± 0.23	6.0 ± 0.33	2	3.7 ± 0.57

^a $I = 0.1$ M (NaCl), pH = 7.0, and $T = 25.0$ °C. ^bAbsorbance titration. ^cFluorescence titration.

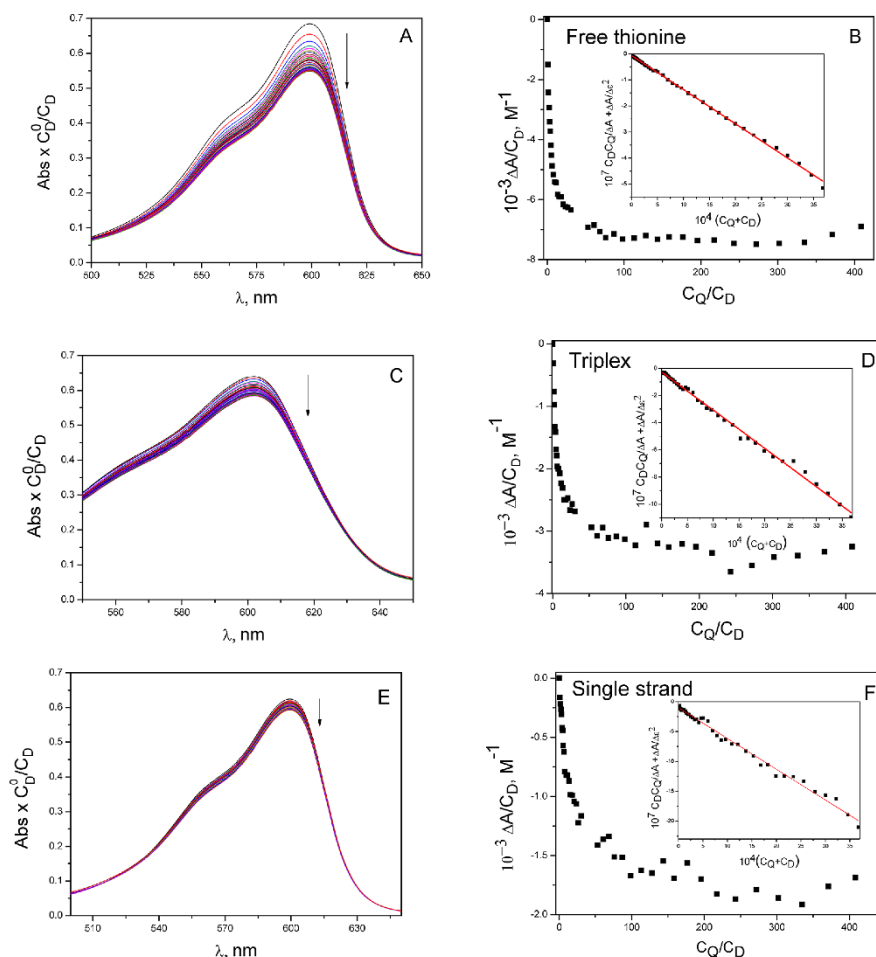


Figure 3. Absorption spectra (A, C, and E), binding isotherms (B, D, and F), and inset eq 4 plot obtained for (A and B) thionine/ $Fe(CN)_6]^{4-}$, (C and D) thionine–triplex/ $Fe(CN)_6]^{4-}$, and (E and F) thionine–ss/ $Fe(CN)_6]^{4-}$. $C_D/C_P = 0.1$. $C_Q = 1.00 \times 10^{-2}$ M, $C_D = 1.37 \times 10^{-5}$ M. $\lambda = 600$ nm, $I = 0.1$ M (NaCl), pH = 7.0, and $T = 25$ °C.

with the corresponding binding isotherms, which were monophasic. The fluorescence of thionine upon interaction with the duplex is quenched compared to triplex. For thionine–duplex, only a decrease in the fluorescence intensity was observed, whereas for the triple helix the decrease is accompanied by a 10 nm red shift. This behavior differs from that observed with other aminoacridines like proflavine,²⁸ in which a fluorescence increase is observed upon addition of duplex and triplex.

Except for thionine–ss (whose fluorescence isotherm could not be analyzed), the binding constants were evaluated from

the absorbance and fluorescence experiments at $I = 0.1$ M using the McGhee and von Hippel equation:³⁵

$$\frac{C_D}{\Delta A} = \frac{1}{\Delta \epsilon^2} + \frac{1}{K_{app} \Delta \epsilon} \frac{1}{[P]} \quad (2)$$

where $[P]$ stands for the equilibrium polynucleotide concentration calculated from the expression $[P] = C_P f(r)$, where $f(r) = (1 - nr)^n / [1 - (n - 1) - r]^{(1-n)}$, r being the ratio of the bound to free polynucleotide. The site size (n), the number of base pairs occupied by a single dye molecule upon binding, was calculated at low ionic strength, in which the complex is quantitatively formed. The intersection of the first real of the

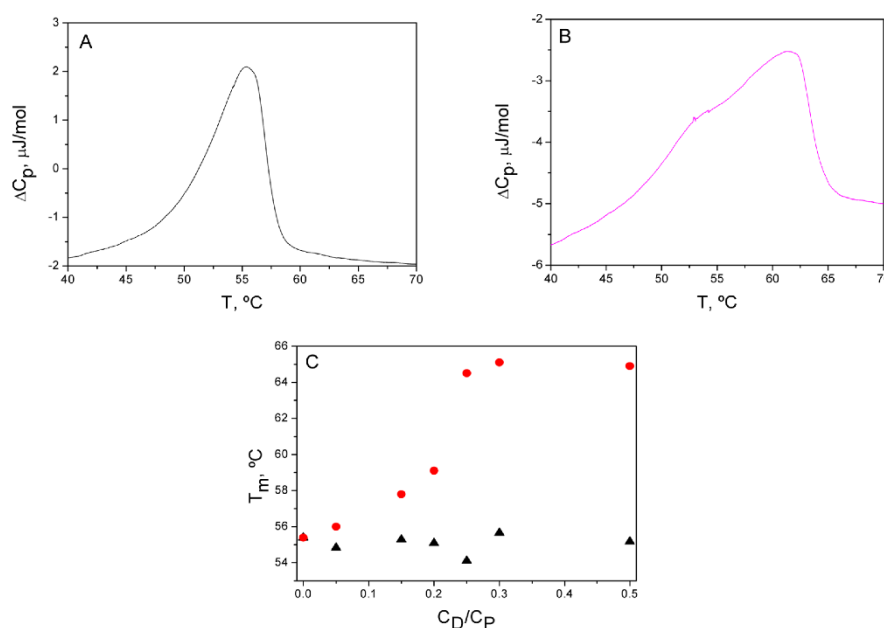


Figure 4. DSC melting plots for thionine–duplex: (A) $C_D/C_P = 0$; (B) $C_D/C_P = 0.25$. $C_P = 4.00 \times 10^{-4}$ M; scan rate, $1^\circ\text{C}/\text{min}$; $P = 3$ atm; $\text{pH} = 7.0$; $I = 0.1$ M (NaCl). (C) T_m vs C_D/C_P : (\blacktriangle) T_{mF} ; (\bullet) T_{mD} .

two branches of the titration curve yields the value of n on the X axis. The $C_D/\Delta A$ versus $1/[P]$ plot yields the K_{app} value by an iteration procedure. ΔA is calculated as $A - A_0$, A and A_0 being the absorbance of the dye in the presence of polynucleotide and the absorbance of the dye alone, and $\Delta\epsilon = \epsilon_{pD} - \epsilon_D$; note that in fluorescence experiments ΔA and $\Delta\epsilon$ are replaced by ΔF and $\Delta\phi$, respectively. Supporting Information Figure 3SI shows the McGhee and von Hippel fitting, and Table 1 collects the binding constants obtained.

3.2. Quenching. Quenching experiments constitute a reliable method to investigate the binding of nucleic acids and proteins. Quenching measurements were performed by adding increasing amounts of $K_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ to a constant free dye content in solution or bound to RNA in single strand, or double or triple helices. Thus, four sets of experiments were performed: thionine–ss, thionine–duplex, and thionine–triplex, all of them at $C_D/C_P = 0.1$, and free thionine as well. The F_0/F versus $K_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ data pairs were plotted (Supporting Information Figure 4SI) according to the Stern–Volmer equation $F_0/F = 1 + K_{SV} [Q]$ being the quencher concentration and F_0 and F the fluorescence emission intensity in the absence and in the presence of quencher, respectively. The nonlinear behavior observed even at the lowest quencher content reveals a complex behavior that entails different processes.

To gain a deeper insight onto possible quenching processes, the absorption spectra were recorded during the titration with $K_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ under the same conditions of the quenching experiments. The results corresponding to the interaction of the quencher with free thionine, thionine–triplex, and thionine–ss at $C_D/C_P = 0.1$ are shown in Figure 3, parts A, C, and E. No spectral changes were observed on addition of $K_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ to thionine–duplex at $C_D/C_P = 0.1$. This behavior reveals that ferrocyanide reacts with all three free thionine, thionine–ss, and thionine–triplex, whereas it does

not react with thionine–duplex. Parts B, D, and F of Figure 3 plot the binding isotherms, and the inset shows the graphical fittings to eq 3:

$$\frac{C_D C_Q}{\Delta A} + \frac{\Delta A}{\Delta\epsilon^2} = \frac{1}{K_Q \Delta\epsilon} + \frac{C_D + C_Q}{\Delta\epsilon} \quad (3)$$

The fluorophore–quencher formation constant, K_Q , was evaluated from the intercept. The values obtained at $\text{pH} = 7.0$, $I = 0.1$ M were $K_Q = (2.2 \pm 0.4) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ for the thionine/ $K_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ binary system and for the ternary systems $K_Q = (1.1 \pm 0.2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ for thionine–triplex/ $K_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ and $K_Q = (5.1 \pm 0.7) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ for thionine–ss/ $K_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

The similar values obtained for the K_Q constants of ferrocyanide/free thionine system and ferrocyanide/thionine–triplex complex suggest that an external thionine–triplex complex is formed. Absence of the ferrocyanide/thionine–duplex ternary complex is explained by the greater thionine affinity with the duplex compared to ferrocyanide (Table 1), and because the intercalated site does not favor the formation of the ternary complex. Summarizing, under the $C_D/C_P = 0.1$ conditions, only the free and external bound thionine in thionine–triplex and, to less extent, in thionine–ss are able to form complexes with ferrocyanide. A dynamic quenching effect must characterize the ferrocyanide complex, because the fluorescence diminishes in the presence of the polynucleotide (either duplex or triplex) with respect to free thionine (Supporting Information Figure 2SI).

3.3. Thermal Stability. The thionine effect on the thermal stability of the double and triple helices was evaluated by DSC. When thionine was added to duplex and the C_D/C_P ratio was raised, the denaturation process yielded two peaks. Parts A and B of Figure 4 show the evolution of the calorimetric curves for thionine–duplex at 0 and 0.25 C_D/C_P ratio. Two peaks appeared as the C_D/C_P ratio was raised from 0.15 to 0.50,

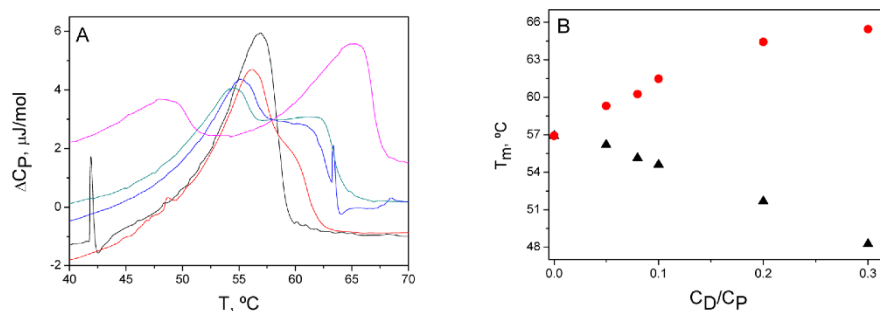


Figure 5. DSC Melting plots for thionine–triplex: $C_D/C_P = 0, 0.05, 0.08, 0.1, 0.2,$ and 0.3 . $C_P = 4.00 \times 10^{-4}$ M; scan rate, 1 $^\circ\text{C}/\text{min}$; $P = 3$ atm; $\text{pH} = 7.0$; $I = 0.1$ M (NaCl); $T = 20$ – 90 $^\circ\text{C}$. (B) T_{mD} vs C_D/C_P : (\blacktriangle) T_{mD} , (\bullet) T_{mT} ; $I = 0.1$ M (NaCl) and $\text{pH} = 7.0$.

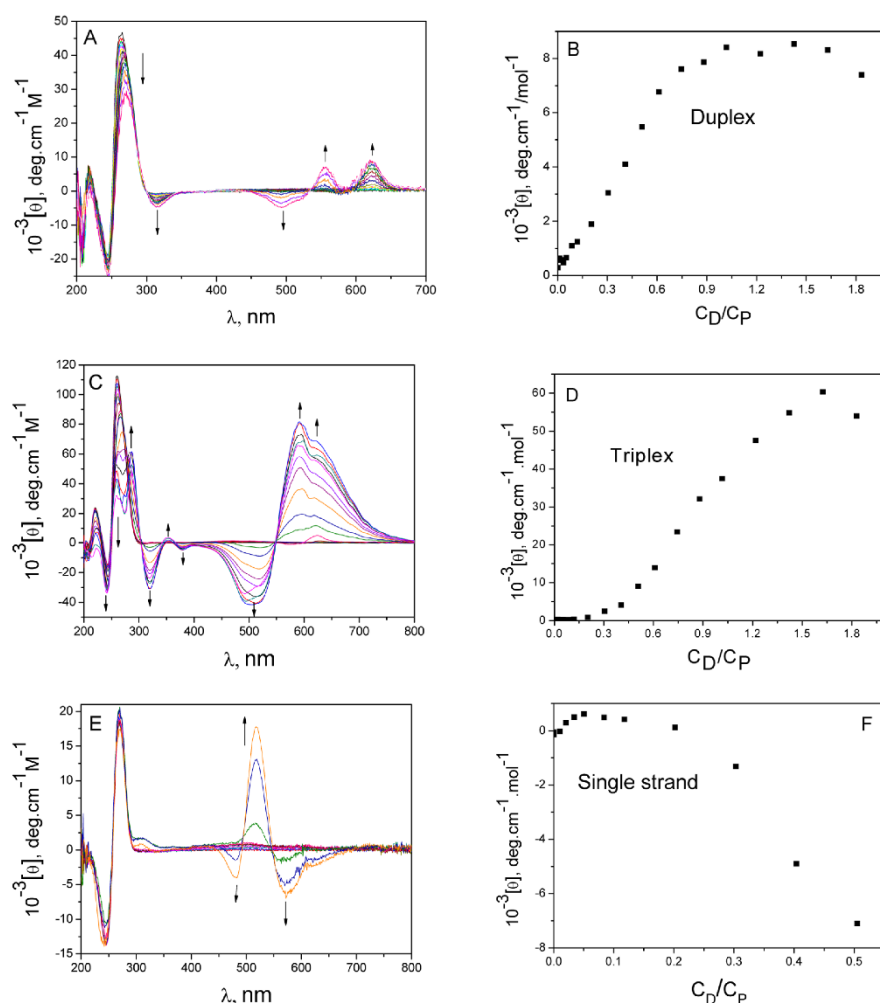


Figure 6. CD spectrograms (A, C, and E) and $[\theta]$ vs C_D/C_P plots (B, D, and F) for thionine–duplex (A and B), $C_D = 9.20 \times 10^{-4}$ M, $\lambda = 625$ nm; thionine–triplex system (C and D), $C_D = 9.00 \times 10^{-4}$ M, $\lambda = 625$ nm; thionine–ss (E and F), $C_D = 9.00 \times 10^{-4}$ M, $\lambda = 572$ nm. $I = 0.1$ M (NaCl), $\text{pH} = 7.0$, and $T = 25$ $^\circ\text{C}$.

revealing two melting processes. The left peak is assigned to melting of free duplex because the melting temperature (T_{mF}) was independent of the C_D/C_P ratio; the right peak corresponds

to denaturation of the duplex thionine–duplex to yield thionine–poly(rU) + thionine–poly(rA), T_{mD} being melting temperature. The T_{mD} value rose in 10 $^\circ\text{C}$ steps up to $C_D/C_P =$

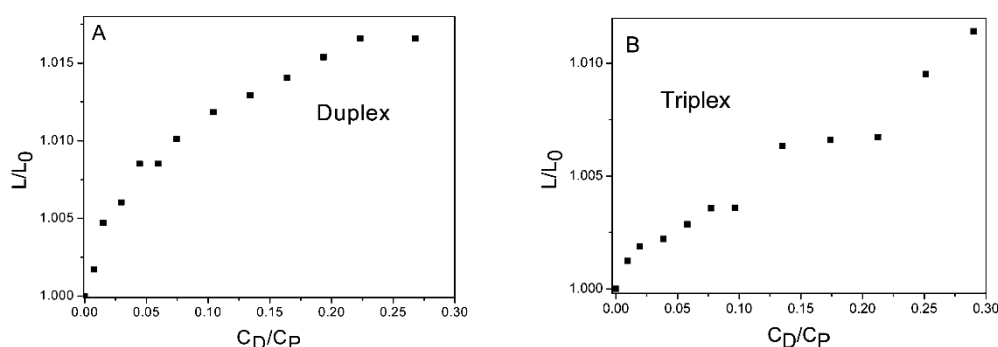


Figure 7. Relative contour length obtained for (A) thionine–duplex, $C_D = 1.00 \times 10^{-3}$ M, $I = 0.1$ M, and (B) thionine–triplex, $C_D = 1.16 \times 10^{-3}$ M, $I = 0.1$ M (NaCl), pH = 7.0, and $T = 25$ °C.

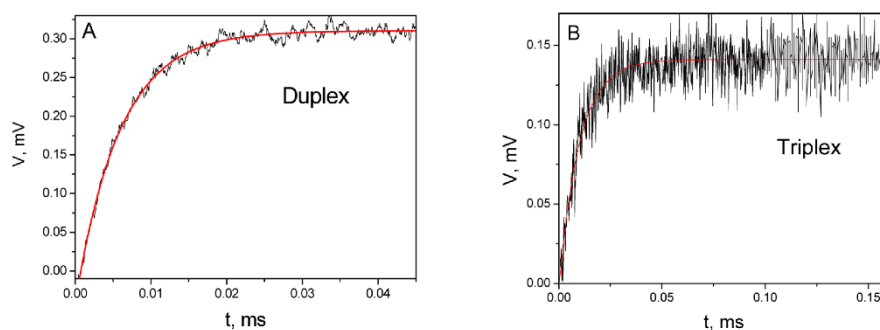


Figure 8. T-jump curve for thionine–duplex (A) $C_D^0 = 5.50 \times 10^{-4}$ M, $C_P^0 = 1.40 \times 10^{-3}$ M, and for thionine–triplex (B) $C_D^0 = 5.50 \times 10^{-4}$ M, $C_P^0 = 2.52 \times 10^{-3}$ M. $I = 0.1$ M (NaCl), pH = 7.0, and $T = 25$ °C.

0.25 (Figure 4C); such a T_{mD} increase is typical of intercalation reactions displaying thermal stabilization of the system.²⁷

The melting temperature (T_{mT}) of the triple stranded RNA was 57 °C in the absence of thionine. When the thionine content was raised, two bands appeared that stepwise moved apart. The intensity of the right-hand band rose, while dropping that of the left-hand band; the set of DSC melting plots yielded an “isocaloric point” with constant heat capacity, denoting that a reaction at equilibrium governed by the thionine content is at work (Figure 5A). The maximum of the right-hand band adopts the same increase profile as that for T_{mD} of the thionine–duplex intercalated complex, outlined by the stretch of rising temperature (Figure 4C), that is, thionine causes the formation of the thionine–duplex complex from thionine–triplex. Likewise, the drop in the melting temperature, T_{mT} , for thionine–triplex (Figure 5B) reveals the formation of an external complex, most likely linked to the groove.³⁶

3.4. CD Measurements. The data gathered point to dye/polynucleotide interactions that alter the achiral environment of thionine, giving rise to induced circular dichroism (ICD) in agreement with the conformational change of the polynucleotide structure. The spectrograms recorded are strongly dependent on the ionic strength, consistent with observations by Kamiya.³⁷ Supporting Information Figure SSI shows the spectrogram and titration isotherm of thionine–duplex at $I = 0.01$ M. Five different bands are observed in the ICD, three negative at $\lambda = 313$, 495, and 580 nm, and two positive at $\lambda = 551$ and 620 nm, as well as two isodichroic points at 511 and 565 nm. At $I = 0.1$ M (Figure 6A), two isodichroic points

appeared at $\lambda = 534$ and 594 nm. The plot of the molar ellipticity at 625 nm versus C_D/C_P (Supporting Information Figure SSIB and Figure 6B) shows an inflection point at $C_D/C_P = 0.75$ and $I = 0.01$ M that correlates fairly well with the saturation of the single complex observed at $I = 0.1$ M. The increase of $[\theta]$ with C_D/C_P corresponds to an intercalation process, and the decrease corresponds to groove binding,³⁸ revealing that two distinct complexes are formed at $I = 0.01$ M, whereas only a single intercalated complex is formed at $I = 0.1$ M, in good agreement with previous results.

Parts C and D of Figure 6 show the spectrogram and isotherm ($[\theta]$ vs C_D/C_P) for thionine–triplex at $I = 0.1$ M. A complicated pattern is observed that consists of maxima in the ICD region at 352, 595, and 620 nm, minima at 319, 380, and 520, and an isodichroic point at 594 nm. The band at 260 nm vanishes when C_D/C_P is raised, emerging as a new band at 288 nm. The molar ellipticity at 625 nm versus C_D/C_P gives rise to a sigmoid curve that resembles a titration curve.

No bathochromic effect was observed for thionine–ss (Figure 6E) at $\lambda = 260$ nm. Two positive bands appeared in the ICD region at 312 and 520 nm and two negative at 482 and 572 nm, giving rise to two isodichroic points at $\lambda = 495$ and 595 nm. The spectrogram probes interaction of thionine with single-stranded RNA, as observed in the absorbance titrations. The $[\theta]$ versus C_D/C_P plot obtained (Figure 6F) differs from that of the double and triple stranded. For the RNA single strand, the inflection point is observed at $C_D/C_P = 0.2$.

3.5. Viscosity Measurements. The viscosity ratio η/η_0 , where η_0 is the viscosity of the polymer alone and η is the

viscosity of the dye/polynucleotide system, is related to the elongation of the polynucleotide^{39,40} by eq 4:³²

$$\frac{L}{L_0} = \sqrt[3]{\frac{\eta}{\eta_0}} = 1 + \beta \frac{C_D}{C_P} \quad (4)$$

where L is the contour length of the dye/polynucleotide system, L_0 is that of the free polynucleotide, and β is the slope. L/L_0 was plotted as a function of the C_D/C_P ratio; Figure 7 shows the plot of eq 4 at $I = 0.1$ M. Precipitation of thionine has prevented us from arriving only up to $C_D/C_P = 0.28$; the plot describes a downward curve, probably due to saturation of the polynucleotide free sites at high C_D/C_P ratio. These results concur with the intercalative binding of thionine into the double helix.³² For triplex, the L/L_0 versus C_D/C_P plot is similar to that of the duplex, even though the initial slope of the isotherm is clearly different and no saturation of polynucleotide is observed up to $C_D/C_P = 0.3$.

3.6. Kinetic Study. The binding of thionine with the double and triple RNA helices was studied by the T-jump technique in the fluorescence mode. The resulting curves were all single exponential (Figure 8, parts A and B). The reciprocal of the relaxation time as a function of the concentration term ($[P] + [D]$) gives rise to a single straight line (Figure 9),

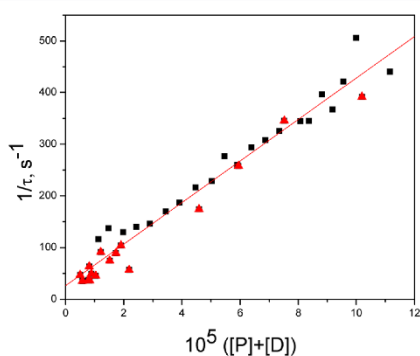


Figure 9. $1/\tau$ vs $([P] + [D])$ plot for thionine–duplex (■) $C_D^0 = 5.50 \times 10^{-4}$ M, $C_P^0 = 1.40 \times 10^{-3}$ M, and for thionine–triplex, (▲) $C_D^0 = 5.50 \times 10^{-4}$ M, $C_P^0 = 2.52 \times 10^{-3}$ M. $I = 0.1$ M (NaCl), pH = 7.0, and $T = 25$ °C.

suggesting that the reaction mechanism corresponding to thionine interaction with duplex and triplex RNA occurs in a single step, consistent with eq 5. The equilibrium concentration values for the triplex were determined from the highest K_{app} value (Table 1) because, as seen above, the triplex partially converts into the duplex under the experimental conditions and therefore the constant embraces both processes.

$$1/\tau = k_f([P] + [D]) + k_{-1} \quad (5)$$

The apparent equilibrium constant, K_{app} , can be calculated as the ratio between the formation constant (k_f) and the dissociation constant (k_d). The K_{app} (Table 2) coincides with the binding constant for thionine–duplex deduced statically (Table 1), which supports preceding results, bearing out the isothermal denaturation reaction. It should be recalled that the formation and dissociation rates of the complexes formed by groove binding are too fast to be observed by T-jump. Therefore, the kinetic results unambiguously show that, starting

Table 2. Formation Constants, k_f , Dissociation Constants, k_d , and Equilibrium Constant, K_{app} , Obtained for Thionine–Duplex and Thionine–Triplex^a

	thionine–duplex and thionine–triplex
k_f	$(4.02 \pm 0.13) \times 10^6$, M ⁻¹ s ⁻¹
k_d	26.27 ± 7.40 , s ⁻¹
$K_{app} = k_f/k_d$	$(1.53 \pm 0.18) \times 10^5$, M ⁻¹

^a $I = 0.1$ M (NaCl), pH = 7.0, and $T = 25$ °C.

from either duplex or triplex, an intercalation reaction is observed, and this corresponds to binding to the duplex.

4. DISCUSSION

Thionine intercalates into duplex RNA. For thionine–duplex, the absorbance and fluorescence experiments led to same K_{app} value, very close to that reported for the formation of the intercalated thionine–dsCT–DNA complex¹ and similar to that for intercalation of ethidium bromide into duplex.⁴¹ The affinity constant for the formation of thionine–ssCT–DNA¹ is an order of magnitude lower than that for thionine–ss. The values deduced for n were much higher for thionine–CT–DNA ($n = 5.6$ for dsCT–DNA and $n = 7.4$ for ssCT–DNA)¹ and with synthetic DNA⁹ compared to thionine–duplex (Table 1). This means that the thionine–DNA complex reached saturation at a lower concentration ratio than thionine–duplex RNA and thionine–ss. For thionine–triplex, the K_{app} value deduced from absorbance measurements was higher relative to fluorescence measurements (Table 1), a feature to be justified below. In both cases, the binding constant for thionine–triplex was lower relative to the intercalated ethidium–triplex complex.²⁷ The lowest K_{app} value was closer to that for external binding. The isotherm plotted in Figure 2E and the variation of CD (Figure 6E) demonstrate the interaction of thionine with RNA single strand. The value of the constant 3.7×10^5 M⁻¹ is similar to that of the coralyne–poly(rU) system $K = (4.6 \pm 0.5) \times 10^5$ M⁻¹ (measured in our laboratory).

The experiments using $K_4[Fe(CN)_6]$ as a quencher are informative. The isotherms shown in Figure 3, parts B, D, and F, disclose the formation of the thionine/ $K_4[Fe(CN)_6]$ binary complex and the thionine–triplex/ $K_4[Fe(CN)_6]$ and thionine–ss/ $K_4[Fe(CN)_6]$ ternary complexes. Formation of the thionine–duplex/ $K_4[Fe(CN)_6]$ ternary complex was not observed because the thionine intercalated into duplex is inaccessible to the quencher. These findings reinforce earlier results, that is, the intercalative binding of thionine into duplex RNA and external (most likely groove binding) into triplex RNA. The amplitude of the isotherm recorded for thionine–ss drops to one-fourth relative to free thionine and to one-half relative to thionine–triplex. This result reveals that, at 25 °C and pH = 7.0, poly(rU) is able to generate double helices that intercalate into thionine in a similar way as poly(rA) at 25 °C and pH = 5.2 in the presence of proflavine⁴² and as poly(rU) in the presence of coralyne at 25 °C and pH = 7.0 (data not published). The smaller amplitude of the triplex curve with respect to free thionine can be interpreted on the basis of reaction 6 (see below), in which a certain portion of thionine remains as intercalated thionine–duplex under the experimental conditions used.

In good agreement with the results discussed above, the DSC experiments clearly show two types of binding of thionine to the duplex and triplex. In the case of thionine–duplex, Figure 4C shows that the melting temperature (T_{mD}) increases when

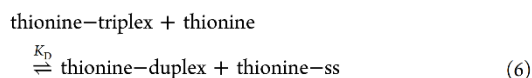
the C_D/C_P ratio is raised, revealing that thionine stabilizes the double helix, this behavior being characteristic of the intercalative binding;³⁸ also is shown a melting temperature (T_{mF}) independent of the thionine concentration, which corresponds to the melting of the free duplex present in solution.

A different behavior is observed for thionine–triplex. When increasing amounts of thionine were added to triplex, two bands related to the denaturation according to a two-step process appeared (Figure 5A) whose maxima progressively moved apart.

Figure 5B shows the evolution of the T_{mT} and T_{mD} values for the two bands which correspond to the denaturation temperature for thionine–triplex \rightarrow thionine–duplex + thionine–poly(rU) and for thionine–duplex \rightarrow thionine–poly(rA) + thionine–poly(rU), respectively.

Formation of thionine–poly(rA) is a reasonable assumption as long as at pH = 7.0 poly(rA) displays great affinity with intercalants, as occurs with coralyne.²⁹ Figure 5B shows that the trend of the increase in T_{mD} is similar to that observed for thionine–duplex (Figure 4C), that is, thionine intercalates into the duplex emerging from the triplex thermal denaturation. On the contrary, T_{mT} diminishes when the thionine content is raised; in other words, thionine destabilizes the triple helix as a consequence of the groove binding.³⁶ This behavior has been observed also with ethidium bromide.²⁷ However, the thionine–triplex system displays a singular behavior (the presence of an isocaloric point) which, to the best of our knowledge, has not been reported hitherto for other systems. Figure 5A shows that the area of the right-hand band increases while that of the left-hand band diminishes. The former is related to the amount of thionine–triplex and the latter with thionine–duplex initially present in solution. In other words, when the thionine content is raised, the percentage of the thionine–triplex complex present in solution at 25 °C diminishes and that of the thionine–duplex increases, the observed isocaloric point denoting that both species are in equilibrium.

These findings, reinforced below by other techniques, reveal that the thionine bound to triplex brings about the isothermal denaturation of the triplex ($T = 25$ °C), according to the reaction scheme:



K_D being the isothermal denaturation constant for equilibrium 6, which shifts to right upon increasing the thionine content, as inferred also from the evolution of the surface of the band areas of Figure 5. Such a behavior is justified by the rather high formation constants for thionine–duplex and thionine–ss relative to thionine–triplex. From the formation constants of the different complexes (Table 1), $K_1 = 6.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ for thionine–triplex, $K_2 = 1.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ for thionine–duplex, and $K_3 = 3.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ for thionine–ss, it follows $K_D = 522$ calculated as $(K_2)(K_3/K_1)(K_{fT})$, the formation constant of triplex from duplex and ss being $K_{fT} = 1.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. The K_{fT} value deduced from kinetic measurements⁴³ at 0.011 M (NaCl) ionic strength was corrected for 0.1 M (NaCl).⁴⁴ This value was (roughly) an order of magnitude lower than that reported for the formation constant of oligonucleotides DNA triplex⁴⁵ quencher.

The difference in the K_{app} values deduced from absorbance and fluorescence measurements for the formation constant of the thionine–triplex complex can now be explained by the larger thionine content in the former case and hence by the greater conversion to duplex, reflected in a higher equilibrium constant. Typically, the interaction of an intercalating reagent with DNA is characterized by following the hypochromism and bathochromic shift associated with the binding of the ligand to the duplex.⁴⁶ These effects, observed in Figure 2, parts A and C, demonstrate the presence of intercalated complexes in the two absorbance experiments, thionine–duplex and thionine–triplex. For this reason, we chose the lower constant value obtained from fluorescence measurements as the representative value of the formation constant for the thionine–triplex external complex.³⁶

The isothermal denaturation also justifies the CD, viscometric, and kinetic results obtained at $T = 25$ °C. Formation of the intercalated thionine–duplex complex from the groove thionine–triplex complex according to eq 6 is also reflected in Figure 6D by the initial induction period and further rise of $[\theta]$ according to the same pattern as that of thionine–duplex (Figure 6B). The observed increase in viscosity in Figure 7A is related to the intercalative binding of thionine to the duplex, because the increase in viscosity bears relation with the helix lengthening due to intercalation. However, the rise in viscosity (Figure 6B), observable for $C_D/C_P > 0.1$, is not justified by the groove binding in thionine–triplex; rather, this behavior is related to formation of the thionine–duplex intercalated complex consistent with the isothermal denaturation and the experiments discussed above.

Finally, the kinetic experiments are conclusive. Given that thionine–duplex and thionine–triplex systems lead to the same kinetic results and in view that groove binding complexes form too rapidly to be observed by T-jump, we can then conclude that the kinetic experiments of the thionine–triplex system refer to the intercalation reaction of thionine into the duplex present in the system in accordance with the denaturation equilibrium, eq 6.

The final question is, why does reaction 6 occur? Several factors favor this reaction. To a first place, thionine competes with the third strand by destabilizing the triplex. That is particularly true if one considers that the constant for the ss–duplex system ($K_{fT} = 1.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$)³⁷ is less than the intercalated thionine–duplex ($K_{app} = 1.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) (Table 1). Therefore, destabilization of the triplex will occur only with those ligands that, once located in the groove of the triplex, can compete with the poly(rU) single strand for the duplex. At large, this event will occur if the ligand (as it happens with thionine) possesses more affinity with the duplex than with the triplex (Table 1) at the same time it intercalates into the duplex through the major groove. Being the major groove occupied by the third strand, it impedes intercalation, favoring the denaturation. If the ligand were able to intercalate through the minor groove, then it could yield a stable intercalated with the triplex. It can then be surmised that the thionine–duplex complex is formed by intercalation of thionine through the major groove. We have reported earlier that intercalants as representative as proflavine²⁸ or ethidium bromide²⁷ tend to destabilize the triplex helix at $T > 37$ °C; in both systems denaturation was not observed at low temperature. In the case of thionine, the isocaloric point of Figure 5A is indicative of the equilibrium reaction 6, which will only be feasible due to the relative stabilities of the different thionine–RNA complexes at

$T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$. The interpretation described above is consistent with the sets of experimental results collected.

It must be underscored that the process represented by eq 6 differs from the disproportionation of the duplex into triplex and a single strand brought about by coralyne, according to the reaction $2(\text{coralyne-duplex}) \rightarrow \text{coralyne-triplex} + \text{coralyne-poly(A)}$; this small crescent-shaped molecule can cause the irreversible disproportionation both for $\text{poly(rA)}\cdot\text{poly(rU)}^{29}$ and $\text{poly(dA)}\cdot\text{poly(dT)}$.⁴⁷ For coralyne-duplex we put forward earlier,²⁹ the formation of an intermediate quadruplex by the merger of two partially intercalated coralyne-duplexes. Moreover, we have verified that coralyne intercalates into the triplex with great affinity. Thionine, on the contrary, intercalates only into the duplex and binds the major groove in the triplex. This behavior and the different affinity of the dye with the triplex, duplex, and single strands²⁹ are the reason for the isothermal denaturation of the triplex with thionine (eq 6) and the disproportionation of the duplex with coralyne.

In summary, despite the wide slate of existing studies underlining the main features that can predict the type of binding of an organic molecule to DNA and/or RNA, the experimental reality is that each dye molecule behaves differently, and a puzzle of data must be rationalized to propose convincingly the reaction mechanism with the duplex or the triplex.

5. CONCLUSIONS

Thionine interacts with duplex RNA in a similar way as it does with DNA, working as an intercalating agent. In the presence of triplex RNA, the thionine units located in the major groove can compete with poly(rU) for the duplex, bringing about thermal denaturation of the thionine-triplex complex. The type of binding and the relative affinity of the thionine-triplex, thionine-duplex, and thionine-ss complexes cause that at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ an equilibrium is reached in which it is the thionine concentration, not the temperature, that governs the triplex helix denaturation. This behavior was not observed with other drugs, not even with acridines of similar structure such as proflavine, endowed with a nitrogen atom instead of sulfur atom; that is, the S atom appears to be responsible for the observed DSC equilibrium, an effect borne out also with the other static and dynamic techniques used in this work.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Absorbance spectra and binding isotherm for the thionine titration with duplex at $I = 0.01\text{ M}$ (NaCl); fluorescence spectrograms and binding isotherms of the titrations of thionine by duplex and by triplex; absorbance and fluorescence titrations analysis according to eq 2; Stern-Volmer plots of free thionine, thionine single-strand, thionine-duplex, and thionine-triplex; circular dichroism spectra and molar ellipticity at $\lambda = 625\text{ nm}$ vs C_D/C_P of thionine-duplex system. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The financial support by the Ministerio de Educación y Ciencia, project CTQ2009-13051/BQU, supported by FEDER, Junta de

Castilla y León, project BU-299A12-1, and Caja de Burgos, Spain, is gratefully acknowledged.

■ REFERENCES

- (1) Paul, P.; Kumar, G. S. *J. Fluoresc.* **2012**, *22*, 71–80.
- (2) Ferguson, L. R.; Denny, W. A. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2007**, *623*, 14–23.
- (3) Rabinowitch, E.; Epstein, L. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, *63*, 69–78.
- (4) Tuite, E. M.; Kelly, J. M. *J. Photochem. Photobiol., B* **1993**, *21*, 103–124.
- (5) Brown, J. P.; Brown, R. J. *Mutat. Res., Rev. Genet. Toxicol.* **1976**, *40*, 203–224.
- (6) Dohno, C.; Stemp, E. D. A.; Barton, J. K. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9586–9587.
- (7) Xie, Y.; Chen, A.; Du, D.; Lin, Y. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *699*, 44–48.
- (8) Paul, P.; Hossain, M.; Suresh Kumar, G. *J. Chem. Thermodyn.* **2011**, *43*, 1036–1043.
- (9) Paul, P.; Kumar, G. S. *J. Hazard. Mater.* **2010**, *184*, 620–626.
- (10) Hecht, C.; Friedrich, J.; Chang, T.-C. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 10241–10244.
- (11) Tor, Y. *ChemBioChem* **2003**, *4*, 998–1007.
- (12) Chow, C. S.; Bogdan, F. M. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1489–1514.
- (13) Wilson, W. D.; Ratmeyer, L.; Zhao, M.; Strekowski, L.; Boykin, D. *Biochemistry* **1993**, *32*, 4098–4104.
- (14) Arnott, S.; Bond, P. J. *Nature (London), New Biol.* **1973**, *244*, 99–101.
- (15) Palchadhuri, R.; Hergenrother, P. J. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2007**, *18*, 497–503.
- (16) Knauer, M. P.; Glazer, P. M. *Hum. Mol. Genet.* **2001**, *10*, 2243–2251.
- (17) Uhlmann, E.; Peyman, A. *Chem. Rev.* **1990**, *90*, 543–584.
- (18) Thuong, N. T.; Hélène, C. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 666–690.
- (19) Sun, J.-S.; Hélène, C. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1993**, *3*, 345–356.
- (20) Kan, Y.; Armitage, B.; Schuster, G. B. *Biochemistry* **1997**, *36*, 1461–1466.
- (21) Lee, J. S.; Latimer, L. J. P.; Hampel, K. J. *Biochemistry* **1993**, *32*, 5591–5597.
- (22) Kukreti, S.; Sun, J.-S.; Garestier, T.; Hélène, C. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 4264–4270.
- (23) Shchyolkina, A. K.; Timofeev, E. N.; Lysov, Y. P.; Florentiev, V. L.; Jovin, T. M.; Arndt-Jovin, D. J. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 986–995.
- (24) Polak, M.; Hud, N. V. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 983–992.
- (25) Lehrman, E. A.; Crothers, D. M. *Nucleic Acids Res.* **1977**, *4*, 1381–1392.
- (26) Felsenfeld, G.; Davies, D. R.; Rich, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 2023–2024.
- (27) García, B.; Leal, J. M.; Paiotta, V.; Ibeas, S.; Ruiz, R.; Secco, F.; Venturini, M. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 16131–16138.
- (28) García, B.; Leal, J. M.; Paiotta, V.; Ruiz, R.; Secco, F.; Venturini, M. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 7132–7139.
- (29) Biver, T.; Boggioni, A.; García, B.; Leal, J. M.; Ruiz, R.; Secco, F.; Venturini, M. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 1697–1710.
- (30) Wilson, W. D.; Wang, Y. H.; Kusuma, S.; Chandrasekaran, S.; Boykin, D. W. *Biophys. Chem.* **1986**, *24*, 101–109.
- (31) Janik, B. *Physicochemical Characteristics of Oligonucleotides and Polynucleotides*;IFI/Plenum: New York, 1971.
- (32) Cohen, G.; Eisenberg, H. *Biopolymers* **1969**, *8*, 45–55.
- (33) Cusumano, M.; Giannetto, A. *J. Inorg. Biochem.* **1997**, *65*, 137–144.
- (34) Blake, A.; Peacocke, A. R. *Biopolymers* **1968**, *6*, 1225–1253.
- (35) McGhee, J. D.; von Hippel, P. H. *J. Mol. Biol.* **1974**, *86*, 469–489.
- (36) Ruiz, R.; García, B.; García-Tojal, J.; Busto, N.; Ibeas, S.; Leal, J.; Martins, C.; Gaspar, J. F.; Borrás, J.; Gil-García, R.; González-Álvarez, M. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2010**, *15*, 515–532.
- (37) Kamiya, M. *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *562*, 70–79.

- (38) García, B.; Leal, J. M.; Ruiz, R.; Biver, T.; Secco, F.; Venturini, M. *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 8555–8564.
- (39) Gopal, M.; Veeranna, S. *J. Photochem. Photobiol., B* **2005**, *81*, 181–189.
- (40) Pilch, D. S.; Waring, M. J.; Sun, J.-S.; Rougée, M.; Nguyen, C.-H.; Bisagni, E.; Garestier, T.; Hélène, C. *J. Mol. Biol.* **1993**, *232*, 926–946.
- (41) D'Amico, M. L.; Paiotta, V.; Secco, F.; Venturini, M. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 12635–12641.
- (42) Ciatto, C.; D'Amico, M. L.; Natile, G.; Secco, F.; Venturini, M. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 2717–2724.
- (43) Blake, R. D.; Fresco, J. R. *J. Mol. Biol.* **1966**, *19*, 145–160.
- (44) Record, M. T.; Anderson, C. F.; Lohman, T. M. *Q. Rev. Biophys.* **1978**, *11*, 103–178.
- (45) Lin, M.-C.; Macgregor, R. B. *Biopolymers* **1997**, *42*, 129–132.
- (46) Bloomfield, V. A.; Crothers, D. M.; Tinoco, I. *Physical Chemistry of Nucleic Acids*; Harper & Row: New York, 1974.
- (47) Jain, S. S.; Polak, M.; Hud, N. V. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 4608–4615.

Supporting Information

Interaction of Thionine with Triple, Double and Single stranded RNAs

H. Lozano, B. García, N. Busto and J.M. Leal
Chemistry Department, University of Burgos, 09001 Burgos, Spain.

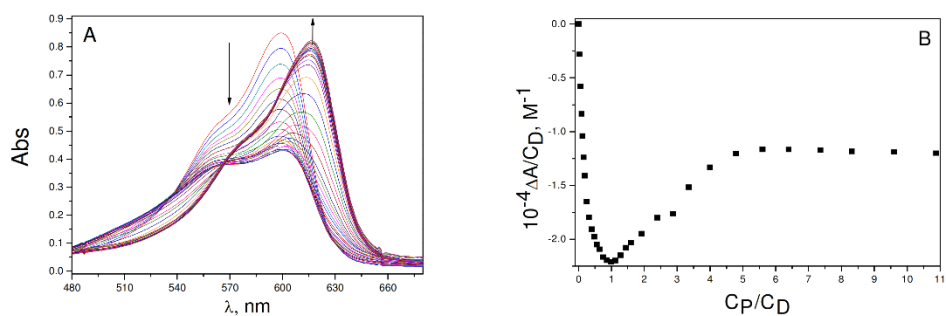


Figure 1SI. A) Spectra and B) Binding isotherm for the titration of thionine with poly(rA)·poly(rU) (duplex), $C_p=6.00 \cdot 10^{-4} M$, $\lambda=600 \text{ nm}$, $I=0.01 M$ (NaCl), $pH=7.0$ and $T=25^\circ C$.

