

Univerzitet u Beogradu

Hemijski fakultet

Marija R. Nišavić

**Ispitivanje interakcija terpiridinskih
kompleksa rutenijuma(II) sa
transportnim proteinima seruma**

Doktorska disertacija

Beograd, 2017

University of Belgrade

Faculty of Chemistry

Marija R. Nišavić

**Investigation of interactions between
terpyridine ruthenium(II) complexes and
serum transport proteins**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2017

MENTORI:

dr Zoran Vujčić, redovni profesor
Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

dr Mario Cindrić, viši znanstveni suradnik
Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Marijana Petković, naučni savetnik
Instituta za nuklearne nauke "Vinča",
Univerziteta u Beogradu

dr Vladimir Beškoski, docent
Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

DATUM ODBRANE

ZAHVALNICA

Ova doktorska disertacija je urađena u Institutu za nuklearne nauke "Vinča", Univerziteta u Beogradu i Institutu "Ruđer Bošković" u Zagrebu, pod mentorskim rukovodstvom dr Marija Cindrića.

Posebnu zahvalnost dugujem svom mentoru, dr Mariju Cindriću na prenesenom znanju i pomoći pri planiranju, izradi i pisanju ove doktorske disertacije. Zahvaljujem mu se na podršci, strpljenju i prijateljskom stavu. Zahvaljujem se i njegovim saradnicama Ameli, Kristini i Ani na pomoći.

Veliku zahvalnost dugujem dr Marijani Petković, članu komisije i rukovodiocu moje grupe u "Vinči", na ukazanom poverenju, podršci i pomoći pri izradi i pisanju ove doktorske disertacije. Ostalim članovima moje grupe: Ivi, Maji, Borisu, Jadranki i Milici zahvaljujem na podršci i dobrom društvu. Oni su moje dane u "Vinči" učinili lepšim.

Mentoru, Prof. dr Zoranu Vujčiću i članu komisije dr Vladimiru Beškoviću se zahvaljujem na podršci, kritičkoj analizi i oceni ove teze.

Kolegama dr Milovanu Stojiljkoviću, dr Leli Korićanac i ostalim koautorima naučnih publikacija proisteklih iz ove disertacije se zahvaljujem na saradnji. Kolegi dr Goranu Janjiću hvala na nesebičnoj pomoći, diskusijama i konstruktivnim savetima.

Zahvaljujem se i grupi Prof. dr Živadina Bugarčića na saradnji i sintezi kompleksa korišćenih tokom izrade ove disertacije.

Svim ostalim kolegama, a posebno Banetu, Jaci i Maji K, hvala na savetima i podršci.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici i prijateljima. Oni su moja najveća podrška i oslonac.

Marija Nišavić

“Ispitivanje interakcija terpiridinskih kompleksa rutenijuma(II) sa transportnim proteinima seruma”

SAŽETAK

Ova disertacija se bavi ispitivanjem interakcija tri potencijalna antitumorska kompleksa Ru(II) opšte formule $mer-[Ru(Cl-tpy)(N-N)Cl]Cl$ (Cl-tpy - 4'-hloro-2,2':6',2''-terpiridin; N-N - 1,2-diaminoetan (en), 1,2-diaminocikloheksan (dach) ili 2,2'-bipiridin (bipy)) sa transportnim proteinima seruma, humanim serum albuminom (HSA) i transferinom (Tf). Odabrani kompleksi Ru(II) pripadaju novoj klasi terpiridinskih kompleksa meridionalne geometrije, koji pokazuju visoku rastvorljivost u vodi. Do sada je u literaturi pokazana sposobnost ovih kompleksa da grade monofunkcionalne adukte sa derivatima guanina, ističući njihov potencijal za vezivanje za DNK molekul. Međutim, interakcije sa proteinima do sada nisu ispitane. Kako se antikancerski agensi na bazi metala u organizam unose intravenozno, vezivanje kompleksa za transportne proteine seruma je izuzetno važno jer može značajno uticati na njihovu biodistribuciju i efikasnost.

Rezultati su pokazali da se sva tri kompleksa vezuju za HSA i Tf, ali u različitoj meri (dach > en >> bipy). U poređenju sa Tf, HSA pokazuje značajno veći vezivni kapacitet za sva tri kompleksa. Konstante vezivanja kompleksa sa en i dach ligandima su u slučaju HSA reda veličine 10^4 - 10^5 M^{-1} , dok je vezivanje za Tf slabije, reda veličine 10^1 - 10^2 M^{-1} . Vrednosti konstanti vezivanja kompleksa sa bipy ligandom su zanemarljive i ukazuju na slabe interakcije. Vezivanje kompleksa nema značajnog uticaja na sekundarnu strukturu proteina, dok se na tercijarnoj strukturi uočavaju blage promene koje su izraženije kod Tf. Detaljnim ispitivanjem vezivnih mesta na Tf je pokazano da na proteinu postoji pet ostataka histidina za koje se kompleksi sa en i dach ligandima mogu vezati koordinativno kovalentno. Jedan od njih, His585, ulazi u sastav vezivnog mesta za gvožđe, dok su ostala mesta nespecifična i uključuju površinske ostatke histidina. Kompleks sa bipy ligandom se za Tf vezuje u maloj meri, najverovatnije preko nekovalentnih interakcija. U okviru vezivnih mesta na HSA, identifikovano je pet ostataka histidina i jedan ostatak asparaginske kiseline, za koje se kompleksi sa en i dach ligandima mogu vezati koordinativno kovalentno. Od toga, samo tri His i jedan Asp mogu biti mete za vezivanje kompleksa sa bipy ligandom. Prema doking studiji,

ovi ostaci ulaze u sastav pet vezivnih mesta za en i dach, odnosno dva za bipy kompleks. Pokazano je da se kompleksi za HSA mogu vezati i nekovalentno, kao i da vezivna mesta diktira oblik kompleksa (hloro, hidrokso ili akva).

Pored navedenog, razvijena je i optimizovana metoda za poboljšanje negativne jonizacije peptida upotrebom nano-elektrosprej masene spektrometrije (ESI MS). Metoda podrazumeva dodatak rastvora formaldehida u izopropanolu, nakon elucije uzoraka sa hromatografske kolone. Primenom metode za identifikaciju vezivnih mesta ispitivanih kompleksa proteomskim “*bottom-up*” pristupom, omogućena je negativna jonizacija peptida koji na sebi nose vezane komplekse rutenijuma. Primećena je redukcija naelektrisanja detektovanih jona (1-) u odnosu na pozitivni jonski mod (3+). Zbog karakteristične izotopske raspodele rutenijuma, prisustvo jednostruko naelektrisanih vrsta olakšava identifikaciju ciljnih vezivnih peptida, bez fragmentacije liganada karakteristične za analizu matriksom-pomognutom laserskom desorpcijom i jonizacijom (*engl.* matrix-assisted laser desorption and ionization, MALDI).

Iz dobijenih rezultata se može zaključiti da kompleksi sa bidentatnim helatnim ligandima koji poseduju sposobnost građenja jakih vodoničnih veza (en i dach) pokazuju značajno veći afinitet za vezivanje transportnih proteina, nego što je to slučaj sa bipy kompleksom. Pored toga, ova osobina pozitivno korelira i sa ispitanom citotoksičnošću kompleksa. Može se zaključiti i da odabrani proteini seruma poseduju potencijal za transport kompleksa, pri čemu je HSA definisan kao glavni vezivni partner za ispitivana jedinjenja. Pored navedenog, u ovoj tezi je stavljen akcenat i na poboljšanje eksperimentalnog pristupa koji uključuje maseno-spektrometrijske metode za strukturnu karakterizaciju vezivanja kompleksa metala za proteine. Po prvi put je opisana upotreba negativne elektrosprej jonizacije za određivanje mesta vezivanja kompleksa metala na proteinima, dajući ovoj tezi i metodološki značaj.

Ključne reči: kompleksi rutenijuma(II), albumin, transferin, interakcije, vezivna mesta, MALDI, ESI, negativna jonizacija

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Biohemija

“Investigation of interactions between ruthenium(II) terpyridine complexes and serum transport proteins”

ABSTRACT

This thesis investigates interactions between three potential anticancer Ru(II) compounds of general formula $mer-[Ru(Cl-tpy)(N-N)Cl]Cl$ (Cl-tpy - 4'-chloro-2,2':6',2''-terpyridine; N-N - 1,2-diaminoethan (en), 1,2-diaminocyclohexan (dach) or 2,2'-bipyridine (bipy)) and serum transport proteins, human serum albumin (HSA) and transferrin (Tf). The selected Ru(II) compounds belong to a novel class of terpyridine complexes of meridional geometry, that exhibit high water solubility. The ability of the compounds to form monofunctional adducts with guanine derivatives has been shown in literature, emphasizing their potential to bind DNA molecule. However, interactions with proteins have not been investigated so far. Since metal-based anticancer compounds are administered in the organism intravenously, binding of complexes to serum transport proteins is exceptionally important because it can significantly alter drugs' biodistribution and efficiency.

The results have shown that all three complexes bind HSA and Tf, but in a different amount (dach>en>>bipy). Comparing to Tf, HSA exhibits significantly higher binding capacity for each of the compounds. The complexes with en and dach ligands bind HSA with binding constant values being within an order of magnitude of 10^4 - 10^5 M^{-1} , while the binding to Tf turned out to be weaker, an order of magnitude of 10^1 - 10^2 M^{-1} . Binding constant values for bipy complex are negligible and suggest weak interactions. Binding of the complexes does not influence secondary structure of proteins significantly, while tertiary structure suffered mild changes that are more pronounced in case of Tf. Detailed investigation of Tf binding sites showed that the protein contains five histidine residues to which the complexes can bind coordinately covalently. One of them, His585, is a part of iron binding site, while the rest of the sites are nonspecific and are comprised of surface histidine residues. The complex with bipy ligand binds Tf to a low extent, most probably through noncovalent interactions. In regard to HSA, five histidine and one aspartic acid residues to which the complexes with en and dach ligands can bind coordinately covalently have been identified. Among them, only three His and one Asp can be targets for binding of the complex with bipy

ligand. According to docking study, these residues constitute five binding sites for en and dach, or two for bipy complex. It has been shown that the complexes can bind HSA in a noncovalent manner and that the binding sites are dictated by the form of the complexes (chloro, hydroxo or aqua).

Further, a method for enhancing peptide negative ionization using nano-electrospray mass spectrometry has been developed and optimized. The method implies post-column addition of formaldehyde diluted in isopropanol. By applying the method for identification of binding sites of the selected complexes using proteomics “bottom-up” approach, negative ionization of ruthenium complex-bound peptides has been enabled. Charge reduction of the detected ions (1-) has been observed, comparing to the positive ion mode (3+). Since ruthenium has a characteristic isotopic distribution, presence of singly charged species facilitates identification of target peptides, without in-source ligand fragmentation that happens during MALDI analysis.

From the obtained results it can be concluded that the complexes bearing bidentate chelate ligands that can form strong hydrogen bonds (en and dach) show significantly higher affinity for binding transport proteins, comparing to bipy complex. Also, this feature correlates positively with investigated cytotoxicity of the complexes. It can also be concluded that the selected serum proteins have a potential for transport of the complexes, with HSA being defined as their main binding partner. Apart from that, this thesis accentuates enhancement of experimental approach that includes mass spectrometry methods for structural characterization of metal complex binding to proteins. For the first time, application of negative ion mode electrospray ionization for determination of metal complex binding sites on proteins has been described, which also gives this thesis a methodological significance.

Key words: ruthenium(II) complexes, albumin, transferrin, interactions, binding sites, MALDI, ESI, peptide negative ionization

Scientific field: Chemistry

Scientific subfield: Biochemistry

Sadržaj

Lista skraćenica	1
1. Uvod	4
2. Opšti deo	7
2.1 Antitumorski kompleksi rutenijuma	7
2.1.1 Kompleksi rutenijuma (III)	9
2.1.1.1 KP1019/NKP-1339	10
2.1.1.1.1 Mehanizmi antitumorske aktivnosti KP1019/NKP1339	10
2.1.1.1.2 NAMI A	12
2.1.1.1.2.1 Mehanizam dejstva NAMI A	13
2.1.2 Kompleksi rutenijuma(II)	14
2.1.2.1 Organometalni arenski Ru(II) kompleksi	15
2.1.2.1.1 RAPTA kompleksi	17
2.1.2.1.1.1 Mehanizam dejstva RAPTA kompleksa	18
2.1.2.2 Rutenijum(II) polipiridinski kompleksi	20
2.2 Transportni proteini seruma	22
2.2.1 Humani serum transferin	22
2.2.1.1 Transport gvožđa i kompleksa metala posredstvom transferinskog ciklusa	24
2.2.2 Humani serum albumin	26
2.2.2.1 Transport antitumorskih lekova posredstvom HSA	27
2.3 Masena spektrometrija u analizi interakcija kompleksa metala sa proteinima	29
2.3.1 MALDI jonizacija	30
2.3.2 Jonizacija na atmosferskom pritisku	31
2.3.2.1 Elektrosprej jonizacija	33
2.3.2.1.1 Nano-elektrosprej jonizacija u negativnom jonskom modu	35
2.3.3 Maseni analizatori	37
3. Naši radovi	38
3.1 Ispitivanje citotoksičnosti terpiridinskih kompleksa Ru(II)	38
3.2 Karakterizacija terpiridinskih kompleksa Ru(II) upotrebom MALDI MS	42
3.3 Ispitivanje vezivanja terpiridinskih kompleksa Ru(II) za HSA i Tf upotrebom MALDI MS	44

3.4	Određivanje stehiometrije vezivanja terpiridinskih kompleksa Ru(II) za HSA i Tf.....	46
3.5	Određivanje afiniteta vezivanja terpiridinskih kompleksa Ru(II) za HSA i Tf.....	48
3.5.1	Vezivanje kompleksa Ru(II) za HSA	48
3.5.2	Vezivanje kompleksa Ru(II) za Tf	52
3.6	Ispitivanje uticaja vezivanja terpiridinskih kompleksa Ru(II) na konformacione promene HSA i Tf.....	54
3.6.1	Uticaj vezivanja kompleksa na sekundarnu strukturu HSA i Tf	55
3.6.2	Uticaj vezivanja kompleksa na tercijarnu strukturu HSA i Tf	56
3.7	Strukturna karakterizacija proizvoda interakcije kompleksa Ru(II) sa HSA i Tf metodama tačne hromatografije i masene spektrometrije	57
3.7.1	Identifikacija mesta za vezivanje kompleksa Ru(II) na BSA i Tf upotrebom HPLC/MALDI MS.....	58
3.7.1.1	Ispitivanje vezivanja i hromatografsko razdvajanje rutenovanih vrsta	58
3.7.1.2	Detekcija i identifikacija rutenovanih vrsta upotrebom MALDI MS.....	61
3.7.1.2.1	Identifikacija ciljnih sekvencija za vezivanje kompleksa Ru(II) na BSA	62
3.7.1.2.2	Identifikacija ciljne amino-kiseline za vezivanje kompleksa Ru(II) na BSA	63
3.7.1.2.3	Identifikacija ciljnih sekvencija i ciljnih amino-kiselina za vezivanje kompleksa Ru(II) na Tf	65
3.7.2	Identifikacija mesta za vezivanje kompleksa Ru(II) na HSA upotrebom nano-LC/nano-ESI MS.....	68
3.7.2.1	Ispitivanje efikasnosti formaldehida kao modifikatora negativne jonizacije peptida	69
3.7.2.1.1	Mehanizam transfera protona formaldehida.....	71
3.7.2.2	Ispitivanje vezivanja kompleksa Ru(II) za angiotenzin II: poređenje pozitivnog i negativnog moda	72
3.7.2.3	Identifikacija mesta za vezivanje kompleksa Ru(II) na HSA u pozitivnom jonskom modu.....	74
3.7.2.4	Identifikacija mesta za vezivanje kompleksa Ru(II) na HSA u negativnom jonskom modu.....	78
3.8	Doking studija vezivanja terpiridinskih kompleksa Ru(II) za HSA.....	82
3.9	Zaključci.....	89
4.	Eksperimentalni deo.....	91
4.1	Ispitivanje citotoksičnosti Ru(II) terpiridinskih jedinjenja.....	92
4.2	Karakterizacija terpiridinskih kompleksa Ru(II) upotrebom MALDI MS.....	92
4.3	Ispitivanje vezivanja terpiridinskih kompleksa Ru(II) za HSA i Tf upotrebom MALDI MS	93