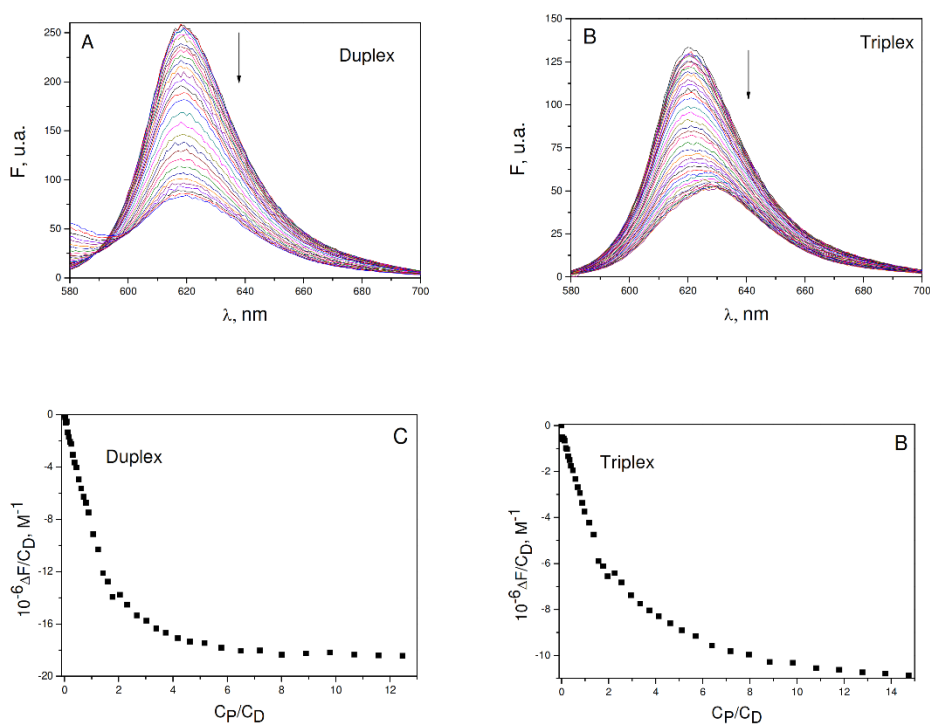


Figure 2SI. Spectrograms of A) thionine-duplex obtained from fluorescence measurements $C_p=1.63 \cdot 10^{-4} M$ B) thionine-triplex, $C_p=1.50 \cdot 10^{-4} M$ and Fluorescence binding isotherms of C) thionine-duplex and D) thionine-triplex. $\lambda_{exc}=565 \text{ nm}$, $I=0.1 M$ (NaCl), $pH=7.0$ and $T=25^\circ C$.

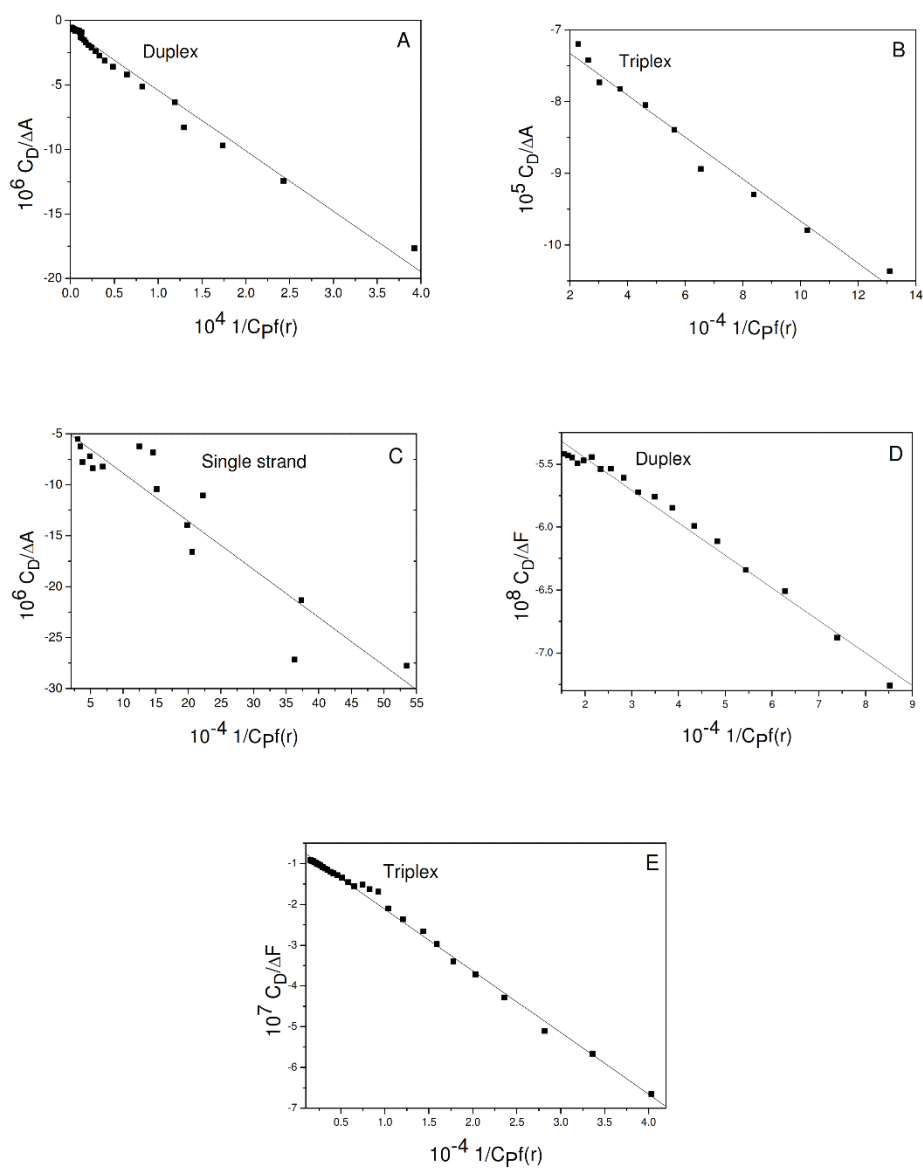


Figure 3SI. Absorbance (A,B,C) and fluorescence (D,E) titration analyses carried out with eq 2: (A,D) thionine-duplex (B,E) thionine-triplex and (C) thionine-ss. $I=0.1M$ (NaCl), $pH=7.0$ and $T=25^\circ C$

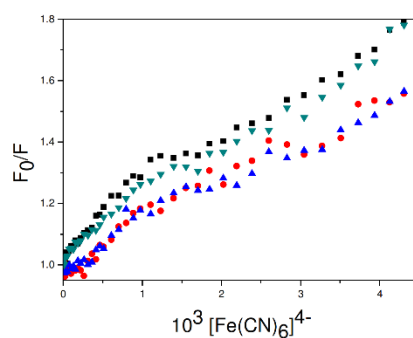


Figure 4SI. Stern-Volmer plot for free thionine (■), thionine-ss (▼), thionine-duplex (●) and thionine-triplex (▲). $C_D/C_P=0.1$, $C_D=9 \mu\text{M}$, $\lambda_{exc}=565\text{nm}$, $\lambda_{exc}=625 \text{ nm}$, $I=0.1 \text{ M}$ (NaCl), $\text{pH}=7.0$ and $T=25^\circ\text{C}$.

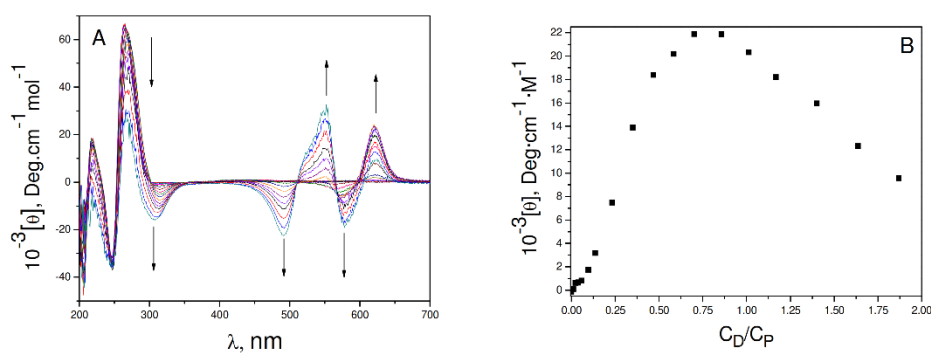


Figure 5SI. Circular dichroism spectrogram and $[\theta]$ vs C_D/C_P plot for thionine-duplex at $C_P^0=1.21 \cdot 10^{-4}\text{M}$, $C_D=9.00 \cdot 10^{-4}$, $\lambda=625\text{nm}$ $I=0.01\text{M}$ (NaCl), $\text{pH}=7.0$ and $T=25^\circ\text{C}$.

Capítulo V
Estabilización de
disoluciones de Al(III) por
complejación con ácido
cacodílico

V. Estabilización de disoluciones de Al(III) por complejación con ácido cacodílico. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17, 29803–13 (2015)

En este capítulo se aborda la reacción de complejación entre Aluminio y Cacodilato Sódico a diferentes valores de pH para posteriormente, en el capítulo VI, describir su interacción con ARN y ADN.

Este trabajo ha sido realizado en colaboración con el grupo del profesor F. Secco (Universidad de Pisa) con el que nuestro grupo mantiene una fructífera colaboración desde el año 2000. El profesor Secco es un experto en el estudio de los mecanismos de complejación de diferentes ligandos con metales de transición. Algunas de las características que despiertan interés en la investigación de Aluminio en sistemas biológicas son su poder prooxidante, su función como excitotoxina¹⁴⁶ y sus efectos genotóxicos y citotóxicos.¹⁴⁷ Inicialmente, el estudio se planteó a $\text{pH} < 4$ donde el Aluminio, en forma de Al^{3+} , es soluble. Sin embargo, tras unas pruebas de solubilidad iniciales, se descubrió que, en presencia de cacodilato sódico, era posible solubilizar el metal incluso a $\text{pH} = 7$, cambiando el enfoque hacia la caracterización del complejo Aluminio-Cacodilato en un amplio rango de pH, incluyendo pH neutro. Se han realizado estudios de especiación del Aluminio, así como la determinación de las constantes de equilibrio de los complejos Aluminio-Cacodilato.

Para el estudio se ha empleado espectroscopía UV-Vis, espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{27}Al y simulaciones teóricas mediante DFT. Los resultados obtenidos muestran que la afinidad entre Aluminio y cacodilato es máxima entre $\text{pH} = 5$, donde la estructura más probable es dimérica, (Figura V.1), y a $\text{pH} = 7$, donde la interacción es más débil y se forman agregados solubles constituidos por la inserción de moléculas de Cacodilato en la esfera de coordinación de un oligómero formado por trece átomos de Aluminio.

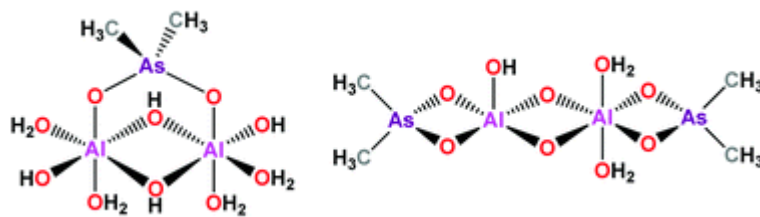


Figura V.1. Estructuras diméricas más probables en la complejación de Aluminio y Cacodilato a pH = 5.



PCCP

PAPER

View Article Online

View Journal | View Issue



Cite this: *Phys. Chem. Chem. Phys.*,
2015, 17, 29803

Stabilization of Al(III) solutions by complexation with cacodylic acid: speciation and binding features†

Matteo Lari,^a Héctor J. Lozano,^a Natalia Busto,^a Tarita Biver,^b José M. Leal,^a Saturnino Ibeas,^a James A. Platts,^c Fernando Secco^b and Begoña García*^a

Aluminium ions are believed to play a role in a number of neurological and skeletal disorders in the human body. The study of the biological processes and molecular mechanisms that underlie these pathological disorders is rendered a difficult task due to the wide variety of complex species that result from the hydrolysis of Al³⁺ ions. In addition, this ion displays a pronounced tendency to precipitate as a hydroxide, so certain complexing agents should be envisaged to stabilize Al(III) solutions in near physiological conditions. In this work, we show that the common buffer cacodylic acid (dimethylarsinic acid, HCac) interacts with Al(III) to give stable complexes, even at pH 7. After preliminary analyses of the speciation of the metal ion and also of the ligand, a systematic study of the formation of different Al/Cac complexes at different pH values has been conducted. UV-Vis titrations, mass spectrometry NMR measurements and DTF calculations were performed to enlighten the details of the speciation and stoichiometry of Al/Cac complexes. The results altogether show that Al/Cac dimer complexes prevail, but monomer and trimer forms are also present. Interestingly, it was found that cacodylate promotes the formation of such relatively simple complexes, even under conditions where the polymeric form, Al₁₃O₄(OH)₂₄⁷⁺, should predominate. The results obtained can help to shed some light into the reactivity of aluminium ions in biological environments.

Received 8th August 2015,
Accepted 6th October 2015

DOI: 10.1039/c5cp04717j

www.rsc.org/pccp

1. Introduction

Aluminium ions are prone to forming a variety of hydrolytic species,¹ including the Al₁₃O₄(OH)₂₄⁷⁺ polymeric form. This ion exhibits a certain tendency to precipitate as Al(OH)₃, even at a relatively acidic pH, and reacts with oxygen-containing ligands.^{2,3} Many studies have enlightened the importance of aluminium in biological fluids and its ability to bind biosubstrates, both outside and inside the cell, associating its presence to health related diseases.^{4–8} The presence of different hydrolytic forms entails the involvement of a number of equilibria and, consequently, many other possible complexes. These features render aluminium a very complex system.

Dimethylarsinic (cacodylic) acid, (CH₃)₂AsOOH, is widely used to study the interaction of biological molecules with organic dyes or metal ions.⁹ Cacodylic acid (HCac, pK_A = 6.2 ± 0.1), with a buffer window ranging from pH 5.2–7.2,^{10–13} is quite a valuable

tool for studying nucleic acids and proteins under physiological conditions. On the other side, the cacodylate anion is unreactive towards many divalent metal ions;¹⁴ for this reason it can serve to ensure buffer inactivity for many biomolecule/metal ion (or metal complex) systems. On the other hand, there is evidence that the cacodylate anion can bind to metal ions such as Sb(III), Bi(III),¹⁵ Pd(II)¹⁶ and some rare earth metals.¹⁷ The formation of the Al(III)/Cac complex,¹⁸ and more recently the synthesis of complexes of the dimethylarsinate anion and metal ions of group XIII (Al, Ga, In, Tl) has been reported.¹⁹ However, to the best of our knowledge, systematic thermodynamic studies of the aluminium/cacodylic acid system in solution under different experimental conditions are still lacking. This work is focused on studying the Al(III)/Cac system at different pH values to infer the nature and strength of the Al(III)/ligand interaction and to assess the possible use of cacodylate to provide Al(III) buffered solutions for biochemical studies at neutral pH.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Al(ClO₄)₃·8H₂O solid salt (Fluka) was the aluminium source. Aluminium stock solutions were prepared by dissolving appropriate

^a Departamento de Química, Universidad de Burgos, Plaza Misael Bañuelos s/n, 09001 Burgos, Spain. E-mail: begar@ubu.es

^b Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale, Università di Pisa, Via Moruzzi 13, 56124 Pisa, Italy

^c School of Chemistry, Cardiff University, Park Place, Cardiff CF10 3AT, UK

† Electronic supplementary information (ESI) available: Fig. S1–S7, Tables S1–S3 and derivation of eqn (8). See DOI: 10.1039/c5cp04717j

amounts of the solid in HClO₄ aqueous solutions, brought at pH = 2.0 to avoid hydroxide precipitation. Standardization of aluminium stock solutions was carried out through EDTA titrations, using Eriochrome Black-T as an indicator. Briefly, a calibrated excess of EDTA was added to an aliquot of the aluminium solution; the mixture was then boiled and, after the addition of acetate buffer (pH = 6.0), it was titrated with a standardized Zn²⁺ solution. Stock solutions of sodium dimethylarsinate ((CH₃)₂AsOONa, NaCac – Carlo Erba, 96% purity) were prepared by dissolving weighed amounts of the solid in water and titrating with NaOH. To reliably reproduce the ionic strength near physiological conditions, the ionic strength (*I*) of the working solutions was kept constant at 0.1 M with sodium perchlorate (Merck), whereas the desired pH was attained by the addition of small amounts of NaOH and HClO₄. NaClO₄ was chosen as the ionic buffer because perchlorate is an inert anion,²⁰ whereas other species such as chloride and phosphate can form complexes with Al(III).²¹ All of the reactants were analytical grade and were used without further purification. Ultra-pure water from a Millipore MILLI-Q water purification system was used to prepare the solutions and as a reaction medium.

2.2. Methods

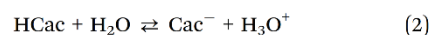
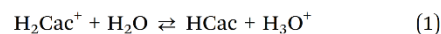
pH measurements were performed with a Metrohm 713 (Herisau, Switzerland) pH-meter equipped with a combined glass electrode. The aluminium samples were not as stable as those with only the buffer, and based on several repeated measurements we have stated the pH uncertainty to be ±0.05. The pH values measured in D₂O were not corrected for the isotope effect as data on D₂O at high acidity levels is lacking. Spectrophotometric titrations were carried out with a Shimadzu 2450-Spectrophotometer, equipped with jacketed cell holders (thermostat precision 0.1 °C). All experiments were conducted at 25 °C. Titrations of the Al(III)/Cac system were performed in a batch-wise mode at the desired pH values and an ionic strength of 0.1 M (NaClO₄). Different samples were prepared for different metal-to-ligand ratios and left for 24 h to achieve equilibration. The absorbance spectrum for each sample was recorded in the 190–300 nm range (1 cm path-length cells) and the binding parameters were evaluated by averaging out the results obtained at different selected wavelengths in the 205–193 nm range. Mass spectra were recorded by means of a TOF Mass Spectrometer Bruker Maxis Impact with electrospray ionization (ESI) for C_L/C_M = 1 (C_M = 0.2 mM) samples in double distilled water, C_L and C_M being the cacodylate and aluminium ion concentrations, respectively. NMR samples were prepared by dissolving the proper amount of Al³⁺ in 0.5 mL of the respective oxygen-free deuterated solvent to obtain 5 mM working solutions with the corresponding amount of sodium cacodylate for each C_L/C_M ratio studied. Unless otherwise stated, the spectra were recorded at 298 K on a Varian Unity Inova-400 (399.94 MHz for ¹H; 104.21 MHz for ²⁷Al). Typically, 1D ¹H NMR spectra were acquired with 32 scans into 32k data points over a 16 ppm spectral width; the ²⁷Al NMR spectra were acquired with 16 scans. ¹H chemical shifts were referenced internally to TMS *via* 1,4-dioxane in D₂O ($\delta = 3.75$ ppm). Chemical shift values are reported in ppm. The NMR data processing was carried out using MestReNova version 6.1.1.

DFT calculations were carried out using the B3LYP functional to optimize some proposed structures for the aluminium–sodium cacodylate complex; this procedure was used satisfactorily for DFT calculations of metals,²² and specifically for aluminium,^{23–25} applying the 6-31G(d) basis set to C, H and O atoms. A double zeta function (LANL2DZ) was used for Al and As, including an effective core potential calculation (ECP) for core electrons, diminishing the computational calculation costs. Water was used as solvent. All calculations and data analyses were performed with Gaussian 09.²⁶

3. Results and discussion

3.1. Evaluation of the pK_{A,1} and pK_{A,2} acidity constants of cacodylic acid

Cacodylic acid is a diprotic acid; its diprotonated form is denoted here as H₂Cac⁺. This species undergoes acid dissociation according to eqn (1) and (2), which characterize the acid dissociation constants K_{A,1} and K_{A,2}, respectively.



The ¹H-NMR spectrum of cacodylate shows a singlet signal ascribable to the methyl groups of NaCac. The location of these peaks very much depends on the acidity of the medium, the higher the acidity level the larger the chemical shift of the peaks (Fig. 1A).

The pK_{A,1} and pK_{A,2} values have been determined by analyses of the chemical shift of the ¹H-NMR singlets of sodium cacodylate at different values of pH and acidity function *H*₀ (Fig. 1B); the latter function was employed at the highest acidity levels used, outside the boundary of the pH scale.²⁷ The two dissociation constants of cacodylic acid were evaluated according to eqn (3):

$$\delta = \frac{\delta_{\text{B}} - \delta_{\text{BH}^+}}{1 + 10^{-\text{pH} + \text{p}K_{\text{A},i}}} + \delta_{\text{BH}^+} \quad (3)$$

where δ_{B} and δ_{BH^+} represent the chemical shifts of the basic and acidic forms, respectively, and δ that at an intermediate acid concentration, according to species shown in eqn (1) and (2). To determine pK_{A,1}, eqn (3) was applied directly adopting the chemical shift at pH = 4 for δ_{B} , whereas that for δ_{BH^+} was taken as the highest value in Fig. 1B. The continuous line denotes the outcome of the two fittings. The pK_{A,1} and pK_{A,2} values obtained, 1.3 ± 0.2 and 6.2 ± 0.1 respectively, were in reasonably good agreement with literature values, pK_{A,1} = 1.1^{10,28} and 2.6,²⁸ and pK_{A,2} = 6.2.^{10–13} Fig. 1C shows the speciation curves of cacodylic acid.

As for the absorbance measurements, Fig. S1 (ESI†) shows the spectra of cacodylic acid at different pH values (*I* = 0.1 M, NaClO₄). The change in absorbance upon titration within the 2–10 pH range (Fig. S1, ESI† inset) has enabled us to evaluate the second acid dissociation constant of cacodylic acid, pK_{A,2} = 6.0 ± 0.2. A point worthy of mentioning is that the absorption spectra of cacodylate lie within the limit of the instrumental range, and the measurement suffers from a low signal-to-noise ratio.

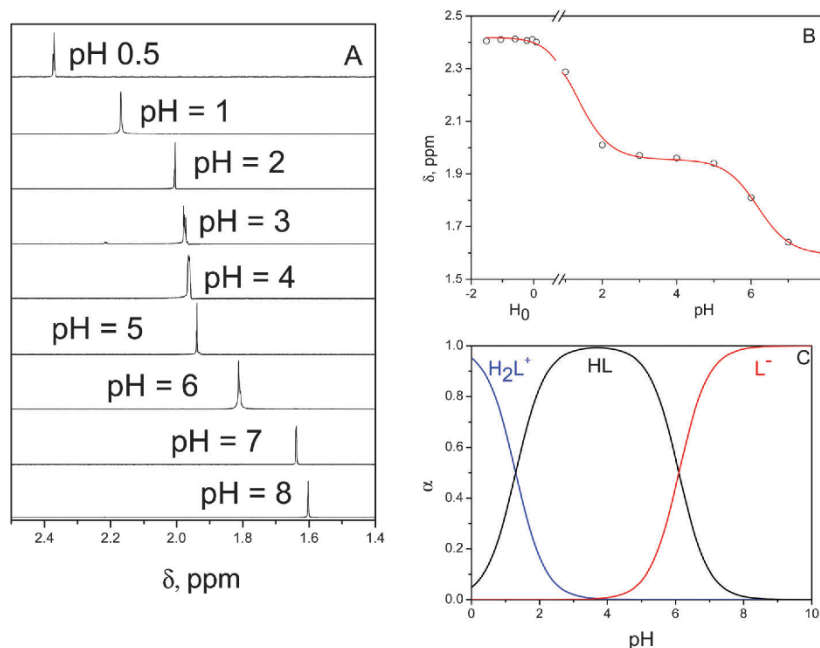


Fig. 1 (A) ^1H -NMR spectra at pH = 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8. (B) δ versus pH (or H_0) plot corresponding to $pK_{A,1}$ and $pK_{A,2}$. $C_L = 5.00 \times 10^{-3}$ M. (C) Speciation of cacodylic acid ($pK_{A,1} = 1.3$, $pK_{A,2} = 6.2$). $I = 0.1$ M (NaClO_4) and $T = 25$ °C.

Therefore, to ensure reliable results, $K_{A,2}$ was calculated at every wavelength in the 195–205 nm range. The mean values obtained in this range were within the experimental error. Below pH 3, the observed shift to lower wavelengths of the 193 nm band can be ascribed to formation of the H_2Cac^+ species.

3.2. Speciation of aluminium forms

Fig. 2 shows the ^{27}Al -NMR spectra in the 1–6 pH range (above pH 6, measurements could not be performed because the aluminium precipitates). The NMR measurements show that the hexaquoaluminium(III) ion, $\text{Al}(\text{OH})_6^{3+}$, prevails between pH 1 and 4. The wide band in ^{27}Al -NMR spectra observed between pH 5 and 6 can be ascribed to the polycation species $\text{Al}_{13}\text{O}_4(\text{OH})_{21}^{7+}$ (also denoted as Al_{13} -mer).²⁹ Between pH 6 and 7, partial or full neutralization of the polymer charge promotes aggregation of Al_{13} -mer, which tends to precipitate, and formation of more complex polymeric forms, such as $\text{Al}_2\text{O}_8\text{Al}_{28}(\text{OH})_{56}(\text{H}_2\text{O})_{26}^{18+}$ (also known as Al_{30} -mers) is likely to occur.^{30,31}

The NMR findings are corroborated by literature data. The molar fraction (β) of the Al^{3+} hexahydrate ion and its hydrolytic forms can be calculated according to eqn (4):¹

$$\log Q_{xy} = \log K_{xy} + a \frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} + bm_x \quad (4)$$

where I is the ionic strength of the medium, Q_{xy} is the equilibrium ratio related to formation of the hydrolyzed $\text{Al}_x(\text{OH})_y^{(3x-y)+}$ species ($x\text{Al} + y\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Al}_x(\text{OH})_y^{(3x-y)+} + y\text{H}^+$), K_{xy} is the relevant thermodynamic equilibrium constant, and m_x is the overall aluminium molality, a and b are fitting parameters.¹

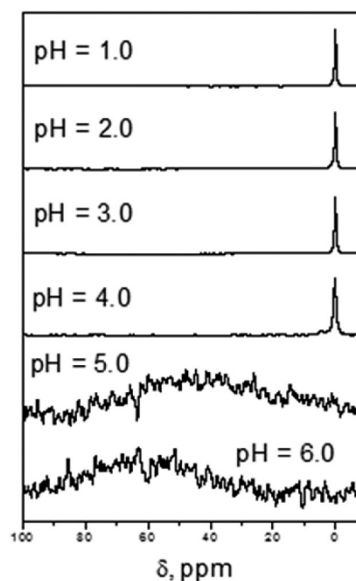


Fig. 2 ^{27}Al -NMR spectra of $\text{Al}(\text{III})$ at different pH values. $C_M = 5.0 \times 10^{-3}$ M, $I = 0.1$ M (NaClO_4) and $T = 25$ °C. The pH-independent narrow peak at (roughly) δ 0 ppm, is ascribed to the monomeric species Al^{3+} , whereas the broad band observed at pH 5 and 6 corresponds to the $\text{Al}_{13}\text{O}_4(\text{OH})_{24}^{7+}$ polymer.

This calculation was performed at different pH values and metal concentrations using the Octave program,³² yielding the distribution plots shown in Fig. 3. This figure shows that

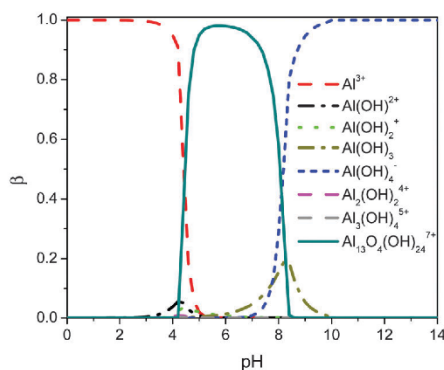


Fig. 3 Speciation of Al(III). $C_M = 1.0 \times 10^{-3}$ M, $I = 0.1$ M (NaClO₄) and $T = 25$ °C.

the amount of dimer and trimer species is negligible and that the predominant species in the 4.5 to 8.0 pH range is $Al_{13}O_4(OH)_{24}^{7+}$, whereas $Al(OH)_4^-$ is the prevailing species above pH 8.0.

The results from Fig. 3 are compared in Fig. S2(A) and (B) (ESI[†]) with other results obtained for Al^{3+} concentrations of 1.0×10^{-4} and 1.0×10^{-5} M, showing that in dilute solutions the polymeric species are absent. Additionally, an increase in the aluminium concentration (C_M) causes a modest diminution of $\beta_{Al^{3+}}$ and a sharp increase in the polymeric form $Al_{13}O_4(OH)_{24}^{7+}$.

3.3. The aluminium/cacodylate system

Mass spectrometry. The different number of peaks recorded at different pH values reveals the complexity of the distribution of the aluminium species (Fig. S3, ESI[†]). We focused our attention on the most representative peaks in the spectrum and determined four types of species: (1) free cacodylate, which is predominant, in particular, the $[HCac + H]^+$ ($m/z = 139$) and $[NaCac + H]^+$ ($m/z = 161$) adducts and other peaks reported in literature,^{33,34} such as $m/z = 277, 259, 299, 281, 437$ and 419 (corresponding to $[H_2Cac_2 + H]^+$, $[H_2Cac_2 + H - H_2O]^+$, $[H_2Cac_2 + Na]^+$, $[H_2Cac_2 + Na - H_2O]^+$, $[H_3Cac_3 + Na]^+$, $[H_3Cac_3 + Na - H_2O]^+$), respectively; (2) perchlorate and cacodylate salt clusters:

$[Na(NaClO_4)_x]^+$ ($m/z = 145, 267, 389$) and $[Na(NaCac)_x]$ ($m/z = 183, 343, 503, 663$); (3) Al non-complexed forms: $Al(OH)_2(H_2O)_v^+$ ($m/z = 79, 115, 133$); $Al_2O(OH)_2_3^+$ ($m/z = 121$) and (4) Al/Cac complexes. By analogy with the formulation of aluminium(III) aquo-chloro-complexes, we adopt the general formula $Al_xO_y(OH)_z - Cac_u(H_2O)_v^{n+}$ for the aluminium/cacodylate complexes.³⁵ The distribution of the different forms is shown in Fig. 4, whereas the respective formulas are summarized in the ESI[†] (Table S1).

It should be pointed out here that assignment of the proper formula is prone to a certain degree of ambiguity.³⁶ Firstly, the $(OH)_2^{2-}$ and $O(OH)_2^{2-}$ patterns, having the same value of m/z ratio, cannot be differentiated. Therefore, $Al_2O(OH)Cac(H_2O)^+$ could be replaced by $Al_2(OH)_3Cac_2^+$. Moreover, some peaks can be assigned to either a free or a bound aluminium species. For instance, the peak at $m/z = 121$ can be ascribed to the free species $Al_2O(OH)_3^+$ and to the $Al_2O(OH)Cac(H_2O)_v^{2+}$ complex, and the peaks at 301 and 319 to the 1:2 complex $AlCac_2(H_2O)_v^+$ or to the 3:1 complex, $Al_3O(OH)Cac(H_2O)_v^+$. The theoretical and literature data (see below) will allow us to put forward the most stable form.^{35–39}

At pH 4.0, 5.0 and 6.0 the most intense peaks are those associated with the dimeric forms. On the other hand, monomeric species are mainly present not only at pH 5, but also at pH 4. Trimeric forms display lower intensity signals and are detected at pH 5.0, 6.0 and 7.0. In particular, the signal at pH 7.0 is lower than those detected at pH 5.0 and 6.0, concurrent with the weakening of the interaction of cacodylate at neutral pH, observed in the NMR experiments, as described below.

The high abundance of dimeric complexes contrasts with the β values, indicating a rather modest presence of dimers when cacodylate is absent (Fig. 3). To support this view, previous studies^{35–39} on aluminium complexes with organic ligands have shown that $Al_2O(OH)_3^+$ yields a small peak, suggesting that the dimeric aluminium free species are only poorly present in solution. Hence, it can be surmised that, in addition to the 1:1 complex, the presence of cacodylate induces the formation of dimeric and (to a lesser extent) also trimeric and tetrameric species. Furthermore, the observation that the peaks of these species are also present at pH 5.0 and 6.0 (where in the absence

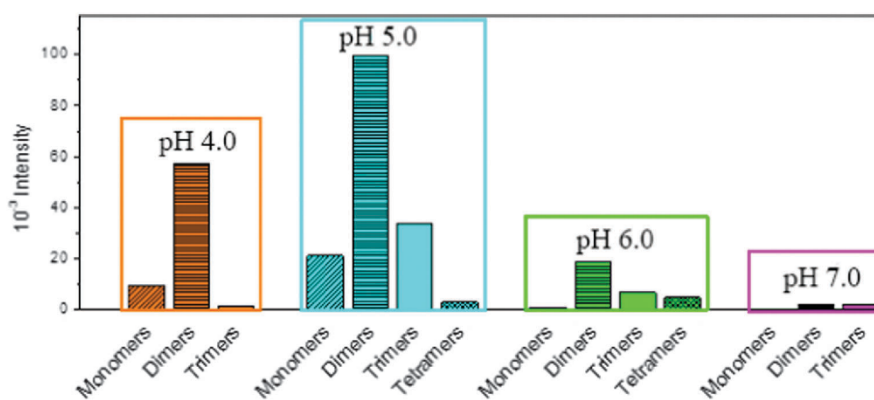


Fig. 4 Distribution of the different Al/Cac complex forms obtained from MS experiments at different pH values. $C_L = C_M = 2.0 \times 10^{-4}$ M and $T = 25$ °C.

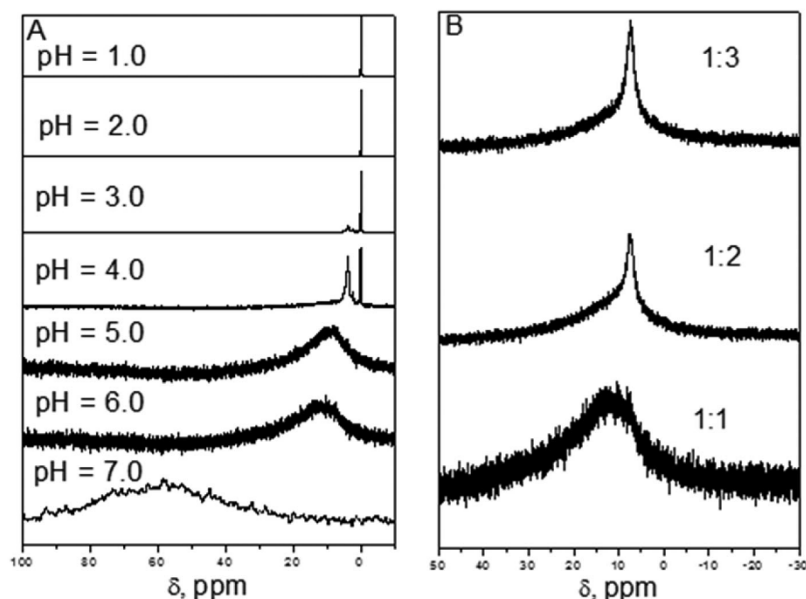


Fig. 5 ^{27}Al -NMR spectra for (A) the Al/NaCac system at pH = 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 and 7.0, $C_M/C_L = 1:1$ and (B) the Al/NaCac system at $C_M/C_L = 1:1$, 1:2 and 1:3, $C_M = 5.0 \times 10^{-3}$ M, pH = 6.0, $I = 0.1$ M (NaClO_4) and $T = 25$ °C.

of the ligand the polymeric Al_{13} -mer form prevails by far, suggests that the ligand induces splitting of Al_{13} -mer to give smaller entities.

^{27}Al -NMR and ^1H -NMR studies. Fig. 5A shows the ^{27}Al -NMR spectra for Al/Cac in the pH 1–7 range. Between pH 1.0 and 2.0, only the signal corresponding to free Al^{3+} was observed at 0 ppm. In addition to the signal at 0 ppm, at pH 3.0 and 4.0 two further signals were observed at 2 and 4 ppm, the former remaining very modest at the two pH values. The second displays a remarkable increase in intensity on going from pH 3.0 to pH 4.0. At pH 5.0 and 6.0, wide bands were observed at 8 and 12 ppm, respectively. At pH 7.0, the centre of the band is shifted to 60 ppm.

Fig. 6 shows the ^1H -NMR spectra of the Al/NaCac system recorded at different pH values and different times. The peak of the free ligand (circled δ), and other peaks are displayed in the $4 \leq \text{pH} \leq 7$ range, which are associated to bound cacodylate. All of the ^{27}Al -NMR and ^1H -NMR experiments have contributed to the interpretation of the behaviour of the aluminium/cacodylate system at different pH values. No Al/Cac complex is formed at pH 1.0 and 2.0. However, small amounts of complex are detected at pH 3.0 and the extent of binding becomes more and more important as the pH is raised, in agreement with the general behaviour displayed by complex formation reactions of metal ions with ligands protonated at the reaction site.

Concerning the data at pH 4.0, comparison of the ^{27}Al -NMR spectra of free (Fig. 2) and bound (Fig. 5A) aluminium shows a remarkable increase in the peak at 4 ppm, which can be associated to the dimeric aluminium/cacodylate form.^{40,41} In the ^1H -NMR spectrum (Fig. 6A), the singlet at 1.86 ppm could be related to the AlCac^{2+} complex. Actually, the beta value of

Al^{3+} at pH 4.0 is 0.9, and a singlet peak is in agreement with the Al^{3+} symmetrical form with the chelating ligand. In addition, it is supported by the fact that this peak is not seen at pH 5.0 (Fig. 6C), where $\beta_{\text{Al}^{3+}} = 0.004$. The two peaks at 1.95 and 1.79, having the same intensity, most likely correspond to a dimeric form, in which the two methyl groups have different environments. Also other small peaks are present, in particular in the 1.88–1.85 ppm range and at 1.82 ppm, which could be related to other monomeric species, such as $\text{Al}(\text{OH})\text{Cac}^+$.

The broad peak observed at pH 5.0 and 6.0 in the ^{27}Al -NMR experiments (Fig. 5A) should be associated to the sum of the dimeric, trimeric and other polymeric species arising from the decomposition of the Al_{13} aggregate associated to the broad peak at 60 ppm (Fig. 2). In addition, the ^{27}Al -NMR spectra recorded at pH 6.0 for C_L/C_M 1, 2 and 3 show constriction of the broad peak, with a signal increase at 7.5 ppm (Fig. 5B). This behaviour agrees well with further splitting of the Al_{13} -mer in the presence of an excess of cacodylate. As stated above, the ^1H -NMR experiments show that the peak at 1.86 ppm, present at pH 4.0, disappears when the solution pH is raised (spectra at pH 5.0 and 6.0 in Fig. 6C and D), while the peaks at 1.95 and 1.80 ppm exhibit remarkable intensity. Moreover, a very slow kinetic process is observed, followed by the increase of two peaks at 2.01 and 1.92 ppm of the same intensity (Fig. 6E and F). Therefore, we can surmise that the interaction between aluminium and cacodylate is the summation of two reactions. The first one is fast, possibly representing the ligand binding to monomeric or dimeric aluminium species, and the second, slower, represents the decomposition of the polymeric Al_{13} -mer induced by the interaction with cacodylate to give simpler species, which is in agreement with the observed disaggregation of Al_{13} -mer induced

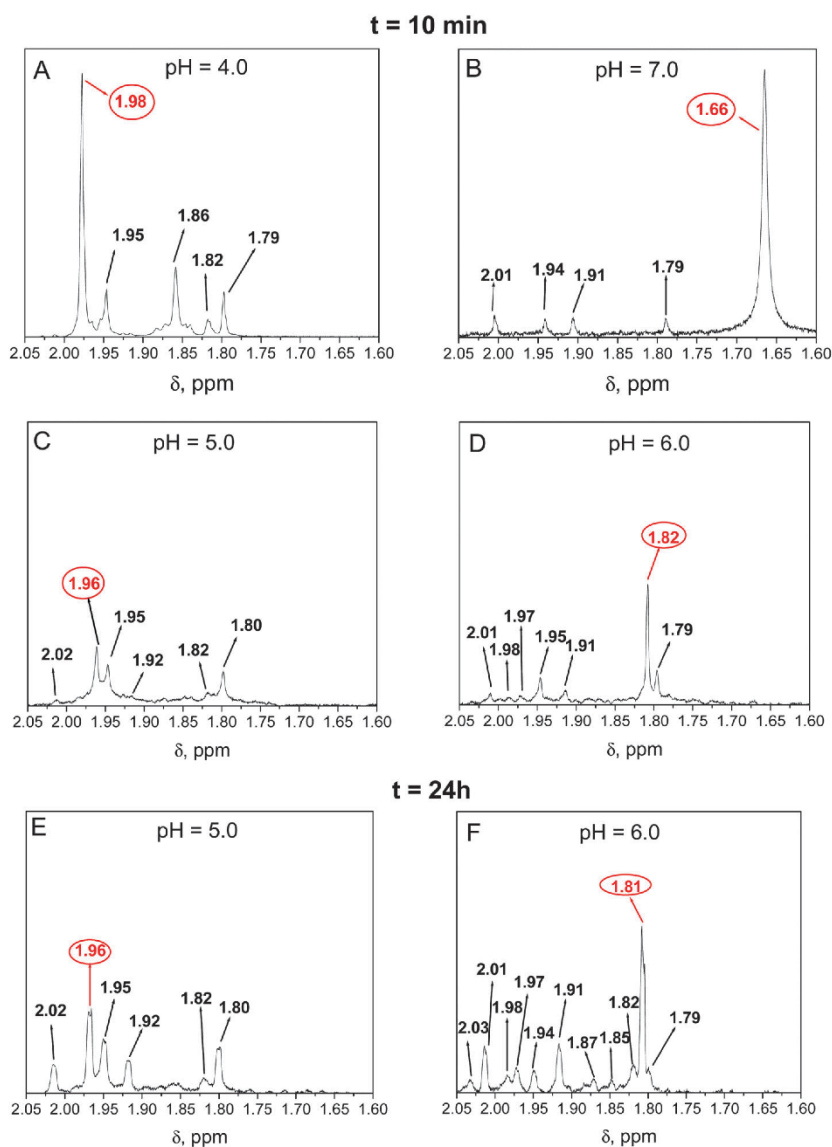


Fig. 6 $^1\text{H-NMR}$ kinetics of the Al/NaCaC complex at $t = 10$ min (A–D) and $t = 1$ day (E and F). $C_M = C_L = 5.0 \times 10^{-3}$ M, $I = 0.1$ M (NaClO_4), pH = 4.0–7.0 and $T = 25$ °C. The circled chemical shift stands for the free cacodylate at each pH.

by ligands with oxygen-containing groups, such as acetate, oxalate and lactate and, more conceivably, by protons.^{31,42–44} In this case, disaggregation seems to be more strongly dependent on the pH and less on the ligand nature.

Furrer *et al.*⁴² state that disaggregation of Al_3 -mer is driven by proton concentration. In other words, the presence of cacodylate does not justify by itself the disaggregation of the aluminium oligomers under the experimental conditions ($C_L/C_M = 1$). However, the ^1H NMR spectra (Fig. S4, ESI[†]) show that an excess of ligand causes an increase in the peak intensity associated to complexed cacodylate. Thus, certain competition between the inner and outer coordination spheres can be envisaged in an excess of ligand, where

the former can evolve to simpler forms by disruption of the polymer. The results at pH 7.0 significantly differ from the trend observed at pH 5.0 and 6.0. A very broad, low intensity, peak centred at 60 ppm is obtained in the $^{27}\text{Al-NMR}$ spectra (Fig. 5A), and the $^1\text{H-NMR}$ exhibits very small peaks of the complexed forms (Fig. 6B), even at the same resonance of the peaks at pH 5.0 and 6.0. However, at pH 7.0 no precipitation was observed in the Al/Cac solutions, whereas extended precipitation occurs for the free aluminium. Therefore, we can assume interactions occur, although of a different nature compared to those at work at lower pH values.

Stumm⁴⁵ suggested that the interaction of an organic ligand with a solid interface can be differentiated between inner

(strong bonding) and outer (weak bonding) coordination spheres. In a study of the acetate/aluminium system⁴⁶ it was proposed that the interaction of the acetate ion with Al₂O₃ in suspension involves mainly the outer coordination sphere. We suggest that at pH 7.0 cacodylate can interact with Al(III) aggregates in the same way as acetate reacts with an aluminium oxide suspension. The resulting complex enables aluminium to remain in solution. This result is interesting because we verified that cacodylate renders aluminium soluble in near physiological condition systems (*I* = 0.1 M, pH = 7.0 and *T* = 25 °C).

Determination of K_{app} of aluminium/cacodylate complexes.