4.4	Određivanje stehiometrije vezivanja terpiridinskih kompleksa Ru(II) za HSA i Tf.....	93
4.5	Određivanje afiniteta vezivanja terpiridinskih kompleksa Ru(II) za HSA i Tf.....	95
4.6	Ispitivanje uticaja vezivanja terpiridinskih kompleksa Ru(II) na konformacione promene HSA i Tf.....	96
4.7	Strukturna karakterizacija proizvoda interakcije kompleksa R(II) sa HSA i Tf metodama tečne hromatografije i masene spektrometrije	97
4.7.1	HPLC/MALDI MS.....	97
4.7.1.1	Hromatografsko razdvajanje rutenovanih vrsta.....	97
4.7.1.2	Detekcija i identifikacija rutenovanih vrsta upotrebom MALDI MS.....	98
4.7.2	nano-UPLC/nano-ESI MS.....	100
4.7.2.1	Ispitivanje efikasnosti formaldehida kao modifikatora negativne jonizacije peptida	100
4.7.2.2	Ispitivanje vezivanja kompleksa Ru(II) za angiotenzin II.....	101
4.7.2.3	Ispitivanje vezivanja kompleksa Ru(II) za HSA	102
4.8	Doking studija vezivanja terpiridinskih kompleksa Ru(II) za HSA.....	103
5.	Literatura	105

Lista skraćenica

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

HSA – humani serum albumin

Tf – transferin

TfR1 – transferinski receptor 1

EPR – efekat povećane permeabilnosti i zadržavanja (*engl.* enhanced permeability and retention effect)

NMR – nuklearna magnetna rezonancija

MS – masena spektrometrija

ESI – elektrosprej jonizacija

MALDI – matriskom pomognuta laserska desorpcija i jonizacija (*engl.* matrix-assisted laser desorption and ionization)

HPLC – tečna hromatografija visokih performansi (*engl.* high performance liquid chromatography)

Cisplatina (cis Pt) – *cis*-diamindihloridoplatina(II)

Cl-tpy – 4'-hloro-2,2',6',2''-terpiridin

tpy - 2,2',6',2''-terpiridin

bipy – 2,2'-bipiridin

en – etilendiamin

dach – (\pm)-*trans*-1,2-diaminocikloheksan

DMSO – dimetilsulfoksid

PF₆ – heksafluorofosfat

im – imidazol

ind – indazol

p-cym – p-izopropil toluen

PTA - 1,3,5-triaza-7-fosfatriciklo[3.3.1.1]dekan

[9]aneS3 – 1,4,7-tritiaciklononan

azpy – 2-fenilazopiridin

KP418 - *trans*-[tetrahloridobis(1H-imidazol)rutenat(III)]

NAMI A - imidazolijum [*trans*-tetrahloro(dmsO)(imidazol)rutenat(III)]

KP1019 - indazolijum [*trans*-tetrahlorobis(1H-indazol)rutenat(III)]

NKP-1339 - natrijum *trans*-[tetrahloridobis(1H-indazol)rutenat(III)]

RAPTA C – [η^6 -cym)RuCl₂(PTA)]

GRP78 – glukoza regulisani protein

ER – endoplazmatični retikulum

UPR – odgovor na neuvijene proteine (*engl.* unfolded protein response)

MMP- matriksmetaloproteinaza

ROS – reaktivne kiseonične vrste

MAPK – mitogenima aktivirana protein kinaza

ERK – ekstracelularnim signalima regulisana kinaza

NADPH – redukovani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

SOD – superoksid dizmutaza

API – jonizacija na atmosferskom pritisku

Q – kvadrupol

QIT – kvadrupol jonski trap

TOF – vreme preleta (*engl.* time of flight)

FT-ICR – Furijeova transformacija-jon ciklotron rezonancija

ICP OES – optička emisiona spektroskopija sa induktivno kuplovanom plazmom

Ditranol – 1,8,9-antracentriol

MTPP – *mezo*-tetrakis(pentafluorofenil)porfirin

DHB – 2,5-dihidroksibenzoeva kiselina

CHCA – α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina

1. Uvod

Antitumorski kompleksi na bazi platine su se pokazali efikasnim u tretmanu različitih vrsta tumora, a neki od njih su već više decenija u kliničkoj upotrebi [1]–[3]. Mehanizam dejstva platinskih kompleksa se prvenstveno zasniva na ometanju transkripcije, što je posledica vezivanja leka za DNK molekul [4], [5]. Međutim, niska selektivnost, visoka toksičnost i stečena rezistencija na ove lekove su podstakli razvoj novih hemoterapeutika na bazi metala. U tom kontekstu, kompleksi rutenijuma su privukli pažnju zbog obećavajućih osobina poput niske toksičnosti, povećane selektivnosti prema kancerskim ćelijama i izuzetnog antimetastatskog dejstva [6]–[9]. Iako vezivanje za DNK može doprineti efikasnosti kompleksa rutenijuma, najčešće se ne smatra njihovim primarnim mehanizmom dejstva. Uopšteno, antikancerska aktivnost se zasniva na sposobnosti kompleksa da uvede tumorske ćelije u apoptozu, proces programirane ćelijske smrti koji može biti indukovano interakcijama sa DNK i proteinima [10]. Iako tačni mehanizmi nisu u potpunosti rasvetljeni, indentifikovan je veći broj ciljnih proteina za vezivanje jedinjenja rutenijuma, a koji se smatraju ključnim faktorima odgovornim za njihovu efikasnost.

Pored uloge u antitumorskoj aktivnosti, proteini učestvuju u transportu i biodistribuciji lekova na bazi kompleksa prelaznih metala. Kako se ovi agensi u organizam unose intravenozno, proteini seruma su prvi molekuli sa kojima dolaze u susret. Humani serum albumin (HSA) je najzastupljeniji protein seruma sa dobro utvrđenom sposobnošću transporta različitih lekova i malih molekula [11]. Smatra se da transport antikancerskih agenasa posredstvom HSA doprinosi selektivnosti preko efekta povećane permeabilnosti i retencije (*engl.* enhanced permeability and retention, EPR) [12]. Ovaj efekat se javlja kao posledica defektne vaskulature tumorskog tkiva koja omogućava makromolekulima da prođu kroz razmake između endotelijalnih ćelija krvnih sudova, dok je njihovo uklanjanje iz tumora otežano usled neefikasne limfne drenaže. Transferin (Tf) sistemskom cirkulacijom prenosi gvožđe od mesta preuzimanja do ćelija i tkiva. Pored smanjenog vezivanja za DNK u poređenju sa platinskim kompleksima, sposobnost rutenijuma da imitira gvožđe pri vezivanju za Tf se smatra

faktorom koji doprinosi niskoj opštoj toksičnosti ovih kompleksa [13], [14]. Kako kancerske ćelije imaju povećanu potrebu za gvoždem, dostava kompleksa preko transferinskog ciklusa povećava njihovu selektivnost. Iz navedenih razloga, ispitivanje interakcija kompleksa rutenijuma sa HSA i Tf je od izuzetnog značaja u proceni pogodnosti novosintetisanih vrsta za upotrebu kao antikancerskih agenasa.