The apparent equilibrium constant, K_{app} , for the formation of the aluminium/cacodylate (Al/Cac) complexes, was determined from batch-wise spectrophotometric titrations performed for different pH values. The apparent reaction is,



where M_f and L_f are the non-complexed free metal and ligand forms, respectively, and ML_T is the total complex. Most of the experimental data-pairs were obtained with no excess of metal or ligand. The interaction between aluminium species and cacodylate causes a hypochromic effect (Fig. 7A). The data-pairs were analysed according to eqn (6):

$$\frac{C_L C_M}{\Delta A} + \frac{\Delta A}{\Delta \varepsilon^2} = \frac{C_L + C_M}{\Delta \varepsilon} + \frac{1}{K_{app} \Delta \varepsilon} \quad (6)$$

where C_L and C_M are the analytical ligand and metal concentration, respectively, $\Delta A = A - \varepsilon_i C_L$ and $\Delta \varepsilon = \varepsilon_{ML} - \varepsilon_L$, where ε_i is the absorptivity of the *i*th species.

Different binding isotherms were obtained using absorbance values within 195–205 nm (Fig. 7A), a range where aluminium ions display no absorption, whereas the different dimethylarsinic forms have different absorptivity, ε_i . As for the $pK_{A,2}$ constant of free cacodylate calculated by UV-Vis, the use of different tracks reinforces the goodness of our results. The equilibrium constants obtained (Table 1) are averaged values. At pH = 2.0, such evaluation was unfeasible because the change in absorbance was too modest owing to the repression of the

binding reaction caused by protons, which is in agreement with the NMR results.

The relationship between K_{app} and $[H^+]$ is expressed by eqn (7) (see ESI†) in the form:

$$\begin{aligned} \frac{K_{app}}{\alpha_L \beta_{Al}} = & K^I + K^{II} \frac{Q_{1.1}}{[H^+]} + K^{III} \frac{Q_{1.2}}{[H^+]^2} + K^{IV} \frac{Q_{1.3}}{[H^+]^3} + K^V \frac{Q_{1.4}}{[H^+]^4} \\ & + K^{VI} \frac{Q_{2.2} C_M \beta_{Al}}{[H^+]^2} + K^{VII} \frac{Q_{3.4} C_M^2 \beta_{Al}^2}{[H^+]^4} \\ & + K^{VIII} \frac{Q_{13.32} C_M^{12} \beta_{Al}^{12}}{[H^+]^{32}} \end{aligned} \quad (7)$$

where α_L is the mole fraction of the species Cac⁻, β_{Al} is the mole fraction of the species Al³⁺, K^I , K^{II} , K^{III} , K^{IV} , K^V , K^{VI} , K^{VII} and K^{VIII} are the true thermodynamic constants for the binding of Cac to Al³⁺, Al(OH)²⁺, Al(OH)₂⁺, Al(OH)₃, Al(OH)₄⁻, Al₂(OH)₂⁴⁺, Al₃(OH)₄⁵⁺ and Al₁₃O₄(OH)₂₄⁷⁺, respectively. On the other side, the β values (Fig. 3) support simplification of eqn (7) to eqn (8). Actually, except for the Al³⁺ and Al₁₃-mer, all contributions are negligible under the experimental conditions employed, due to the mole fraction of the other species being low.

$$\frac{K_{app}}{\alpha_L \beta_{Al}} = K^I + K^{VIII} \frac{Q_{13.32} C_M^{12} \beta_{Al}^{12}}{[H^+]^{32}} \quad (8)$$

Moreover, since formation of the polymeric form is fully attained within a very narrow pH range, two well defined pH ranges can be distinguished. In the first range (3.0 < pH < 4.3), the monomers Al³⁺ and AlOH²⁺ are active, while in the second (4.7 < pH < 5.0) the Al₁₃-mer is active. For pH > 4.5, the contribution of K^I to eqn (8) is negligible (Fig. 7B). In this pH range, $\log[K_{app}/(\alpha_L \beta_{Al}^{13})]$ versus pH plots for different C_M values (Fig. S5A, ESI†), and a $\log[K_{app}[H^+]^{32}/(\alpha_L \beta_{Al}^{13})]$ versus C_M plot (Fig. S5B, ESI†) yielded straight lines with a slope equal to 32 and 12, respectively, reinforcing the presence of Al₁₃O₄(OH)₂₄⁷⁺ as the reactive species. Analysis according to eqn (8) of K_{app} versus pH plots yielded $K^{VIII} = (1.6 \pm 0.4) \times 10^6 \text{ M}^{-12}$ (Fig. 7B). This data can be used in

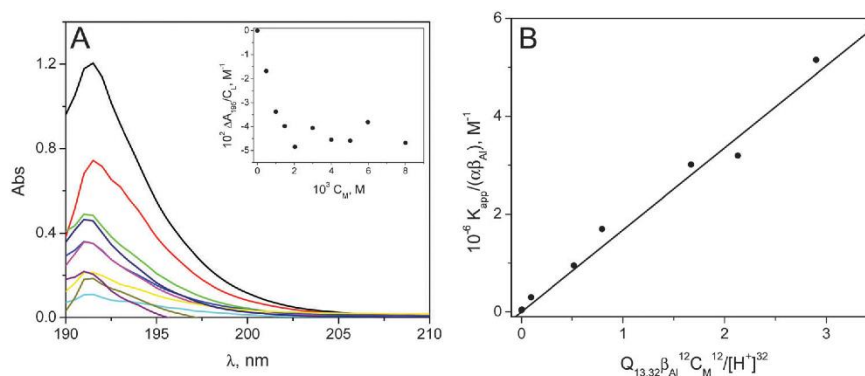


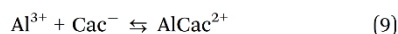
Fig. 7 (A) Example of spectrophotometric titration of the Al/Cac system. Inset: Track at $\lambda = 195$ nm. $C_L = 1.0 \times 10^{-3}$ M, $I = 0.1$ M, pH = 4.8 and $T = 25$ °C. (B) Analysis according to eqn (8) of the 4.3 < pH < 5.0 data.

Table 1 Apparent equilibrium constants for the binding of aluminium to cacodylate (K_{app}) at different pH values. $I = 0.1 \text{ M}$ (NaClO_4) and $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$

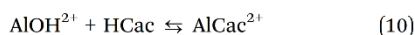
pH	$K_{\text{app}} \text{ (M}^{-1}\text{)}$
3.0	25 ± 5
4.0	290 ± 50
4.3	560 ± 60
4.5	2200 ± 300
4.7	3400 ± 600
4.8	4600 ± 900
4.9	5400 ± 1000
5.0	6500 ± 1000

the $3.0 < \text{pH} < 4.3$ region to evaluate the true thermodynamic constant $K^{\text{I}} = (4 \pm 2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

Likewise, from the NMR data obtained we evaluated the apparent equilibrium constant for $C_{\text{L}} = C_{\text{M}}$ and different pH values (see ESI†). The K_{app} values obtained at pH 4 and 5 (Table S1, ESI†) concur well with the spectrophotometric values (Table 1). However, the values obtained at pH 6 and 7 are smaller than expected, thus disagreeing with the model proposed by the UV measurements (Fig. S6, ESI†) due to the observed aggregation trend of the Al_{13} units. The ^{27}Al -NMR results show that the interaction between the metal and ligand yields the AlCac complex and not AlHCac or AlH_2Cac , however no indication was inferred as to whether AlCac is forming *via* reaction (9) or (10):



Reaction (9) cannot be distinguished from the equivalent reaction (10), neither by thermodynamic experiments (since the dependence of the conditional equilibrium constant on $[\text{H}^+]$ would be the same) nor kinetically (since the formula of the activated complex would be the same):



Careful consideration of the kinetics behaviour of the Al(III) species has allowed us to establish the most probable pathway: with AlOH^{2+} being about 10^4 -fold more reactive than the Al^{3+} aquo ion (as it follows from comparison of the respective rates of water exchange⁴⁷), the first step of the Al(III) binding to a chelating ligand should be about 10^3 -fold faster in the case of AlOH^{2+} .⁴⁸ Hence, for $\text{pH} > 2$ the formation of AlCac^{2+} will proceed mainly through reaction (10). The equilibrium constant of reaction (10), denoted as K^{II} , is related to K^{I} by the relationship $K^{\text{II}} = K^{\text{I}}K_{\text{A2}}/Q_{11}$. Its value is $K^{\text{II}} = (8 \pm 4) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. It is only for $\text{pH} > 5$ that the contribution of the deprotonated Cac^- ion to the binding reaction becomes important. This interpretation differs from that advanced in a previous study,¹⁹ where the formation of the 1:1 complex was rationalized assuming that the main process is the reaction of the Al^{3+} ion with the deprotonated form of the ligand, Cac^- .

DFT calculations: hypothesis of Al/Cac structures. By means of mass spectrometry and NMR data, we have hypothesized possible Al/Cac structures. It can reasonably be assumed that the ligand chelates the metal, as demonstrated for other oxygenated ligands with aluminium.^{31,46,49}

The suggested structure of the monomer species is shown in Fig. 8A (note that water molecules can be replaced by hydroxo groups, and more than one ligand could be present). For the dimer species, the mass spectrometry and NMR data gathered do not clarify the exact structure, so different geometries can be considered. Based on earlier studies on different Al(III) complexes,^{36,46} we propose the following structures: two aluminium atoms linked by two oxygen groups (Fig. 8B); the interaction of the aluminium atoms is obtained *via* hydroxo groups (Fig. 8C); only one oxygen binds the aluminium atoms, like in the third structure (Fig. 8D). Interestingly, a different M_2L structure is proposed for the aluminium/acetate complex.⁴⁶ Since cacodylate has a similar structure to acetate, we propose a similar geometry associated to the most intense signal in the mass spectra ($m/z = 121$) and NMR spectra ($\delta = 1.95$ and 1.80 ppm) (Fig. 8E). As a matter of fact, a *syn-syn* bridging geometry is considered using the experimental results, where the two oxygens bind to both aluminium atoms in the dimeric form. Hence, a double hydroxo- or oxo-bridged geometry is present. For the trimeric and tetrameric species, other more complex structures can be hypothesized with the same bridging geometry.

To convincingly justify the hypotheses drawn on the dimeric complexes, we undertook theoretical energy calculations of these complexes. For the M_2L dimeric system, four different structures were calculated (B, C and two more E structures, with and without bridging oxygens, which will be denoted as E(OH) and E(O) , respectively). The two E structures consist of a 2:1 complex, where cacodylate is bound to only one Al atom *via* a double O-bridge. The B and C structures resemble the E(O) and E(OH) structures, respectively, but with OH bridging ligands between Al atoms, instead of an O-bridge, and two more hydroxo ligands.

The stability has been studied in terms of the overall energy (products energy). The DFT optimization of these structures results in the following stability sequence, from the most to the least stable (Hartree units): (B) (-849.660435) > (C) (-849.651503) > (E(O)) (-849.590124) > (E(OH)) (-849.558751). Thus, the most stable structure involves OH-bridging ligands between Al atoms with cacodylate bound to both metal centres. The optimized structure of (E(OH)) is plotted in Fig. 9A.

A non-symmetrical conformation has been obtained (C_1 symmetry group) with OH groups in the Al-Al plane pointing to the cacodylate group. Surprisingly, methyl groups bound to the As adopted an eclipsed conformation. Full NBO (Natural Bond Orbital) analysis has revealed, as expected, that the Al and As sites are primarily positively charged. Oxygen atoms in the Al-O-As bonds are significantly more negative than the others due to the donating nature of the metals charge. Thus, the oxygen site in the OH-bridges between Al atoms are, indeed, more negative than those on the water molecules. The characterization parameters (bond distance and angle) of the “core” of the molecule (every atom surrounding the Al and As atoms) are compiled in Table S2, ESI†. The two atom distances and angles containing Al are similar, showing that the core lies in a symmetrical environment and the above mentioned asymmetry is due to the slightly asymmetric conformation of the H_2O , OH and CH_3 groups.

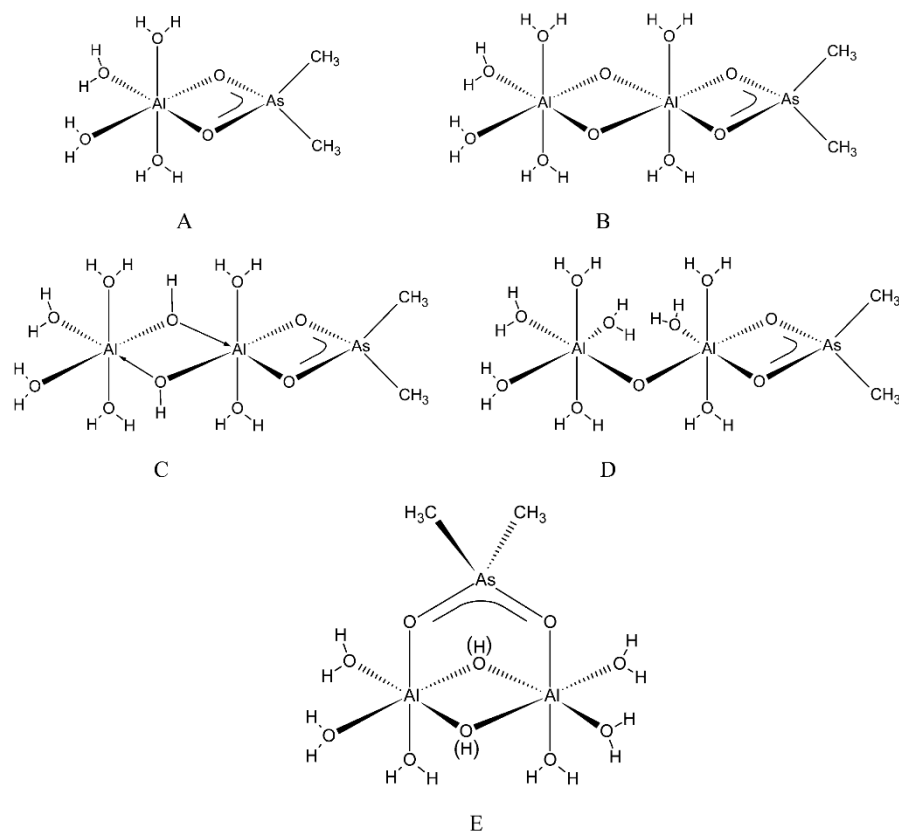


Fig. 8 (A) 1 : 1 structure. (B) First 2 : 1 structure. (C) Second 2 : 1 structure. (D) Third 2 : 1 structure. (E) Fourth 2 : 1 structure: *syn-syn* bridging geometry.

In addition, the DFT optimization and geometry analysis of two 2 : 2 complex structures (Fig. S7, ESI[†]), has been carried out, whose presence was confirmed by mass spectrometry ($m/z = 361$). Since the calculations for a double *syn-syn* bridging geometric complex (Fig. S7A, ESI[†]) proved it to be unstable in water, a complex linear geometry (Fig. S7B, ESI[†]) has been optimized by DFT to a minimum energy state ($E = -933.31$ Hartrees). In the final conformation, one hydrogen atom from a water molecule is lost, and transferred to one of the O-bridging ligands between the Al atoms. Moreover, a full water molecule is lost, remaining nearby the 2 : 2 complex *via* H-bonding interactions (Fig. 9B). These rearrangements, result in a surprisingly different conformation for Al atoms, from the initial Al(octahedral)-Al(octahedral) to Al(pyramidal)-Al(octahedral).

The stabilization of the pyramidal configuration can be explained by the H-bonding induced by the above mentioned water molecule that comes off of the molecule (Table S3, ESI[†]), showing that the expected symmetry of the optimized structure is totally lost. The distance and angle values of the Al-O bonds considerably differ from their theoretical mirror image bonds. The dihedral angles show a different orientation of the As-O-Al(pyramidal)-O and As-O-Al(octahedral) rings compared to the plane containing Al(1), O(2) and Al(3); the Al(pyramidal) ring is primarily orientated to the *yz* plane, whereas the

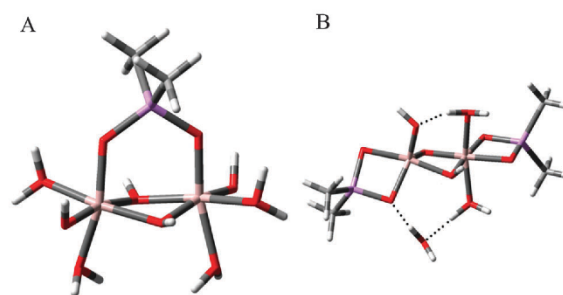


Fig. 9 (A) DFT optimization of the E(OH) structure in water, using the B3LYP functional with a 6-31G(d) basis set for C (grey), H (white) and O (red) atoms, and LANL2DZ for Al (pink) and As (purple) atoms. (B) DFT optimization of the 2 : 2 linear complex in water, using the B3LYP functional with a 6-31G(d) basis set for C (grey), H (white) and O (red) atoms, and LANL2DZ for Al (pink), As (purple) atoms and H-bonding interactions (dashed lines).

Al(octahedral) containing ring, lies in the *xz* plane. As described for the 2 : 1 complex, the NBO analysis shows electron donation from the metals to oxygen, an effect more intense for the O-bridging ligands between Al atoms.

DFT calculations suggest that the 2 : 2 complex hypothesized by MS data is an asymmetric system, in which the four methyl

groups are surrounded by different chemical environments; then, it follows that they have different chemical shifts. The $^1\text{H-NMR}$ spectrum at $\text{pH} = 6.0$ (Fig. 6D) of the Al/Cac system shows a number of peaks that, even if they cannot be specifically associated to the corresponding methyl groups, could agree with a Al_2Cac_2 asymmetric system. At $\text{pH} = 5.0$ these peaks are only a little visible, even if the MS spectra denote that Al_2Cac_2 is a relevant product. Regarding the $^{27}\text{Al-NMR}$, the broad peak observed does not allow us to obtain information on the presence of this specific complex. However, other studies suggest the presence of penta-coordinated aluminium in complexes of oxygenated ligands with mono and dimeric aluminium.^{50,51}

4. Conclusions

Thermodynamic experiments of the interaction between Al(III) and dimethylarsinic acid suggest that the apparent binding affinity has a maximum in the $\text{pH} 5\text{--}6$ region, whereas at $\text{pH} = 4.0$ and $\text{pH} = 7.0$ the binding strength is low. Comparison of the MS and NMR data suggests that the main species formed is a 2 : 1 complex. Thus, the most probable effect is that the 1 : 1 complex, which forms first, has a high affinity for a second aluminium ion. In particular, the most plausible structure is the dimeric *syn-syn* bridging geometric structure of cacodylate, interacting with the two aluminium centres (Fig. 8E). On the other hand, the different behaviour observed at $\text{pH} 7.0$ relative to that at $\text{pH} 4\text{--}6$ is explained by assuming the formation of an outer sphere coordination of the ligand to the Al_{13} aggregates at neutral pH , thus avoiding precipitation. On the other hand, at a lower pH the polymeric form splits into smaller units, an effect promoted mainly by the proton and, to a less extent, by the ligand. Elucidation of the Al/Cac complex, which prevents aluminium from precipitating, in particular under near physiological conditions ($I = 0.1\text{ M}$, $\text{pH} = 7.0$ and $25.0\text{ }^\circ\text{C}$), can be very useful for obtaining a system for studying the biological processes and molecular mechanisms that underlie pathological effects induced by aluminium ions.

Acknowledgements

This work was supported by Obra Social "la Caixa" (OSLC-2012-007), and MINECO, CTQ2014-58812-C2-2-R projects, Spain.

Notes and references

- C. F. Baes and R. E. Mesmer, *Hydrolysis of Cations*, John Wiley & Sons, New York, 1976, ch. 6, pp. 112–123.
- M. Lamberti, I. D'Auria, M. Mazzeo, S. Milione, V. Bertolasi and D. Pappalardo, *Organometallics*, 2012, **31**, 5551–5560.
- J. I. Mujika, J. M. Ugalde and X. Lopez, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2012, **14**, 12465–12475.
- S. Bhattacharjee, Y. Zhao, J. M. Hill, F. Culicchia, T. P. A. Kruck, M. E. Percy, A. I. Pogue, J. R. Walton and W. J. Lukiw, *J. Inorg. Biochem.*, 2013, **126**, 35–37.
- T. Kiss, *J. Inorg. Biochem.*, 2013, **128**, 156–163.
- A. Strunecka, R. L. Blaylock and J. Patocka, *Curr. Inorg. Chem.*, 2012, **2**, 8–18.
- C. Exley and J. D. Birchall, *J. Theor. Biol.*, 1992, **159**, 83–98.
- E. H. Jeffery, K. Abreo, E. Burgess, J. Cannata and J. L. Greger, *J. Toxicol. Environ. Health*, 1996, **48**, 649–665.
- S. A. Latt and H. A. Sober, *Biochemistry*, 1967, **6**, 3307–3314.
- B. Holmberg, *Z. Phys. Chem.*, 1910, **70**, 153–158.
- J. Juillard and N. Simonet, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1968, 1883–1894.
- K. B. Jacobson, B. D. Sarma and J. B. Murphy, *FEBS Lett.*, 1972, **22**, 80–82.
- T. W. Shin, K. Kim and I. J. Lee, *J. Solution Chem.*, 1997, **26**, 379–390.
- H. Diebler, F. Secco and M. Venturini, *Biophys. Chem.*, 1987, **26**, 193–205.
- P. V. Ioannou, *Monatsh. Chem.*, 2012, **143**, 1349–1356.
- P. V. Ioannou, *Z. Anorg. Allg. Chem.*, 2010, **636**, 1347–1353.
- C. F. Whittemore and C. James, *J. Am. Chem. Soc.*, 1913, **35**, 127–132.
- R. Pietsch, *Microchim. Acta*, 1958, 220–224.
- P. V. Ioannou, *Monatsh. Chem.*, 2013, **144**, 793–802.
- W. C. Wolsey, *J. Chem. Educ.*, 1973, **50**, A335–A337.
- P. A. W. van Hees and U. S. Lundstrom, *Geoderma*, 2000, **94**, 201–221.
- M. Lashkari and M. R. Arshadi, *Chem. Phys.*, 2004, **299**, 131–137.
- H. Kawamura, V. Kumar, Q. Sun and Y. Kawazoe, *Mater. Trans., JIM*, 2001, **42**, 2175–2179.
- Z. J. Wu and X. F. Ma, *Chem. Phys. Lett.*, 2003, **371**, 35–39.
- X. Jin, W. Yang, Z. Qian, Y. Wanga and S. Bi, *Dalton Trans.*, 2011, **40**, 5052–5058.
- M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, Ö. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski and D. J. Fox, *Revision C.01*, Gaussian, Inc., 2010.
- B. Garcia, S. Ibeas, F. J. Hoyuelos, J. M. Leal, F. Secco and M. Venturini, *J. Org. Chem.*, 2001, **66**, 7986–7993.
- M. L. Kilpatrick, *J. Am. Chem. Soc.*, 1949, **71**, 2607–2610.
- G. Furrer, C. Ludwig and P. W. Schindler, *J. Colloid Interface Sci.*, 1992, **149**, 56–67.
- C. Ye, Z. Bi and D. Wang, *Colloids Surf., A*, 2013, **436**, 782–786.

- 31 W. H. Casey, *Chem. Rev.*, 2006, **106**, 1–16.
- 32 J. W. Eaton, D. Bateman and S. Hauberg, *A High-Level Interactive Language for Numerical Computations*, Create Space Independent Publishing Platform, 3.0.1 edn, 2009.
- 33 M. H. Florencio, M. F. Duarte, A. M. M. deBettencourt, M. L. Gomes and L. F. V. Boas, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1997, **11**, 469–473.
- 34 H. R. Hansen, A. Raab and J. Feldmann, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2003, **18**, 474–479.
- 35 T. Urabe, M. Tanaka, S. Kumakura and T. Tsugoshi, *J. Mass Spectrom.*, 2007, **42**, 591–597.
- 36 A. Sarpola, V. Hietapelto, J. Jalonen, J. Jokela, R. S. Laitinen and J. Ramo, *J. Mass Spectrom.*, 2004, **39**, 1209–1218.
- 37 A. T. Sarpola, V. K. Hietapelto, J. E. Jalonen, J. Jokela and J. H. Ramo, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 2006, **86**, 1007–1018.
- 38 A. Sarpola, V. Hietapelto, J. Jalonen, J. Jokela and R. S. Laitinen, *J. Mass Spectrom.*, 2004, **39**, 423–430.
- 39 T. Urabe, T. Tsugoshi and W. Tanakaa, *J. Mass Spectrom.*, 2009, **44**, 193–202.
- 40 J. W. Akitt and B. E. Mann, *J. Magn. Reson.*, 1981, **44**, 584–589.
- 41 J. J. Fitzgerald, L. E. Johnson and J. S. Frye, *J. Magn. Reson.*, 1989, **84**, 121–133.
- 42 G. Furrer, M. Gfeller and B. Wehrli, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 1999, **63**, 3069–3076.
- 43 A. Masion, F. Thomas, D. Tchoubar, J. Y. Bottero and P. Tekely, *Langmuir*, 1994, **10**, 4353–4356.
- 44 A. Amirbahman, M. Gfeller and G. Furrer, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 2000, **64**, 911–919.
- 45 W. Stumm, *Chemistry of the solid–water interface: processes at the mineral–water and particle–water interface in natural systems*, John Wiley & Sons, New York, 1992, ch. 1, pp. 4–8.
- 46 P. Persson, M. Karlsson and L. O. Ohman, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 1998, **62**, 3657–3668.
- 47 J. P. Nordin, D. J. Sullivan, B. L. Phillips and W. H. Casey, *Inorg. Chem.*, 1998, **37**, 4760–4763.
- 48 F. Secco and M. Venturini, *Inorg. Chem.*, 1975, **14**, 1978–1981.
- 49 R. B. Martin, *Clin. Chem.*, 1986, **32**, 1797–1806.
- 50 J. F. Stebbins, S. Kroeker, S. K. Lee and T. J. Kiczanski, *J. Non-Cryst. Solids*, 2000, **275**, 1–6.
- 51 C. H. Lin, B. T. Ko, F. C. Wang, C. C. Lin and C. Y. Kuo, *J. Organomet. Chem.*, 1999, **575**, 67–75.

Electronic Supplementary Information (ESI)

Stabilization of Al(III) solutions by complexation with cacodylic acid:
speciation and binding features

Matteo Lari^a, Héctor Lozano^a, Natalia Busto^a, Tarita Biver^b, José M. Leal^a, Saturnino Ibeas^a, James A. Platts^c,

Fernando Secco^b, Begoña García^{a*}

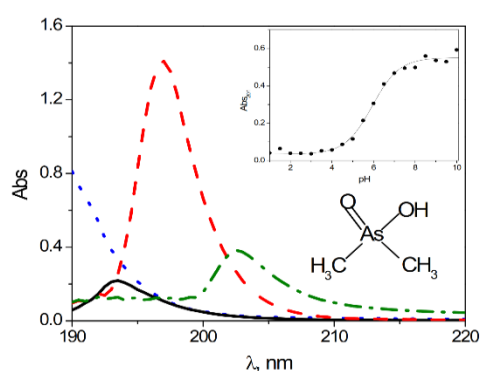


Fig. S1 Absorbance spectra of dimethylarsinic acid recorded at different pH. (•••) 1.0, (—) 3.0, (---) 7.0, (- · - ·) 11.0. $C_L = 1.0 \times 10^{-3}$ M, $I = 0.1$ M (NaClO_4) and $T = 25.0$ °C. Inset: Absorbance variation with pH at for the HCac/Cac⁻ system at $\lambda = 201$ nm. For pH 3, the band with maximum at $\lambda = 193$ nm, should be related to the HCac form. Above pH 3, the spectrum shifts towards a new band centred at $\lambda = 197$ nm, ascribable to the dimethylarsinate anion (Cac⁻). Inside: change in absorbance upon titration in the 2-10 pH range.

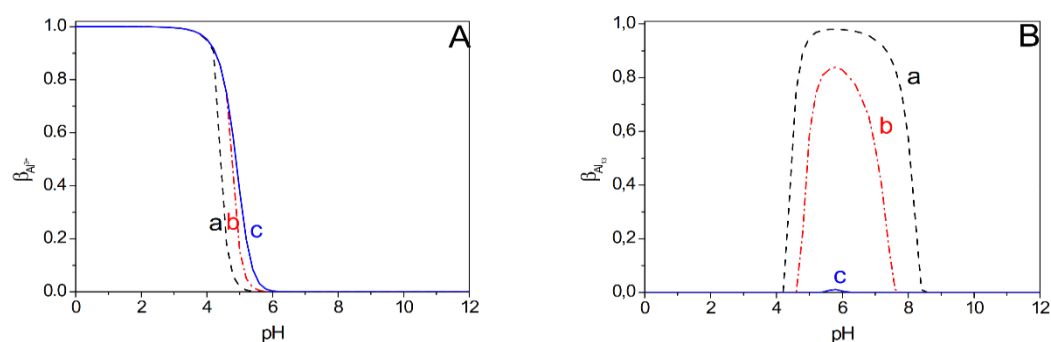
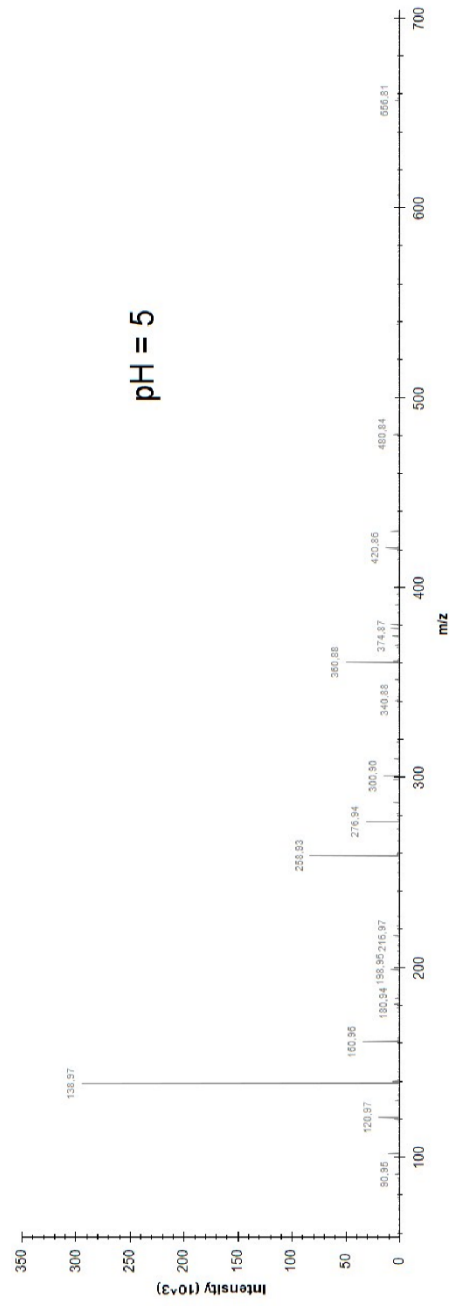
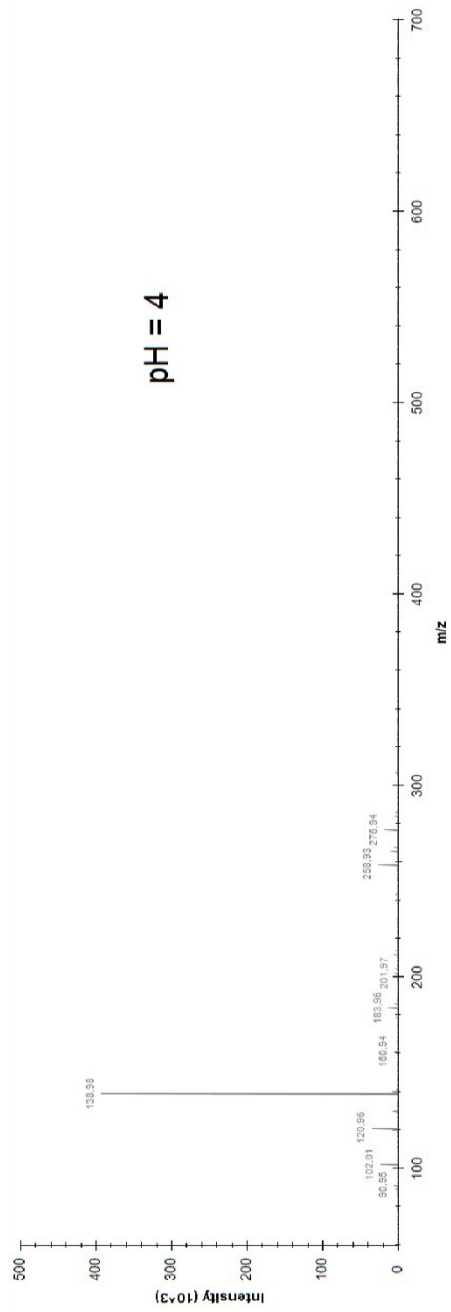


Fig. S2 (A) Molar fraction of Al^{3+} ($\beta_{\text{Al}^{3+}}$) vs. pH at different analytical concentration of the metal, C_M . (B) Molar fraction of the polymeric aluminium ($\beta_{\text{Al}_{12}}$) vs. pH at different C_M . (a) $C_M = 10^{-5}$ M, (b) $C_M = 10^{-4}$ M and (c) $C_M = 10^{-3}$ M. $I = 0.1$ M and $T = 25.0$ °C.



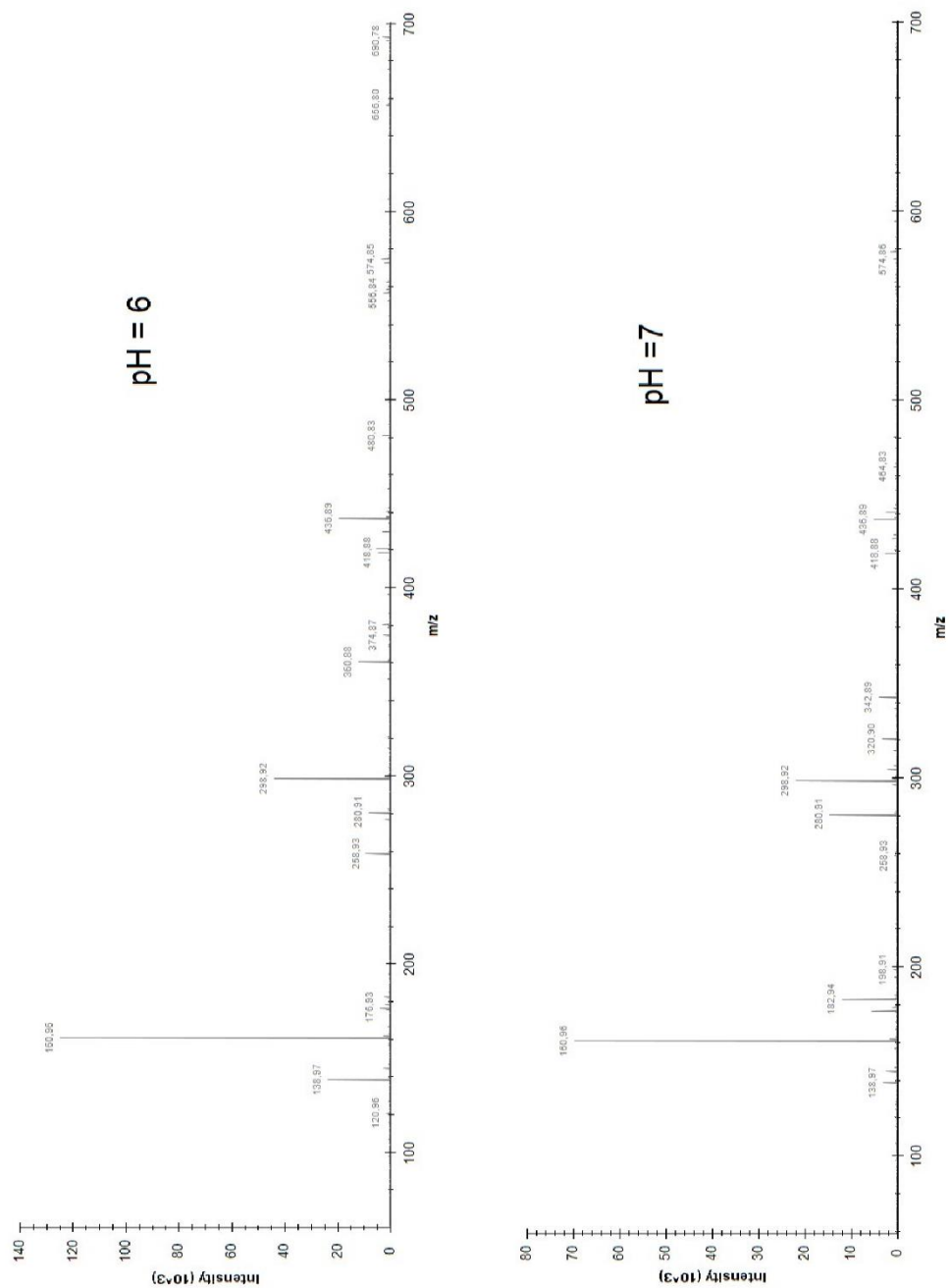


Fig. S3 Mass Spectra of Al/Cac solution at pH = 4.0, 5.0, 6.0 and 7.0. $C_M = 2.0 \times 10^{-4}$ M, $C_L = 2.0 \times 10^{-4}$ M, T = 25.0 °C.

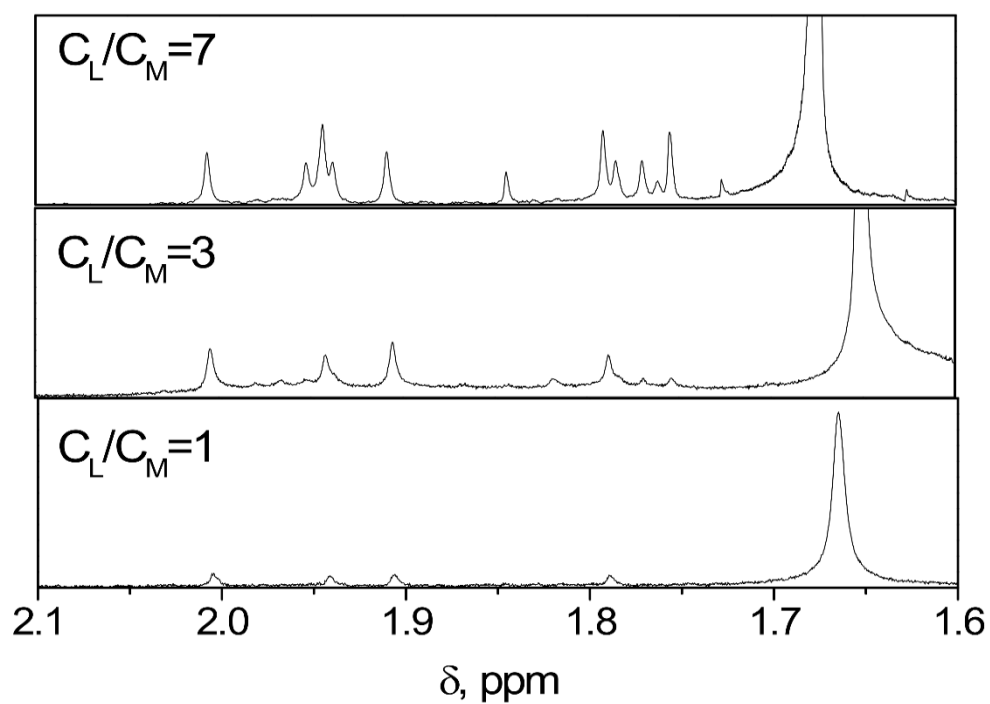


Fig. S4 NMR spectra of Al/Cac complexes at different C_L/C_M . $C_M = 1.0 \times 10^{-3}$ M, $I = 0.1$ M (NaClO₄), pH = 7.0, $T = 25.0$ °C.

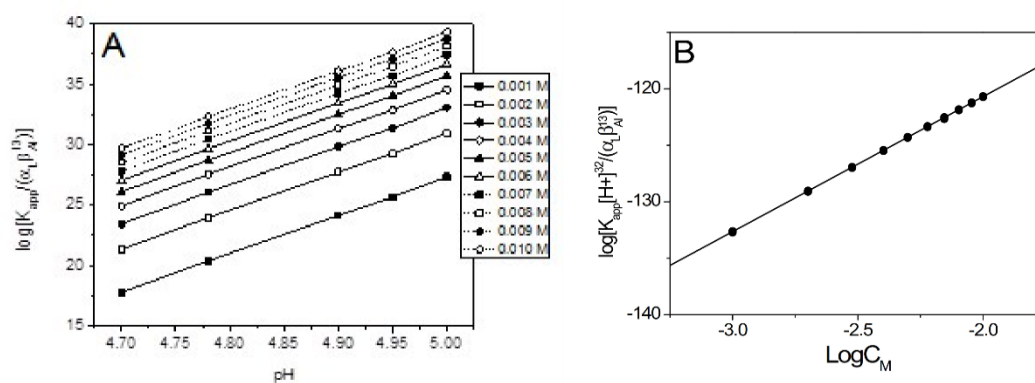


Fig. S5 (A) Data treatment of eq 8 as a function of pH at different C_M values; (B) data treatment of eq 8 as a function of $\text{Log}C_M$; $I = 0.1 \text{ M}$ and $T = 25.0 \text{ }^\circ\text{C}$.

NMR determination of K_{app} of Aluminium/Cacodylate complexes: To evaluate the apparent equilibrium constant for complex formation (K_{app}) from the NMR data of Fig. S5, quantitative analyses were conducted according to eqn. (S1), where I_L^n is the normalized peak area of free cacodylate and I_{ML}^n is the total normalized area of the bound cacodylate .

$$K_{app} = \frac{[ML]}{[M][L]} = \frac{I_{ML}^n C_L}{I_L^n C_L (C_M - I_{ML}^n C_L)} \quad (\text{S1})$$

Table S1 Apparent equilibrium constants for complex formation (K_{app}) obtained from the ^1H -NMR spectra. $C_M = C_L = 5.0 \times 10^{-3} \text{ M}$, $I = 0.1 \text{ M}$ and $T = 25.0 \text{ }^\circ\text{C}$.

pH	$10^{-3} K_{app} (\text{M}^{-1})$
4	0.2 ± 0.1
5	4 ± 2
6	1.5 ± 0.5
7	0.06 ± 0.02

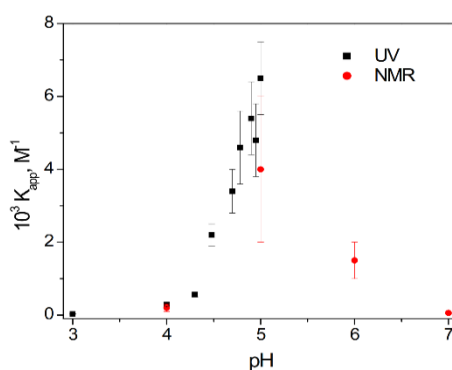


Fig. S6 Resume of the values of K_{app} obtained from the UV titrations (■) and the NMR spectra (●). $I = 0.1 \text{ M}$ and $T = 25.0 \text{ }^\circ\text{C}$

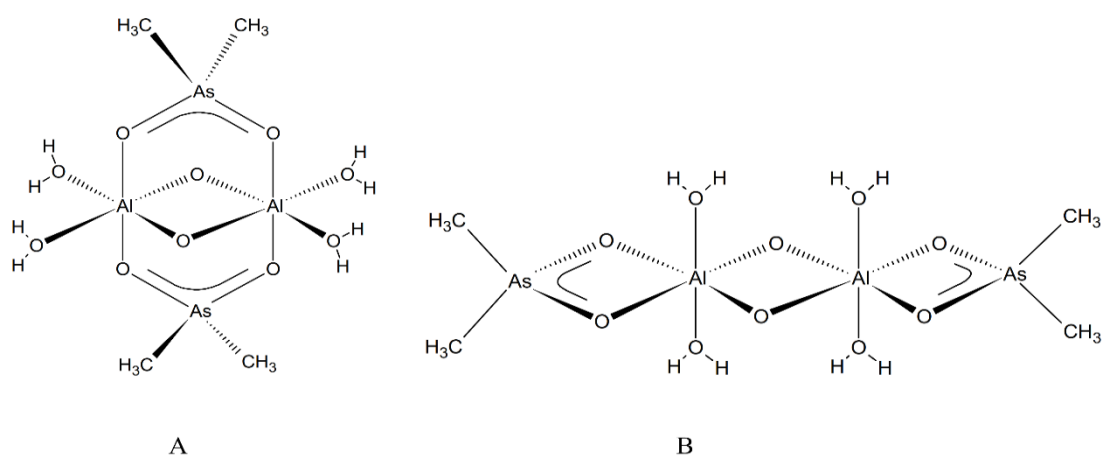
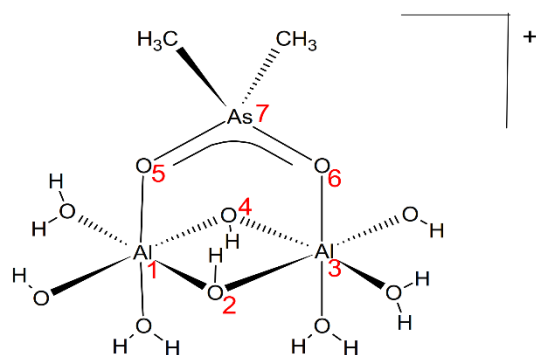


Fig. S7 Structures for DFT analysis for the M_2L_2 dimeric system.

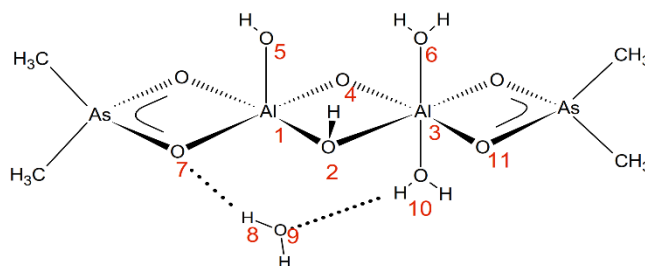
Table S2 Formula of Al/Cac complexes by the mass spectrometry data. $C_M = C_L = 2.0 \times 10^{-4}M$; $T=25.0^\circ C$.

Complexes	V	m/z	10^3 Intensity				
			pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	
<i>Monomeric</i>	$AlCac(H_2O)_v^{2+}$	1	91	5	3	1	0.5
	$AlOHcAc(H_2O)_v^+$	0	181	1.5	4		
		1	199	2	8	-	-
		2	217	1	6		
<i>Dimeric</i>	$Al_2O(OH)Cac(H_2O)_v^{2+}$	1	121	40	30	2	1
		2	130	17	3	-	-
	$Al_2O(OH)Cac_2(H_2O)_v^+$	0	361		50	13	
		1	379	-	7	1	-
		2	397		2	1	
		$Al_2OCac_3(H_2O)_v^+$	0	481		6	3
1	499		-	1	0.5	-	
2	517			0.5	0.3	-	
<i>Trimeric</i>	$Al_3O(OH)_3Cac(H_2O)_v^{3+}$	2	107	1	1	1	1
		0	283		5		
	$Al_3O_3(OH)Cac(H_2O)_v^+$	1	301	-	7	-	-
		2	319		2.5		
		$Al_3O_2(OH)_2Cac_2(H_2O)_v^+$	0	421	-	13	5
	1		439		1	1	-

	$\text{Al}_3\text{O}(\text{OH})_3\text{Cac}_3(\text{H}_2\text{O})_v^+$	1	577		1.5	-	-
		2	595	-	-	0.5	0.5
		3	613		-	-	0.5
		4	631		-	0.5	-
<i>Tetrameric</i>	$\text{Al}_4\text{O}_2(\text{OH})_2\text{Cac}_3(\text{H}_2\text{O})_v^+$	1	603		-	-	-
		4	657		-	1.5	-
		6	693		3	3	-
		7	711		-	0.5	-

Table S3 Selected parameters, Distances (Å) and Angles (Deg), for the 2:1 Al/Cac complex.


Distances		Angles	
Atoms	Value	Atoms	Value
Al(1)-O(2)	1.92	O(2)-Al(1)-O(4)	74.28
Al(1)-O(4)	1.93	O(2)-Al(1)-O(5)	97.82
Al(1)-O(5)	1.90	O(2)-Al(3)-O(4)	74.28
Al(1)-Al(3)	3.00	O(2)-Al(3)-O(6)	96.14
Al(3)-O(2)	1.93	Al(1)-O(2)-Al(3)	102.65
Al(3)-O(4)	1.92	Al(1)-O(4)-Al(3)	102.79
Al(3)-O(6)	1.90	O(5)-As(7)-O(6)	112.86
As(7)-O(5)	1.70		
As(7)-O(6)	1.70		

Table S4 Selected parameters, Distances (Å), Angles (Deg), and Dihedral Angles (Deg) for the 2:2 Al/Cac complex.


Distances		Angles		Dihedral angles	
Atoms	Value	Atoms	Value	Atoms	Value
Al(1)-O(2)	1.98	O(2)-Al(1)-O(4)	84.35	O(7)-Al(1)-O(2)-Al(3)	133.78
				Al(1)-O(2)-Al(3)-O(11)	164.80

Al(1)-O(4)	1.75	O(2)-Al(1)-O(5)	89.26
Al(1)-O(5)	1.82	O(2)-Al(3)-O(4)	74.28
Al(1)-Al(3)	1.95	O(2)-Al(3)-O(6)	84.69
Al(3)-O(2)	1.94	Al(1)-O(2)-Al(3)	87.87
Al(3)-O(4)	1.78	Al(1)-O(4)-Al(3)	99.98
Al(3)-O(6)	2.11	O(7)-Al(1)-O(2)	90.67
Al(3)-O(10)	2.04		
Al(1)-O(7)	1.93		
O(7)-H(8)	1.75		
O(9)-H(10)	1.65		

Derivation of Equation 8

The apparent constant K_{app} which represents the overall equilibria between the Aluminium forms and the cacodylic acid forms can be expressed by eqn. S2, where $[i]$, is the concentration at the equilibrium of the i^{th} form.

$$K_{app} = \frac{[AlCac^{2+}] + [Al(OH)Cac^+] + [Al(OH)_2Cac] + [Al(OH)_3Cac^-] + [Al(OH)_4Cac^{2-}] + [Al_2(OH)_2Cac^{3+}] + [Al_3(OH)_4Cac^{4+}]}{([HCac] + [Cac^-])([Al^{3+}] + [Al(OH)^{2+}] + [Al(OH)_2^+] + [Al(OH)_3] + [Al(OH)_4^-] + [Al_2(OH)_2^{4+}] + [Al_3(OH)_4^5])} \quad (S2)$$

Using the molar fraction of deprotonated cacodylate (α_L) and Al^{3+} (β_{Al})

$$\alpha_L = \frac{[Cac^-]}{[HCac] + [Cac^-]} \quad (S3)$$

$$\beta_{Al} = \frac{[Al^{3+}]}{[Al^{3+}] + [Al(OH)^{2+}] + [Al(OH)_2^+] + [Al(OH)_3] + [Al(OH)_4^-] + [Al_2(OH)_2^{4+}] + [Al_3(OH)_4^5]} \quad (S4)$$

eqn. S2 turns into eqn. S5. (Note that in eqn S3 the species H_2CaC^+ has been disregarded since the concentration of this species is negelegible in the full range of pH investigated)

$$\frac{K_{app}}{\alpha_L \beta_{Al}} = \frac{[AlCac^{2+}]}{[Al^{3+}][Cac^-]} + \frac{[Al(OH)Cac^+]}{[Al^{3+}][Cac^-]} + \frac{[Al(OH)_2Cac]}{[Al^{3+}][Cac^-]} + \frac{[Al(OH)_3Cac^-]}{[Al^{3+}][Cac^-]} + \frac{[Al(OH)_4Cac^{2-}]}{[Al^{3+}][Cac^-]} + \frac{[Al_2(OH)_2Cac^{3+}]}{[Al^{3+}][Cac^-]} + \frac{[Al_3(OH)_4Cac^{4+}]}{[Al^{3+}][Cac^-]} + \frac{[Al_{13}O_4(OH)_{24}Cac^{6+}]}{[Al^{3+}][Cac^-]} \quad (S5)$$

The equilibrium ratio $Q_{x,y}$ for aluminium hydrolysis, defined in Ref.1 of the text are introduced in eqn. S5, to convert $[Al^{3+}]$ into the concentrations of the desired hydrolyzed forms. So, eqn. S6 is obtained.

$$\frac{K_{app}}{\alpha_L \beta_{Al}} = \frac{[AlCac^{2+}]}{[Al^{3+}][Cac^-]} + \frac{[Al(OH)Cac^+]}{[Al(OH)^{2+}][Cac^-][H^+]} Q_{1.1} + \frac{[Al(OH)_2Cac]}{[Al(OH)_2^+][Cac^-][H^+]^2} Q_{1.2} + \frac{[Al(OH)_3Cac^-]}{[Al(OH)_3][Cac^-][H^+]} Q_{1.3} + \frac{Q_{1.4}}{[H^+]^4}$$

$$\begin{aligned}
 & + \frac{[Al_2(OH)_2Cac^{3+}] Q_{2,2} C_M \beta_{Al}}{[Al_2(OH)_2^{4+}][Cac^-] [H^+]^2} + \frac{[Al_3(OH)_4Cac^{4+}] Q_{3,4} C_M^2 \beta_{Al}^2}{[Al_3(OH)_4^{5+}][Cac^-] [H^+]^4} + \frac{[Al_{13}O_4(OH)_{24}Cac^{6+}]}{[Al_{13}O_4(OH)_{24}^{7+}][Cac^-]} \\
 & \frac{Q_{13,32} C_M^{12} \beta_{Al}^{12}}{[H^+]^{32}}
 \end{aligned} \tag{S6}$$

The equilibrium constants of the different complexes can be expressed as $K^x = [ML]/([M][L])$. Introduction of this equation in eqn. S6 yields equation eqn. S7.

$$\frac{K_{app}}{\alpha_L \beta_{Al}} = K^I + K^{II} \frac{Q_{1,1}}{[H^+]} + K^{III} \frac{Q_{1,2}}{[H^+]^2} + K^{IV} \frac{Q_{1,3}}{[H^+]^3} + K^V \frac{Q_{1,4}}{[H^+]^4} + K^{VI} \frac{Q_{2,2} C_M \beta_{Al}}{[H^+]^2} + K^{VII} \frac{Q_{3,4} C_M^2 \beta_{Al}^2}{[H^+]^4} + K^{VIII} \frac{Q_{13,32} C_M^{12} \beta_{Al}^{12}}{[H^+]^{32}} \tag{S7}$$

However, since the predominant species are Al^{3+} and Al_{13} in the experimental conditions, the equation can be simplified, resulting the eqn. S8, which corresponds to eqn. 8 of the text

$$\frac{K_{app}}{\alpha_L \beta_{Al}} = K^I + K^{VIII} \frac{Q_{13,32} C_M^{12} \beta_{Al}^{12}}{[H^+]^{32}} \tag{S8}$$

Capítulo VI

Interacción de complejos derivados de Aluminio con ADN y ARN a diferentes pHs

VI. Interacción de complejos derivados de Aluminio con ADN y ARN a diferentes pHs

En el anterior capítulo se comprobó la formación de diferentes complejos Aluminio/Cacodilato en función de la acidez del medio. A $\text{pH} = 7$ el complejo formado es un oligómero constituido por trece átomos de Aluminio que satura su esfera de coordinación con Cacodilato (en adelante $\text{Al}_{13}\text{Cac}_x$). A $\text{pH} = 5$ se forma el dímero Al_2Cac_2 . Para ambos valores de pH se ha estudiado la interacción de estos complejos con ADN y ARN y establecido las diferencias tanto en función del pH como del tipo de polinucleótido.

La interacción de Aluminio con polinucleótidos ya ha sido objeto de investigación, habiéndose confirmado la capacidad de este metal de interactuar con ADN,¹⁴⁸ con preferencia sobre cationes divalentes, siendo capaz de provocar un cambio conformacional desde la forma B hasta la Z cuando está complejado con Maltol.¹⁴⁹ Estos hechos junto con la actividad biológica del Aluminio descrita en el Capítulo V, ponen de manifiesto el interés que suscita el estudio de la interacción con polinucleótidos de nuevos complejos derivados de Aluminio.

Para este estudio se han empleado métodos cinéticos y termodinámicos. A $\text{pH} = 5$ el mecanismo de reacción ha sido caracterizado con un espectrofotómetro UV-Vis convencional y un viscosímetro, dado que se forma un lento enlace covalente entre el polinucleótido y Al_2Cac_2 . A $\text{pH} = 7$ no se observó variación de absorción con el tiempo. A ambos valores de pH el estudio termodinámico se ha llevado a cabo mediante espectrofotometría UV-Vis, dicroísmo circular y viscosimetría.

Los resultados obtenidos muestran una interacción muy diferente de $\text{Al}_{13}\text{Cac}_x$ y Al_2Cac_2 frente a ARN y ADN. En el caso de $\text{Al}_{13}\text{Cac}_x$ ($\text{pH} = 7$) el gran tamaño del complejo hace que la interacción con los polinucleótidos solo sea posible mediante enlace externo, mostrando mayor afinidad por la conformación A del ARN (produce una desestabilización de la doble hélice) que por ADN. En el caso de Al_2Cac_2 ($\text{pH} = 5$) el enlace covalente conlleva una estabilización térmica de ambos polinucleótidos.

Interaction of Aluminium derivative complexes with DNA and RNA at different pHs

VI.1. Abstract

The interaction of four polynucleotides (poly(rA)·poly(rU), ctDNA, poly[(dA·dT)]₂ and poly[(dG·dC)]₂) with two different aluminum derivatives acting as ligands has been studied from a kinetic and thermodynamic points of view. At pH = 7 the complex is Al₁₃CaC_x, where CaC_x is an unknown number of cacodylate molecules that confer an unknown charge to the complex, and at pH = 5, the Al complex is Al₂CaC₂ is present and. The complex Al₁₃CaC_x interacts with the studied RNA and DNA via non covalent binding, the affinity of RNA being slightly higher than that of DNA. At pH = 5 the interaction between Al₂CaC₂ and the studied polynucleotides takes place via covalent binding.

VI.2. Introduction

Non-essential metals, such as Aluminium, are well-known due to their toxic properties. Aluminium is often related to neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease,¹⁵⁰ Parkinson dementia or dialysis encephatolopy. In addition, Aluminium ion is commonly introduced in human body by foods and drinks.¹⁵¹ Some facts that turn Al ions dangerous for biological systems are its pro-oxidant power and its ability to act out as an excitotoxin.¹⁴⁶ Regarding Aluminium compounds, genotoxic and cytotoxic effects have been published for AlCl₃¹⁴⁷ a commonly Al salt, used in this work as the metal source. Nowadays a wide variety of investigations have reported interactions of Aluminium or Al-ligand with DNA through different modes of binding. In 1987, Dyrssen et al¹⁵² confirmed the formation of the Al/DNA complex by ion exchange reaction ($K_{ex} = 6.47$, pH = 4.5 – 5.5, I = 50mM) with DNA's phosphate groups with preference over essentials metals such as Mg²⁺ and Ca²⁺. Later on, some works have been published proving that on *in vitro* studies Al binds to polynucleotides via cross-linking¹⁵³ and a slightly cross-linking of proteins and DNA by Al have been found in NAH cells.¹⁵⁴ However, such experiments were carried out using NaCac as a buffer, and, as we demonstrated in a previous work,¹⁵² sodium cacodylate reacts with Aluminium to yield different complexes depending on the pH: a dimer species at pH = 5 and an

oligomer species at pH = 7. Therefore, those results must be reinterpreted. On the other hand, some complexes containing Al are prone to interact with DNA, driving the B form of DNA to Z-DNA,¹⁴⁹ in the same way as divalent cations do. The interactions described above are relatively surprising due to the fact that Al is not soluble at pH > 4, unless Al complexes are formed with O-donor ligands,¹⁵⁵ whose structures and consequently the interaction mode towards polynucleotides, should strongly depend on the medium acidity. Moreover, interactions of Aluminium with proteins have also been reported: Al³⁺ binds to transferrin^{156–158} and can be transported and then accumulated in organs. In its AlF₄⁻ form, Aluminium is able to bind Guanine (GDP or GTP) through the phosphate groups,¹⁵⁹ playing a role in G-rich dimerization processes that are related to oncogenicity.¹⁶⁰ For these reasons, the study of the interaction of Al complexes deserves a research to gain deeper knowledge on how this metal can affect human body, even at pH = 5, where in polynucleotides the double helix form¹⁶¹ still remain.

VI.3. Materials and Methods

Al³⁺ ions were obtained from Aluminium perchlorate (Al(ClO₄)₃) supplied by Sigma-Aldrich. Sodium cacodylate [(CH₃)₂AsO₂Na], was purchased from Fluka. Doubly distilled water from a Millipore Q apparatus (APS, Los Angeles, California) was used. Stock solutions were prepared in 0.1M NaClO₄. The Aluminium concentration is denoted as M, C_M being its concentration expressed in molarity. Sodium cacodylate was used as a ligand (L), C_L being the ligand concentration. The complex formed is denoted as D and its concentration expressed as C_D. poly(rA)·poly(rU), ctDNA, poly[(dA·dT)]₂ and poly[(dG·dC)]₂ were purchased from Sigma-Aldrich as lyophilized sodium salts, and were used without further purification. Stock solutions of the polynucleotides were prepared by dissolving the solid in water and standardized spectrophotometrically, using $\epsilon = 14900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($\lambda = 260 \text{ nm}$), $\epsilon = 13200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($\lambda = 260 \text{ nm}$), $\epsilon = 13300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($\lambda = 260 \text{ nm}$) and $\epsilon = 16800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($\lambda = 254 \text{ nm}$) for poly(rA)·poly(rU), ctDNA, poly[(dA·dT)]₂ and poly[(dG·dC)]₂ respectively. Polynucleotide (P) concentration have been labeled as C_P and is expressed as molarity of base-pairs (M_{BP}).

pH measurements were carried out with a Metrohm 16 DMS Titrino pH-meter fitted out with a combined glass electrode with a 3 M KCl solution as a liquid

junction. pH values were adjusted with HClO₄ or [NaOH] = 0.20, 0.55 and 5.40M we used to adjust pH values.

Spectrophotometric measurements were carried in a Hewlett-Packard 8453A (Agilent Technologies, Palo Alto, California) photodiode array spectrophotometer. Absorbance titrations were performed with two different cells, due to the absence of absorbance bands of Aluminium in the UV-Vis range. Initially, a known volume of ligand is added to the sample cell (S), and the same volume of solvent is added in a reference cell (R). In the next step, equal volumes of polynucleotide are added over both cells, monitoring their absorbance. Kinetic studies were performed by adding the ligand and polynucleotide mixture to the cell, recording its absorbance at different times. For thermal denaturation, the sample was heated from 20 to 90 °C at 0.3 °C/min rate reaching in 1 min stabilization. The cooling processes were performed by reversing heating the conditions.

Circular dichroism (CD) measurements were performed in a MOS-450 BioLogic (Claix, France) modular equipment at 25 °C by adding increasing amounts of the complex to a polynucleotide solution and recording the CD spectra at different times. Spectrograms from 200 – 400 nm were obtained nm at 2 s/nm. Molar ellipticity (deg·M_{BP}⁻¹·cm⁻¹) was calculated using $[\theta] = 100 \cdot \theta / C_P \cdot l$, where C_P is the polynucleotide concentration (M_{BP}) and l is the cell light path (cm).

Viscosity measurements were performed with a Micro-Ubbelohde viscometer and analysed using $\eta/\eta_0 = (t - t_0)/(t_{DNA} - t_0)$, where t₀ and t_{DNA} are the flow times of the solvent and polynucleotide solutions, respectively, whereas t is the flow time of the Al complex and the polynucleotide mixture. Mean values of replicated measurements were used to evaluate the viscosity of the Al complex/polynucleotide system, η , and that of polynucleotide alone, η_0 .¹⁶²

VI.4. Results and discussion

In a previous work,¹⁵² the speciation at different pH values of the complex formed after the reaction of Aluminium with Sodium cacodylate was reported. At pH = 7, the complex consists of the Al₁₃O₄(OH)₂₄⁷⁺ oligomer (Al₁₃Cac_x complex in advance) whose coordination sphere is saturated with Cacodylate. On the other hand, at pH = 5.0, the main complex is primarily Al₂Cac₂ (cationic). From this point, we study the interaction of the complexes with different polynucleotides at

pH = 7 and 5. The results obtained with every instrumental technique will be compared and critically discussed.

Kinetics

Kinetic studies were performed at pH = 7 with absorbance and viscosity measurements in excess of RNA and DNA in order to check the binding mode between the ligand and the polynucleotides. For the $Al_{13}Cac_x/poly(rA)\cdot poly(rU)$ system a sharp diminution in the absorbance intensity was observed after 2 h due to precipitation phenomenon of Al_{13} -mer. For the $Al_{13}Cac_x/ctDNA$ system, the amplitude of the kinetic trace (not shown) was negligible. Additionally, kinetic measurements were also performed for $Al_{13}Cac_x/poly[(dA\cdot dT)]_2$ and $Al_{13}Cac_x/poly[(dG\cdot dC)]_2$ systems with no significant change in absorbance (not shown). The kinetic effect of the $Al_{13}Cac_x$ complex was also evaluated with viscosity measurements, no change in viscosity was observed for $Al_{13}Cac_x/poly(rA)\cdot poly(rU)$, nor for $Al_{13}Cac_x/ctDNA$ (not shown). The absence of a kinetic process suggests that the formation of a complex between $Al_{13}Cac_x$ and RNA and DNA take place via non covalent binding and it will be studied from a thermodynamic standpoint.

Similar experiments were carried out at pH = 5, where Al_2Cac_2 is present. Figure VI.1 shows two kinetic traces for the $Al_2Cac_2/poly(rA)\cdot poly(rU)$ and $Al_2Cac_2/ctDNA$ systems. The study was also performed by studying the variation of L/L_0 with time, for ctDNA the reaction takes place in the first 40 min, whereas for RNA the reaction goes to completion after 150 min as shown in Figure VI.2. The processes have been analyzed by fitting a biexponential equation to the data-pairs and the rate constants obtained are listed in Table VI.1. For Al_2Cac_2 the interaction with RNA and DNA takes place via covalent binding. By comparing the k_1 values we can conclude that the interaction of Al_2Cac_2 is faster with DNA than with RNA. In the studied systems, k_2 is ascribable to rearrangements inside RNA and DNA helices.

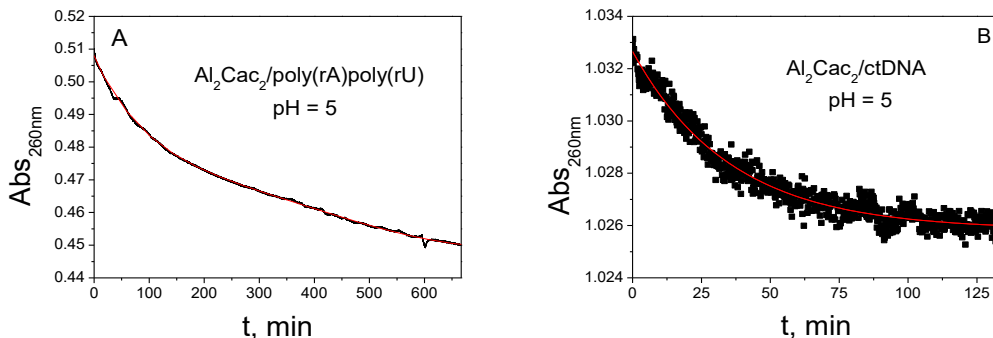


Figure VI.1. Slow kinetic in absorbance for (A) $\text{Al}_2\text{Cac}_2/\text{poly}(\text{rA})\cdot\text{poly}(\text{rU})$ system, $C_P = 3.4 \times 10^{-5}$ M and (B) $\text{Al}_2\text{Cac}_2/\text{ctDNA}$ system. $C_P = 9.9 \times 10^{-5}$ M. $C_P/C_D = 25$, $\lambda = 260$ nm, $I = 0.1$ M (NaClO_4), pH = 5 and $T = 25$ °C. No kinetic traces were obtained at pH = 7.

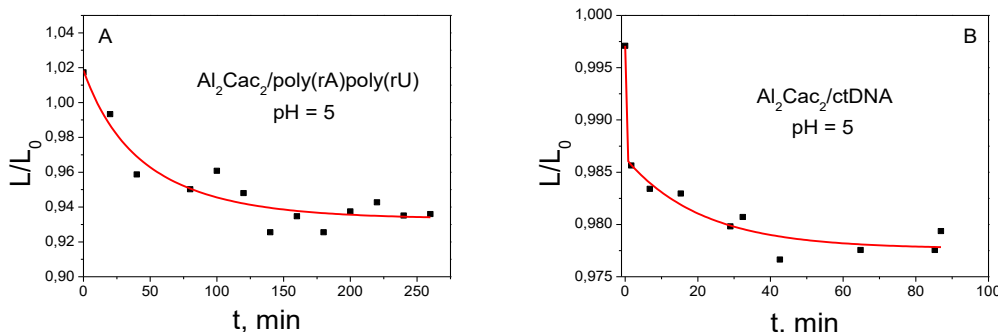


Figure VI.2. L/L_0 versus t for (A) $\text{Al}_2\text{Cac}_2/\text{poly}(\text{rA})\cdot\text{poly}(\text{rU})$ system and (B) $\text{Al}_2\text{Cac}_2/\text{ctDNA}$ system. $C_P = 2.0 \times 10^{-4}$ M, $C_D/C_P = 0.5$, $I = 0.1$ M (NaClO_4), pH = 5 and $T = 25$ °C.

Table VI.1. Rate constants (k_1 and k_2) for $\text{Al}_2\text{Cac}_2/\text{poly}(\text{rA})\cdot\text{poly}(\text{rU})$ and $\text{Al}_2\text{Cac}_2/\text{ctDNA}$ systems. $I = 0.1$ M (NaClO_4), pH = 5 and $T = 25$ °C.

System	k_1, s^{-1}	k_2, s^{-1}
$\text{Al}_2\text{Cac}_2/\text{poly}(\text{rA})\cdot\text{poly}(\text{rU})$	0.05	0.01
$\text{Al}_2\text{Cac}_2/\text{ctDNA}$	6.25	0.04

Thermal behavior

a) Thermal reversibility

Heating-Cooling experiments were performed by UV-Vis measurements in order to check the melting reversibility of DNA and RNA in the presence of the $\text{Al}_{13}\text{Cac}_x$ complex at pH = 7 (Figure VI.3). The values obtained at 25°C, (Table

VI.2) show the difference, in percentage, between the absorbance of the heating and cooling processes, A_{HC} (equation [6.1]), where A_H and A_C stand for the absorbance values of the heating and cooling processes at a given temperature respectively. For free poly(rA)·poly(rU) and $Al_{13}Cac_x$ /poly(rA)·poly(rU), the A_{HC} values are practically equal (9 and 11 respectively). For poly[(dA·dT)]₂ and Al_2Cac_2 /poly[(dA·dT)]₂ the difference is slightly higher (13 and 19 respectively). With these results in mind we can assume that the presence of $Al_{13}Cac_x$ barely induces change in the RNA or DNA thermal denaturation reversibility, showing low or even negligible alteration of the double helix structure. On the other hand, a similar study was carried out at pH = 5 for Al_2Cac_2 /poly(rA)·poly(rU) and Al_2Cac_2 /poly[(dA·dT)]₂ systems (Figure VI.4). Under these conditions, the irreversibility of RNA denaturation, induced by the presence of Al_2Cac_2 , is greater than that obtained for $Al_{13}Cac_x$ ($A_{HC} = 16$ and 30 for free poly(rA)·poly(rU) and Al_2Cac_2 /poly(rA)·poly(rU), respectively). The same behavior was obtained for Al_2Cac_2 /poly[(dA·dT)]₂; obtaining an increase of the A_{HC} parameter (20.8 and 24.5 for free poly[(dA·dT)]₂ and Al_2Cac_2 /poly[(dA·dT)]₂, respectively), thus resulting in a decrease in the renaturation process in the presence of Al_2Cac_2 . These results suggest that the medium acidity not only modify the type of complex at work, but also the interaction with polynucleotides since the amount of polynucleotide that can return to free double helix is different at pH = 5. We propose a more specific interaction of Al_2Cac_2 compared to $Al_{13}Cac_x$ oligomer, ascribable to its lower size and, consequently, to its better ability to approach the double helices. Thus, the irreversibility of the cooling processes at pH = 5 as well as the slow reaction kinetics observed suggest covalent binding as the Al_2Cac_2 mode of binding.

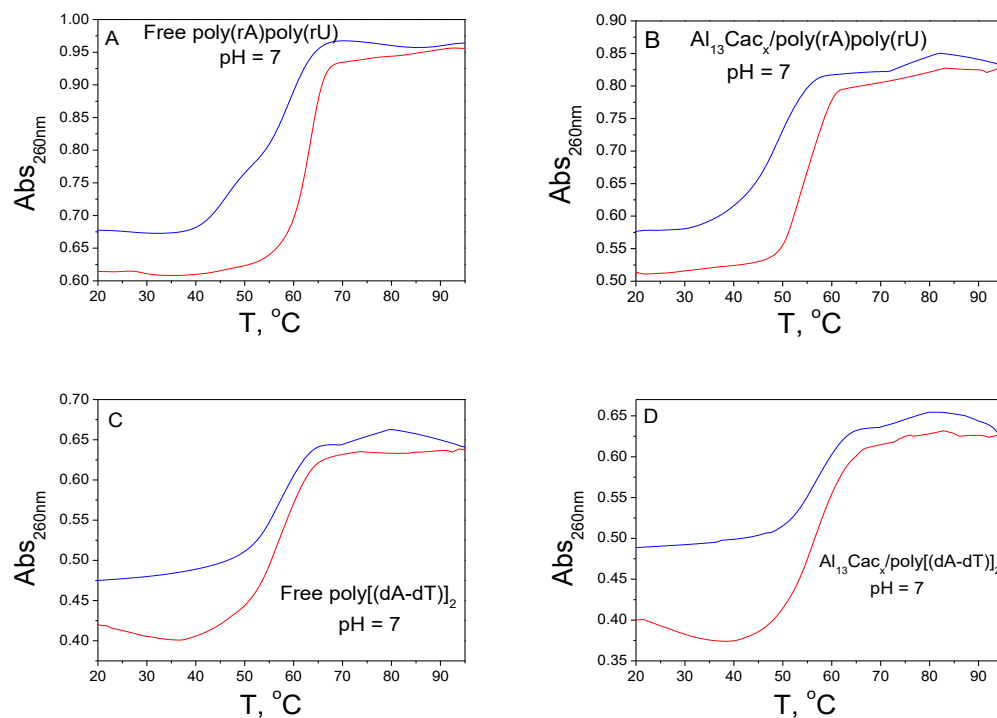


Figure VI.3. Heating(—)-Cooling(—) profiles for (A) Free poly(rA)·poly(rU), (B) $\text{Al}_{13}\text{Cac}_x/\text{poly}(\text{rA})\cdot\text{poly}(\text{rU})$, (C) Free poly[(dA·dT)]₂ and (D) $\text{Al}_{13}\text{Cac}_x/\text{poly}[(\text{dA}\cdot\text{dT})]_2$ system. $C_p = 2.5 \times 10^{-5}$ M, $C_D/C_P = 0.4$. Heating: T = 20 – 95 °C, scan rate = 0.3 °C/min, stabilization time = 1 min. Cooling: T = 95 – 20 °C, scan rate = -0.3 °C/min, stabilization time = 1 min. $\lambda = 260$ nm, I = 0.1 M (NaClO₄) and pH = 7.

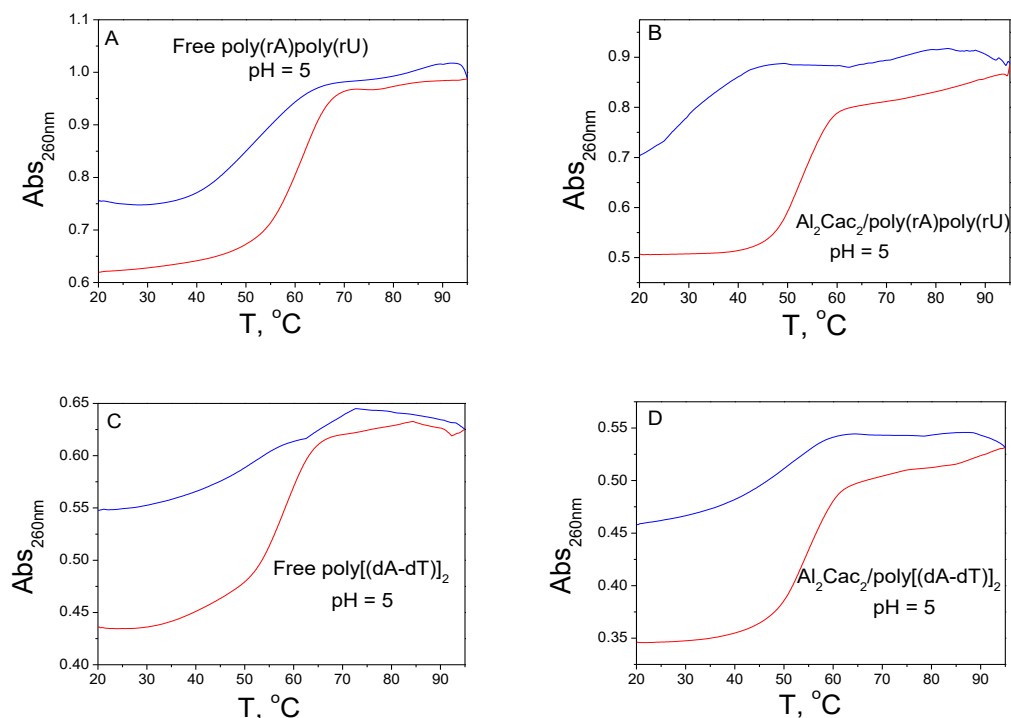


Figure VI.4. Heating(—)-Cooling(—) profiles for (A) Free poly(rA)·poly(rU), (B) $\text{Al}_2\text{Cac}_2/\text{poly}(\text{rA})\cdot\text{poly}(\text{rU})$ system, (C) Free poly[(dA·dT)]₂ and (D) $\text{Al}_2\text{Cac}_2/\text{poly}[(\text{dA}\cdot\text{dT})]_2$ system. $C_p = 2.5 \times 10^{-5}$ M. Heating: $T = 20 - 95$ °C, scan rate = 0.3 °C/min, stabilization time = 1 min. Cooling: $T = 95 - 20$ °C, scan rate = -0.3 °C/min, stabilization time = 1 min. $\lambda = 260$ nm, $I = 0.1$ M (NaClO_4) and pH = 5.

$$A_{HC} = \frac{A_C - A_H}{A_C} \quad [6.1]$$

Table VI.2. A_{HC} values, taken at $T = 25$ °C, for free poly(rA)·poly(rU), free Free poly[(dA·dT)]₂, Complex/poly(rA)·poly(rU) and Complex/poly[(dA·dT)]₂. Complex stands for $\text{Al}_{13}\text{Cac}_x$ and Al_2Cac_2 at pH = 7 and 5 respectively.

System	A_{HC} (pH = 7), %	A_{HC} (pH = 5), %
Free poly(rA)·poly(rU)	9.1	16.8
Complex/poly(rA)·poly(rU)	11.4	30.9
Free poly[(dA·dT)] ₂	13.5	20.8
Complex/poly[(dA·dT)] ₂	19.8	24.5

b) Thermal stability

The thermal stability of RNA and DNA has been tested in the presence of $\text{Al}_{13}\text{Cac}_x$ through thermal denaturation experiments (Figure VI.5A and 5B). At physiological pH, RNA undergoes destabilization when the $\text{Al}_{13}\text{Cac}_x$ concentration

in the media is raised. We have obtained $\Delta T_m = -5$ °C at the highest concentration ($C_D/C_P = 0.7$) compared to free RNA. By contrast, ctDNA is almost unaffected by the presence of $Al_{13}Cac_x$, and T_m remains unaltered in all the C_D/C_P ratio range studied. The influence of the Al_2Cac_2 at pH = 5 has also been studied in terms of thermal stability of polynucleotides as the concentration of the complex is raised (Figure VI.5C and 5D). The T_m value increases for RNA and DNA in the presence of Al_2Cac_2 up to $C_D/C_P = 0.2$ reaching a plateau and no stabilization is longer obtained. These results are opposed to that obtained under physiological conditions, in which thermal destabilization was observed.

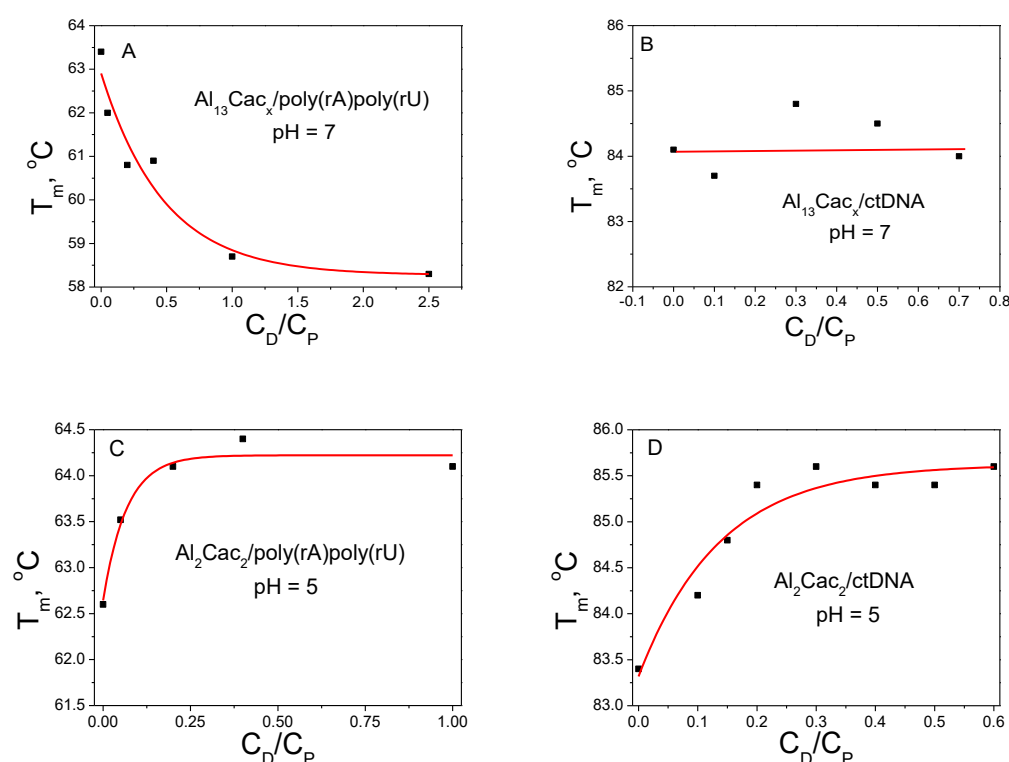


Figure VI.5. Melting temperature, T_m versus C_D/C_P at pH = 7 for (A) $Al_{13}Cac_x$ /poly(rA)·poly(rU) system, $C_P = 2.5 \times 10^{-5}$ M and (B) $Al_{13}Cac_x$ /ctDNA system, $C_P = 1.00 \times 10^{-5}$ M, and at pH = 5 for (C) Al_2Cac_2 /poly(rA)·poly(rU) system, $C_P = 2.5 \times 10^{-5}$ M and (D) Al_2Cac_2 /ctDNA system, $C_P = 2.5 \times 10^{-5}$ M. Scan rate = 0.3 °C/min, stabilization time = 1 min and I = 0.1M ($NaClO_4$).

Viscosity

Figure VI.6A and B shows the dependence of the contour length ratio (L/L_0) on the $Al_{13}Cac_x$ complex concentration, both for RNA and DNA containing solutions. At pH = 7.0, the relative viscosity decreases, showing that the RNA double helix undergoes stacking as a consequence of the interaction. Intercalation

binding mode can be ruled out for these systems at physiological pH whereas only modest changes were observed for the DNA viscosity. At pH = 5, despite the thermal stability observed in denaturation experiments, the binding of Al_2Cac_2 shortens both the RNA and DNA as shown in Figure VI.6C and D, confirming the covalent binding. The L/L_0 ratio decreases as the concentration of Al_2Cac_2 is raised up to $C_D/C_P = 0.1$; from these levels $\text{Al}_2\text{Cac}_2/\text{poly}(\text{rA})\cdot\text{poly}(\text{rU})$ system increases its contour length in a second step up to $C_D/C_P = 0.4$.

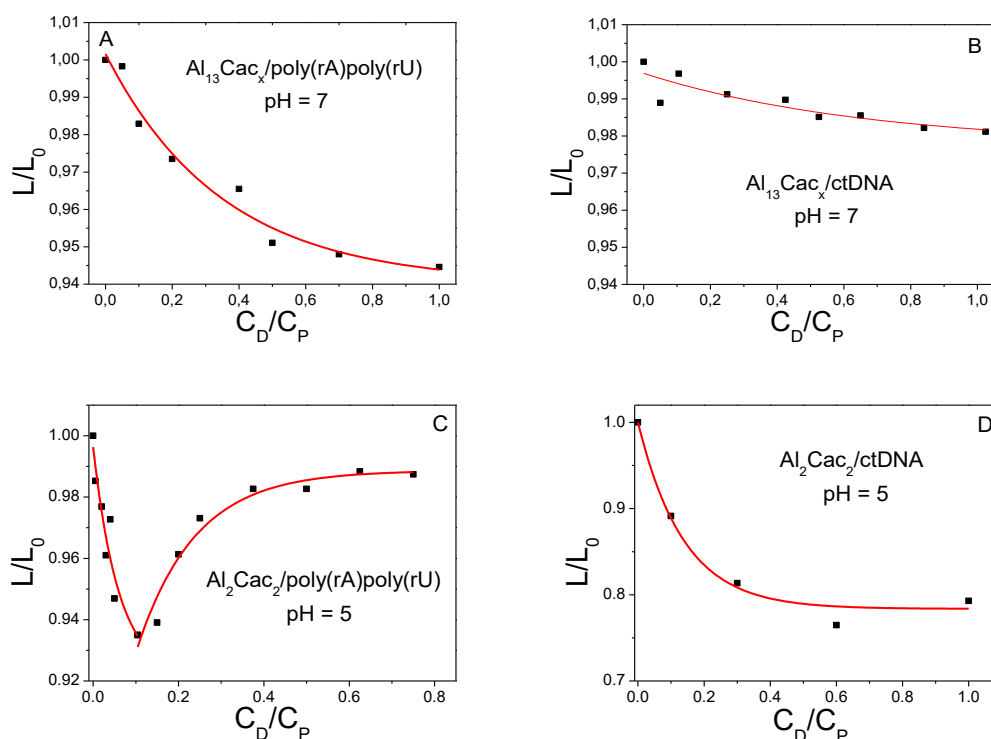


Figure VI.6. L/L_0 vs C_D/C_P at pH = 7 for (A) $\text{Al}_{13}\text{Cac}_x/\text{poly}(\text{rA})\cdot\text{poly}(\text{rU})$, (B) $\text{Al}_{13}\text{Cac}_x/\text{ctDNA}$ systems and at pH = 5 for $\text{Al}_2\text{Cac}_2/\text{poly}(\text{rA})\cdot\text{poly}(\text{rU})$ and (B) $\text{Al}_2\text{Cac}_2/\text{ctDNA}$ system. $C_P = 2.0 \times 10^{-4}$ M, $I = 0.1$ M (NaClO_4) and $T = 25$ °C. Samples at pH = 5 were measured after 2 h incubation due to kinetic effects.

Circular dichroism

Circular dichroism measurements were performed for the four polynucleotides at both pH values. In the case of pH = 7, for $\text{Al}_{13}\text{Cac}_x/\text{poly}(\text{rA})\cdot\text{poly}(\text{rU})$ system (Figure VI.7A) the proper band of RNA at $\lambda = 260$ nm diminishes as the complex concentration is raised over the whole concentration range studied. Moreover, a new negative band emerges in the ICD zone at $\lambda = 310$ nm, whose behavior is similar to that obtained at 260 nm, showing

a small conformational change of RNA in the presence of $Al_{13}Cac_x$. The CD spectra of the ctDNA circular dichroism bands shows a negligible conformational change, when adding increasing amounts of $Al_{13}Cac_x$ (Figure VI.7C) where only the positive band at 276 nm slightly decreases as the concentration of $Al_{13}Cac_x$ is raised. In the case of the $poly[(dA \cdot dT)]_2$ and $poly[(dG \cdot dC)]_2$ homopolymers (Figure VI.7E and 7G respectively), only small changes in the ellipticity were recorded for the negative band at $\lambda = 246$ and 252 nm, respectively, when $Al_{13}Cac_x$ concentration is raised.

Conformational changes of the polynucleotide structure induced by Al_2Cac_2 have also been studied with CD at pH = 5 after 2 h of incubation. As shown in Figure VI.7B, the positive band of RNA decreases up to $C_D/C_P = 0.5$. The results for RNA at pH = 5 are very different from that obtained for pH = 7, since new bands on the ICD region are absent at this pH. For Al_2Cac_2 /ctDNA system, (Figure VI.7D), the changes in the bands of DNA are really small, the change being more pronounced for the positive band in the $C_D/C_P = 0 - 0.5$ range. In the case of $poly[(dA \cdot dT)]_2$, (Figure VI.7F), certain variation of the bands in the presence of Al_2Cac_2 is observed when comparing with the same experiment at pH = 7. An isodicroic point appears at $\lambda = 280$ nm and a positive ICD band emerges at $\lambda = 280$ nm, showing the formation of a complex between Al_2Cac_2 and $poly[(dA \cdot dT)]_2$. For $poly[(dG \cdot dC)]_2$, structural changes were also observed in Figure VI.7H, but the interaction is weaker than that obtained for $poly[(dA \cdot dT)]_2$. Therefore, a partial selectivity towards A-T sequences over G-C is obtained. Moreover, same patterns were obtained for Adenine containing systems ($poly(rA) \cdot Poly(rU)$ and $poly[(dA \cdot dT)]_2$), where two different behaviors can be observed. The first, from $C_D/C_P = 0$ to 0.5, where $[\theta]$ of the proper positive bands decreases and increases for $poly(rA) \cdot Poly(rU)$ and $poly[(dA \cdot dT)]_2$, respectively, and then, the inversion of each trend at $C_D/C_P > 0.5$. In the case of G-C containing systems (ctDNA and $poly[(dG \cdot dC)]_2$) the interaction takes places from $C_D/C_P = 0$ to 1.5.