Različite biofizičke metode, poput rendgenske kristalografije [15]–[17], nuklearne magnetne rezonancije (NMR) [18], [19] i masene spektrometrije (MS) [20]–[22] se koriste za strukturnu karakterizaciju i određivanje mesta vezivanja kompleksa metala na proteinima. Meke jonizacione tehnike masene spektrometrije su sve češće u upotrebi zbog tačnosti, specifičnosti, brzine snimanja, niske potrošnje uzorka, kao i mogućnosti za simultanu analizu smeše proteina. Analiza elektrosprej jonizacijom (ESI) se smatra najpogodnijom za očuvanje interakcija između kompleksa metala i proteina, pa se najčešće i koristi za određivanje mesta vezivanja proteomskim „*bottom-up*“ pristupom [23]–[25]. Matriksom-pomognuta laserska desorpcija i jonizacija (MALDI) je ređe u upotrebi zbog većeg stepena fragmentacije u izvoru, nego što je to slučaj kod ESI MS [26]. Uprkos tome, prednost MALDI MS je nastajanje isključivo jednostruko naelektrisanih jonskih vrsta što značajno olakšava identifikaciju jona koji sadrže rutenijum, zbog njegove karakteristične izotopske raspodele. Nastajanje višestruko naelektrisanih jona peptida u ESI MS izvoru otežava identifikaciju zbog sličnosti u izotopskoj raspodeli između jona peptida koji na sebi imaju i onih koji nemaju vezan kompleks rutenijuma, što ručnu analizu podataka čini dugotrajnom i sklonom greškama.

Do sada, kompleksi rutenijuma(III): NAMI A [27], KP1909 [28] i NKP-1339 [29] su ušli u klinička ispitivanja. Pretpostavka da do njihove aktivacije dolazi redukcijom u tumorskom tkivu je fokus istraživanja stavila na komplekse Ru(II) koji pokazuju veću reaktivnost prema biološkim molekulima. Među njima, posebnu pažnju su privukli Ru(II) arenški kompleksi kojima pripada i RAPTA C [30], kompleks koji je zbog izuzetnog antimetastatskog dejstva odobren za preklinička ispitivanja. Drugoj, značajnoj grupi ovih jedinjenja pripadaju Ru(II) polipiridinski kompleksi. Među njima, facijalni izomeri su mnogo više proučavani od njihovih izomera sa meridijalnom geometrijom. Terpiridinska jedinjenja meridionalne geometrije su pokazala obećavajuću antitumorsku aktivnost, ali su detaljnija istraživanja gotovo napuštena zbog slabe

rastvorljivosti terpiridinskih derivata u vodi [31]–[35]. Istraživanja ovih kompleksa su se pretežno bazirala na ispitivanju citotoksičnosti i vezivanju za DNK, dok su interakcije sa proteinima zanemarene. S tim u vidu, sintetisani su terpiridinski kompleksi opšte formule $mer-[Ru(Cl-tpy)(N-N)Cl]Cl$ (Cl-tpy - 4'-hloro-2,2':6',2''-terpiridin; N-N - 1,2-diaminoetan (en), 1,2-diaminocikloheksan (dach) ili 2,2'-bipiridin (bipy)) koji pokazuju visoku rastvorljivost u vodi, kao i sposobnost vezivanja za derivate guanina [36]. Ovi kompleksi su korišćeni kao model za ispitivanje vezivanja za proteine u ovoj doktorskoj disertaciji.

Opšti cilj ove disertacije je ispitivanje vezivanja, kao i strukturna karakterizacija proizvoda interakcije između tri navedena $mer-Ru(II)$ kompleksa i transportnih proteina seruma, HSA i Tf. U okviru toga, postavljeni su pojedinačni ciljevi:

- Ispitati citotoksičnost odabranih $Ru(II)$ kompleksa na tumorskim ćelijskim linijama.
- Odrediti konstante i stehiometriju vezivanja za odabrane proteine seruma, kao i uticaj vezivanja kompleksa na sekundarnu i tercijarnu strukturu proteina.
- Odrediti prirodu interakcije i mesta za vezivanje kompleksa na transferinu „*bottom-up*“ proteomskim pristupom uz pomoć HPLC/MALDI MS metode.
- Odrediti prirodu interakcije i mesta za vezivanje kompleksa na humanom serum albuminu „*bottom-up*“ proteomskim pristupom uz pomoć nano-LC/nano-ESI MS metode.
- Razviti i optimizovati metodu negativne jonizacije peptida upotrebom nano-ESI MS, sa svrhom njenog korišćenja kao komplementarne ili alternativne MS metode za identifikaciju mesta za vezivanje kompleksa metala na proteinima/peptidima. Testirati metodu za ispitivanje vezivanja kompleksa za HSA.
- Racionalizovati eksperimentalno dobijene podatke kroz teorijsko predviđanje mesta i energija vezivanja, kao i definisanje oblika (hloro, akva ili hidrokso) u kom se kompleksi vezuju za HSA.

2. Opšti deo

2.1 Antitumorski kompleksi rutenijuma

Rutenijum je otkriven 1844. godine od strane Karla Karloviča Klauza (Karl Karlovitch Klaus), a ime je dobio po „Ruteniji“, *lat.* nazivu za Rusiju [37]. Ovaj hemijski element pripada platinskoj (VIII) grupi prelaznih metala, ima atomski broj 44 i atomsku masu 101.07. Od ukupno sedam izotopa rutenijuma (^{96}Ru - Ru^{104}), ^{102}Ru je najzastupljeniji (31.6%). U fiziološkim uslovima, rutenijum može postojati u tri oksidaciona stanja (II-IV), od kojih je oksidaciono stanje III najzastupljenije. Do promene oksidacionog stanja Ru(III) može doći u prisustvu bioloških oksidanata i reduktanata [38].