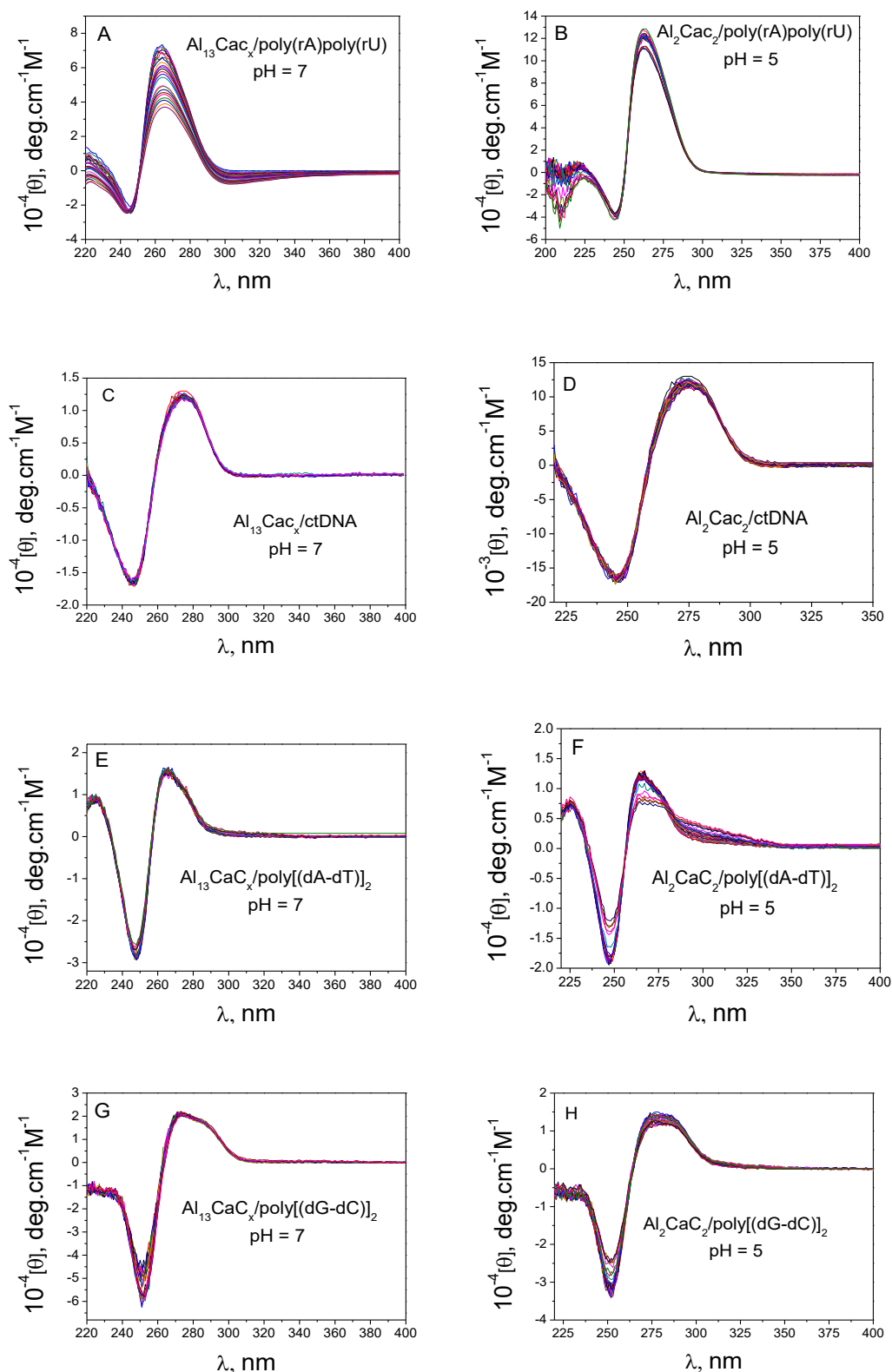


Figure VI.7. CD spectra at pH = 7 for (A) $\text{Al}_{13}\text{CaC}_x/\text{poly}(\text{rA})\text{poly}(\text{rU})$, (C) $\text{Al}_{13}\text{CaC}_x/\text{ctDNA}$, (E) $\text{Al}_{13}\text{CaC}_x/\text{poly}[(\text{dA}\cdot\text{dT})]_2$ and (G) $\text{Al}_{13}\text{CaC}_x/\text{poly}[(\text{dG}\cdot\text{dC})]_2$, and at pH = 5 for (B) $\text{Al}_2\text{CaC}_2/\text{poly}(\text{rA})\text{poly}(\text{rU})$, (D) $\text{Al}_2\text{CaC}_2/\text{ctDNA}$, (F) $\text{Al}_2\text{CaC}_2/\text{poly}[(\text{dA}\cdot\text{dT})]_2$ and (H) $\text{Al}_2\text{CaC}_2/\text{poly}[(\text{dG}\cdot\text{dC})]_2$. $C_P = 1.40 \times 10^{-4}$ M, $I = 0.1$ M (NaClO_4) and $T = 25$ °C. Samples at pH = 5 were measured after 2 h of incubation due to kinetic effects.

RNA and DNA were titrated by adding increasing amounts of $\text{Al}_{13}\text{Cac}_x$ at $\text{pH} = 7$, after subtracting the DNA contribution from the absorbance, a binding isotherm is observed (insets of Figure VI.8) The binding constant was calculated by fitting equation [2.17] to the data-pairs, being $K = (1.84 \pm 0.39) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ and $K = (1.20 \pm 0.37) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ for $\text{Al}_{13}\text{Cac}_x/\text{poly}(\text{rA})\cdot\text{poly}(\text{rU})$ and $\text{Al}_{13}\text{Cac}_x/\text{ctDNA}$ systems respectively, showing almost the same affinity of $\text{Al}_{13}\text{Cac}_x$ for DNA than for RNA.

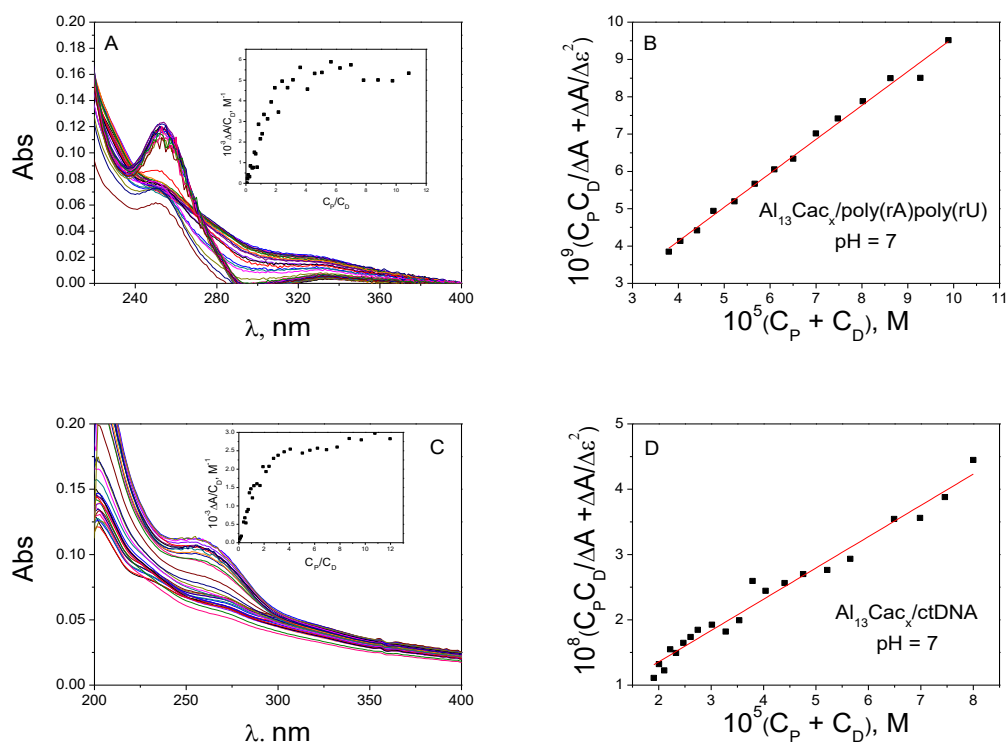


Figure VI.8. Absorbance spectra with binding isotherm (Inset) and Hildebrand & Benesi fit of (A, B) $\text{Al}_{13}\text{Cac}_x/\text{poly}(\text{rA})\cdot\text{poly}(\text{rU})$ $\lambda = 330 \text{ nm}$. (C, D) $\text{Al}_{13}\text{Cac}_x/\text{ctDNA}$, $\lambda = 260 \text{ nm}$. $C_p = 2.99 \times 10^{-4} \text{ M}$, $C_D = 1.32 \times 10^{-5} \text{ M}$. $I = 0.1 \text{ M}$ (NaClO_4), $\text{pH} = 7$ and $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. Absorbance titrations were not performed at $\text{pH} = 5$ due to the presence of covalent binding.

VI.5. Conclusions

We have studied the interaction of RNA and DNA with two aluminum derivative complexes. At $\text{pH} = 7$, the complex is $\text{Al}_{13}\text{Cac}_x$, and interacts with the polynucleotide via external binding. Even if we have obtained the same order of affinity of the aluminum complex towards RNA and DNA, the conformational changes induced upon the interaction are greater in RNA than in DNA as it has been shown in viscosity and CD measurements. The presence of $\text{Al}_{13}\text{Cac}_x$ modifies RNA

structures, as shown by the different techniques employed, destabilizing the thermal stability of the double helix of RNA. These results suggest some type of selectivity for the A-conformation over the B-conformation. By contrast, at pH = 5 the complex is Al_2Cac_2 and the interaction with DNA and RNA are covalent in nature as shown by the slow kinetic processes. These mechanisms are confirmed by CD and viscosity measurements. The influence of these complex over the polynucleotide structures and thermal reversibility is also observed by the different hysteresis cycles obtained in the heating-cooling experiments of free polynucleotides and complex/polynucleotide systems.

Capítulo VII
Efecto en el ADN y
actividad citotóxica de
derivados de Quinona y
sus correspondientes
complejos dinucleares de
Ru(II)

VII. Efecto en el ADN y actividad citotóxica de derivados de quinona y sus correspondientes complejos dinucleares de Ru(II)

En este capítulo se ha estudiado la interacción con ADN de dos ligandos orgánicos derivados de la quinona: una naftoquinona (Naphthazarin, N) y una antraquinona (Quinizarin, Q), así como de sus correspondientes complejos dinucleares de Ru(II) $\text{Cl}_2\text{Ru}_2\text{N}$ y $\text{Cl}_2\text{Ru}_2\text{Q}$ (Figura VII.1).

La elección de las quinonas se debe a su conocida actividad biológica.^{163–165} Además, en el caso de los compuestos de Rutenio, nuestro grupo tiene experiencia en la investigación de la interacción con ADN de distintos complejos mononucleares de Rutenio^{166–168}. Por este motivo se decidió sintetizar complejos dinucleares conteniendo ligandos con actividad biológica conocida como son las quinonas, con el objetivo de establecer una relación estructura-actividad. Para ello se han estudiado la interacción de ADN con los ligandos N y Q y con los complejos $\text{Cl}_2\text{Ru}_2\text{N}$ y $\text{Cl}_2\text{Ru}_2\text{Q}$ y comparado su comportamiento desde los puntos de vista químico y biológico. Estos estudios se han llevado a cabo en colaboración con el Profesor Gustavo Espino, del área Química Inorgánica de la Universidad de Burgos

Para la realización de este trabajo se han empleado técnicas de síntesis inorgánica y caracterización mediante RMN de ^1H y análisis elemental. La interacción de los ligandos con ADN se ha realizado desde un punto de vista cinético y termodinámico. El estudio se ha realizado empleando espectroscopía de absorción, viscosimetría, dicroísmo circular y calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Los resultados experimentales se han complementado con simulaciones teóricas. Se han empleado métodos semi-empíricos con los que se obtienen las estructuras iniciales de los compuestos. A partir ellas se han realizado estudios por DFT (B3LYP, M062X y $\omega\text{B97X-D}$) y en el caso de los sistemas más complejos se han empleado cálculos QM/MM mediante el método ONIOM para Gaussian 09.

Los resultados reflejan una gran influencia, en cuanto a la interacción con ADN, del anillo aromático extra que tiene Quinizarin respecto a Naphthazarin y sus

respectivos compuestos dinucleares de Ru(II). Los ligandos N y Q interactúan con ADN mediante intercalación, siendo más pronunciada en el caso de Naphthazarin. Sin embargo, es Quinizarin el que tiene más afinidad por la doble hélice de ADN. Los compuestos dinucleares de Ru (II) sufren reacción de acuación, siendo los derivados aquo los que interactúan con ADN mediante enlace covalente crosslinking. El resultado es que se crea una “pinza” por unión de cada centro metálico de Rutenio a los N7 de los residuos de dos Guaninas consecutivas. La Figura VII.1 muestra que los ligandos N y Q actúan como puente entre los centros metálicos y los N7 de dos Guaninas consecutivas.

Los estudios de citotoxicidad indican una actividad significativa para Naphthazarin y casi nula para Quinizarin. Comparada con los complejos, la actividad de $\text{Cl}_2\text{Ru}_2\text{N}$ disminuye respecto a Naphthazarin, mientras que la de $\text{Cl}_2\text{Ru}_2\text{Q}$ aumenta respecto a Quinizarin. Los mejores resultados de actividad antiproliferativa han sido obtenidos para $\text{Cl}_2\text{Ru}_2\text{N}$ debido a su buen factor de selectividad (relación entre los IC_{50} en células tumorales y sanas).

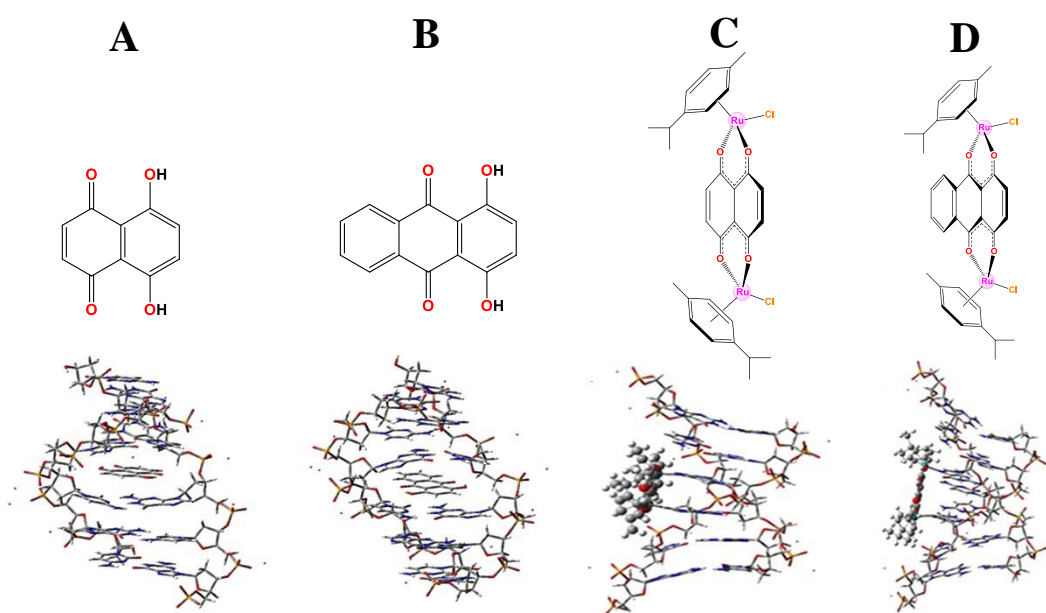


Figura VII.1. Estructuras y modos de interacción de (A) Naphthazarin, (B) Quinizarin (C) $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{N}]^{2+}$ y (D) $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}$.

Effect on DNA binding and cytotoxic activity of the extra ring of two quinones and their dinuclear Ru(II) complexes

VII.1. Abstract

The interaction of ctDNA with Naphthazarin (N, Naphthoquinone), Quinizarin (Q, Anthraquinone) and their *p*-cymene di-Ruthenium (II) complexes containing N ($\text{Cl}_2\text{Ru}_2\text{N}$) and Q ($\text{Cl}_2\text{Ru}_2\text{Q}$) as bridging ligands, has been studied experimentally and theoretically. Free quinones N and Q intercalate into DNA base pairs being the stacking distance between the ligand and the closest base-pair 3.34 Å and 3.19 Å for N and Q respectively. The experimental part shows that the affinity constant of the Q/DNA system is two orders higher than that of N/DNA. Computational studies show that the extra ring of Q increases the rigidity more than N, enhancing the affinity and the stacking interactions but the intercalation degree is higher in N than in Q. $\text{Cl}_2\text{Ru}_2\text{X}$ (X = N or Q) complexes, undergo aquation forming $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{X}]^{2+}$, followed by covalent binding between the two Ru atoms and the two N7 sites of consecutive Guanines of DNA, the Ru-N7 distances being: 2.44 and 2.50 Å for $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{N}]^{2+}/\text{ctDNA}$ system, and 2.37 and 2.39 Å for $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}/\text{ctDNA}$ system. Computational simulations support the experimental results, showing that both $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{N}]^{2+}$ and $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}$ are able to bind to DNA via either interstrand or intrastrand crosslinking. The decrease in relative viscosity and the thermal stabilization indicate that interstrand crosslinking prevails, this behavior being more pronounced for $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}$. The cytotoxic activity of the N compound is notable, whereas it is negligible for Q. Moreover, among the four studied compounds the $\text{Cl}_2\text{Ru}_2\text{N}$ complex is the most promising of the four compounds due to its low resistance factor and good selectivity. The number of rings of the aromatic moieties and the covalent binding are key to understand the behavior of the quinones and their Ruthenium derivatives.

VII.2. Introduction

One of the most important research fields in the study of DNA binding drugs are constituted by metal complexes, which have been widely used in Magnetic Image Resonance, radiopharmacy, and in arthritis and ulcer therapy as well as chemotherapy.^{169,170} One such type of metal complexes, Ru(II)-arene

compounds,¹⁷¹ has attracted attention in anticancer research^{172–175} and exhibit low toxicity compared to cisplatin, [Pt(NH₃)₂Cl₂]. The arene group stabilizes the oxidation state of Ru(II) complexes¹⁷⁶ and provides a lipophilic moiety that allows transportation through plasmatic membrane. Recently, we have reported on the anticancer properties of several half-sandwich Ru(II) complexes and the mechanism of action of most active derivatives^{166,167,177,178}. In this work, we address the binding mode of ctDNA and deoxyguanosine monophosphate, *d*GMP, with Naphthazarin (5,8-dihydroxy-1,4-naphthoquinone), and Quinizarin (1,4-Dihydroxyanthraquinone), Figure VII.1A and 1B respectively, and their dinuclear Ru(II) counterparts, Cl₂Ru₂N and Cl₂Ru₂Q, Figure VII.1C and 1D respectively, the bridging ligands being Naphthazarin (N) and Quinizarin, (Q). The bicyclic naphthoquinone dye, Naphthazarin, finds application as reactive oxygen species (ROS) scavenger,¹⁷⁹ due to its ability to form semiquinones.¹⁸⁰ The cytotoxic activity¹⁸¹ and the ability to inhibit the activity of topoisomerase (I)¹⁸² has been proven with this family of compounds. Regarding Naphthazarin, its scavenging activity against DMSO oxidation has been demonstrated.¹⁸³ This dye is cytotoxic in human gastric cancer cells, diminishing the cell viability below to 90 % at 5 μM.¹⁸⁴

Anthraquinones are anthracene derivatives with anti-tumour effect¹⁸⁵ and inhibitory action on topoisomerase (II).¹⁸⁶ These compounds have attracted attention due to the ease to add side-chains to the anthraquinone moiety, altering their affinity with DNA¹⁸⁷ and G-Quadruplexes.¹⁸⁸ Anthraquinones exhibit antiproliferative and antimetastatic activity in melanoma cells.¹⁸⁹ Quinizarin is prone to one- or two-electron reduction^{190–192} reacting with molecular oxygen and superoxide anion to yield ROS,¹⁹³ which could induce oxidative damage to DNA. Viscosity measurements have revealed that the interaction of Quinizarin with ctDNA is intercalative in nature,¹⁹⁴ and can unwind negatively supercoiled DNA.¹⁹⁵ rendering Quinizarin part of well-known DNA intercalators such as daunorubicin and doxorubicin.¹⁹⁶

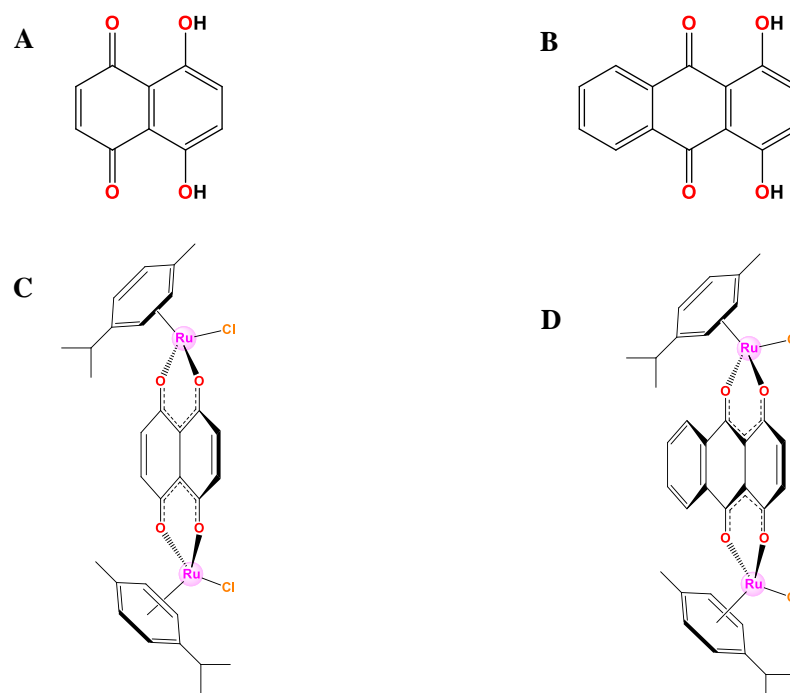


Figure VII.1. Molecular structure of (A) Naphthazarin, (B) Quinizarin, (C) [Cl₂Ru₂N and (D) Cl₂Ru₂Q.

Dinuclear Ru(II) compounds have attracted attention due to their cytotoxic¹⁹⁷ and photochemical potential.¹⁹⁸ In this work, dinuclear Ru(II) complexes, [(η^6 -*p*-cymene)₂ Ru₂(OO \cap OO)(Cl)₂] (Cl₂Ru₂X, with (OO \cap OO) the bridging ligand), have been synthesized from Naphthazarin and Quinizarin, (Cl₂Ru₂N and Cl₂Ru₂Q, respectively). The structure of dinuclear Ru(II)-arene drugs, with two binding sites, usually presents higher affinity for DNA than mononuclear complexes,¹⁹⁹ and are able to alter the DNA binding mode more drastically than the corresponding mononuclear complexes.²⁰⁰ Coordination of an additional bridging ligand to the dinuclear complexes leads to the formation of tetranuclear metallacages, which can be used as G-Quadruplex stabilizing agents^{201–203} or as encapsulation cages.¹⁷¹ Specifically, reports on formation of hexa²⁰⁴ and tetra²⁰⁵ metallacages have been published, the latter showing antiproliferative activity.²⁰⁶ To the best of our knowledge, the interactions Cl₂Ru₂N/ctDNA and Cl₂Ru₂Q/ctDNA have not been reported before. This work shows the ability of dinuclear Ruthenium complexes to modify the behavior of its respective bridging ligand upon interaction with DNA.

VII.3. Materials and methods

Calf thymus DNA (ctDNA), was purchased from Sigma Aldrich. Solutions of ctDNA were prepared by dissolving ctDNA in water and sonicated using a MSE-Sonyprep sonicator by applying 20 cycles of 10 s to suitable DNA samples (10 mL ctDNA, 3×10^{-3} M) with 20s pause between cycles, at 98 μ m amplitude. The sonicator tip was introduced directly into the solution, kept in an ice bath to minimize thermal sonication effects. To keep the integrity of ctDNA, the percentage of DMSO was kept below 5% in all experiments. Naphthazarin and Quinizarin were purchased from Sigma Aldrich and Acros Organics, and dissolved in DMSO without further purification. Henceforth, the polynucleotide will be denoted as P, C_P being its concentration, expressed in base-pair molarity (M_{BP}) and the dye will be denoted as D, C_D being its concentration.

Spectrophotometric measurements were carried out in a Hewlett-Packard 8453A (Agilent Technologies, Palo Alto, California) photodiode array spectrophotometer by adding increasing amounts of polynucleotide solutions to the dye solution in the cell. The sample was not illuminated during the equilibration period. Titrations were performed at 25 °C and analyzed at $\lambda = 517$ nm and 489 nm for Naphthazarin and Quinizarin, respectively. The data were corrected by dilution (C_D^0/C_D). The binding constants for both systems, N/ctDNA and Q/ctDNA, were evaluated applying [2.16].

Thermal denaturation studies were performed heating the dye/polynucleotide system from 20 to 110 °C, at 1 °C/min scan rate and 3 atm pressure.

Circular dichroism measurements were carried out in a MOS-450 BioLogic (Claix, France) modular equipment at 25 °C by adding increasing amounts of the dye to the polynucleotide solution. Spectrograms were obtained in the 200 – 800 nm range at 2 nm/s speed. Molar ellipticity ($\text{deg} \cdot M_{BP}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) was calculated using $[\theta] = 100 \cdot \theta / C_P \cdot l$, where C_P is the polynucleotide concentration (M_{BP}) and l is the cell light path (cm).

Viscosity measurements were performed using a Micro-Ubbelohde viscometer. The viscosity data were analyzed calculating the relative viscosity (η/η_0), being $\eta/\eta_0 = (\eta_{PD} - \eta_{DMSO})/(\eta_P - \eta_{DMSO})$, where η_{PD} , η_P and η_{DMSO} are the

viscosity of the dye/ctDNA system, ctDNA/buffer and DMSO/buffer, respectively. Mean values of six replicated measurements were used to evaluate the sample viscosity, η , and that of DNA alone, η_0 .⁹² Calculation of relative viscosity has allowed us to evaluate the relative contour length ratio L/L_0 of the dye/polynucleotide complex, L , and polynucleotide alone, L_0 , through $L/L_0 = (\eta/\eta_0)^{1/3}$.

Computational simulations were performed *in silico* for Quinizarin, Naphthazarin and their analogous dinuclear Ruthenium complexes upon DNA interaction with Gaussian 09.²⁰⁷ Previous structural optimization of the four dyes were carried out by DFT studies applied to both Quinizarin and Naphthazarin, using B3LYP functional and 6-31G(d) basis set. For Ruthenium atoms, ECP was used with double-zeta functions (LANL2DZ) to diminish the computational cost and account for relativistic effects. Gas phase dye optimizations were performed under at 0 K conditions.

Dye/DNA (Ligand/DNA and Ru(II) complexes/DNA) interactions were studied with two different B-DNA structures: 2 poly(G)·poly(C) base-pairs and 2 poly(GC), base-pairs constructed with X3DNA software.²⁰⁸ Final Ru(II) complex/DNA structures were obtained following a 5-step procedure: For steps 1-4, the DNA backbone was studied via AMBER94 force field potential with electronic embedding within the ONIOM approach²⁰⁹ part. QM part (Ruthenium complexes, Guanines and Cytosines), were studied by enhancing theory level in each step: Hartree-Fock (Step 1) \rightarrow B3LYP (Step 2) \rightarrow M062-X (Step 3) \rightarrow ω B97X-D (Step 4), which considers long range interactions,¹²⁵ such as base-pairs stacking interactions. In step 5, the full system was studied with ω B97X-D functional; 6-31G(d) basis set was employed for QM regions throughout.

DNA parameters were analyzed with X3DNA software.²⁰⁸ As the number of base pairs is short, dye/DNA interaction was analyzed in terms of three translational local base-pair step parameters, Shift, Slide and Rise, which represent the displacement between two consecutive base-pairs moving along x, y and z axes, respectively. Three local angular base-pair step parameters, Tilt, Roll and Twist,²¹⁰ show the change in the orientation of two consecutive base-pairs around x, y and z axes, respectively. Graphical description of these parameters can be found in Figure

VIIS.1. In addition, some DNA parameters were calculated for the helix (taking into account all base-pairs and the resulting DNA conformation), and are labelled with prefix h- (h standing for helical). Block and stacking representation were generated with W3DNA.²¹¹ Moreover, the DNA system was increased up to 6 DNA base-pairs for more accurate description of the studied systems, treating extra bases with AMBER94. The stability of the dye/DNA system has been analyzed in terms of the total energy balance with simulated aqueous solvent, ΔE , applying equation [7.1], where the subscripts complex, DNA and dye, stands for the dye/DNA system, the type of free DNA and free dye, respectively.

$$\Delta E = E_{\text{complex}} - E_{\text{DNA}} - E_{\text{dye}} \quad [7.1]$$

Cytotoxicity ATP Lite assay. Cell culture A2780 and A2780cis cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented with fetal bovin serum (FBS) and 2 mM L-Glutamin at 4×10^3 cells/well density, 37 °C and 5% CO₂. MRC-5 and MCF-7 cells were grown in EMEM (Minimum Essential Medium Eagle) with 2mM L-Glutamin and Earle's BSS with 1.5 g/L sodium bicarbonate, 0.1 mM non-essential aminoacids and 1 mM sodium piruvate supplemented with FBS and 0.01mg/mL bovine insulin at 1×10^4 density. Cytotoxicity was assayed by ATPLite (Perkin Elmer) with cells plated in 96-well plate; after 24 h the drugs were added at different concentrations. After seven days, 100 μ L of the reactant were added. Then the plate was incubated under agitation for two minutes, protected from light and the luminescence was read at 1000 ms (EnSpire, Perkin Elmer). Experiments were performed in triplicated, 4000 cells each point. The concentration/response curves were constructed, performing calculation of the growth inhibitory potency (IC₅₀) by fitting the curves to equation [7.2].

$$y = \frac{E_{\text{max}}}{1 + \left(\frac{IC_{50}}{x}\right)^n} \quad [7.2]$$

where y is the % growth inhibitory effect, E_{max} is the maximal inhibitory effect observed, IC₅₀ is the concentration of the compound inhibiting 50% growth, n is the slope of the fitting, and x is the drug concentration. Nonlinear regression was carried out by GraphPad Prism, version 2.01, 1996 (GraphPad Software Inc.).

VII.4. Results and Discussion

$[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})_2\text{Ru}_2(\text{OO}\cap\text{OO})(\text{Cl})_2]$ complexes were synthesized by the procedures adapted from the literature^{90,91} shown in VII.6. Supporting Information section and in Figure VIIS.2.

To assess the effect of Ru(II) metal on DNA, this piece of work was split into two parts. First, we study the interaction between N and Q with DNA to secondly stand comparison with the behavior of DNA in the presence of the dinuclear Ru(II) complexes, $\text{Cl}_2\text{Ru}_2\text{N}$ and $\text{Cl}_2\text{Ru}_2\text{Q}$. Each part is, in turn, subdivided into experimental and computational studies.

VII.4.1. Interaction of the ligands Naphthazarin and Quinizarin with ctDNA

Experimental Study

The reaction between ctDNA and Naphthazarin (N) or Quinizarin (Q) can be represented by equation [2.3] and the binding constants, K_{app} , can be obtained by absorbance titrations. Henceforth, C_D and C_P stand for the analytical ligand and ctDNA concentration. The spectra obtained for N and Q in the presence of increasing amounts of DNA are shown in Figure VII.2A and 2C, respectively. In both systems, the intensity of the maximum absorbance diminishes as the ctDNA concentration is raised and 10 nm bathochromic shift of the band at $\lambda = 465$ nm is observed for the Q/ctDNA system. Figure VII.2B and 2D show the fitting of [2.16] to the $\Delta A/C_D$ versus $[P]$ equilibrium concentration. The K_{app} values were obtained by iteration until convergence, being $K_{\text{app}} = (1.49 \pm 0.98) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ for the Q/ctDNA system and $(2.19 \pm 0.49) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ for N/ctDNA. These values reveal remarkably higher affinity of the anthraquinone derivative to DNA compared to naphthoquinone. The binding constant for the intercalation process of Q is one order of magnitude higher than that previously reported in 50 - 50 water-ethanol²¹² and two orders higher than that obtained for negative supercoiled DNA.¹⁹⁵

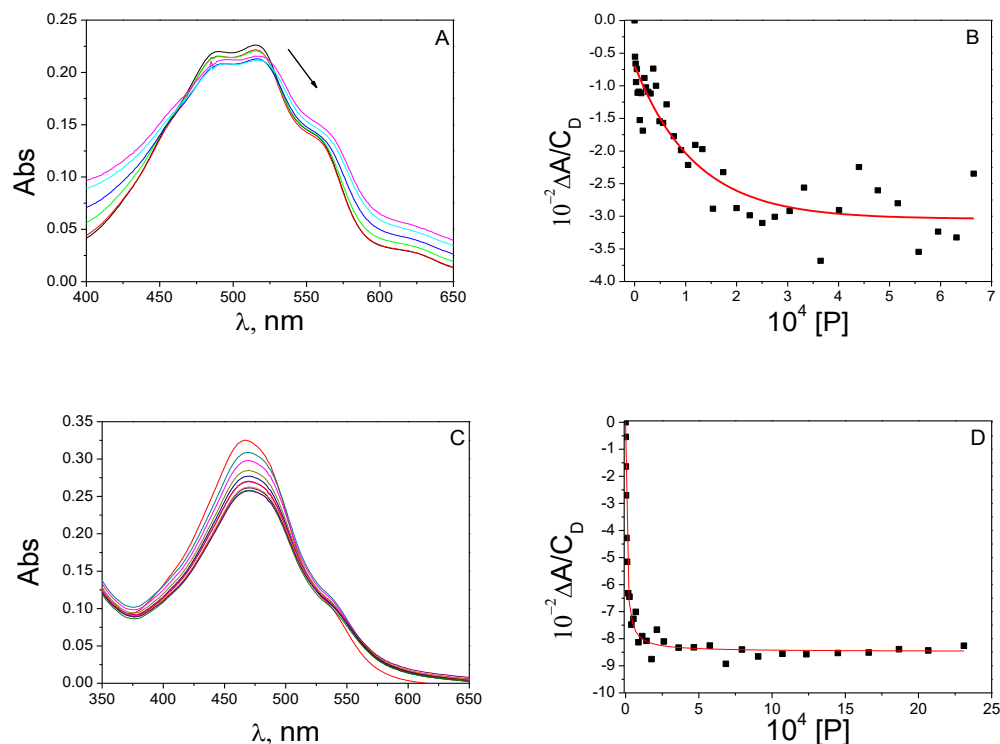


Figure VII.2. Absorption spectra of (A) N/ctDNA system and (C) Q/ctDNA system. Binding isotherm and fitting to equation [2.16] (continuous red line) are plotted in (B) N/ctDNA system and (D) Q/ctDNA system. $I = 6.5 \text{ mM (NaClO}_4\text{)}$, $\text{pH} = 7$ and $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

The circular dichroism data listed (Figure VII.3) show that Naphthazarin and Quinizarin are able to induce only small changes in the ctDNA structure, although the distortion is slightly more pronounced for Q due to its larger size.

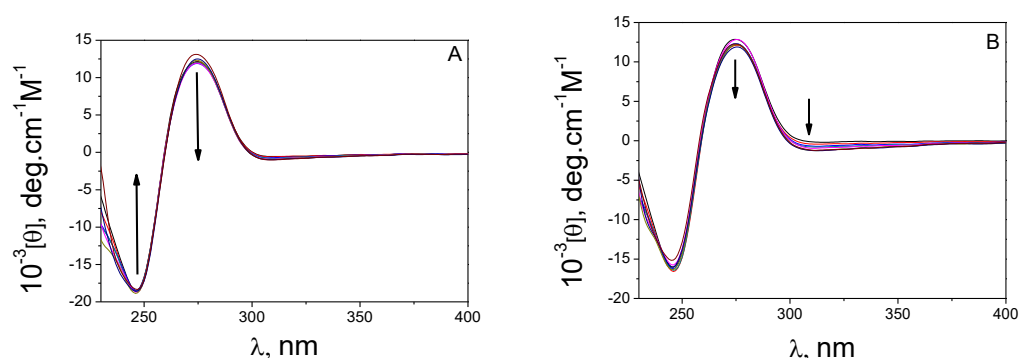


Figure VII.3. CD spectra *versus* C_D/C_P ratio of (A) N/ctDNA system, $C_P = 1.4 \times 10^{-4} \text{ M}$ and (B) Q/ctDNA system, $C_P = 5.9 \times 10^{-5} \text{ M}$. $I = 6.5 \text{ mM (NaClO}_4\text{)}$, $\text{pH} = 7$ and $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

The variation in the relative contour length ratio (L/L_0) for N/ctDNA and Q/ctDNA was calculated by viscosity measurements (Figure VII.4A). L/L_0

increased as C_D/C_P was raised up to $C_D/C_P = 0.2$, reaching a plateau; this behavior is ascribed to intercalation, with site size $n = 5$, *i.e.* one ligand unit intercalates every five base-pairs. The elongation is more pronounced for N/ctDNA than for Q/ctDNA. The positive values in the initial linear region, 0.27 for N/ctDNA and 0.08 for Q/ctDNA, suggest partial ligand intercalation into DNA, as reported earlier for Quinizarin.¹⁹⁴ The elongation of the DNA double helix by N is three times greater than that caused by Q; this feature will be explained with the computational simulation data, showing that the minor and major grooves enlargement induced by Naphthazarin are greater than those obtained for Quinizarin.

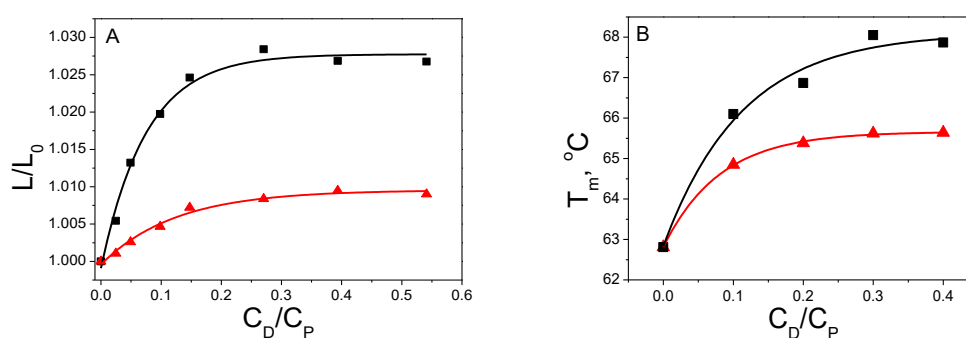


Figure VII.4. (A) L/L_0 vs C_D/C_P for the systems (■) N/ctDNA and (▲) Q/ctDNA, $C_P = 2.3 \times 10^{-4}$ M, $T = 25$ °C. (B) T_m vs C_D/C_P for the systems (■) N/ctDNA and (▲) Q/ctDNA, $C_P = 4.0 \times 10^{-4}$ M. $I = 6.5$ mM (NaClO_4), $\text{pH} = 7$ and $T = 25$ °C.

The variation of the melting temperature (T_m) of ctDNA upon addition of N and Q was studied by DSC measurements. Figure VII.4B shows the T_m versus C_D/C_P for N/ctDNA, Q/ctDNA and free ctDNA. As an example, the DSC curves at $C_D/C_P = 0.2$ for N/ctDNA and Q/ctDNA and for free DNA can be found in the Supporting Information (Figure VIIS.3). The results obtained indicate higher increase in T_m induced by N than by Q; that is, despite its lower affinity, N induces a stronger stabilization of ctDNA than Q. Due to the well-known thermal stability induced in intercalation process, the results concur fairly well with the higher intercalation degree obtained for N compared to Q in the viscosity experiments.

Computational study

To stand comparison between computational results obtained for ligands and Ru(II) complexes in the presence of DNA, theoretical simulations were performed with the dyes and G–C base-pairs containing two different polynucleotide lengths. Two base-pair length polynucleotides to get faster high-level calculations of dye behavior inside the base pairs, and also six base-pair length for a more accurate dye/DNA overall structure.

Ligand/poly(G)·poly(C). The optimized structures of N/poly(G)·poly(C) and Q/poly(G)·poly(C) systems, as well as their block representations from full DFT studies are available in the Supporting Information in Figure VIIS.4 and Figure VIIS.5, respectively. The H-bonds between Guanine and Cytosine are kept in both base pairs in the presence of N or Q. Occupation of the dye molecules in the empty space between base-pairs, promotes their separation, allowing for the formation of stacking interactions of each ligand with the upper and lower base pairs. Therefore, when comparing change of Rise values from free poly(G)·poly(C) (3.76 Å) to N/poly(G)·poly(C) (7.35 Å) and to Q/poly(G)·poly(C) (6.83 Å) systems, intercalative behavior is confirmed in both cases. Rise value is highly increased due to N and Q intercalation and the distance between the base-pair involving intercalation is larger for N than for Q. DNA parameters values analyzed in this work, for poly(G)·poly(C) containing systems are shown in Figure VII.5A and 5B, being Shift, Slide and Rise the displacement between two consecutive base-pairs over x, y and z axes, respectively, and Tilt, Roll and Twist, angular parameters in x, y and z axes, respectively (see graphical representation of the DNA parameters, Figure VIIS.1).

Ligand/poly(GC). Intercalation of Naphthazarin and Quinizarin was also studied with poly(GC), following the same calculation steps as with poly(G)·poly(C). No changes were found in the interaction mode with DNA. For N/poly(GC) (Figure VIIS.6), the conformation adopted by the ligand shows the rings almost parallel to both Guanines, which undergo reorientation in the presence of the ligand. A very different conformation was found for Quinizarin (Figure VIIS.7).

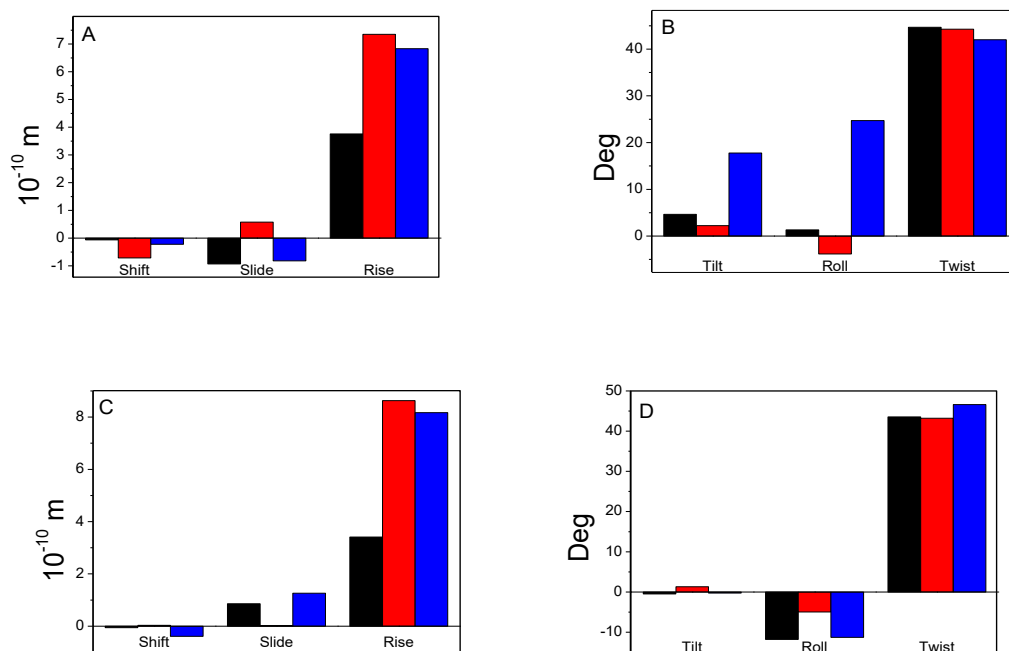


Figure VII.5. DNA parameter values obtained for (A, B): free poly(G)·poly(C) (—), N/poly(G)·poly(C) (—) and Q/poly(G)·poly(C) (—) and for (C, D) poly(GC) (—), N/poly(GC) (—) and Q/poly(GC) (—).

The Rise parameter (Figure VII.5C and 5D) reveal that the base pair separation due to intercalation is slightly higher for Naphthazarin (8.63 Å) than for Quinizarin (8.17 Å). Since the helix torsion change is almost negligible (Twist parameter), 43.20°, 43.55° and 46.62° for poly(GC), N/poly(GC) and Q/poly(GC), respectively, we can conclude that the structural change induced by intercalation of both ligands affects only the helix length.

The interaction energy and the percentage of Rise increment (compared to free DNA) are shown in Table VII.1. Naphthazarin displays higher affinity with poly(G)·poly(C) than with poly(GC), whereas the affinity for Quinizarin is reversed. In addition, the final energy balance is favoured for Quinizarin-containing systems, rather than for Naphthazarin. The results obtained concur with the binding constants obtained by absorbance titration and reflect the higher stabilization that the extra ring exerts in favour of to Quinizarin, thus enhancing of the π -stacking stabilization compared to Naphthazarin. The intercalation degree has been estimated by comparing the Rise values of free DNA to its respective Ligand/DNA systems. For poly(G)·poly(C) and poly(GC), Naphthazarin induces higher Rise

increments than Quinizarin, (see above in viscosimetry experiments), the size of Naphthazarin allows better penetration into base-pairs.

Table VII.1. Energy balance and Rise increment obtained for the 2-base-pairs dye/DNA systems.

System	ΔE, kcal/mol	% Rise increment
N/poly(G)·poly(C)	-13.67	19.55
N/poly(GC)	-1.86	22.90
Q/poly(G)·poly(C)	-27.58	18.16
Q/poly(GC)	-35.14	21.72

To get a more reliable description of the Ligand/DNA systems, a six base-pair poly(GC) polynucleotide was chosen for theoretical simulations with Naphthazarin and Quinizarin. The interaction process was carried out placing the ligands between the third and fourth base pairs. The DFT optimized structures of Naphthazarin and Quinizarin with poly(GC) are shown in Figure VII.6. The ligand interaction with this DNA sequence promotes base-pair separation. In addition, due to stacking interactions observed for both systems, the ligands tend to adopt a similar conformation inside the intercalation site in which their aromatic rings are placed, in a parallel plane to upper and lower Guanines presenting better π -electron system interaction than Cytosines. Therefore, when comparing change of Rise values from free poly(GC) (3.01 Å) to Naphthazarin/poly(GC) (7.03 Å) and to Quinizarin/poly(GC) (7.02 Å), intercalative behavior is confirmed in both systems.

Unwinding is expected to occur upon intercalation due to DNA elongation; this can be measured by h-Twist parameter, which considers the helix torsion. Once bound the ligands to poly(GC), h-Twist decreases due to unwinding. At first sight, due to the similar values of Rise, h-Rise and h-Twist parameters, one can conclude that Naphthazarin and Quinizarin intercalate into poly(GC) to same extent as with poly(G)·poly(C). Although the behavior of these parameters suffices to clarify the ligand/DNA interaction, all of them are in fact influenced by the local base-pair and local base-pair step parameters. Nonetheless, minor and major groove widths provide full information about DNA elongation change. Therefore, Table VII.2 summarizes groove widths for free poly(G)·poly(C) and Ligand/poly(G)·poly(C). Minor and major groove enlargements induced by Naphthazarin are greater than for Quinizarin due to the higher intercalation degree of N. These data are in good

agreement with the results obtained from the experimental measurements quoted. The Ligand/DNA system energies have been estimated by applying the energy balance between products and reactants (equation [7.1]). Quinizarin-containing systems, rather than Naphthazarin, have proved to be the most stable. The results reflect the higher stabilization that the extra ring affords with Quinizarin, allowing for enhanced π -stacking stabilization (primarily with Guanine molecules), compared to Naphthazarin. The lower energy of the Quinizarin/DNA systems, are in good agreement with the binding constants obtained by absorbance titrations. In summary, computational data support: 1) The affinity of Q is higher than the affinity of N for DNA and 2) N induces greater elongation and thermal stabilization of DNA.

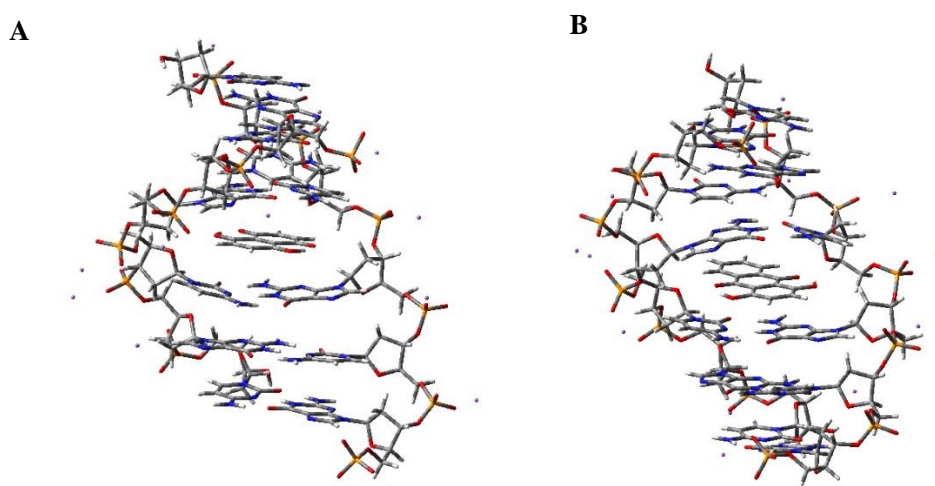


Figure VII.6. Six base-pairs dye/poly(GC) DFT-optimized structures, for (A) Naphthazarin and (B) and Quinizarin.

Table VII.2. Helical Twist (h-Twist), helical Rise (h-Rise), energy balance (ΔE), minor and major groove widths obtained for free six base-pairs poly(GC) and six base-pairs Ligand/poly(GC) systems.

System	h-Twist, deg	h-Rise, Å	Minor Groove width, Å	Major Groove width, Å	ΔE , kcal/mol
Free poly(GC)	41.02	3.01	10.6	14.4	-
N/poly(GC)	34.30	7.03	14.2	21.8	-9.63
Q/poly(GC)	33.74	7.02	13.3	21.0	-17.35

VII.4.2. Interaction of the Ru_2N and Ru_2Q complexes with ctDNA

Once performed the study of N and Q with DNA, we address the effect of Ru(II) in the Cl_2Ru_2N and Cl_2Ru_2Q complexes. This section is also split into experimental and computational parts.

Experimental Study

Aquation of Cl_2Ru_2N and Cl_2Ru_2Q

Initially, we study the aquation of Cl_2Ru_2N and Cl_2Ru_2Q complexes. Since the chlorido-complexes are insoluble in water, the kinetics of substitution of the Cl groups by DMSO was performed in DMSO. Figure VII.7 shows the spectral curves and the kinetic traces for Cl_2Ru_2N and Cl_2Ru_2Q . The absorbance-time data pairs were fitted by a biexponential equation; the rate constants obtained, k_1 and k_2 , related to substitution of chloride groups by DMSO molecules through a two-step mechanism.

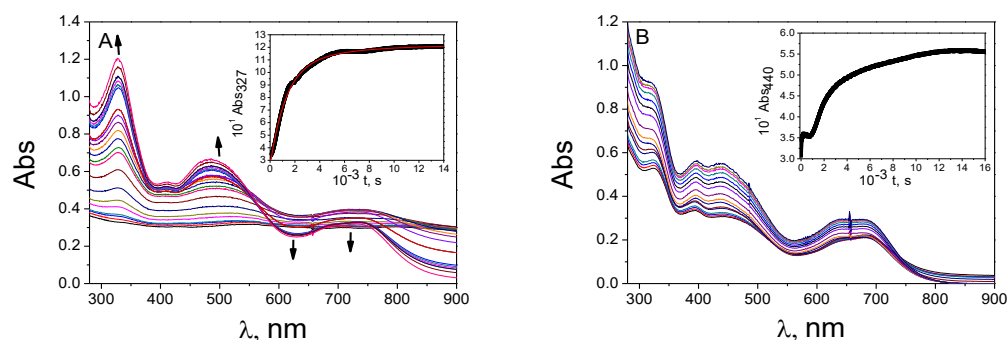


Figure VII.7. $[(DMSO)_2Ru_2X]^{2+}$ formation from Cl_2Ru_2X . (A) $X = N$ and (B) $X = Q$: Absorbance spectra as function of time. Insets: Absorbance-time plot. $C_D = 1.5 \times 10^{-5}$ M, 100% DMSO and $T = 25$ °C.

Figure VII.8 shows the two-step mechanism. The first step, governed by k_1 , is the substitution of one Cl atom by a DMSO molecule, forming $[(DMSO,Cl)Ru_2X]^+$ complexes; the second, governed by k_2 , is related to substitution of the another chloride groups, yielding the $[(DMSO)_2Ru_2X]^{2+}$ complexes ($X = N$ or Q).

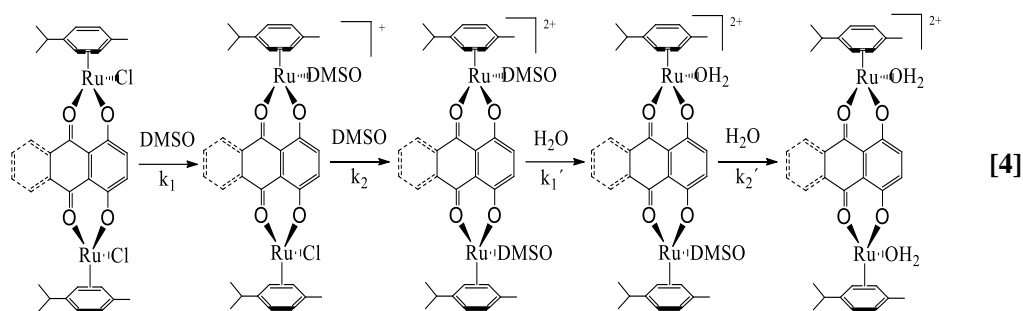


Figure VII.8. Reaction steps for the substitutions of Cl for DMSO and DMSO for H₂O for [(DMSO,Cl)Ru₂X]⁺, [(DMSO)₂Ru₂X]²⁺, [(DMSO, H₂O)Ru₂X]²⁺, and [(H₂O)₂Ru₂X]²⁺ complexes (X = N or Q).

The k_1 constant was higher than k_2 , indicating that substitution of the second Cl atom is unfavourable due to the presence of a previously substituted DMSO molecule in the complex (Table VII.3). This behavior is more evident when Q is the bridging ligand, showing the key role played on the reactivity of the complex by the third extra ring. In summary, the two chloride groups in Cl₂Ru₂N and Cl₂Ru₂Q can be replaced in the presence of DMSO, forming the [(DMSO)₂Ru₂X]²⁺ complexes.

Table VII.3. Rate constants k_1 , k_2 , k_1' and k_2' for the formation of [(DMSO,Cl)Ru₂X]⁺, [(DMSO)₂Ru₂X]²⁺, [(DMSO, H₂O)Ru₂X]²⁺ and [(H₂O)₂Ru₂X]²⁺ complexes (X = N or Q). From Cl₂Ru₂X dissolved in pure DMSO (k_1 and k_2), and from [(DMSO)₂Ru₂X]²⁺ dissolved in water (k_1' and k_2'), I = 6.5 mM (NaClO₄). pH = 7 and T = 25 °C.

Reactant	$10^2 k_1, s^{-1}$	$10^4 k_2, s^{-1}$	$10^2 k_1', s^{-1}$	$10^4 k_2', s^{-1}$
Cl ₂ Ru ₂ N	0.080 ± 0.001	2.03 ± 0.20	1.26 ± 0.08	2.2 ± 0.1
Cl ₂ Ru ₂ Q	2.75 ± 0.06	14.8 ± 1.2	0.31 ± 0.01	2.73 ± 0.05

Once the Cl₂Ru₂X complexes are dissolved in DMSO and the [(DMSO)₂Ru₂X]²⁺ derivatives are formed, both are diluted in aqueous solvent and the aquation processes are observed. The absorbance-time data-pairs were fitted by a biexponential equation. Figure VII.9 shows the kinetic spectral curves and the kinetic traces obtained for formation of [(DMSO,H₂O)Ru₂X]²⁺ (governed by k_1') and [(H₂O)₂Ru₂X]²⁺ (governed by k_2') at fixed wavelength (see Figure VII.9). The k_1' and k_2' values are listed in Table VII.3 and can be compared with k_1 and k_2 .

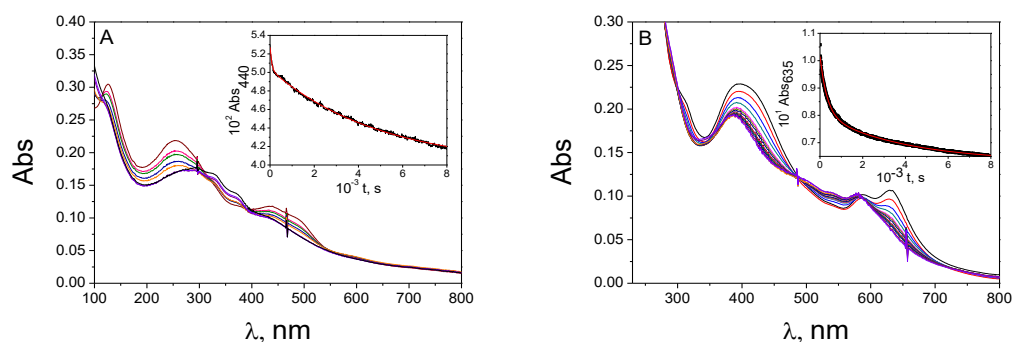


Figure VII.9. $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{X}]^{2+}$ formation from $[(\text{DMSO})_2\text{Ru}_2\text{X}]^{2+}$. (A) $\text{X} = \text{N}$ and (B) $\text{X} = \text{Q}$: Absorbance spectra as function of time. Insets: Absorbance-time plot. $C_D = 2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$, $I = 6.5 \text{ mM}$ (NaClO_4), $\text{pH} = 7$ and $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

For N complex, k_1 and k_2 are lower than k_1' and k_2' , respectively, whereas for Ru_2Q complex the opposite is true. Thus, the third ring is responsible for the more favored substitution of Cl by DMSO and inhibits the substitution of DMSO by H_2O . In conclusion, the naphthoquinone ligand promotes the aquation faster than the anthraquinone moiety. Given that diaquo-complexes are water-soluble, they will be the reactants in the study of the interaction with *d*GMP and ctDNA.

$[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{N}]^{2+}/d\text{GMP}$ and $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}/d\text{GMP}$ interaction

To determine the binding mode of DNA with $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{X}]^{2+}$, the interaction of these compounds with the nucleotide *d*GMP has been tested. Figure VII.10A and 10B shows the spectrograms and kinetic traces for *d*GMP + $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{N}]^{2+}$ and for *d*GMP + $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}$ reactions, respectively. The absorbance-time data-pairs were fitted by a biexponential function.

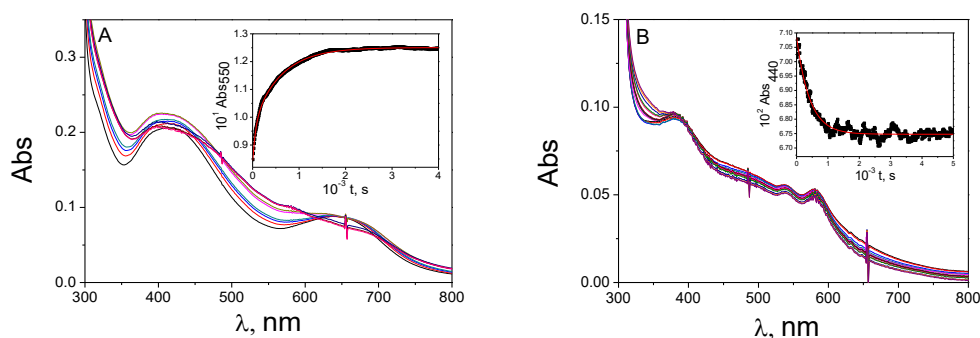


Figure VII.10. (A) Absorbance spectra as a function of time for $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{N}]^{2+}/d\text{GMP}$ system, $C_D = 5.0 \times 10^{-5} \text{ M}$. (B) Absorbance spectra as a function of time for $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}/d\text{GMP}$ system, $C_D = 2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$. Insets: Absorbance-time plots. $C_p/C_D = 10$, $I = 6.5 \text{ mM}$ (NaClO_4), $\text{pH} = 7$ and $T = 25^\circ \text{C}$.

Table VII.4 shows k_1'' and k_2'' values for both systems; k_1'' is the rate constant for the substitution of one water molecule, forming $[(\text{H}_2\text{O}, d\text{GMP})\text{Ru}_2\text{X}]^{2+}$ complexes, and k_2'' stands for the substitution of the second H_2O for $d\text{GMP}$ to give $[(d\text{GMP})_2\text{Ru}_2\text{X}]^{2+}$ complexes. k_1'' was always one order greater k_2'' , indicating that substitution of H_2O by $d\text{GMP}$ is affected by the presence of another $d\text{GMP}$ molecule. This trend is also observed with ctDNA (see below). Given that k_1'' and k_2'' are greater for Naphthazarin than for Quinizarin, reactivity with $d\text{GMP}$ is higher for the former.

Table VII.4. Kinetic constants k_1'' and k_2'' obtained for the interaction of $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{X}]^{2+}$ with $d\text{GMP}$ and k_3 , k_4 with ctDNA. $I = 6.5 \text{ mM}$ (NaClO_4), $\text{pH} = 7$ and $T = 25^\circ \text{C}$.

	$k_1'', \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$k_2'', \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$
$[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{N}]^{2+}/d\text{GMP}$	302 ± 20	33.6 ± 2
$[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}/d\text{GMP}$	62 ± 4	7.0 ± 0.1
	$k_3, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	k_4, s^{-1}
$[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{N}]^{2+}/\text{ctDNA}$	176 ± 24	2.4 ± 0.1
$[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}/\text{ctDNA}$	463 ± 62	0.6 ± 0.1

$[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{N}]^{2+}/\text{ctDNA}$ and $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}/\text{ctDNA}$ interactions

$[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{N}]^{2+}$ and $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}$ can form complexes with ctDNA through consecutive reactions mechanism, similar to $d\text{GMP}$. Figure VII.11 shows the spectral curves and kinetic traces for the reaction of ctDNA with $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{N}]^{2+}$ and $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}$. As with $d\text{GMP}$, absorbance-time data pairs were fitted by a biexponential function. The values of k_3 and k_4 obtained are shown

in Table VII.4; k_3 is greater than k_4 , following the same pattern obtained for *dGMP*. Nonetheless, contrary to the pattern observed for k'' , where two water molecules were substituted by two *dGMP* units, in the presence of DNA both water molecules are replaced by two Guanine moieties of same ctDNA molecule. One of the Ru(II) atoms of the $[(H_2O)_2Ru_2X]^{2+}$ complexes binds in a first step to one Guanine of ctDNA, yielding the $(H_2O, DNA_1)Ru_2X$ complexes (governed by k_3) and, in the second step, the other Ru(II) atom binds to another Guanine, forming the final $(DNA_{1,2})Ru_2X$ complexes (governed by k_4). $DNA_{1,2}$ indicate $(Ru-N7(G))_2$ bonds to consecutive base pairs of ctDNA. These results are supported by computational calculations. It can be observed (Table VII.4) that k_3 is much higher than k_4 , in agreement with inhibited formation of the second Ru(II)-DNA bond.

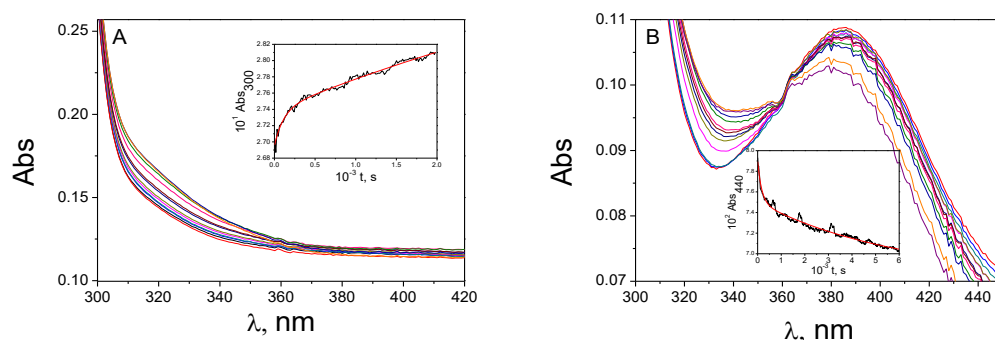


Figure VII.11. (A) Absorbance spectra as time function for $[(H_2O)_2Ru_2N]^{2+}/ctDNA$ system, $C_D = 5.0 \times 10^{-5}$ M. (B) Absorbance spectra as time function for $[(H_2O)_2Ru_2Q]^{2+}/ctDNA$ system $C_D = 2.5 \times 10^{-5}$ M. Insets: absorbance vs time plot. $C_P/C_D = 10$, $I = 6.5$ mM ($NaClO_4$), $pH = 7$ and $T = 25$ °C.

CD spectra for different C_D/C_P ratio are shown in Figure VII.12 for the $[(H_2O)_2Ru_2X]^{2+}/ctDNA$ systems. Sample measurements were performed after overnight incubation to avoid kinetics effects. The CD spectra obtained for ctDNA in the presence of $[(H_2O)_2Ru_2X]^{2+}$ considerably differs from that obtained for the ligands (Figure VII.3), showing the influence of Ru(II) upon DNA interaction with both $[(H_2O)_2Ru_2N]^{2+}$ and $[(H_2O)_2Ru_2Q]^{2+}$ complexes.

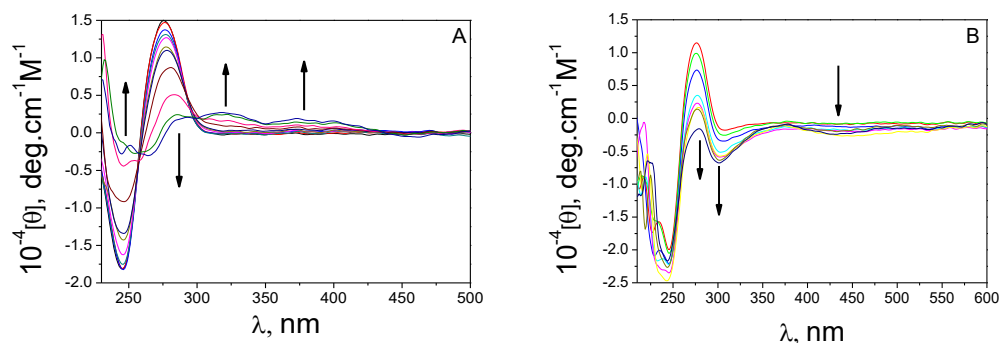


Figure VII.12. CD spectra of (A) $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{N}]^{2+}/\text{ctDNA}$ system, $C_P = 6.0 \times 10^{-5} \text{ M}$, $C_D = 1.41 \times 10^{-3} \text{ M}$ and (B) $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}/\text{ctDNA}$ system, $C_P = 5.88 \times 10^{-5} \text{ M}$ and $C_D = 2.05 \times 10^{-3} \text{ M}$. $I = 6.5 \text{ mM}$ (NaClO_4), $\text{pH} = 7$ and $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

The obtained CD spectra of $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{N}]^{2+}/\text{ctDNA}$ system (Figure VII.12A) is very different than that of $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}/\text{ctDNA}$ (Figure VII.12B), showing the key role of the bridging ligands N and Q regarding DNA interaction of their respective complexes. For $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{N}]^{2+}$, the negative band at 246 nm increases and the positive band at 277 nm diminishes as the concentration ratio was raised. In addition, new positive bands at $\lambda = 320$ and 380 nm appear in the range $0 < C_D/C_P < 0.8$. By contrast, for the same C_D/C_P ratio, addition of increasing amounts of $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}$ to ctDNA results in a hypochromic effect as well as two additional negative bands emerge at 301 nm and 440 nm, showing again the influence of the ligands in dinuclear Ru(II) complexes.

Lastly, the behavior of the viscosity measurements (Figure VII.13A) is ascribable to covalent interstrand crosslinkg $(\text{DNA}_{1,2})\text{Ru}_2\text{X}$ that shortens DNA by forming a junction binding $(\text{Ru}-\text{N}7\text{G})_2$. This effect is higher when X is N. Due to the different interaction, the behavior of these complexes differs from that of the ligands (Table VII.4A). In addition, thermal stability of ctDNA in the presence of Ruthenium compounds, was studied with DSC in the same way as for Naphthazarin and Quinizarin.

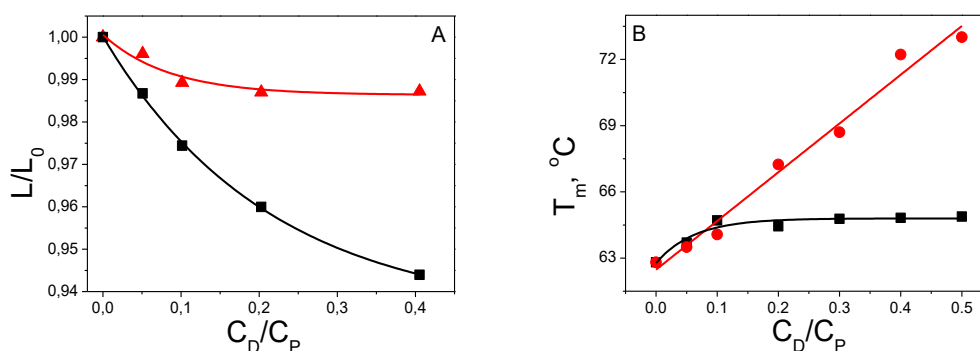


Figure VII.13. (A) L/L_0 versus C_D/C_P for (■) $[(H_2O)_2Ru_2N]^{2+}/ctDNA$ system and (▲) $[(H_2O)_2Ru_2Q]^{2+}/ctDNA$ system, $C_P = 2.30 \times 10^{-4}$ M and $T = 25$ °C. (B) T_m vs C_D/C_P for $[(H_2O)_2Ru_2X]^{2+}/ctDNA$ systems: (■) $[(H_2O)_2Ru_2N]^{2+}/ctDNA$ and (▲) $[(H_2O)_2Ru_2Q]^{2+}/ctDNA$ systems. $C_P = 4.04 \times 10^{-4}$ M. $I = 6.5$ mM ($NaClO_4$) and $pH = 7$.

Figure VII.13B, shows the variation of melting temperature of ctDNA (T_m) when C_D/C_P ratio is raised. $[(H_2O)_2Ru_2N]^{2+}$ induces modest enhancement of T_m ($\Delta T_m = 1$ °C), reaching a plateau for low C_D/C_P ratio, while $[(H_2O)_2Ru_2Q]^{2+}$ promotes linear increase in T_m of 10 °C up to $C_D/C_P = 0.5$. As an example, the DSC curves at $C_D/C_P = 0.1$ for $[(H_2O)_2Ru_2N]^{2+}/ctDNA$ and $[(H_2O)_2Ru_2Q]^{2+}/ctDNA$ and for free DNA can be found in the Supporting Information (Figure VIIS.8). This behavior differs from that obtained for N and Q although both, ligands and complexes, induce DNA thermal stabilization. The increase in T_m is ascribable to intercalation (see Figure VII.4B, relative to N and Q free ligands) or crosslink interstrand covalent binding. Computational simulations will provide evidence for the possibility of both inter and intrastrand crosslinking between two N7(G) of DNA and $[(H_2O)_2Ru_2N]^{2+}$ or $[(H_2O)_2Ru_2Q]^{2+}$ to give $(DNA_{1,2})Ru_2X$.

Computational study

Computational study of the interaction of $[(H_2O)_2Ru_2X]^{2+}$ complexes were performed with two free Guanines and ssDNA (single strand of two Guanines). As with N and Q ligands, we present evidence for the interaction of $[(H_2O)_2Ru_2X]^{2+}$ with two base-pair, poly(G)·poly(C) and poly(GC); the calculation was also upgraded to a six base-pair poly(GC) polynucleotide. $[(H_2O)_2Ru_2X]^{2+}$ complexes with two Guanines (2G) were studied first, to check the binding mode and the possibility of double coordination of the bases. Results show that the two Guanine units interact with the organometallic complexes by covalent binding, forming

$[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{X}]^{2+}/2\text{G}$. The covalent binding to Guanine molecules by the Ruthenium complexes is confirmed via N7(*d*GMP)-Ru bonds, as shown in Figure VII.14. Again, the extra ring of $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}$ plays an important role to differentiate the behavior of both complexes. Thus, due to the rigidity induced by the three-ringed ligands, Guanines remain parallel to each other and orthogonally toward the bridging ligand. By contrast, $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{N}]^{2+}$ is flexible and Guanines bend the organometallic complex to give a final structure in which Guanines are oriented one to another and interact through H bonding. Moreover, we could optimize $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{X}]^{2+}/\text{poly}(\text{G})$ systems, Figure VII.15. For both complexes, the Ru(II)-N7 bond is preferential rather than other coordinating positions. The presence of the backbone leads to separation of the two Guanines compared to that obtained for $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{X}]^{2+}/2\text{G}$ systems and, for $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}$, upper Guanine rotates pointing its NH_2 moiety to the upper *p*-cymene group as a consequence of the rigidity above mentioned.

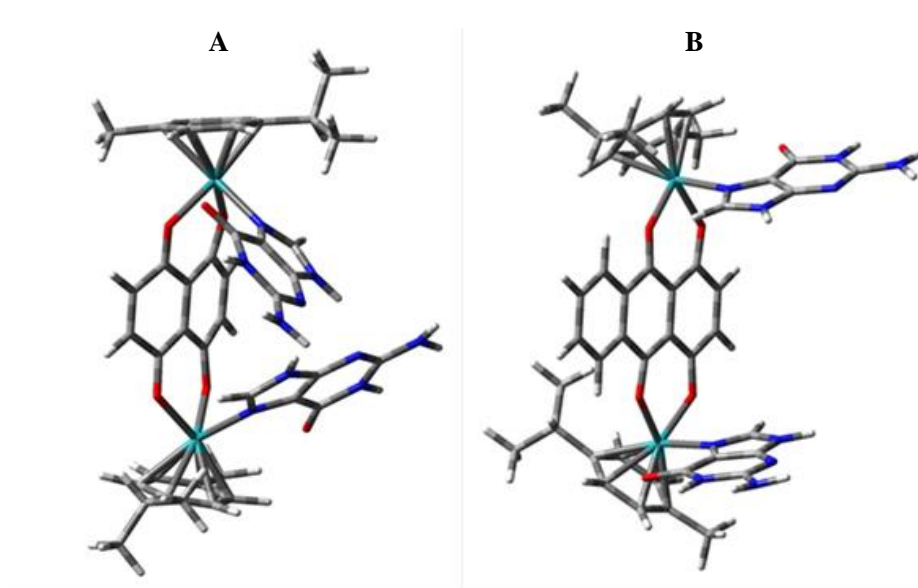


Figure VII.14. (A) $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{N}]^{2+}/2\text{G}$ and (B) $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}/2\text{G}$ DFT-optimized structures.

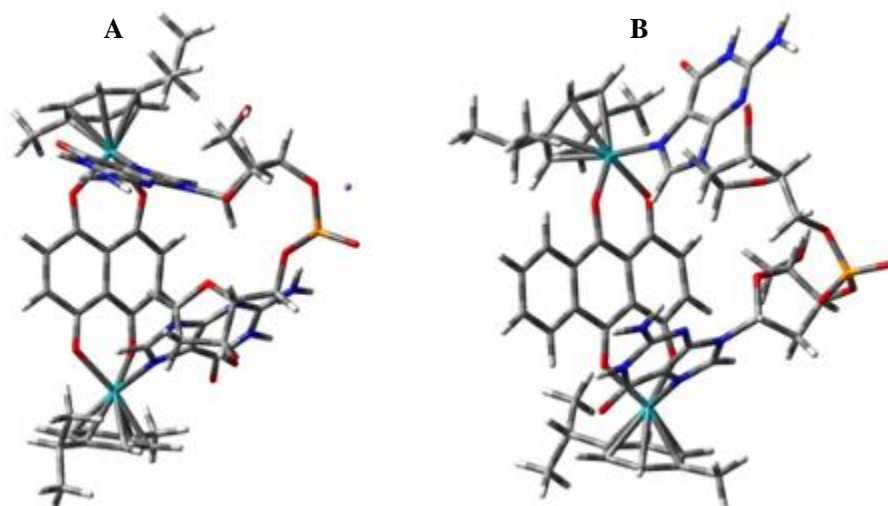


Figure VII.15. (A) $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{N}]^{2+}/\text{poly}(\text{G})$ and (B) $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}/\text{poly}(\text{G})$ DFT-optimized structures.

Regarding $\text{poly}(\text{G})\cdot\text{poly}(\text{C})$, the optimized structures for the $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{X}]^{2+}/\text{poly}(\text{G})\cdot\text{poly}(\text{C})$ systems are shown in Figure VII.16. $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{N}]^{2+}$ binds to both Ru atoms through the Guanine N7 sites. The binding is favored by the flexibility of the Ru-O-C bonds and the reorientation of Guanines to a position pointing to Ru atoms. Moreover, base-pair interactions are kept, which contributes to the structure stability. For $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}/\text{poly}(\text{G})\cdot\text{poly}(\text{C})$ complexes, the third ring of the bridging ligand is close to the backbone of the DNA sequence, instead of the base-pairs, to avoid steric interactions. The schematic representation (Figure VIIS.9) shows that the H bonding interaction between Guanines and Cytosines remains unchanged. Due to DNA interaction, *p*-cym groups undergo rotation to leave isopropyl groups aiming to Guanine moities to minimize steric hindrance and maximize H interactions. The same pattern was observed for $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}/\text{poly}(\text{G})\cdot\text{poly}(\text{C})$, where the system is not affected by the inclusion of the third extra aromatic ring located close to the backbone. Due to DNA interaction, the planarity of the bridging ligands is lost and the rings tend to stay away from the polynucleotides.

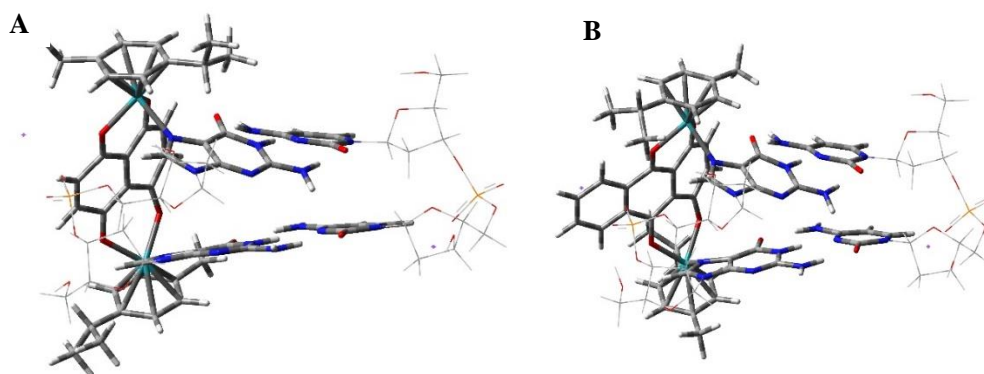


Figure VII.16. (A) $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{N}]^{2+}/\text{poly}(\text{G})\cdot\text{poly}(\text{C})$ and (B) $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}/\text{poly}(\text{G})\cdot\text{poly}(\text{C})$ DFT-optimized structures. Backbone is represented as wireframe for a better visualization.

Figure VII.17A displays the DNA base-pair step parameters of free $\text{poly}(\text{G})\cdot\text{poly}(\text{C})$, $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{N}]^{2+}/\text{poly}(\text{G})\cdot\text{poly}(\text{C})$ and $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}/\text{poly}(\text{G})\cdot\text{poly}(\text{C})$; both Ru complexes induce inversion from negative to positive of the base pairs shifts on X axis (Shift). Slide parameters diminish in the presence of the complexes, leading Guanines to almost overlap with Cytosines. The base-pairs distance is nearly the same as in the three cases, discarding DNA elongation. The influence of the $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{N}]^{2+}$ and $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}$ binding is well noticeable analyzing Tilt, Roll and Twist angles (Figure VII.17B). Roll parameters undergo inversion to allow N7 sites aim to Ru, creating the covalent bond. That interaction promotes Tilt parameter to increase as a result of the G and Ru approximation, diminishing Twist values as well. These results are in good agreement with the viscosimetry measurements discussed previously.

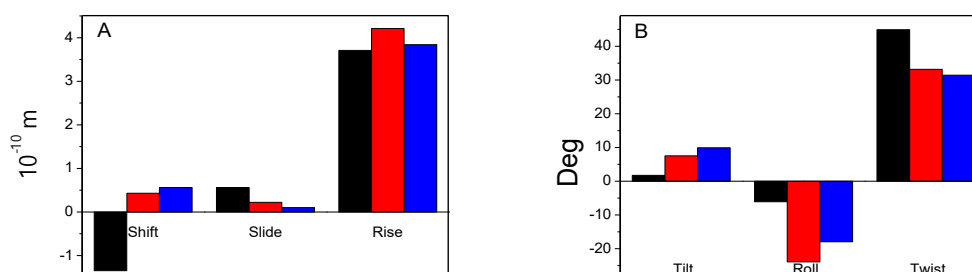


Figure VII.17. DNA parameter values obtained for free (—) $\text{poly}(\text{G})\cdot\text{poly}(\text{C})$, (—) $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{N}]^{2+}/\text{poly}(\text{G})\cdot\text{poly}(\text{C})$ and (—) $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}/\text{poly}(\text{G})\cdot\text{poly}(\text{C})$. (A) Shift, Slide and Rise and (B) Tilt, Roll and Twist.

To determine the preference of these compounds for inter or intrastrand crosslinking, the interaction of the Ru complexes was studied with two base-pair poly(GC) as well, with the same procedure as with poly(G)·poly(C). We chose two base-pair of poly(GC) in which Guanines and Cytosines of the same strand alternate. The optimized structure of the $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{N}]^{2+}/\text{poly}(\text{GC})$ and $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}/\text{poly}(\text{GC})$ systems are depicted in Figure VII.18A and 18B, respectively.

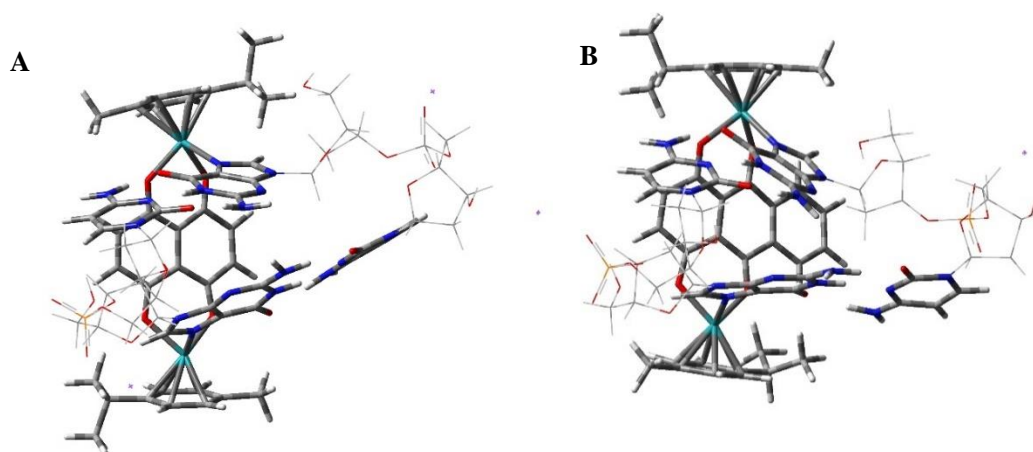


Figure VII.18. (A) $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{N}]^{2+}/\text{poly}(\text{GC})$ and (B) $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}/\text{poly}(\text{GC})$ DFT-optimized structures. Backbone is represented as wireframe for a better visualization.

The binding of both Ru atoms induce strong variation of the base pair conformations (Figure VIIS.10A and 10B), centering Guanine units to an eclipsed position. This modification shows the high affinity of the N7 atoms with Ru, even being able to significantly distort the DNA. Hydrogen bond interactions between Guanine and Cytosine remain unaltered. For $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}/\text{poly}(\text{GC})$, the overall final structure is similar to that obtained with $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{N}]^{2+}$. Regarding poly(GC) interaction, it is possible to study the influence of each compound by analyzing the modification of DNA parameters. Thus, base-pair displacement along cartesian axis are depicted in Figure VII.19A. $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{N}]^{2+}$ promotes inversion of Shift parameter compared to free DNA from negative to positive value, whereas $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}$ remains negative.

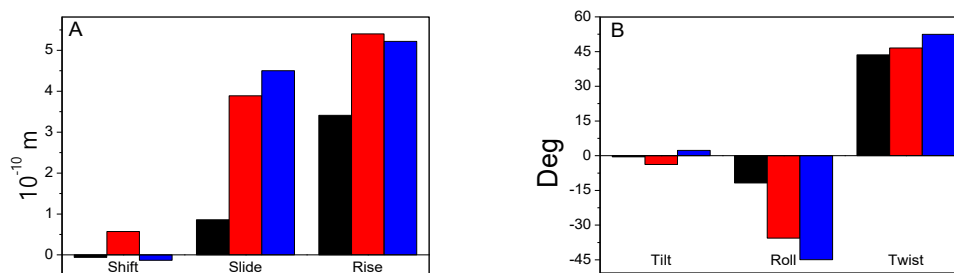


Figure VII.19. DNA parameter values obtained for (—) free poly(GC), (—) [(H₂O)₂Ru₂N]²⁺/poly(GC) and (—) [(H₂O)₂Ru₂Q]²⁺/poly(GC). (A) Shift, Slide and Rise and (B) Tilt, Roll and Twist.

We present the binding energies calculated for each system (Table VII.5). The binding energies of [(H₂O)₂Ru₂N]²⁺/poly(G)·poly(C) and [(H₂O)₂Ru₂Q]²⁺/poly(G)·poly(C) are slightly lower than those obtained for poly(GC), the intrastrand crosslinking interaction inducing slightly better stabilization. Nonetheless, as the difference between inter and intrastrand crosslinking is negligible, it is reasonable to consider a competitive process between intra and inter crosslinking. The stabilization induced by [(H₂O)₂Ru₂Q]²⁺ is greater than that of [(H₂O)₂Ru₂N]²⁺.

Table VII.5. Total energies obtained from full DFT optimization (ωB97X-D/6-31G(d)) for [(H₂O)₂Ru₂N]²⁺/poly(G)·poly(C), [(H₂O)₂Ru₂N]²⁺/poly(GC), [(H₂O)₂Ru₂Q]²⁺/poly(G)·poly(C) and [(H₂O)₂Ru₂Q]²⁺/poly(GC), in aqueous phase.

System	E, kcal/mol
[(H ₂ O) ₂ Ru ₂ N] ²⁺ /poly(G)·poly(C)	-4.08
[(H ₂ O) ₂ Ru ₂ N] ²⁺ /poly(GC)	-4.08
[(H ₂ O) ₂ Ru ₂ Q] ²⁺ /poly(G)·poly(C)	-4.18
[(H ₂ O) ₂ Ru ₂ Q] ²⁺ /poly(GC)	-4.18

The computational study of [(H₂O)₂Ru₂N]²⁺ and [(H₂O)₂Ru₂Q]²⁺ upon DNA interaction was also upgraded to six base-pair poly(GC) polynucleotides. Due to the high computational cost, the functional applied was B3LYP, with 6-31G(d) basis set for light atoms (C, H, N, Na, N, P and S) and ECP for Ru atoms with LANL2DZ basis set. As depicted in Figure VII.20, [(H₂O)₂Ru₂N]²⁺ and [(H₂O)₂Ru₂Q]²⁺ bind to DNA via covalent binding through two N7 atoms of consecutive base-pairs. In the resulting dye/DNA complex, *p*-cymene groups of the

Ruthenium complexes are positioned close to the backbone of the double helix. These conformations leave the bridging ligands outside and in front of the base-pairs to which Ru atoms are bound.

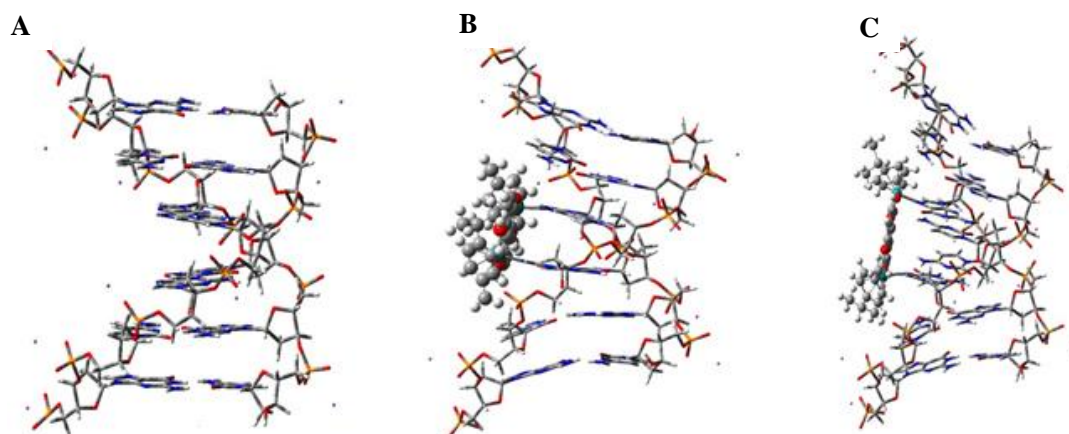


Figure VII.20. DFT-optimized structures, for (A) free poly(GC) (B) $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{N}]^{2+}/\text{poly}(\text{GC})$ and (C) $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}/\text{poly}(\text{GC})$.