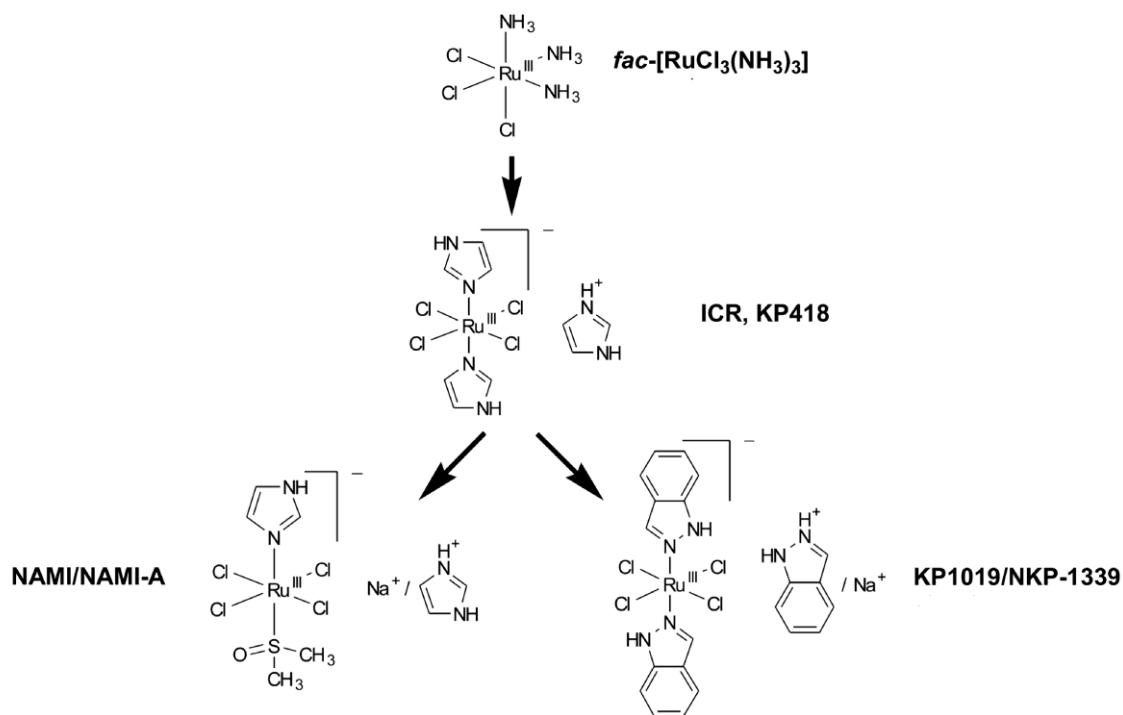
Otkriće inhibitornog dejstva kompleksa *fac*- $[\text{RuCl}_3(\text{NH}_3)_3]$ na deobu ćelija *Escherihia coli* je pobudilo interesovanje za upotrebu rutenijumovih kompleksa kao potencijalnih antikancerskih agenasa [39]. Kako je rastvorljivost ovih kompleksa u vodi bila problem za eventualna klinička ispitivanja ovog i sličnih jedinjenja, istraživanja su usmerena na sintezu novih, pretežno jonskih kompleksa sa povećanim brojem halidnih liganada. Nasuprot platinskim kompleksima koji imaju kvadratno-planarnu geometriju, kompleksi rutenijuma su heksa koordinisani i formiraju oktaedarnu geometriju [40]. Sposobnost rutenijuma da koordiniše šest liganada je omogućila sintezu raznovrsnih jedinjenja sa različitim funkcionalizovanim grupama. Pored toga, spomenuta mogućnost promene oksidacionog stanja Ru(III) kompleksa u zavisnosti od uslova sredine je, najpre od strane Klarka (Michael Clarke) i saradnika, predložena kao strategija za „aktivaciju redukcijom“ koja podrazumeva prelazak inertnijeg Ru(III) kompleksa u reaktivniji Ru(II) oblik [41]. Naime, nakon redukcije Ru(III), π -donorski ligandi više ne ostaju tako jako vezani za metalni centar [42]. Redukujuća sredina solidnih tumora je, u poređenju sa zdravim tkivima, delimično uzrokovana relativno visokim koncentracijama glutationa (0,5-10 mM) i askorbinske kiseline (≤ 10 mM). Zapravo, redukcija Ru(III) do Ru(II) dejstvom navedenih bioreduktanta je podržana velikim brojem naučnih studija [43]–[46]. Važno je istaći da, i glutation i askorbinska kiselina poseduju kompleksirajuće osobine. Stoga se, zajedno sa još jačim ćelijskim kompleksirajućim agensom, citratom, mogu takmičiti sa proteinima za koordinaciju za

aktivno Ru mesto na kompleksu [47]. Takođe, sniženje pH u tumorskom tkivu do kog dolazi usled niske koncentracije kiseonika i posledične prekomerne produkcije laktata, može biti faktor koji favorizuje redukciju Ru(III) kompleksa do Ru(II) oblika [42]. Do hipoksije dolazi zbog neusklađenog razvoja krvnih sudova sa rastom tumorskog tkiva, što za rezultat ima smanjenu dostupnost O₂ tumorskim ćelijama [48]. Smatra se da ove razlike u metabolizmu između zdravih i tumorskih ćelija mogu doprineti selektivnoj aktivaciji antikancerskih agenasa na bazi rutenijuma [42], [44].

Slično kao i platinski kompleksi, neki kompleksi rutenijuma pokazuju sporu kinetiku ligandne izmene koja se, u slučaju aktivacije, kreće na skali od nekoliko minuta do nekoliko dana [49]. Sposobnost ligandne izmene zavisi od prirode liganada i ukupnog naelektrisanja kompleksa, i od ključnog je značaja za biološku aktivnost [50]. U tom kontekstu, halidni ligandi često imaju svojstvo izmenjivog liganada. Hidroliza halidnih liganada sa različitih mono- i bi-funkcionalnih kompleksa metala, koja je praćena aktivacijom kompleksa, se smatra putem aktivacije za vezivanje kompleksa za biološke molekule. Dobro utvrđeni mehanizam vezivanja cisplatine za DNK uključuje aktivaciju leka hidrolizom hloridnih liganada i koordinacijom platine za nukleotide. U procesu hidrolize, hloridni ligandi bivaju zamenjeni molekulima vode, formirajući aktivne akva oblike koji su reaktivniji prema biološkim nukleofilima u poređenju sa njihovim hloro analogima. Ovakav vezivni mehanizam je pripisan i mnogim drugim platinskim, kao i nekim organometalnim jedinjenjima rutenijuma [51]. Pokazano je da brzina aktivacije u velikoj meri zavisi od prirode helatnih liganada i da je u direktnoj vezi sa citotoksičnošću leka. Rezultati dobijeni na monofunkcionalnim „*piano-stool*“ Ru(II) arenkim kompleksima ukazuju na to da samo kompleksi koji podležu brzom do umereno sporom hidrolizi pokazuju citotoksično dejstvo [52]. Kako je koncentracija hlorida u krvi relativno visoka (104 mM), kompleksi se predominantno nalaze u manje reaktivnom, hloro obliku. Koncentracija hlorida opada u citoplazmi (23 mM) i nukleusu (4 mM), što pogoduje konverziji kompleksa u reaktivnije akva oblike. Dominantno prisustvo manje reaktivnih hloro oblika u krvotoku i ekstracelularnom okruženju se smatra dobrim za redukciju sporedne reaktivnosti pre ulaska kompleksa u ćeliju. Iako su i hloro i akva vrste uvek prisutne, njihov odnos zavisi od konstante ravnoteže kao i od lokacije kompleksa nakon unosa u organizam (tj. od eksperimentalnih uslova).

2.1.1 Kompleksi rutenijuma (III)

Nakon *fac*-[RuCl₃(NH₃)₃] kompleksa, prvi rezultati koji su bili obećavajući po mogućnost primene kompleksa rutenijuma u antikancerskoj terapiji su dobijeni sintezom *trans*-[tetrahloridobis(1H-imidazol)rutenat(III)] (KP418), koji je pokazao terapijsku aktivnost u lečenju mišije P388 leukemije i B16 melanoma [53]. Struktura ovog kompleksa je poslužila kao osnova za sintezu narednih generacija Ru(III) jedinjenja koja su ušla u klinička ispitivanja, i to: imidazolijum [trans-tetrahloro(DMSO)(imidazol)rutenat(III)] (NAMI-A) [54], [55], indazolijum [trans-tetrahlorobis(1H-indazol)rutenat(III)] (KP1019) [28], [56], i natrijum trans-[tetrahloridobis(1H-indazol)rutenat(III)] (NKP-1339) [8] koji je u vodi rastvorna so KP109 (Slika 1).



Slika 1. Strukture antitumorskih kompleksa rutenijuma (III). Preuzeto i modifikovano iz [8].

Uprkos strukturnim i hemijskim sličnostima, ovi kompleksi ispoljavaju različite biološke aktivnosti [10].

2.1.1.1 KP1019/NKP-1339

Kompleks KP1019 je sintetisan 1989. godine od strane Keplera i saradnika [57]. Privukao je pažnju zbog utvrđene aktivnosti prema mišijem modelu kancera debelog creva. U ovoj studiji je pokazano da je tretman KP1019 kompleksom veoma efikasan i da redukuje veličinu tumora i do 95%, bez smrtnosti i bez značajnog gubitka telesne težine (6%) životinje. Pored toga, pokazano je i da je efikasniji od 5-fluorouracila, standardnog agensa koji se koristi za tretiranje kancera debelog creva. Stoga je KP1019 izabran za dalja, (pre)klinička ispitivanja.