Bending of DNA occurs due to the double covalent binding between the Ruthenium compounds and DNA; $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{N}]^{2+}$ and $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}$ approach to DNA from the major the groove side; due to the size of the metal complexes, reorientation of the overall structure sets in and DNA major groove increases to let $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{N}]^{2+}$ and $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}$ enter between third and fourth base-pairs of the studied polynucleotide. Consequently, minor groove bends diminishing its width, as shown in Table VII.6. In addition, local base-pair step parameters were analyzed for the base-pair, in which Ru compounds are bound. Thus, Tilt parameter (base-pairs aperture when fixing yz axis) shows different behavior for $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{N}]^{2+}$ and $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}$. On one hand, $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{N}]^{2+}$ promotes Tilt inversion compared to free poly(GC), leaving third and fourth base-pairs nearly parallel to each other. On the other side, the third extra ring of the bridging ligand in $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}$ increases Tilt value from 2.17 Å to 2.9 Å. Same pattern was observed for Roll; $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{N}]^{2+}$ decreases Roll value, whereas $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}$ it increases. In addition, covalent binding of $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{N}]^{2+}$ and $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}$ promotes helix elongation (h-Rise) and unwinding (h-Twist) of the helix. These values are ascribable to bending of the DNA to create a space in which the $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{X}]^{2+}$ can accommodate.

Table VII.6. Selected local base-pair step parameters (Tilt and Roll), local base-pair helical parameters (h-Twist and h-Rise), Minor and Major Groove widths, selected for free poly(GC), $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{N}]^{2+}/\text{poly}(\text{GC})$ and $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}/\text{poly}(\text{GC})$ systems.

System	Tilt, deg	Roll, deg	h-Twist, deg	h-Rise, Å	Minor Groove width, Å	Major Groove width, Å
Free poly(GC)	2.17	-7.44	41.42	3.63	11.30	16.60
$[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{N}]^{2+}/\text{poly}(\text{GC})$	-0.32	-8.47	38.72	4.06	10.80	23.80
$[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}/\text{poly}(\text{GC})$	2.97	-3.75	39.86	4.84	11.00	24.50

VII.4.3. Cytotoxic Activity

The cytotoxicity of the ligands and the corresponding Ru(II) complexes was evaluated in tumour cells, MCF-7 (human breast cancer), A2780 (human ovarian carcinoma), A2780cis (human ovarian cisplatin resistant carcinoma) and in a healthy cell line (MRC-5, human lung fibroblast). The results obtained are expressed as IC_{50} , *i.e.* the concentration of drug required to inhibit by 50% the cell proliferation. The IC_{50} values, the resistance factors (RF) and the selectivity factors are collected in Table VII.7. The cytotoxic activity of $\text{Cl}_2\text{Ru}_2\text{N}$ versus several cancer cell lines has been previously reported with poor results except against Colo320 ($\text{IC}_{50} = 12.95 \mu\text{M}$), and A549 ($\text{IC}_{50} = 18.05 \mu\text{M}$).^{213–215} The dinuclear Ru(II) complex is more cytotoxic than the bridging ligand for the $\text{Cl}_2\text{Ru}_2\text{Q}$. By contrast, for $\text{Cl}_2\text{Ru}_2\text{N}$, the cytotoxic activity of the ligand is reduced when bridging between the metal centers. It should be noticed that the Ru(II) complexes exhibit lower resistance factor (RF) than cisplatin and the calculated selectivity factors (SF) are comparable to cisplatin. Therefore, $\text{Cl}_2\text{Ru}_2\text{N}$ is the compound that displays the best results, lowest RF and highest SF values compared to Naphthazarin and cisplatin.

Table VII.7. IC₅₀ (μM, 96h, 37 °C)^a values for ligands Naphthazarin and Quinizarin and for the binuclear Cl₂Ru₂N and Cl₂Ru₂Q complexes in the cell lines MCF-7, A2780, A2780cis and MCR-5.

Dye	MCF-7	A2780cis	A2780	MRC-5	RF ^c	SF ^d
						MCF-7, A2780
Naphthazarin	1.39 ± 0.05	0.62 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.92 ± 0.01	4.1	0.7, 1.5
Quinizarin	----	---	72 ^b ± 9	---	----	----
Cl₂Ru₂N	16 ± 1	2.21 ± 0.06	2.54 ± 0.07	14 ± 1	0.9	0.9, 5.5
Cl₂Ru₂Q	72 ^b ± 5	21 ± 1	12 ± 1	71 ^b ± 1	1.8	1.0, 6.0
Cisplatin^e	18 ± 2	5.06 ± 0.13	0.74 ± 0.01	5.19 ± 0.42	6.8	0.3, 7.0

^aIC₅₀ values are expressed as mean ± standard deviation from at least three independent experiments, as obtained by the MTT assay using 96h exposure times at 37 °C.

^bIC₅₀ value extrapolated by the software might not be correctly estimated due to lack of maximum inhibitory effect at tested concentrations.

^cRF (resistance factor) = ratio of IC₅₀ for A2780cis/IC₅₀ for A2780; the lower the RF value, the better.

^dSF(selectivity factor) = ratio of IC₅₀ for MRC-5/IC₅₀ for either A2780 or MCF-7. MRC-5 fibroblasts are usually chosen as models for healthy cells to evaluate the selectivity of chemotherapeutic drugs. The higher the SF value, the more selective the activity.

^eValues taken from Justin et al.²¹⁶

VII.5. Conclusions

Naphthazarin and Quinizarin interact with ct-DNA in a one-step reaction which, in light of the experiments and DFT calculations performed, occurs via intercalation. The good agreement between absorbance titrations and the calculated energies suggests higher affinity of DNA with Quinizarin than with Naphthazarin. This feature could be explained by the third extra ring of Quinizarin, which enables easier π -stacking stabilization. Nonetheless, affinity is not straightforwardly related to intercalation extent, as deduced from the computational data. From the Rise and Twist parameters, we deduce that Naphthazarin is able to intercalate into ctDNA to a larger extent than Quinizarin, the intercalation extent being related to the thermal stability and viscosity increase rather than the apparent binding constant. Regarding the Cl₂Ru₂X/*d*GMP and Cl₂Ru₂X/ctDNA interactions, once the [(H₂O)₂Ru₂X]²⁺ complexes are formed the interaction with *d*GMP and ct-DNA occurs by a two-step mechanism, leading to the covalent [(*d*GMP)₂Ru₂X]²⁺ and (DNA_{1,2})Ru₂X (X = N or Q) complexes, respectively. For the Cl₂Ru₂X/ct-DNA systems, viscosity diminished and melting temperature increased, indicating that interaction by means

of interstrand crosslinking is feasible. All the experimental results were confirmed computationally. The interaction between $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{X}]^{2+}$ complexes and DNA is shown to occur via two Ru-N7 bonds of consecutive Guanines, yielding an inter strand crosslinking able to bend the double helix and host the entering complexes. As to the cytotoxic activity, Naphthazarin is the most cytotoxic but the least selective compound towards tumour cells, while Quinizarin is non cytotoxic, the extra ring of Quinizarin can be related to the absence of cytotoxicity. On the other hand, the Ru(II) metal centers enhance the cytotoxic activity of Quinizarin, whereas it decreases that of Naphthazarin. In any case, the dinuclear complexes reduce the resistance factor and increase the selectivity toward tumour cells of both bridging ligands. It should be highlighted here that $\text{Cl}_2\text{Ru}_2\text{N}$ is the most promising compound in terms of cytotoxic activity due to its low resistance factor and good selectivity.

VII.6. Supporting Information

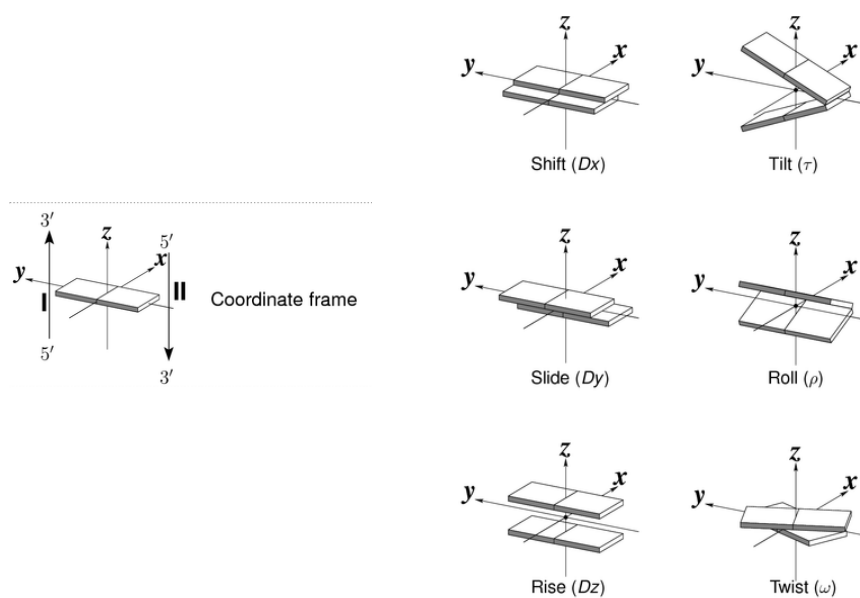


Figure VII.6.1. DNA local base-pair step parameters representation. Shaded sides represent view from minor groove. Image taken from X3DNA publication.²⁰⁸

Synthesis of $[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})_2\text{Ru}_2(\text{OO}\cap\text{OO})(\text{Cl})_2]$ complexes.

$[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})_2\text{Ru}_2(5,8\text{-dihydroxy-1,4-naphthoquinonato})(\text{Cl})_2]$, $\text{Cl}_2\text{Ru}_2\text{N}$: In a Schlenk flask $[\text{Ru}(p\text{-cym})\text{Cl}_2]_2$ (0.236 mmol) and Naphthazarin (0.236 mmol) were added to 10 mL of deoxygenated ethanol under N_2 atmosphere, giving a red-coloured solution. Then, Sodium Acetate (NaAcO , 0.472 mmol) was added to the previous solution. The mixture was stirred and heated under reflux overnight,

giving a brown suspension which was filtered, obtaining a brown solid. Then, the solid was washed with ether (3×10 mL) and hexane (3×10 mL) and dried under vacuum to yield the final product. The reaction is outlined in Figure VIIS.2A.

Characterization: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 25°C): δ 8.35 (dd, $J = 6.0, 3.3$ Hz, 2H), 7.62 (dd, $J = 6.0, 3.4$ Hz, 2H), 7.02 (d, $J = 0.8$ Hz, 2H), 5.55 (dd, $J = 17.6, 5.7$ Hz, 4H), 5.32 – 5.23 (m, 4H), 2.95 (dt, $J = 13.9, 6.9$ Hz, 2H), 2.26 (s, 6H), 1.59 (s, 3H), 1.42 – 1.32 (m, 13H). Elemental analysis calculated for $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{O}_4\text{Cl}_2\text{Ru}_2$: C, 49.39; H 4.42; N, O, and S, 0%.

$[(\eta^6\text{-}p\text{-cymene})_2\text{Ru}_2(1,4\text{-dihydroxyanthraquinonato})(\text{Cl})_2]$, $\text{Cl}_2\text{Ru}_2\text{Q}$: in a Schlenk flask $[\text{Ru}(p\text{-cym})\text{Cl}_2]_2$ (0.326 mmol) was added to 30mL methanol. Then, Quinizarin (0.326 mmol) and NaAcO (0.652 mmol) were added under N_2 atmosphere to the previous solution. The reaction was stirred overnight at room temperature, giving a green suspension which was filtered, giving a green solid which was washed with CH_2Cl_2 , hexane and dried under vacuum, yielding the final product, Figure VIIS.2B. **Characterization:** ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ 6.95 (s, 4H), 5.49 (d, $J = 6.1$ Hz, 4H), 5.23 (d, $J = 6.0$ Hz, 4H), 2.92 – 2.80 (m, 2H), 2.22 (s, 6H), 1.31 (d, $J = 6.9$ Hz, 12H) ppm.). Elemental analysis calculated for $\text{C}_{34}\text{H}_{34}\text{O}_4\text{Cl}_2\text{Ru}_2$: C, 52.38; H, 4.4; N, O and S, 0%.

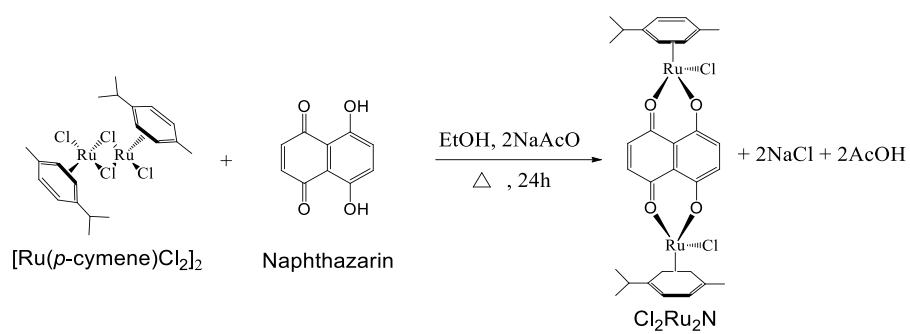
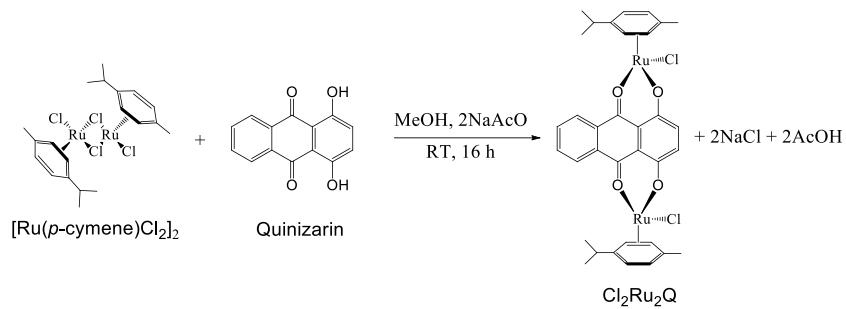
**A****B**

Figure VIIS.2. Synthesis of (A) $\text{Cl}_2\text{Ru}_2\text{N}$ and (B) $\text{Cl}_2\text{Ru}_2\text{Q}$ from $[\text{Ru}(\text{p-cym})\text{Cl}_2]_2$ and Naphthazarin and Quinizarin, respectively.

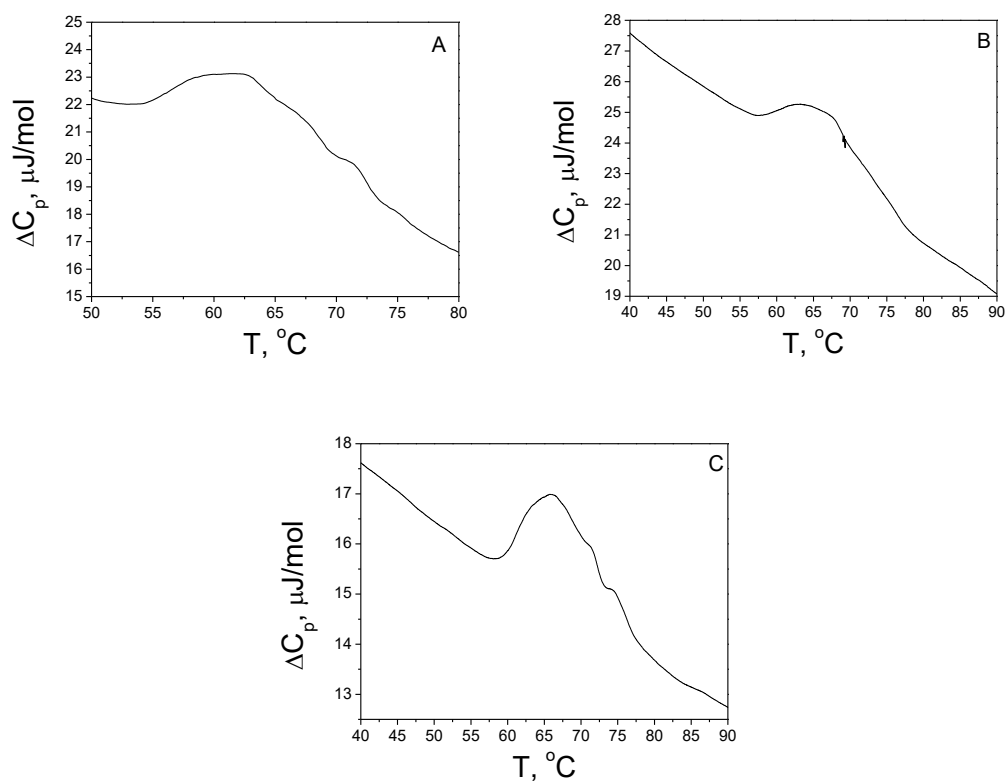


Figure VIIS.3. DSC curves for (A) free ctDNA, (B) Naphthazarin/ctDNA system at $C_D/C_P = 0.2$ and (C) Quinizarin/ctDNA system at $C_D/C_P = 0.2$. $C_P = 4.04 \times 10^{-4}$ M, scan rate: 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ I = 6.5 mM (NaClO_4) and pH = 7.

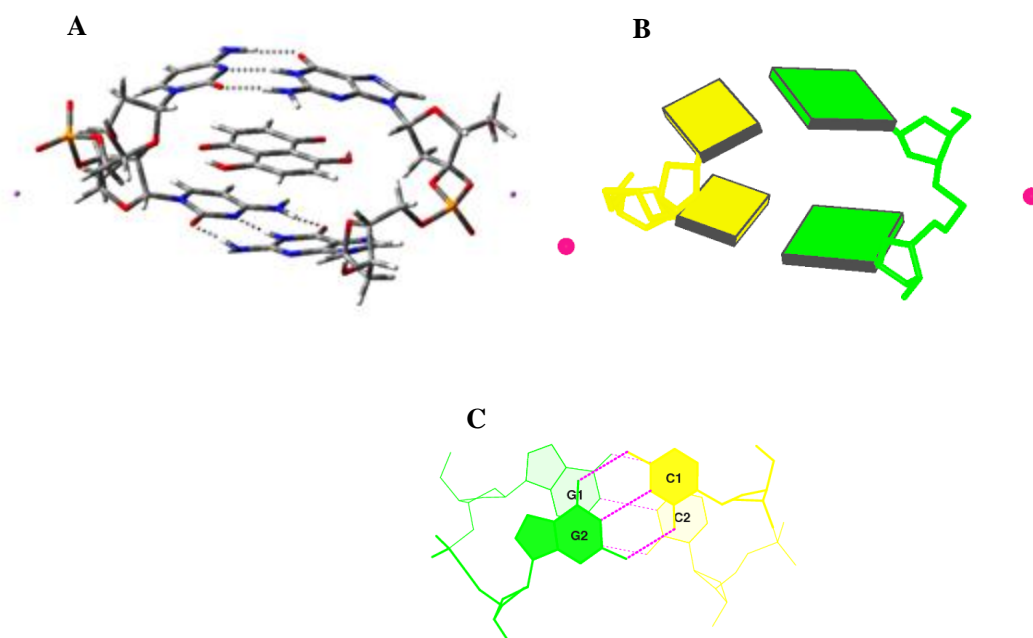


Figure VIIS.4. (A) N/poly(G)·poly(C) DFT-optimized structure. (B and C) Schematic view of base-pairs and backbone conformation from minor groove view and top view, respectively. Green and yellow stand for Guanine and Cytosine molecules, respectively.

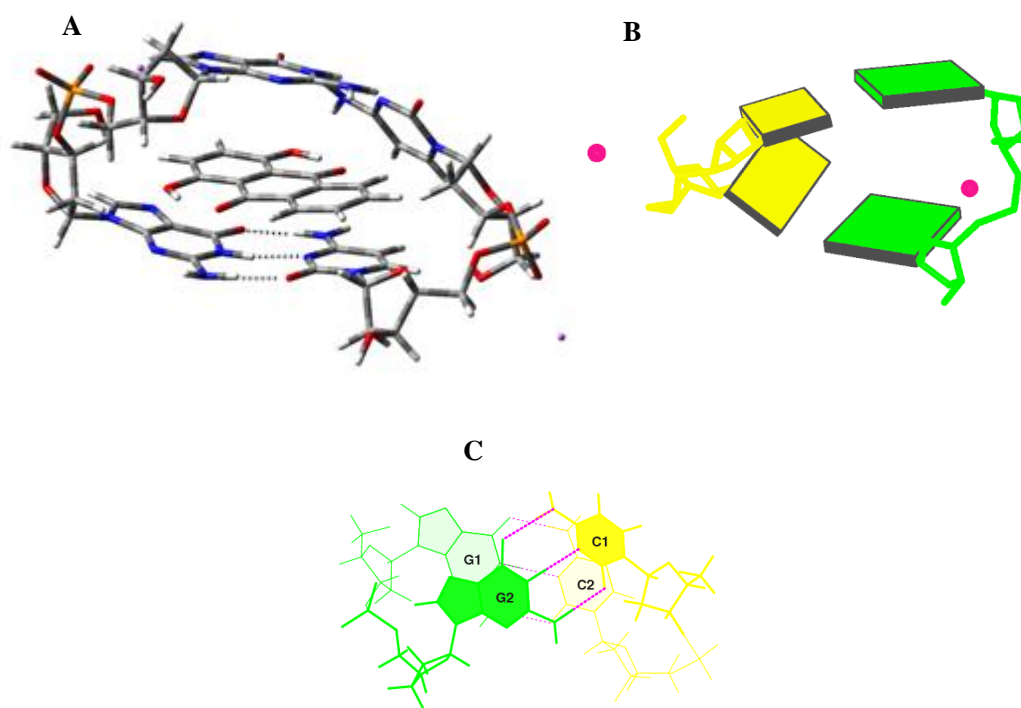


Figure VIII.5. (A) Q/poly(G)·poly(C) DFT-optimized structure. (B and C) Schematic view of base-pairs and backbone conformation from minor groove view and top view respectively. Green and yellow stand for Guanine and Cytosine molecules, respectively.

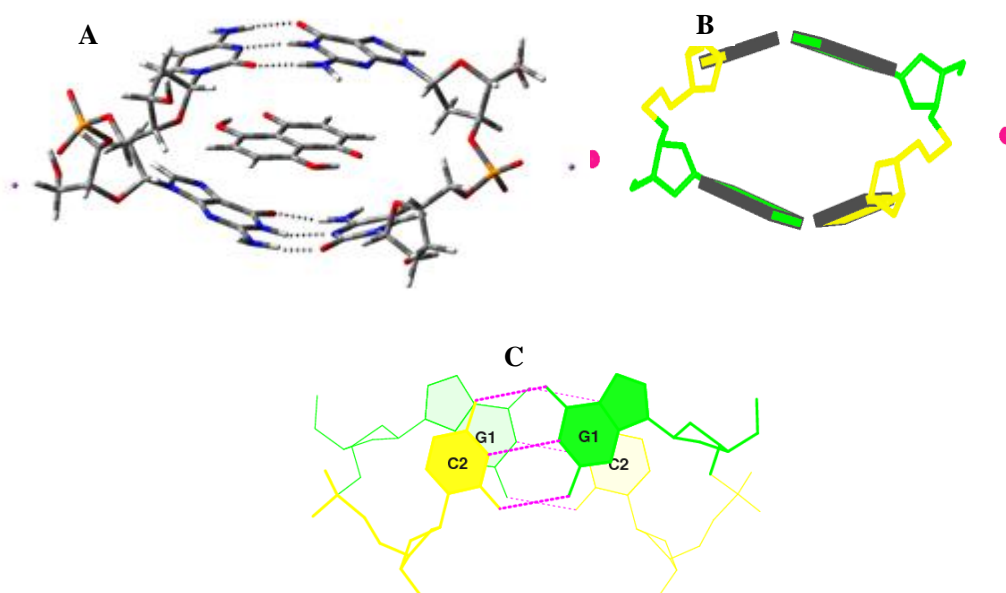


Figure VIII.6. (A) N/poly(GC) DFT-optimized structure. (B and C) Schematic view of base-pairs and backbone conformation from minor groove view and top view respectively. Green and yellow stand for Guanine and Cytosine molecules, respectively.

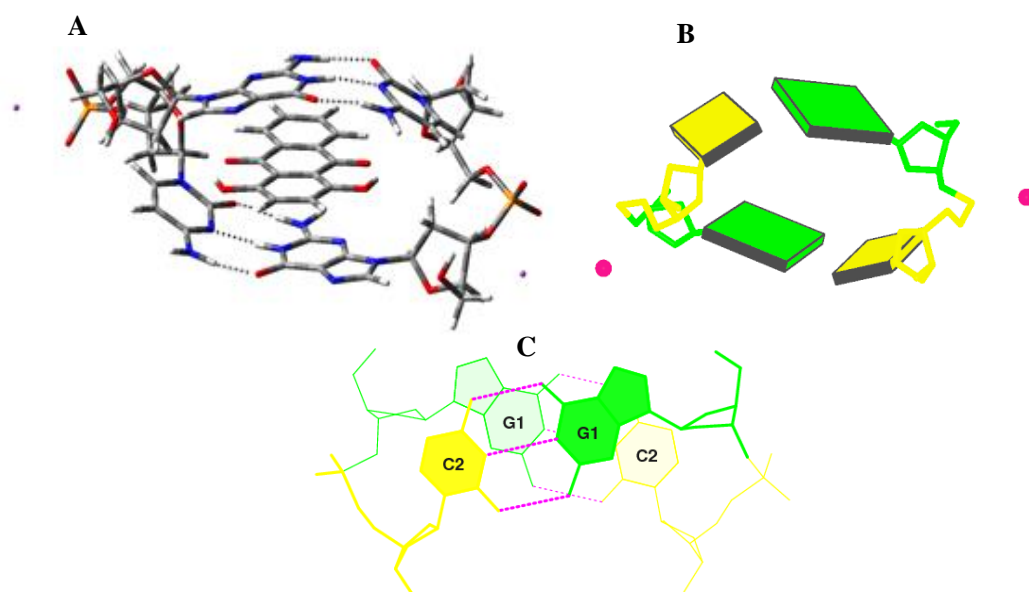


Figure VIII.7. (A) Q/poly(GC) DFT-optimized structure. (B and C) Schematic view of base-pairs and backbone conformation from minor groove view and top view respectively. Green and yellow stand for Guanine and Cytosine molecules, respectively.

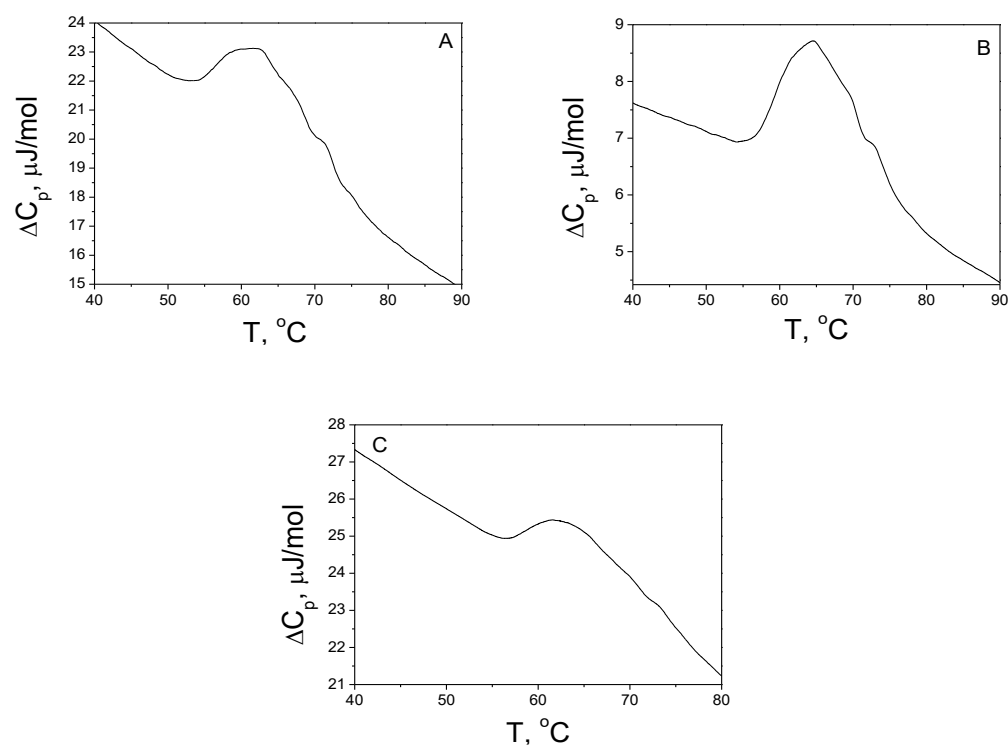


Figure VIII.8. DSC curves for $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{X}]^{2+}/\text{ctDNA}$ systems. (A) Free ctDNA, (B) $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{N}]^{2+}/\text{ctDNA}$, $C_D/C_P = 0.1$, (C) $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}/\text{ctDNA}$. $C_D/C_P = 0.1$. $C_P = 4.04 \times 10^{-4} \text{ M}$, scan rate: $1^\circ\text{C}/\text{min}$, $I = 6.5 \text{ mM}$ (NaClO_4) and $\text{pH} = 7$.

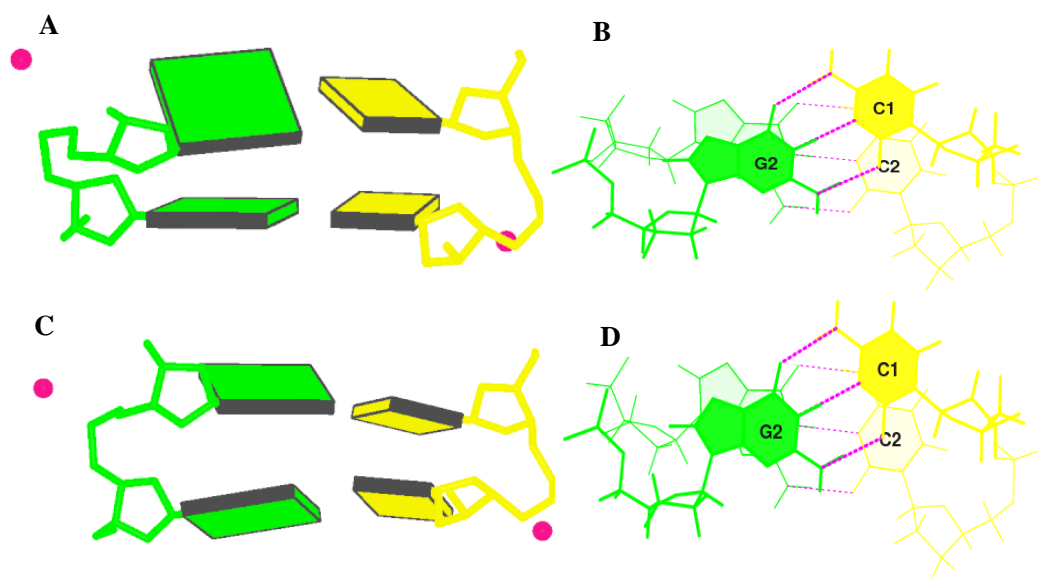


Figure VIIS.9. (A) and (B) Schematic view of base-pairs and backbone conformation from minor groove view and top view respectively for $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{N}]^{2+}/\text{poly}(\text{G})\cdot\text{poly}(\text{C})$. (C) and (D): Schematic view of base-pairs and backbone conformation from minor groove view and top view respectively for $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}/\text{poly}(\text{G})\cdot\text{poly}(\text{C})$. Green and yellow stand for Guanine and Cytosine molecules respectively.

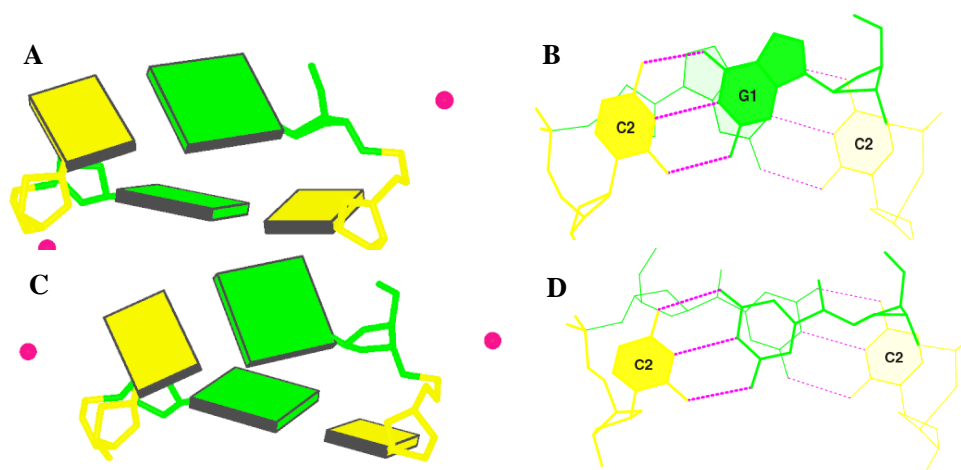


Figure VIIS.10. (A) and (B) Schematic view of base-pairs and backbone conformation from minor groove view and top view respectively for $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{N}]^{2+}/\text{poly}(\text{GC})$. (C) and (D) Schematic view of base-pairs and backbone conformation from minor groove view and top view respectively for $[(\text{H}_2\text{O})_2\text{Ru}_2\text{Q}]^{2+}/\text{poly}(\text{GC})$. Green and yellow squares stand for Guanine and Cytosine molecules respectively.

Conclusiones Generales

Conclusiones Generales

A lo largo de la tesis doctoral se ha estudiado la interacción de seis ligandos diferentes con ADN y ARN. Para ello, se han empleado métodos experimentales y teóricos de la Química, los cuales se complementan a la hora de proponer el mecanismo de la reacción.

Los resultados obtenidos en esta tesis dependen de la naturaleza, orgánica o inorgánica, de los ligandos y del tipo y número de hebras del polinucleótido.

En el caso de los ligandos orgánicos hemos determinado las constantes de afinidad de los complejos intercalados Tionina/poly(rA)·poly(rU), Naphthazarin/ADN y Quinizarin/ADN, siendo del orden de 10^5 , 10^4 y 10^6 M⁻¹ respectivamente. Si comparamos los sistemas conteniendo ADN comprobamos que el tamaño de los ligandos, entendido como el número de anillos aromáticos que posee la molécula, juega un papel determinante en la afinidad. Por otro lado, la interacción de Tionina con ARN en conformación de hélice sencilla, doble y triple ha mostrado que la gran afinidad por la doble hélice conlleva una desnaturalización isotérmica de la triple hélice a 25 °C. Este comportamiento es muy poco frecuente ya que los procesos de desnaturalización ocurren a altas temperaturas.

Por el contrario, los complejos con metales (Al(III) y Ru(II)) estudiados, han demostrado unirse covalentemente a la doble hélice de ADN y ARN en el primer caso y a la doble hélice de ADN en el segundo caso. La capacidad de interacción está determinada por el tipo de metal y complejo, como se demuestra en la imposibilidad del oligómero Al₁₃Cac_x de unirse a ADN o ARN, mientras que el complejo Al₂Cac₂ se une covalentemente tanto a ARN como ADN y provoca estabilización térmica de los polinucleótidos. Los compuestos de [(H₂O)₂Ru₂N]²⁺ y [(H₂O)₂Ru₂Q]²⁺, se unen por enlace covalente, tipo crosslinking, a dos N7 de Guaninas consecutivas, obteniéndose en ambos casos un enlace que deforma la doble hélice, aumenta la estabilidad térmica del ADN e inhibe la capacidad intercalante de sus ligandos puentes, Naphthazarin y Quinizarin respectivamente.

Bibliografía

- (1) Mendel, G. *Experiments in Plant Hybridisation*; Cosimo, Inc., 2008.
- (2) Haeckel, E. H. *Generelle Morphologie Der Organismen Allgemeine Grundzuge Der Organischen Formen-Wissenschaft, Mechanisch Begrundet Durch Die von Charles Darwin Reformirte Descendenz-Theorie von Ernst Haeckel: Allgemeine Entwicklungsgeschichte Der Organismen Kritische G*; Verlag von Georg Reimer, 1866; Vol. 2.
- (3) Dahm, R. Friedrich Miescher and the Discovery of DNA. *Dev. Biol.* **2005**, 278 (2), 274–288.
- (4) Levene, P. A. THE STRUCTURE OF YEAST NUCLEIC ACID. IV. AMMONIA HYDROLYSIS. *J. Biol. Chem.* **1919**, 40 (2), 415–424.
- (5) Avery, O. T.; MacLeod, C. M.; McCarty, M. STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES : INDUCTION OF TRANSFORMATION BY A DESOXYRIBONUCLEIC ACID FRACTION ISOLATED FROM PNEUMOCOCCUS TYPE III. *J. Exp. Med.* **1944**, 79 (2), 137–158.
- (6) Hershey, A. D.; Chase, M. Independent Functions of Viral Protein and Nucleic Acid in Growth of Bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* **1952**, 36 (1), 39–56.
- (7) FRANKLIN, R. E.; GOSLING, R. G. Evidence for 2-Chain Helix in Crystalline Structure of Sodium Deoxyribonucleate. *Nature* **1953**, 172 (4369), 156–157.
- (8) Watson, J. D.; Crick, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids. *Nature* **1953**, 171 (4356), 737–738.
- (9) Koonin, E. V. Carl Woese's Vision of Cellular Evolution and the Domains of Life. *RNA Biol.* **2014**, 11 (3), 197–204.
- (10) Kresge, N.; Simoni, R. D.; Hill, R. L. Chargaff's Rules: The Work of Erwin Chargaff. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280 (24), e21–e21.
- (11) Calladine, C. R.; Drew, H. R.; Luisi, B. F.; Travers, A. A. *Understanding DNA*; Elsevier, 2004.
- (12) Jose, D.; Porschke, D. Dynamics of the B–A Transition of DNA Double

- Helices. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32* (7), 2251–2258.
- (13) POHL, F. M. Polymorphism of a Synthetic DNA in Solution. *Nature* **1976**, *260* (5549), 365–366.
- (14) Biver, T.; Garcia, B.; Leal, J. M.; Secco, F.; Turriani, E. Left-Handed DNA: Intercalation of the Cyanine Thiazole Orange and Structural Changes. A Kinetic and Thermodynamic Approach. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12* (40), 13309–13317.
- (15) Pohl, F. M.; Jovin, T. M. Salt-Induced Co-Operative Conformational Change of a Synthetic DNA: Equilibrium and Kinetic Studies with poly(dG-dC). *J. Mol. Biol.* **1972**, *67* (3), 375–396.
- (16) Zheng, G.; Kochel, T.; Hoepfner, R. W.; Timmons, S. E.; Sinden, R. R. Torsionally Tuned Cruciform and Z-DNA Probes for Measuring Unrestrained Supercoiling at Specific Sites in DNA of Living Cells. *J. Mol. Biol.* **1991**, *221* (1), 107–122.
- (17) Wittig, B.; Dorbic, T.; Rich, A. Transcription Is Associated with Z-DNA Formation in Metabolically Active Permeabilized Mammalian Cell Nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88* (6), 2259–2263.
- (18) Hartmann, B.; Piazzola, D.; Lavery, R. BI-BII Transitions in B-DNA. *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21* (3), 561–568.
- (19) Felsenfeld, G.; Davies, D. R.; Rich, A. FORMATION OF A THREE-STRANDED POLYNUCLEOTIDE MOLECULE. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79* (8), 2023–2024.
- (20) Rich, A. DNA Comes in Many Forms. *Gene* **1993**, *135* (1-2), 99–109.
- (21) Jain, A.; Wang, G.; Vasquez, K. M. DNA Triple Helices: Biological Consequences and Therapeutic Potential. *Biochimie* **2008**, *90* (8), 1117–1130.
- (22) Renneberg, D.; Leumann, C. J. Exploring Hoogsteen and Reversed-Hoogsteen Duplex and Triplex Formation with Tricyclo-DNA Purine Sequences. *ChemBioChem* **2004**, *5* (8), 1114–1118.
- (23) Bolli, M.; Christopher Litten, J.; Schu'tz, R.; Leumann, C. J. Bicyclo-DNA: A Hoogsteen-Selective Pairing System. *Chem. Biol.* **1996**, *3* (3), 197–206.