Natrijumova so KP1019, NKP1339, je inicijalno pripremljena kao prekursor u formulaciji KP1019 za klinička testiranja [58]. Zbog povećane rastvorljivosti u vodi koja je omogućila unošenje veće doze leka pacijentima, izabran je za vodećeg kandidata u daljem kliničkom razvoju. Izmereni redoks potencijal NKP1339 u fosfatnom puferu pH 7 iznosi +0,03 V vs. SVE (standardna vodonična elektroda). Budući da se opseg fizioloških redoks potencijala kreće od -0,4 V za NADPH (koji je najjači fiziološki reduktant) do +0,8 V za O₂ (najjači fiziološki oksidans), na osnovu potencijala NKP1339 se može pretpostaviti da do aktivacije ovog kompleksa dolazi redukcijom u biološkom okruženju (u ćelijama, redoks potencijal O₂ je obično samo ~ +0,14 V) [8]. Važno je naglasiti da se rutenijumovi kompleksi ne redukuju dok su vezani za serumske proteine [43], [59], te da do aktivacije redukcijom dolazi tek nakon oslobađanja od proteina unutar kancerskih ćelija. Takođe, redukcija Ru i povećana aktivnost KP1019 je potvrđena u prisustvu redukovanog glutaciona (GSH) i askorbinske kiseline [44], [45].

2.1.1.1.1 Mehanizmi antitumorske aktivnosti KP1019/NKP1339

Iako je pokazano vezivanje rutenijuma za DNK u nukleusu kancerskih ćelija koje su tretirane KP1019 kompleksom, pojavili su se dokazi da antikancerska aktivnost KP1019 nije primarno bazirana na direktnim oštećenjima DNK molekula [41], [56]. Ispitivanje vezivanja KP1019 [56], [60] i NKP1339 [56] za ćelijske proteine u citosolu kancerskih ćelija je pokazalo da se rutenijum može detektovati pretežno u dvema frakcijama proteina različite veličine, >700 kDa koja odgovara proteinskim agregatima/kompleksima i frakciji koja odgovara proteinima male molekulske mase,

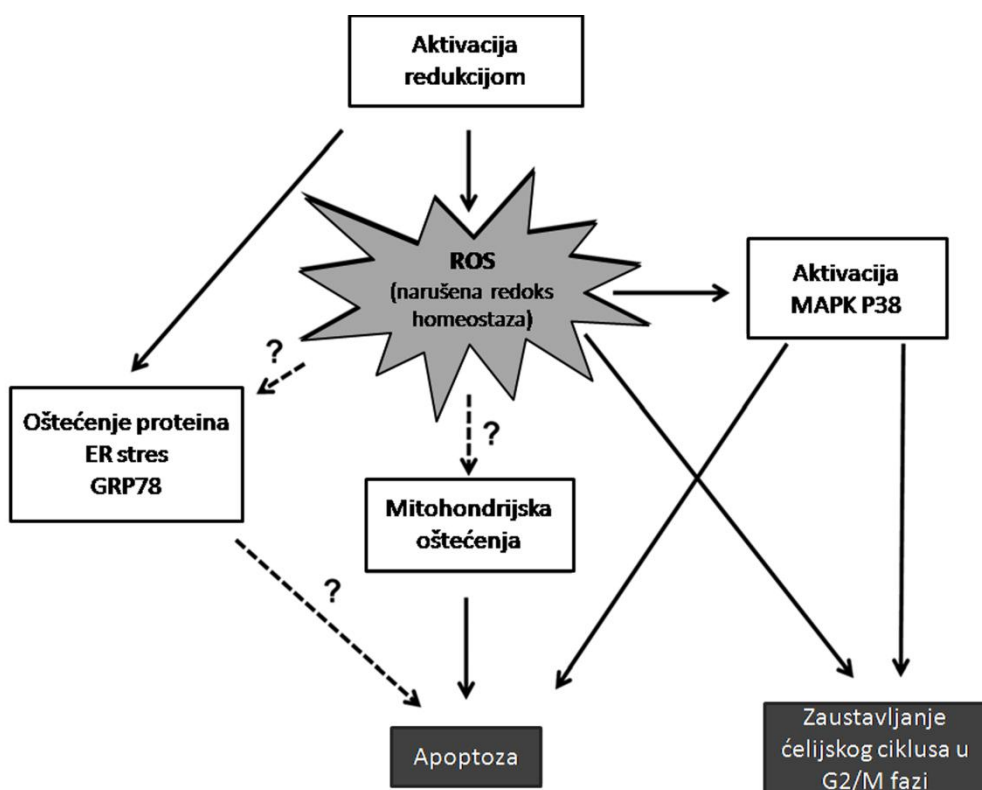
<40 kDa. Ovakav odabir intracelularnih proteinskih vezivnih partnera KP1019/NKP1339 se u velikoj meri razlikuje od rezultata dobijenih za cisplatinu [8].

Jedna od potencijalnih citosolnih meta NKP1339 kompleksa je protein regulisan glukozom (GRP78), molekulske mase 78 kDa [61]. Ovaj šaperon endoplazmatskog retikuluma (ER) predstavlja ključni faktor odgovora na pogrešno uvijene proteine (*engl.* unfolded protein response, UPR), do čije aktivacije dolazi po akumulaciji neuvijenih ili pogrešno uvijenih proteina u lumenu ER [62]. Vezivanje NKP1339 za GRP78 sugerira da postoji interakcija ovog kompleksa sa ćelijskom mašinerijom za održavanje pravilne konformacije proteina. U odnosu na zdrave ćelije, kancerske ćelije imaju izmenjene različite procese u ćeliji koji im omogućavaju visok stepen proliferacije, povećan metabolizam glukoze, kao i otpornost na stres i inicijaciju ćelijske smrti. Jedan od načina na koji tumorske ćelije postižu otpornost na stres uključuje regulaciju ključnih faktora UPR-a, kao što su šaperoni i UPR ciljni geni. Nasuprot zdravim ćelijama koje nisu izložene ER stresu i kod kojih je UPR u neaktivnom stanju, kancerske ćelije zavise od očuvanja kapaciteta ER za uvijanje proteina. Stoga UPR predstavlja obećavajuću strategiju za lečenje kancera.

Pored direktnih interakcija sa biomolekulima, smatra se da redoks aktivnost Ru(III) jedinjenja interferira sa ćelijskom redoks ravnotežom preko direktnih i indirektnih mehanizama [7]. Kompleksi Ru(III) mogu učestvovati u Fentonovim reakcijama koje vode ka genezi reaktivnih kiseoničnih vrsta (*engl.* reactive oxygen species, ROS). Pored toga, vezivanje za GSH smanjuje nivo slobodnog GSH u ćelijama, što ih čini podložnijim endogenom i egzogenom oksidacionom stresu. U skladu sa tim, formiranje intracelularnih ROS je dokazano kod ćelija kancera debelog creva, ubrzo nakon tretmana KP1019 kompleksom [63].

Kompleks NKP1339 je, kao i NAMI A, identifikovan kao direktni "hvatač" azot oksida, NO \cdot [64]. Pokazano je da reakcija sa NO \cdot dovodi do redukcije Ru(III) i formiranja [Ru(II)-NO $^+$] vrsta. Kako je NO \cdot dobro poznati signalni glasnik u različitim fiziološkim procesima, naročito u vaskularnoj homeostazi, neurotransmisiji, kao i u inflamatornom/imunom odgovoru i progresiji tumora, može se pretpostaviti da KP1019 i NKP1339 imaju efekat na migraciju endotelijalnih ćelija i angiogenezu [65].

Kao posledica opisanog redoks stresa, tretman KP1019 i NKP1339 kompleksima indukuje apoptozu kancerskih ćelija preko mitohondrijskog puta [41]. Pokazano je i da tretman NKP1339 kompleksom, slično kao i NAMI A, dovodi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa u G2/M fazi [66]. Nađeno je i da je zaustavljanje ćelijskog ciklusa praćeno regulacijom MAPK (p38 mitogen-aktivirana protein kinaza) puta u odgovoru na stres. Ilustrativan prikaz opisanih mehanizama koji leže u osnovi antitumorskog dejstva KP1019 i NKP1339 kompleksa je prikazan na Slici 2.

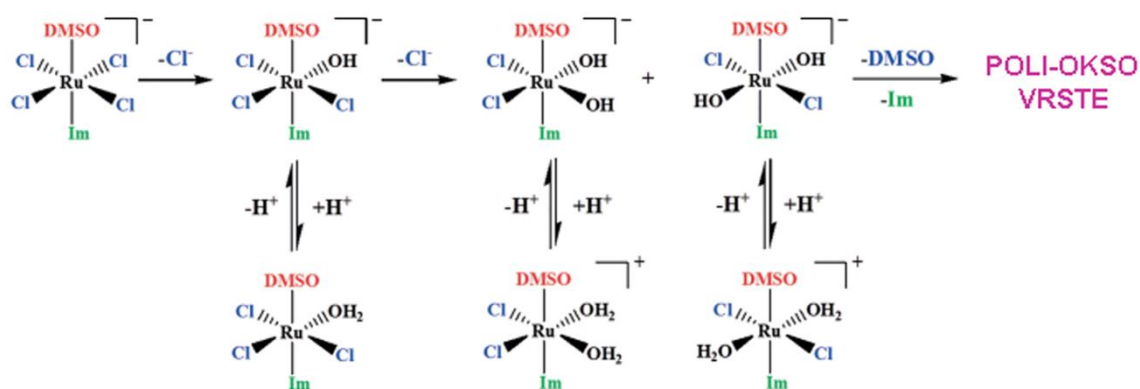


Slika 2. Mehanizmi odgovorni za antikancersku aktivnost KP1019 i NKP1339 kompleksa. Preuzeto i modificovano iz [8].

2.1.1.2 NAMI A

Rutenijumov kompleks NAMI A su sintetisali Alessio, Sava i saradnici, pioniri u proučavanju kompleksa prelaznih metala ranih devedesetih godina prošlog veka [54]. Pokazano je da NAMI A ispoljava izuzetnu i selektivnu aktivnost prema kancerskim metastazama pretežno solidnih tumora, ali da nije efikasan u redukciji primarnih kancera [27]. U ovom kompleksu, Ru(III) atom je koordinisan sa šest liganada, i to:

jedan molekul imidazola, jedan molekul dimetil sulfoksida (DMSO) i četiri hloridna liganda. Svi pobrojani ligandi mogu biti zamenjeni molekulima vode ili hidroksidnim jonima, što za rezultat daje smešu akva vrsta koje su odgovorne za antimetastatsku aktivnost [67]. *In vitro* eksperimentima je utvrđeno da NAMI A lako podleže hidrolizi pri fiziološkim uslovima. Prema mehanizmu hidrolize prikazanom na Slici 3, hloridni ligandi se najbrže izmenjuju vodom i/ili hidroksidnim jonima [68]. Ovaj proces je praćen progresivnim oslobađanjem liganda DMSO, što vodi formiranju do sada neokarakterisanih tamno zelenih poliokso vrsta [69].



Slika 3. Predloženi mehanizam hidrolize NAMI A. Preuzeto i modifikovano iz [68].

Sam proces hidrolize kompleksa u velikoj meri zavisi od pH i temperature. Proces akvacije je gotovo u potpunosti suprimiran na sobnoj temperaturi i niskom pH (3-5), pri čemu dolazi do slabe disocijacije DMSO ($2\% \text{ h}^{-1}$). Ovo su uslovi odabrani za administraciju NAMI A pacijentima sporom infuzijom. Zbog prisustva DMSO koji je π -akceptor srednje jačine, NAMI A ima relativno visok redukcionni potencijal (0,235 V vs. SVE) [70], [71]. Većina vrsta koje nastaju tokom akvacije kompleksa (osim onih bez DMSO) ima veći redoks potencijal od primarnog jedinjenja, te su podložnija redukciji [72].

2.1.1.2.1 Mehanizam dejstva NAMI A

Manjak citotoksičnosti naspram ćelijskih linija solidnih tumora je najverovatnije posledica činjenice da NAMI A podleže brzim ekstracelularnim transformacijama pri čemu njegovi metaboliti predominantno interaguju sa ćelijskim zidom i ne bivaju značajno internalizovani od strane ćelija [73]. Funkcionalne *in vitro* studije su dokazale

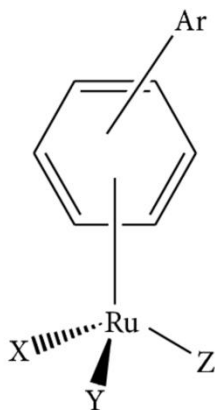
kapacitet NAMI A da značajno utiče na tumorske ćelije koje imaju sposobnost metastaziranja, kao i njegovu sposobnost da deluje na mikrookolinu tumora, narušavajući recipročne interakcije između kancerskih ćelija i komponenata tumorskog miljea. Ovaj kompleks inhibira glavne korake u procesu širenja metastaza, kao što su odvajanje ćelija od primarnog tumora, sekrecija proteolitičkih enzima, migracija i invazija, re-adhezija na mestima sekundarnog rasta. Ovakvi inhibicioni efekti su proporcionalni invazivnom stepenu ćelijske linije i nisu povezani sa citotoksičnošću [27]. Šta više, mehanizam metastatske kontrole bi se mogao pripisati kooperaciji između anti-angiogenih i anti-invazivnih osobina NAMI A na tumorske ćelije i krvne sudove. Kontrola angiogeneze se najverovatnije zasniva na vezivanju NO· produkovanog od strane endotelijalnih ćelija [64]. Na molekulskom nivou, NAMI A blokira MEK/ERK signalni put, suprimirajući ekspresiju regulatornog *c-myc* gena i proliferaciju endotelijalnih ćelija [74]. Takođe, NAMI A redukuje oslobađanje matriks metaloproteinaza MMP-2 i MMP-9 i spontanu invaziju kancerskih ćelija u MatrigeluTM [27], [75]. Kod tretiranih miševa je primećeno da dolazi do stimulacije fibroblasta na produkciju kolagena koji se nagomilava oko krvnih sudova i tumorske kapsule, povećavajući debljinu vezivnog tkiva primarnog tumora [76]. Kompleks NAMI A se efikasno vezuje za kolagen čime se prolongira njegova eliminacija iz organa bogatih kolagenom [75]. Vezani oblik NAMI A zadržava svoju aktivnost u pogledu sprečavanja invazivnosti tumorskih ćelija. Pored toga, NAMI A stimuliše tumor-infiltrirajuće limfocite [77] i inhibira aktivaciju i/ili ekspresiju integrina. Posledično dolazi do remodelovanja aktinskog citoskeleta i promena u ćelijskoj morfologiji, čime se smanjuje adhezivna moć tumorskih ćelija [78].

2.1.2 Kompleksi rutenijuma(II)

Pretpostavka da do aktivacije Ru(III) kompleksa dolazi po redukciji metalnog centra je fokus istraživanja stavila na ispitivanje antikancerskog potencijala Ru(II) kompleksa. Objavljene su brojne studije koje se bave proučavanjem osobina i aktivnosti ovih jedinjenja, a akcenat je stavljen na dve glavne klase: organometalne arenске Ru(II) komplekse i Ru(II) polipiridinske komplekse.