-
- (24) Bolli, M.; Trafelet, H. U.; Leumann, C. Watson-Crick Base-Pairing Properties of Bicyclo-DNA. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24* (23), 4660–4667.
- (25) Frank-Kamenetskii, M. D.; Mirkin, S. M. Triplex DNA Structures. *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, *64* (1), 65–95.
- (26) Bryan, T. M.; Baumann, P. G-Quadruplexes: From Guanine Gels to Chemotherapeutics. *Mol. Biotechnol.* **2011**, *49* (2), 198–208.
- (27) Bochman, M. L.; Paeschke, K.; Zakian, V. A. DNA Secondary Structures: Stability and Function of G-Quadruplex Structures. *Nat Rev Genet* **2012**, *13* (11), 770–780.
- (28) Shafer, R. H.; Smirnov, I. Biological Aspects of DNA/RNA Quadruplexes. *Biopolymers* **2000**, *56* (3), 209–227.
- (29) Patel, D. J.; Phan, A. T.; Kuryavyi, V. Human Telomere, Oncogenic Promoter and 5'-UTR G-Quadruplexes: Diverse Higher Order DNA and RNA Targets for Cancer Therapeutics. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35* (22), 7429–7455.
- (30) Sarkies, P.; Reams, C.; Simpson, L. J.; Sale, J. E. Epigenetic Instability due to Defective Replication of Structured DNA. *Mol. Cell* **2010**, *40* (5), 703–713.
- (31) Barber, L. J.; Youds, J. L.; Ward, J. D.; McIlwraith, M. J.; O'Neil, N. J.; Petalcorin, M. I. R.; Martin, J. S.; Collis, S. J.; Cantor, S. B.; Auclair, M. RTEL1 Maintains Genomic Stability by Suppressing Homologous Recombination. *Cell* **2008**, *135* (2), 261–271.
- (32) Hiratani, I.; Takebayashi, S.; Lu, J.; Gilbert, D. M. Replication Timing and Transcriptional Control: Beyond Cause and Effect—part II. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2009**, *19* (2), 142–149.
- (33) Muniyappa, K.; Anuradha, S.; Byers, B. Yeast Meiosis-Specific Protein Hop1 Binds to G4 DNA and Promotes Its Formation. *Mol. Cell. Biol.* **2000**, *20* (4), 1361–1369.
- (34) Cahoon, L. A.; Seifert, H. S. An Alternative DNA Structure Is Necessary for Pilin Antigenic Variation in *Neisseria Gonorrhoeae*. *Science* **2009**, *325* (5941), 764–767.
-

- (35) Svoboda, P.; Cara, A. D. Hairpin RNA: A Secondary Structure of Primary Importance. *Cell. Mol. Life Sci. C.* **2006**, *63* (7), 901–908.
- (36) Rastogi, T.; Beattie, T. L.; Olive, J. E.; Collins, R. A. A Long-Range Pseudoknot Is Required for Activity of the Neurospora VS Ribozyme. *EMBO J.* **1996**, *15* (11), 2820–2825.
- (37) Ke, A.; Zhou, K.; Ding, F.; Cate, J. H. D.; Doudna, J. A. A Conformational Switch Controls Hepatitis Delta Virus Ribozyme Catalysis. *Nature* **2004**, *429* (6988), 201–205.
- (38) Adams, P. L.; Stahley, M. R.; Kosek, A. B.; Wang, J.; Strobel, S. A. Crystal Structure of a Self-Splicing Group I Intron with Both Exons. *Nature* **2004**, *430* (6995), 45–50.
- (39) Theimer, C. A.; Blois, C. A.; Feigon, J. Structure of the Human Telomerase RNA Pseudoknot Reveals Conserved Tertiary Interactions Essential for Function. *Mol. Cell* **2005**, *17* (5), 671–682.
- (40) Shen, L. X.; Tinoco, Jr, I. The Structure of an RNA Pseudoknot That Causes Efficient Frameshifting in Mouse Mammary Tumor Virus. *J. Mol. Biol.* **1995**, *247* (5), 963–978.
- (41) Nixon, P. L.; Rangan, A.; Kim, Y.-G.; Rich, A.; Hoffman, D. W.; Hennig, M.; Giedroc, D. P. Solution Structure of a Luteoviral P1–P2 Frameshifting mRNA Pseudoknot. *J. Mol. Biol.* **2002**, *322* (3), 621–633.
- (42) Michiels, P. J. .; Versleijen, A. A. .; Verlaan, P. W.; Pleij, C. W. .; Hilbers, C. W.; Heus, H. A. Solution Structure of the Pseudoknot of SRV-1 RNA, Involved in Ribosomal Frameshifting. *J. Mol. Biol.* **2001**, *310* (5), 1109–1123.
- (43) Egli, M.; Minasov, G.; Su, L.; Rich, A. Metal Ions and Flexibility in a Viral RNA Pseudoknot at Atomic Resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99* (7), 4302–4307.
- (44) Devi, G.; Zhou, Y.; Zhong, Z.; Toh, D.-F. K.; Chen, G. RNA Triplexes: From Structural Principles to Biological and Biotech Applications. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2015**, *6* (1), 111–128.
- (45) Holland, J. A.; Hoffman, D. W. Structural Features and Stability of an RNA

- Triple Helix in Solution. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24* (14), 2841–2848.
- (46) Kim, S. H.; Quigley, G. J.; Suddath, F. L.; McPherson, A.; Sneden, D.; Kim, J. J.; Weinzierl, J.; Rich, A. Three-Dimensional Structure of Yeast Phenylalanine Transfer RNA: Folding of the Polynucleotide Chain. *Science (80-.)*. **1973**, *179* (4070), 285–288.
- (47) Puglisi, J. D.; Tan, R.; Calnan, B. J.; Frankel, A. D.; Williamson. Conformation of the TAR RNA-Arginine Complex by NMR Spectroscopy. *Science (80-.)*. **1992**, *257* (5066), 76–80.
- (48) Dervan, P. B.; Becker, M. M. Molecular Recognition of DNA by Small Molecules. Synthesis of Bis(methidium)spermine, a DNA Polyintercalating Molecule. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100* (6), 1968–1970.
- (49) Chow, C. S.; Bogdan, F. M. A Structural Basis for RNA-Ligand Interactions. *Chem. Rev.* **1997**, *97* (5), 1489–1513.
- (50) Devalia, J. L.; Ogilvie, R. C.; McLean, A. E. M. Dissociation of Cell Death from Covalent Binding of Paracetamol by Flavones in a Hepatocyte System. *Biochem. Pharmacol.* **1982**, *31* (23), 3745–3749.
- (51) Paci, A.; Veal, G.; Bardin, C.; Levêque, D.; Widmer, N.; Beijnen, J.; Astier, A.; Chatelut, E. Review of Therapeutic Drug Monitoring of Anticancer Drugs Part 1--Cytotoxics. *Eur. J. Cancer* **2014**, *50* (12), 2010–2019.
- (52) Facon, T.; Mary, J. Y.; Hulin, C.; Benboubker, L.; Attal, M.; Pegourie, B.; Renaud, M.; Harousseau, J. L.; Guillermin, G.; Chateix, C.; et al. Melphalan and Prednisone plus Thalidomide versus Melphalan and Prednisone Alone or Reduced-Intensity Autologous Stem Cell Transplantation in Elderly Patients with Multiple Myeloma (IFM 99-06): A Randomised Trial. *Lancet (London, England)* **2007**, *370* (9594), 1209–1218.
- (53) Jahnke, K.; Thiel, E.; Bechrakis, N. E.; Willerding, G.; Kraemer, D. F.; Fischer, L.; Korfel, A. Ifosfamide or Trofosfamide in Patients with Intraocular Lymphoma. *J. Neurooncol.* **2008**, *93* (2), 213–217.
- (54) Parker, L. J.; Ciccone, S.; Italiano, L. C.; Primavera, A.; Oakley, A. J.; Morton, C. J.; Hancock, N. C.; Bello, M. Lo; Parker, M. W. The Anti-Cancer Drug Chlorambucil as a Substrate for the Human Polymorphic Enzyme

- Glutathione Transferase P1-1: Kinetic Properties and Crystallographic Characterisation of Allelic Variants. *J. Mol. Biol.* **2008**, *380* (1), 131–144.
- (55) Lozano, R.; Naghavi, M.; Foreman, K.; Lim, S.; Shibuya, K.; Aboyans, V.; Abraham, J.; Adair, T.; Aggarwal, R.; Ahn, S. Y.; et al. Global and Regional Mortality from 235 Causes of Death for 20 Age Groups in 1990 and 2010: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* **2016**, *380* (9859), 2095–2128.
- (56) Cohen, S. M.; Lippard, S. J. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology Volume 67*; Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology; Elsevier, 2001; Vol. 67.
- (57) Montagnani, F.; Turrisi, G.; Marinozzi, C.; Aliberti, C.; Fiorentini, G. Effectiveness and Safety of Oxaliplatin Compared to Cisplatin for Advanced, Unresectable Gastric Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastric Cancer* **2011**, *14* (1), 50–55.
- (58) Zhang, C. X.; Lippard, S. J. New Metal Complexes as Potential Therapeutics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7* (4), 481–489.
- (59) Hearn, J. M.; Romero-Canelón, I.; Qamar, B.; Liu, Z.; Hands-Portman, I.; Sadler, P. J. Organometallic Iridium (III) Anticancer Complexes with New Mechanisms of Action: NCI-60 Screening, Mitochondrial Targeting, and Apoptosis. *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8* (6), 1335–1343.
- (60) Diebler, H.; Secco, F.; Venturini, M. The Binding of Mg(II) and Ni(II) to Synthetic Polynucleotides. *Biophys. Chem.* **1987**, *26* (2-3), 193–205.
- (61) Kelly, J. M.; Tossi, A. B.; McConnell, D. J.; OhUigin, C. A Study of the Interactions of Some polypyridylruthenium(II) Complexes with DNA Using Fluorescence Spectroscopy, Topoisomerisation and Thermal Denaturation. *Nucleic Acids Res.* **1985**, *13* (17), 6017–6034.
- (62) Sirajuddin, M.; Ali, S.; Badshah, A. Drug–DNA Interactions and Their Study by UV–Visible, Fluorescence Spectroscopies and Cyclic Voltametry. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **2013**, *124*, 1–19.
- (63) Reddy, B. S. P.; Sharma, S. K.; Lown, J. W. Recent Developments in Sequence Selective Minor Groove DNA Effectors. *Curr. Med. Chem.* **2001**,

- 8 (5), 475–508.
- (64) Lauria, A.; Montalbano, A.; Barraja, P.; Dattolo, G.; Almerico, A. M. DNA Minor Groove Binders: An Overview on Molecular Modeling and QSAR Approaches. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 2136–2160.
- (65) Neidle, S. DNA Minor-Groove Recognition by Small Molecules. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18* (3), 291–309.
- (66) Tawar, U.; Jain, A. K.; Chandra, R.; Singh, Y.; Dwarakanath, B. S.; Chaudhury, N. K.; Good, L.; Tandon, V. Minor Groove Binding DNA Ligands with Expanded A/T Sequence Length Recognition, Selective Binding to Bent DNA Regions and Enhanced Fluorescent Properties†. *Biochemistry* **2003**, *42* (45), 13339–13346.
- (67) Abu-Daya, A.; Brown, P. M.; Fox, K. R. DNA Sequence Preferences of Several AT-Selective Minor Groove Binding Ligands. *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23* (17), 3385–3392.
- (68) Sischka, A.; Toensing, K.; Eckel, R.; Wilking, S. D.; Sewald, N.; Ros, R.; Anselmetti, D. Molecular Mechanisms and Kinetics between DNA and DNA Binding Ligands. *Biophys. J.* **2005**, *88* (1), 404–411.
- (69) Nguyen, B.; Hamelberg, D.; Bailly, C.; Colson, P.; Stanek, J.; Brun, R.; Neidle, S.; Wilson, W. D. Characterization of a Novel DNA Minor-Groove Complex. *Biophys. J.* **2004**, *86* (2), 1028–1041.
- (70) Eriksson, S.; Kim, S. K.; Kubista, M.; Norden, B. Binding of 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) to AT Regions of DNA: Evidence for an Allosteric Conformational Change. *Biochemistry* **1993**, *32* (12), 2987–2998.
- (71) Rosu, F.; Gabelica, V.; Houssier, C.; De Pauw, E. Determination of Affinity, Stoichiometry and Sequence Selectivity of Minor Groove Binder Complexes with Double-Stranded Oligodeoxynucleotides by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30* (16), e82–e82.
- (72) Drobyshch, A. L.; Zasedatelev, A. S.; Yershov, G. M.; Mirzabekov, A. D. Massive Parallel Analysis of DNA-Hoechst 33258 Binding Specificity with a Generic Oligodeoxyribonucleotide Microchip. *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27* (20), 4100–4105.

- (73) Degtyareva, N. N.; Wallace, B. D.; Bryant, A. R.; Loo, K. M.; Petty, J. T. Hydration Changes Accompanying the Binding of Minor Groove Ligands with DNA. *Biophys. J.* **2007**, *92* (3), 959–965.
- (74) Chaires, J. B.; Waring, M. J. *Drug-Nucleic Acid Interactions*; Academic press, 2001; Vol. 340.
- (75) Lah, J.; Drobnak, I.; Dolinar, M.; Vesnaver, G. What Drives the Binding of Minor Groove-Directed Ligands to DNA Hairpins? *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36* (3), 897–904.
- (76) Lennard, L. Molecular Aspects of Anticancer Drugs-DNA Interactions. Volume 1. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1994**, *37* (1), 103.
- (77) Gago, F. Stacking Interactions and Intercalative DNA Binding. *Methods* **1998**, *14* (3), 277–292.
- (78) Berman, H. M.; Young, P. R. The Interaction of Intercalating Drugs with Nucleic Acids. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **1981**, *10* (1), 87–114.
- (79) Feigon, J.; Denny, W. A.; Leupin, W.; Kearns, D. R. Interactions of Antitumor Drugs with Natural DNA: Proton NMR Study of Binding Mode and Kinetics. *J. Med. Chem.* **1984**, *27* (4), 450–465.
- (80) Wilson, W. D.; Wang, Y.-H.; Kusuma, S.; Chandrasekaran, S.; Boykin, D. W. The Effect of Intercalator Structure on Binding Strength and Base-Pair Specificity in DNA Interactions. *Biophys. Chem.* **1986**, *24* (2), 101–109.
- (81) Chacon-Garcia, R. M. and L. The Search of DNA-Intercalators as Antitumoral Drugs: What It Worked and What Did Not Work. *Current Medicinal Chemistry*. 2005, pp 127–151.
- (82) Lerman, L. S. Structural Considerations in the Interaction of DNA and Acridines. *J. Mol. Biol.* **1961**, *3* (1), 18–IN14.
- (83) Dearing, A.; Weiner, P.; Kollman, P. A. Molecular Mechanical Studies of Proflavine and Acridine Orange Intercalation. *Nucleic Acids Res.* **1981**, *9* (6), 1483–1497.
- (84) Waring, M. J. Complex Formation between Ethidium Bromide and Nucleic Acids. *J. Mol. Biol.* **1965**, *13* (1), 269–282.
- (85) Biver, T.; De Biasi, A.; Secco, F.; Venturini, M.; Yarmoluk, S. Cyanine Dyes

- as Intercalating Agents: Kinetic and Thermodynamic Studies on the DNA/Cyan40 and DNA/CCyan2 Systems. *Biophys. J.* **2005**, 89 (1), 374–383.
- (86) Agudelo, D.; Bourassa, P.; Bérubé, G.; Tajmir-Riahi, H.-A. Intercalation of Antitumor Drug Doxorubicin and Its Analogue by DNA Duplex: Structural Features and Biological Implications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, 66, 144–150.
- (87) Busto, N.; Garcia, B.; Leal, J. M.; Secco, F.; Venturini, M. The Mode of Binding ACMA-DNA Relies on the Base-Pair Nature. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, 10 (13), 2594–2602.
- (88) Hansen, L. F.; Jensen, L. K.; Jacobsen, J. P. Bis-Intercalation of a Homodimeric Thiazole Orange Dye in DNA in Symmetrical Pyrimidine-Pyrimidine-Purine-Purine Oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **1996**, 24 (5), 859–867.
- (89) Camunas-Soler, J.; Manosas, M.; Frutos, S.; Tulla-Puche, J.; Albericio, F.; Ritort, F. Single-Molecule Kinetics and Footprinting of DNA Bis-Intercalation: The Paradigmatic Case of Thiocoraline. *Nucleic Acids Res.* **2015**, 43 (5), 2767–2779.
- (90) Barry, N. P. E.; Therrien, B. Host–Guest Chemistry in the Hexanuclear (Arene)ruthenium Metalla-Prismatic Cage [Ru₆(p-cymene)₆(tpt)₂(dhnq)₃]⁶⁺. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2009**, 2009 (31), 4695–4700.
- (91) Kühlwein, F.; Polborn, K.; Beck, W. Metallkomplexe von Farbstoffen. X. Neue Übergangsmetallkomplexe von Anthrachinonfarbstoffen. *Zeitschrift für Anorg. und Allg. Chemie* **1997**, 623 (12), 1931–1944.
- (92) Cohen, G.; Eisenberg, H. Viscosity and Sedimentation Study of Sonicated DNA–proflavine Complexes. *Biopolymers* **1969**, 8 (1), 45–55.
- (93) Rigler, R.; Rabl, C.; Jovin, T. M. A Temperature-jump Apparatus for Fluorescence Measurements. *Rev. Sci. Instrum.* **1974**, 45 (4).
- (94) Benesi, H. A.; Hildebrand, J. H. A Spectrophotometric Investigation of the Interaction of Iodine with Aromatic Hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**,

- 71 (8), 2703–2707.
- (95) McGhee, J. D.; von Hippel, P. H. Theoretical Aspects of DNA-Protein Interactions: Co-Operative and Non-Co-Operative Binding of Large Ligands to a One-Dimensional Homogeneous Lattice. *J. Mol. Biol.* **1974**, 86 (2), 469–489.
- (96) Scatchard, G. The Attractions of Proteins for Small Molecules and Ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1949**, 51 (4), 660–672.
- (97) Fasman, G. D. *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*; Springer Science & Business Media, 2013.
- (98) Martin, S. R.; Schilstra, M. J. Circular Dichroism and Its Application to the Study of Biomolecules. *Methods Cell Biol.* **2008**, 84, 263–293.
- (99) Kypr, J.; Kejnovská, I.; Renčiuk, D.; Vorlíčková, M. Circular Dichroism and Conformational Polymorphism of DNA. *Nucleic Acids Res.* **2009**, 37 (6), 1713–1725.
- (100) Kamiya, M. The Induced Circular Dichroism of Proflavine Intercalated to DNA. Dye-Polymer Exciton Interactions. *Biochim. Biophys. Acta - Nucleic Acids Protein Synth.* **1979**, 562 (1), 70–79.
- (101) Höhne, G. W. H.; Hemminger, W.; Flammersheim, H.-J. Differential Scanning Calorimetry: An Introduction for Practitioners; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1996; pp 21–40.
- (102) Cooper, A.; Johnson, C. M. Differential Scanning Calorimetry. *Microsc. Opt. Spectrosc. Macrosc. Tech.* **1994**, 125–136.
- (103) Atkins, P.; De Paula, J. *Physical Chemistry for the Life Sciences*; Oxford University Press, USA, 2011.
- (104) Jovin, T. M.; Striker, G. Chemical Relaxation in Molecular Biology; Pecht, I., Rigler, R., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1977; pp 245–281.
- (105) Foresman, J. B.; Frisch, A. E.; Gaussian, I. *Exploring Chemistry with Electronic Structure Methods: A Guide to Using Gaussian*; Gaussian, Incorporated, 1993.
- (106) Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Gould, I. R.; Merz, K. M.;

- Ferguson, D. M.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117* (19), 5179–5197.
- (107) Dewar, M. J. S.; Zoebisch, E. G.; Healy, E. F.; Stewart, J. J. P. Development and Use of Quantum Mechanical Molecular Models. 76. AM1: A New General Purpose Quantum Mechanical Molecular Model. [Erratum to Document Cited in CA103(2):11627f]. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (12), 5348.
- (108) Stewart, J. J. P. Optimization of Parameters for Semiempirical Methods I. Method. *J. Comput. Chem.* **1989**, *10* (2), 209–220.
- (109) Stewart, J. J. P. Optimization of Parameters for Semiempirical Methods V: Modification of NDDO Approximations and Application to 70 Elements. *J. Mol. Model.* **2007**, *13* (12), 1173–1213.
- (110) Řezáč, J.; Fanfrlík, J.; Salahub, D.; Hobza, P. Semiempirical Quantum Chemical PM6 Method Augmented by Dispersion and H-Bonding Correction Terms Reliably Describes Various Types of Noncovalent Complexes. *J. Chem. Theory Comput.* **2009**, *5* (7), 1749–1760.
- (111) Korth, M.; Pitoňák, M.; Řezáč, J.; Hobza, P. A Transferable H-Bonding Correction for Semiempirical Quantum-Chemical Methods. *J. Chem. Theory Comput.* **2010**, *6* (1), 344–352.
- (112) Hohenberg, P.; Kohn, W. Inhomogeneous Electron Gas. *Phys. Rev.* **1964**, *136* (3B), B864–B871.
- (113) Kohn, W.; Sham, L. J. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects. *Phys. Rev.* **1965**, *140* (4A), A1133–A1138.
- (114) Vosko, S. H.; Wilk, L.; Nusair, M. Accurate Spin-Dependent Electron Liquid Correlation Energies for Local Spin Density Calculations: A Critical Analysis. *Can. J. Phys.* **1980**, *58* (8), 1200–1211.
- (115) Becke, A. D. Density-Functional Exchange-Energy Approximation with Correct Asymptotic Behavior. *Phys. Rev. A* **1988**, *38* (6), 3098–3100.
- (116) Lee, C.; Yang, W.; Parr, R. G. Development of the Colle-Salvetti

- Correlation-Energy Formula into a Functional of the Electron Density. *Phys. Rev. B* **1988**, *37* (2), 785–789.
- (117) Chakraborty, D.; Ayers, P. W. *Statistical Complexity: Applications in Electronic Structure*; Sen, K. D., Ed.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2011; pp 35–48.
- (118) Harris, J. Adiabatic-Connection Approach to Kohn-Sham Theory. *Phys. Rev. A* **1984**, *29* (4), 1648–1659.
- (119) Stephens, P. J.; Devlin, F. J.; Chabalowski, C. F.; Frisch, M. J. Ab Initio Calculation of Vibrational Absorption and Circular Dichroism Spectra Using Density Functional Force Fields. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98* (45), 11623–11627.
- (120) Becke, A. D. Density-functional Thermochemistry. III. The Role of Exact Exchange. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98* (7).
- (121) Wang, Y.; Perdew, J. P. Correlation Hole of the Spin-Polarized Electron Gas, with Exact Small-Wave-Vector and High-Density Scaling. *Phys. Rev. B* **1991**, *44* (24), 13298–13307.
- (122) Perdew, J. P.; Chevary, J. A.; Vosko, S. H.; Jackson, K. A.; Pederson, M. R.; Singh, D. J.; Fiolhais, C. Atoms, Molecules, Solids, and Surfaces: Applications of the Generalized Gradient Approximation for Exchange and Correlation. *Phys. Rev. B* **1992**, *46* (11), 6671–6687.
- (123) Kruse, H.; Goerigk, L.; Grimme, S. Why the Standard B3LYP/6-31G* Model Chemistry Should Not Be Used in DFT Calculations of Molecular Thermochemistry: Understanding and Correcting the Problem. *J. Org. Chem.* **2012**, *77* (23), 10824–10834.
- (124) Zhao, Y.; Truhlar, D. G. The M06 Suite of Density Functionals for Main Group Thermochemistry, Thermochemical Kinetics, Noncovalent Interactions, Excited States, and Transition Elements: Two New Functionals and Systematic Testing of Four M06-Class Functionals and 12 Other Function. *Theor. Chem. Acc.* **2007**, *120* (1), 215–241.
- (125) Chai, J.-D.; Head-Gordon, M. Long-Range Corrected Hybrid Density Functionals with Damped Atom-Atom Dispersion Corrections. *Phys. Chem.*

- Chem. Phys.* **2008**, *10* (44), 6615–6620.
- (126) Chai, J.-D.; Head-Gordon, M. Systematic Optimization of Long-Range Corrected Hybrid Density Functionals. *J. Chem. Phys.* **2008**, *128* (8), 084106.
- (127) Becke, A. D. Density-Functional Thermochemistry. V. Systematic Optimization of Exchange-Correlation Functionals. *J. Chem. Phys.* **1997**, *107* (20).
- (128) Minenkov, Y.; Singstad, A.; Occhipinti, G.; Jensen, V. R. The Accuracy of DFT-Optimized Geometries of Functional Transition Metal Compounds: A Validation Study of Catalysts for Olefin Metathesis and Other Reactions in the Homogeneous Phase. *Dalt. Trans.* **2012**, *41* (18), 5526–5541.
- (129) Brunk, E.; Rothlisberger, U. Mixed Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Molecular Dynamics Simulations of Biological Systems in Ground and Electronically Excited States. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (12), 6217–6263.
- (130) Dapprich, S.; Komáromi, I.; Byun, K. S.; Morokuma, K.; Frisch, M. J. A New ONIOM Implementation in Gaussian98. Part I. The Calculation of Energies, Gradients, Vibrational Frequencies and Electric Field Derivatives. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **1999**, *461-462*, 1–21.
- (131) Vreven, T.; Morokuma, K. Chapter 3 Hybrid Methods: ONIOM(QM:MM) and QM/MM. *Annu. Rep. Comput. Chem.* **2006**, *2*, 35–51.
- (132) Vreven, T.; Morokuma, K.; Farkas, Ö.; Schlegel, H. B.; Frisch, M. J. Geometry Optimization with QM/MM, ONIOM, and Other Combined Methods. I. Microiterations and Constraints. *J. Comput. Chem.* **2003**, *24* (6), 760–769.
- (133) Slater, J. C. Atomic Shielding Constants. *Phys. Rev.* **1930**, *36* (1), 57–64.
- (134) Boys, S. F. Electronic Wave Functions. I. A General Method of Calculation for the Stationary States of Any Molecular System. *Proc. R. Soc. London A Math. Phys. Eng. Sci.* **1950**, *200* (1063), 542–554.
- (135) Hehre, W. J.; Ditchfield, R.; Pople, J. A. Self-consistent Molecular Orbital Methods. XII. Further Extensions of Gaussian-type Basis Sets for Use in

- Molecular Orbital Studies of Organic Molecules. *J. Chem. Phys.* **1972**, *56* (5), 2257–2261.
- (136) Rassolov, V. A.; Ratner, M. A.; Pople, J. A.; Redfern, P. C.; Curtiss, L. A. 6-31G* Basis Set for Third-Row Atoms. *J. Comput. Chem.* **2001**, *22* (9), 976–984.
- (137) Hay, P. J.; Wadt, W. R. Ab Initio Effective Core Potentials for Molecular Calculations. Potentials for the Transition Metal Atoms Sc to Hg. *J. Chem. Phys.* **1985**, *82* (1).
- (138) Wadt, W. R.; Hay, P. J. Ab Initio Effective Core Potentials for Molecular Calculations. Potentials for Main Group Elements Na to Bi. *J. Chem. Phys.* **1985**, *82* (1).
- (139) Hay, P. J.; Wadt, W. R. Ab Initio Effective Core Potentials for Molecular Calculations. Potentials for K to Au Including the Outermost Core Orbitals. *J. Chem. Phys.* **1985**, *82* (1).
- (140) Frenking, G.; Antes, I.; Böhme, M.; Dapprich, S.; Ehlers, A. W.; Jonas, V.; Neuhaus, A.; Otto, M.; Stegmann, R.; Veldkamp, A. Pseudopotential Calculations of Transition Metal Compounds: Scope and Limitations. *Rev. Comput. Chem. Vol. 8* **1996**, 63–144.
- (141) Cundari, T. R.; Benson, M. T.; Lutz, M. L.; Sommerer, S. O. Effective Core Potential Approaches to the Chemistry of the Heavier Elements. *Rev. Comput. Chem. Vol. 8* **1996**, 145–202.
- (142) Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cammi, R. Quantum Mechanical Continuum Solvation Models. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (8), 2999–3094.
- (143) Biagini, S.; Bianchi, A.; Biver, T.; Boggioni, A.; Nikolayenko, I. V.; Secco, F.; Venturini, M. DNA Binding of a Proflavine Derivative Bearing a Platinum Hanging Residue. *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105* (4), 558–562.
- (144) Demeunynck, M.; Martelli, F. C. and A. Interest of Acridine Derivatives in the Anticancer Chemotherapy. *Current Pharmaceutical Design.* 2001, pp 1703–1724.
- (145) Paul, P.; Kumar, G. S. Toxic Interaction of Thionine to Deoxyribonucleic Acids: Elucidation of the Sequence Specificity of Binding with

- Polynucleotides. *J. Hazard. Mater.* **2010**, *184* (1-3), 620–626.
- (146) Exley, C. The Coordination Chemistry of Aluminium in Neurodegenerative Disease. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, *256* (19), 2142–2146.
- (147) Lima, P. D. L.; Vaconcellos, M. C.; Montenegro, R. C.; Bahia, M. O.; Antunes, L. M. G.; Costa, E. T.; Burbano, R. R. Genotoxic Effects of Aluminum, Iron and Manganese in Human Cells and Experimental Systems: A Review of the Literature. *Hum. Exp. Toxicol.* **2011**, 0960327110396531.
- (148) Dyrssen, D.; Haraldsson, C.; Nyberg, E.; Wedborg, M. Complexation of Aluminum with DNA. *J. Inorg. Biochem.* **1987**, *29* (1), 67–75.
- (149) Govindaraju, M.; Monica, F. S.; Berrocal, R.; Rao, K. R. S.; Rao, K. S. First Evidence for Aluminum-Maltol Driven B to Z-DNA Conformational Transition in Poly D (GC). D (GC): Relevance to Alzheimer's Disease. *Curr. Trends Biotechnol. Pharm.* **2012**, *6* (2).
- (150) Brenner, S. Aluminum May Mediate Alzheimer's Disease through Liver Toxicity, with Aberrant Hepatic Synthesis of Ceruloplasmin and ATPase7B, the Resultant Excess Free Copper Causing Brain Oxidation, Beta-Amyloid Aggregation and Alzheimer Disease. *Med. Hypotheses* **2013**, *80* (3), 326–327.
- (151) Venturini, M.; Berthon, G. Aluminium Speciation Studies in Biological Fluids. A New Investigation of Aluminium Hydroxide Equilibria under Physiological Conditions. *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.* **1987**, No. 5, 1145–1148.
- (152) Lari, M.; Lozano, H. J.; Busto, N.; Biver, T.; Leal, J. M.; Ibeas, S.; Platts, J. A.; Secco, F.; Garcia, B. Stabilization of Al(iii) Solutions by Complexation with Cacodylic Acid: Speciation and Binding Features. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17* (44), 29803–29813.
- (153) Karlik, S. J.; Eichhorn, G. L. Polynucleotide Cross-Linking by Aluminum. *J. Inorg. Biochem.* **1989**, *37* (4), 259–269.
- (154) Wedrychowski, A.; Schmidt, W. N.; Hnilica, L. S. The in Vivo Cross-Linking of Proteins and DNA by Heavy Metals. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261* (7), 3370–3376.

- (155) Martell, A. E.; Motekaitis, R. J.; Smith, R. M. Aluminium Complexes of Hydroxyaliphatic and Hydroxyaromatic Ligands in Aqueous Systems—some Problems and Solutions. *Polyhedron* **1990**, *9* (2), 171–187.
- (156) Roskams, A. J.; Connor, J. R. Aluminum Access to the Brain: A Role for Transferrin and Its Receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, *87* (22), 9024–9027.
- (157) McGregor, S. J.; Brock, J. H.; Halls, D. The Role of Transferrin and Citrate in Cellular Uptake of Aluminium. *Biol. Met.* **1991**, *4* (3), 173–175.
- (158) Nagaoka, M. H.; Maitani, T. Binding Affinity of Aluminium to Human Serum Transferrin and Effects of Carbohydrate Chain Modification as Studied by HPLC/high-Resolution ICP-MS: —Speciation of Aluminium in Human Serum—. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99* (9), 1887–1894.
- (159) Bigay, J.; Deterre, P.; Pfister, C.; Chabre, M. Fluoride Complexes of Aluminium or Beryllium Act on G-Proteins as Reversibly Bound Analogues of the Gamma Phosphate of GTP. *EMBO J.* **1987**, *6* (10), 2907–2913.
- (160) Gasper, R.; Meyer, S.; Gotthardt, K.; Sirajuddin, M.; Wittinghofer, A. It Takes Two to Tango: Regulation of G Proteins by Dimerization. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2009**, *10* (6), 423–429.
- (161) Williams, M. C.; Wenner, J. R.; Rouzina, I.; Bloomfield, V. A. Effect of pH on the Overstretching Transition of Double-Stranded DNA: Evidence of Force-Induced DNA Melting. *Biophys. J.* **2001**, *80* (2), 874–881.
- (162) Cohen, G.; Eisenberg, H. Viscosity and Sedimentation Study of Sonicated DNA-Proflavine Complexes. *Biopolymers*. pp 45–55.
- (163) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; et al. Gaussian 09, Revision B.01. *Gaussian 09, Revision B.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT*. Wallingford CT 2009.
- (164) van Maanen, J. M. S.; Lafleur, M. V. M.; Mans, D. R. A.; van den Akker, E.; de Ruiter, C.; Kootstra, P. R.; Pappie, D.; de Vries, J.; Retèl, J.; Pinedo, H. M. Effects of the Ortho-Quinone and Catechol of the Antitumor Drug VP-16-213 on the Biological Activity of Single-Stranded and Double-Stranded

- Φ X174 DNA. *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37* (19), 3579–3589.
- (165) Sexton, W. A. Chemical Constitution and Biological Activity. *Chem. Const. Biol. Act.* **1953**.
- (166) Busto, N.; Valladolid, J.; Martínez-Alonso, M.; Lozano, H. J.; Jalón, F. A.; Manzano, B. R.; Rodríguez, A. M.; Carrión, M. C.; Biver, T.; Leal, J. M.; et al. Anticancer Activity and DNA Binding of a Bifunctional Ru(II) Arene Aqua-Complex with the 2,4-Diamino-6-(2-Pyridyl)-1,3,5-Triazine Ligand. *Inorg. Chem.* **2013**, *52* (17), 9962–9974.
- (167) Valladolid, J.; Hortigüela, C.; Busto, N.; Espino, G.; Rodríguez, A. M.; Leal, J. M.; Jalón, F. a; Manzano, B. R.; Carbayo, A.; García, B. Phenanthroline Ligands Are Biologically More Active than Their Corresponding ruthenium(II) Arene Complexes. *Dalton Trans.* **2014**, *43*, 2629–2645.
- (168) Martínez-Alonso, M.; Busto, N.; Jalón, F. A.; Manzano, B. R.; Leal, J. M.; Rodríguez, A. M.; García, B.; Espino, G. Derivation of Structure - Activity Relationships from the Anticancer Properties of ruthenium(II) Arene Complexes with 2-Aryldiazole Ligands. *Inorg. Chem.* **2014**, *53* (20), 11274–11288.
- (169) Mjos, K. D.; Orvig, C. Metallodrugs in Medicinal Inorganic Chemistry. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (8), 4540–4563.
- (170) Allardyce, C. S.; Dyson, P. J. Medicinal Properties of Organometallic Compounds. *Top. Organomet. Chem.* **2006**, *17* (Bioorganometallic Chemistry), 177–210.
- (171) Mirtschin, S.; Slabon-Turski, A.; Scopelliti, R.; Velders, A. H.; Severin, K. A Coordination Cage with an Adaptable Cavity Size. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (40), 14004–14005.
- (172) Fernández, R.; Melchart, M.; Habtemariam, A.; Parsons, S.; Sadler, P. J. Use of Chelating Ligands to Tune the Reactive Site of Half-Sandwich ruthenium(II)-Arene Anticancer Complexes. *Chemistry* **2004**, *10* (20), 5173–5179.
- (173) Yan, Y. K.; Melchart, M.; Habtemariam, A.; Sadler, P. J. Organometallic Chemistry, Biology and Medicine: Ruthenium Arene Anticancer

- Complexes. *Chem. Commun.* **2005**, No. 38, 4764–4776.
- (174) Barragán, F.; López-Senín, P.; Salassa, L.; Betanzos-Lara, S.; Habtemariam, A.; Moreno, V.; Sadler, P. J.; Marchán, V. Photocontrolled DNA Binding of a Receptor-Targeted Organometallic Ruthenium(II) Complex. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (35), 14098–14108.
- (175) Agonigi, G.; Riedel, T.; Zacchini, S.; Păunescu, E.; Pampaloni, G.; Bartalucci, N.; Dyson, P. J.; Marchetti, F. Synthesis and Antiproliferative Activity of New Ruthenium Complexes with Ethacrynic-Acid-Modified Pyridine and Triphenylphosphine Ligands. *Inorg. Chem.* **2015**, *54* (13), 6504–6512.
- (176) Dadci, L.; Elias, H.; Frey, U.; Hoernig, A.; Koelle, U.; Merbach, A. E.; Paulus, H.; Schneider, J. S. . Pi.-Arene Aqua Complexes of Cobalt, Rhodium, Iridium, and Ruthenium: Preparation, Structure, and Kinetics of Water Exchange and Water Substitution. *Inorg. Chem.* **1995**, *34* (1), 306–315.
- (177) Aliende, C.; Pérez-Manrique, M.; Jalón, F. A.; Manzano, B. R.; Rodríguez, A. M.; Cuevas, J. V; Espino, G.; Martínez, M. Á.; Massaguer, A.; González-Bártulos, M.; et al. Preparation of New Half Sandwich Ruthenium Arene Complexes with Aminophosphines as Potential Chemotherapeutics. *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *117*, 171–188.
- (178) Martínez-Alonso, M.; Busto, N.; Jalón, F. A.; Manzano, B. R.; Leal, J. M.; Rodríguez, A. M.; García, B.; Espino, G. Derivation of Structure - Activity Relationships from the Anticancer Properties of ruthenium(II) Arene Complexes with 2-Aryldiazole Ligands. **2014**, *53* (20), 11274–11288.
- (179) Ramirez, O.; Motta-Mena, L. B.; Cordova, A.; Garza, K. M. A Small Library of Synthetic Di-Substituted 1, 4-Naphthoquinones Induces ROS-Mediated Cell Death in Murine Fibroblasts. *PLoS One* **2014**, *9* (9), e106828.
- (180) Nagaoka, T.; Sakai, T.; Ogura, K.; Yoshino, T. Oxygen Reduction with Hydroxy-1,4-Naphthoquinones Immobilized at Carbon Electrodes. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1 Phys. Chem. Condens. Phases* **1987**, *83* (6), 1823–1833.
- (181) Berghot, M. A.; Kandeel, E. M.; Abdel-Rahman, A. H.; Abdel-Motaal, M.

- Synthesis, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Novel Naphthoquinone Derivatives from 2,3-Dihydro-2,3-Epoxy-1,4-Naphthoquinone. *Med. Chem. (Los Angeles, CA, United States)* **2014**, 4 (3), 381–388, 8 pp.
- (182) Song, G.; Kim, Y.; Zheng, X.; You, Y.; Cho, H.; Chung, J. Original Article Naphthazarin Derivatives (IV): Synthesis , Inhibition of DNA Topoisomerase I and Cytotoxicity of 2- or 6-Acyl-5 , 8-Dimethoxy-1 , 4-Naphthoquinones. *Changes* **2000**, 35, 291–298.
- (183) Kourounakis, A. P.; Assimopoulou, A. N.; Papageorgiou, V. P.; Gavalas, A.; Kourounakis, P. N. Alkannin and Shikonin: Effect on Free Radical Processes and on Inflammation - A Preliminary Pharmacochemical Investigation. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **2002**, 335 (6), 262–266.
- (184) Kim, J.-A.; Lee, E. K.; Park, S. J.; Kim, N. D.; Hyun, D.-H.; Lee, C. G.; Lee, J. H.; Yang, K. M.; Heo, K.; Son, T. G. Novel Anti-Cancer Role of Naphthazarin in Human Gastric Cancer Cells. *Int. J. Oncol.* **2012**, 40 (1), 157–162.
- (185) Huang, Q.; Lu, G.; Shen, H.-M.; Chung, M. C. M.; Ong, C. N. Anti-Cancer Properties of Anthraquinones from Rhubarb. *Med. Res. Rev.* **2007**, 27 (5), 609–630.
- (186) Mueller, S. O.; Stopper, H. Characterization of the Genotoxicity of Anthraquinones in Mammalian Cells. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1999**, 1428 (2-3), 406–414.
- (187) Beckford, S. J.; Dixon, D. W. Molecular Dynamics of Anthraquinone DNA Intercalators with Polyethylene Glycol Side Chains. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2012**, 29 (5), 1065–1080.
- (188) Zagotto, G.; Ricci, A.; Vasquez, E.; Sandoli, A.; Benedetti, S.; Palumbo, M.; Sissi, C. Tuning G-Quadruplex vs Double-Stranded DNA Recognition in Regioisomeric Lysyl-Peptidyl-Anthraquinone Conjugates. *Bioconjug. Chem.* **2011**, 22 (10), 2126–2135.
- (189) Rossi, S.; Tabolacci, C.; Lentini, A. Anthraquinones Danthron and Quinizarin Exert Antiproliferative and Antimetastatic Activity on Murine B16-F10 Melanoma Cells. *Anticancer ...* **2010**, 450, 445–449.

- (190) Mukherjee, T.; Swallow, a. J.; Guyan, P. M.; Bruce, J. M. One- and Two-Electron Reduction of Quinizarin and 5-Methoxyquinizarin: A Pulse Radiolysis Study. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1990**, *86* (9), 1483.
- (191) Krasukianis, R.; Mayer, J. REDUCTION OF THE QUINIZARIN MOLECULE IN METHANOL AS STUDIED BY Y-RADIOLYSIS C ~ O OH C ~ O “ OH O ” O “ O ” D-. **1993**, *173* (2), 339–349.
- (192) Macias-Ruvalcaba, N. A.; Evans, D. H. Association Reactions of the Anion Radicals of Some Hydroxyquinones: Evidence for Formation of π - and σ -Dimers as Well as a Neutral-Anion Radical Complex. *J. Phys. Chem. C* **2010**, *114* (2), 1285–1292.
- (193) Ossowski, T.; Pipka, P.; Liwo, A.; Jeziorek, D. Electrochemical and UV-Spectrophotometric Study of Oxygen and Superoxide Anion Radical Interaction with Anthraquinone Derivatives and Their Radical Anions. *Electrochim. Acta* **2000**, *45* (21), 3581–3587.
- (194) Gholivand, M. B.; Kashanian, S.; Peyman, H.; Roshanfekar, H. DNA-Binding Study of Anthraquinone Derivatives Using Chemometrics Methods. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46* (7), 2630–2638.
- (195) Verebová, V.; Adamcik, J.; Danko, P.; Podhradský, D.; Miškovský, P.; Staničová, J. Anthraquinones Quinizarin and Danthron Unwind Negatively Supercoiled DNA and Lengthen Linear DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *444* (1), 50–55.
- (196) Perez-Arnaiz, C.; Busto, N.; Leal, J. M.; Garcia, B. New Insights into the Mechanism of the DNA/Doxorubicin Interaction. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118* (5), 1288–1295.
- (197) Stíbal, D.; Therrien, B.; Süß-Fink, G.; Nowak-Sliwinska, P.; Dyson, P. J.; Čermáková, E.; Řezáčová, M.; Tomšík, P. Chlorambucil Conjugates of Dinuclear P-Cymene Ruthenium Trithiolato Complexes: Synthesis, Characterization and Cytotoxicity Study in Vitro and in Vivo. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2016**, 1–10.
- (198) Hirahara, M.; Nagai, S.; Takahashi, K.; Saito, K.; Yui, T.; Yagi, M. New Series of Dinuclear Ruthenium(II) Complexes Synthesized Using Photoisomerization for Efficient Water Oxidation Catalysis. *Inorg. Chem.*

- 2015**, 54 (15), 7627–7635.
- (199) Smith, J. A.; Collins, J. G.; Keene, F. R. Groove-Binding Ruthenium (II) Complexes as Probes of DNA Recognition. In *Met. Complex-DNA Interact.*; John Wiley & Sons Ltd., 2009; pp 319–346.
- (200) Zou, X.-H.; Ye, B.-H.; Li, H.; Liu, J.-G.; Xiong, Y.; Ji, L.-N. Mono- and Bi-Nuclear ruthenium(II) Complexes Containing a New Asymmetric Ligand 3-(Pyrazin-2-Yl)-as-triazino[5,6-f]1,10-Phenanthroline: Synthesis, Characterization and DNA-Binding Properties. *J. Chem. Soc. Dalt. Trans. Inorg. Chem.* **1999**, No. 9, 1423–1428.
- (201) Shi, S.; Liu, J.; Yao, T.; Geng, X.; Jiang, L.; Yang, Q.; Cheng, L.; Ji, L. Promoting the Formation and Stabilization of G-Quadruplex by Dinuclear RuII Complex Ru₂(obip)L₄. *Inorg. Chem.* **2008**, 47 (8), 2910–2912.
- (202) Xu, L.; Zhang, D.; Huang, J.; Deng, M.; Zhang, M.; Zhou, X. High Fluorescence Selectivity and Visual Detection of G-Quadruplex Structures by a Novel Dinuclear Ruthenium Complex. *Chem. Commun. (Cambridge, United Kingdom)* **2010**, 46 (5), 743–745.
- (203) Wilson, T.; Costa, P. J.; Felix, V.; Williamson, M. P.; Thomas, J. A. Structural Studies on Dinuclear Ruthenium(II) Complexes That Bind Diastereoselectively to an Antiparallel Folded Human Telomere Sequence. *J. Med. Chem.* **2013**, 56 (21), 8674–8683.
- (204) Freudenreich, J.; Dalvit, C.; Suss-Fink, G.; Therrien, B. Encapsulation of Photosensitizers in Hexa- and Octanuclear Organometallic Cages: Synthesis and Characterization of Carceplex and Host-Guest Systems in Solution. *Organometallics* **2013**, 32 (10), 3018–3033.
- (205) Barry, N. P. E.; Furrer, J.; Therrien, B. In- and out-of-Cavity Interactions by Modulating the Size of Ruthenium Metallarectangles. *Helv. Chim. Acta* **2010**, 93 (7), 1313–1328.
- (206) Barry, N. P. E.; Edafe, F.; Therrien, B. Anticancer Activity of Tetracationic Arene Ruthenium Metalla-Cycles. *Dalt. Trans.* **2011**, 40 (27), 7172–7180.
- (207) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.;

- Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenb, D. J. Gaussian 09, Revision D.01. Wallingford CT 2009.
- (208) Lu, X.; Olson, W. K. 3DNA: A Software Package for the Analysis, Rebuilding and Visualization of Three-dimensional Nucleic Acid Structures. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31* (17), 5108–5121.
- (209) Vreven, T.; Byun, K. S.; Komáromi, I.; Dapprich, S.; Montgomery, J. A.; Morokuma, K.; Frisch, M. J. Combining Quantum Mechanics Methods with Molecular Mechanics Methods in ONIOM. *J. Chem. Theory Comput.* **2006**, *2* (3), 815–826.
- (210) Lu, X.-J.; Olson, W. K. 3DNA: A Versatile, Integrated Software System for the Analysis, Rebuilding and Visualization of Three-Dimensional Nucleic-Acid Structures. *Nat. Protoc.* **2008**, *3* (7), 1213–1227.
- (211) Zheng G., L. X.-J. and O. W. . Web 3DNA—a Web Server for the Analysis, Reconstruction, and Visualization of Three-Dimensional Nucleic-Acid Structures. *Nucleic Acids Res.* *37(Web Serv. issue)* **2009**, W240–W246.
- (212) Gholivand, M. B.; Kashanian, S.; Peyman, H. DNA-Binding, DNA Cleavage and Cytotoxicity Studies of Two Anthraquinone Derivatives. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2012**, *87*, 232–240.
- (213) Mishra, A.; Jung, H.; Park, J. W.; Kim, H. K.; Kim, H.; Stang, P. J.; Chi, K.-W. Anticancer Activity of Self-Assembled Molecular Rectangles via Arene-Ruthenium Acceptors and a New Unsymmetrical Amide Ligand. *Organometallics* **2012**, *31* (9), 3519–3526.
- (214) Dubey, A.; Min, J. W.; Koo, H. J.; Kim, H.; Cook, T. R.; Kang, S. C.; Stang, P. J.; Chi, K.-W. Anticancer Potency and Multidrug-Resistant Studies of Self-Assembled Arene-Ruthenium Metallarectangles. *Chem. - A Eur. J.* **2013**, *19* (35), 11622–11628.
- (215) Vajpayee, V.; Lee, S.; Kim, S.-H.; Kang, S. C.; Cook, T. R.; Kim, H.; Kim, D. W.; Verma, S.; Lah, M. S.; Kim, I. S.; et al. Self-Assembled Metalla-Rectangles Bearing Azodipyridyl Ligands: Synthesis, Characterization and Antitumor Activity. *Dalt. Trans.* **2013**, *42* (2), 466–475.

- (216) Wilson, J. J.; Lippard, S. J. Synthesis, Characterization, and Cytotoxicity of Platinum(IV) Carbamate Complexes. *Inorg. Chem.* **2011**, *50* (7), 3103–3115.