2.1.2.1 Organometalni arenski Ru(II) kompleksi

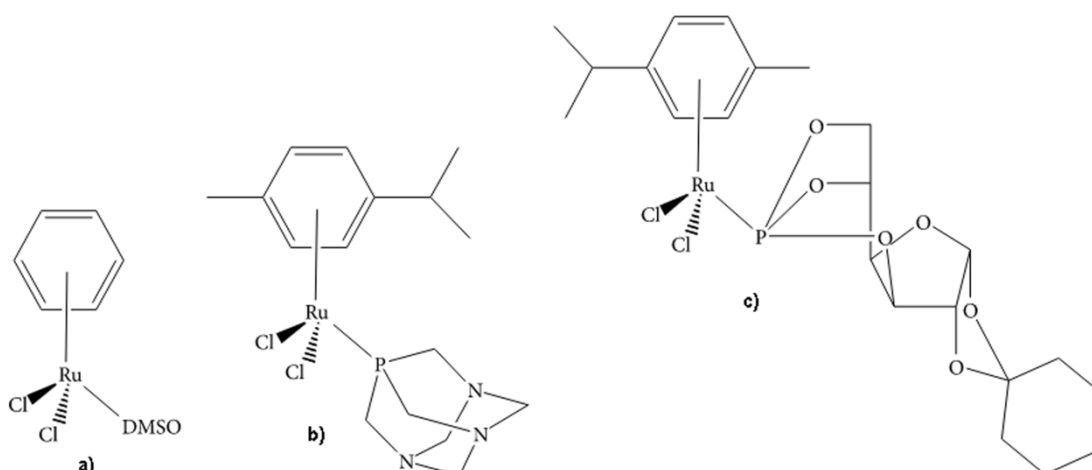
Razvoj tzv. “*half sandwich*” Ru(II) arenskih jedinjenja tipa $[(\eta^6\text{-aren})\text{Ru}(\text{YZ})(\text{X})]$, gde je YZ bidentatni helatni ligand, a X odlazeća grupa predstavlja značajan pomak u razvoju strukturno različitih rutenijumovih jedinjenja sa potencijalnim antikancerskim osobinama [79]. Jedinjenja su u literaturi poznata i kao “*piano-stool*”, zato što im struktura podseća na stolicu klavira (Slika 4). Popularna su zbog širokih mogućnosti derivatizacije arenskog dela koji stabilizuje Ru u +2 oksidacionom stanju, dok tri preostala koordinaciona mesta X, Y i Z mogu biti funkcionalizovana različitim koordinacionim grupama različitih monodentatnih ili bidentatnih liganada [42], [79], [80]. Stoga je jasno da arenski kompleksi rutenijuma dozvoljavaju uvođenje brojnih biološki aktivnih grupa.



Slika 4. Opšta struktura Ru(II) kompleksa sa “*piano stool*” konfiguracijom. Preuzeto iz [10].

Jedan od kompleksa iz ove grupe koji su među prvima sintetisani je $[\text{Ru}(\eta^6\text{-benzen})(\text{DMSO})\text{Cl}_2]$, prikazan na Slici 5a. Ispitivanjem antitumorskog potencijala ovog kompleksa je otkriveno da inhibira topoizomerazu II, koja je važna za pravilnu strukturnu organizaciju hromozoma tokom ćelijske deobe [81].

Sličan kompleks, RAPTA C ($[\text{Ru}(\eta^6\text{-cimen})(\text{PTA})\text{Cl}_2]$) koji umesto DMSO liganda ima PTA (1,3,5-triaza-7-fosfatriciklo[3.3.1.1]dekan), pokazuje značajno veću rastvorljivost u vodi. Ovaj kompleks, prikazan na Slici 5b, je pokazao obećavajuće antimetastatsko dejstvo, visoku selektivnost i generalno nisku toksičnost što ga čini primamljivim za ispitivanje kao potencijalnog terapijskog agensa [82].



Slika 5. Strukturne formule Ru(II) arenskih kompleksa $[\text{Ru}(\eta^6\text{-benzen})(\text{DMSO})\text{Cl}_2]$ (a), RAPTA C (b) i KP1558 (c). Preuzeto i modifikovano iz [10].

Zamenom PTA sa 3,5,6-biciklofosfit- α -D-glukofuranozid ligandom su dobijena visoko aktivna jedinjenja KP1558 (Slika 5c) i njegovi analozi [83]. Lipofilnost ovih jedinjenja se može menjati prilagođavanjem strukture/dužine ugljenohidratnog dela, sa svrhom dobijanja kompleksa visoke rastvorljivosti koji su pogodni za intravenoznu administraciju ili hidrofobnijih vrsta koja olakšavaju preuzimanje kompleksa od strane ćelija. Hidroliza, afinitet vezivanja za proteine i azotne baze, kao i *in vitro* antineoplastična aktivnost kompleksa su ispitani na humanim SW480 (adenokarcinom debelog creva), CH1 (kancer jajnika), cisplatina-rezistentnim A2780 (karcinom jajnika), A549 (karcinom pluća), Me300 (melanom), LNZ308 (glioblastom), i HCEC (endotelijalnim) ćelijskim linijama [83], [84]. U vodi najpre dolazi do hidrolize hloridnog liganda koja dovodi do aktivacije i hidrolize fosfitnog liganda. Kompleks koji nastaje nakon hidrolize Ru-Cl i P-O veza liganda pokazuje afinitet za vezivanje albumina i transferina, a pokazano je i da gradi 1:1 adukt sa 9-etilguaninom. Kompleksi su pokazali izuzetno visoku aktivnost u svim ispitivanim ćelijskim linijama, a nađeno je i da njihova citotoksičnost pozitivno korelira sa prisustvom alkil dela na fosfitnom ligandu, što ih čini lipofilnijim.

Kompleksi opšte formule $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimen})\text{Cl}_2(\text{L})]$ (L= modulatorni ligandi na bazi antracena) su ispitivani u svrhu prevazilaženja rezistencije na veći broj postojećih lekova [85]. Neki od njih su pokazali opšte citotoksično dejstvo prema većem broju

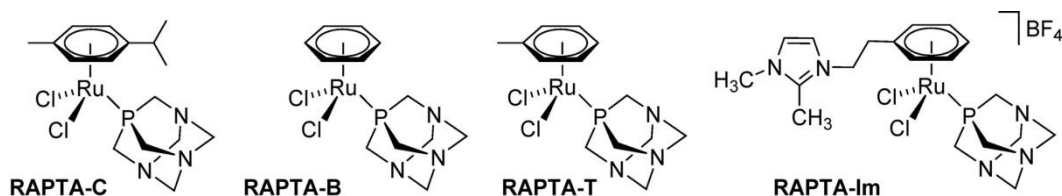
ćelijskih linija, dok su drugi pokazali selektivnost prema određenoj kancerskoj ćelijskoj liniji.

Pored navedenih, mnogobrojne strukturne varijacije arenkih kompleksa rutenijuma su detaljno opisane u literaturi [10]. Zbog istaknutog dejstva i ulaska u klinička istraživanja, dalji pregled će se bazirati na RAPTA tipu kompleksa.

2.1.2.1.1 RAPTA kompleksi

Monodentatni PTA ligand se smatra prepoznatljivim strukturnim obeležjem RAPTA kompleksa, koje odvaja ovu familiju od drugih rutenijum(II) arenkih jedinjenja. U zavisnosti od prirode ko-liganada, PTA može povećati rastvorljivost RAPTA kompleksa u vodi. Kompleks RAPTA C [30], koji je među prvima sintetisan, je privukao pažnju zbog svoje sposobnosti da ošteti DNK molekul u zavisnosti od pH sredine. Naime, oštećenja DNK su detektovana na $\text{pH} \leq 7$, ali ne i na fiziološkom pH (~7,4), što ukazuje na potencijal ovog kompleksa da selektivno ošteti DNK u obolelim hipoksičnim ćelijama.

Potvrđeno je da RAPTA C podleže brzom hidrolizi u vodenom rastvoru 4 mM NaCl [82], dok je u 100 mM NaCl rastvoru hidroliza suprimirana. Pri niskim koncentracijama hlorida, dominantne vrste RAPTA C i RAPTA B ($[\text{Ru}(\eta^6\text{-benzen})\text{Cl}_2(\text{PTA})]$) prikazanim na Slici 6, su monoakvatisani oblici $[\text{Ru}(\eta^6\text{-aren})\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})(\text{PTA})]^+$, uz nešto manje zastupljene $[\text{Ru}(\eta^6\text{-aren})(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})(\text{PTA})]^+$ i $[\text{Ru}(\eta^6\text{-aren})\text{Cl}_2(\text{PTA})]$ oblike koji su takođe prisutni u rastvoru [86]. Stoga se pretpostavlja da se *in vivo* RAPTA jedinjenja, kao i cisplatina, aktiviraju prelaskom u reaktivnije akva oblike u okruženju sa niskom koncentracijom hlorida, kakva se nalazi unutar ćelija. Kako se kroz krvnu plazmu prenosi u manje aktivnom hlorido obliku, RAPTA C se može smatrati prolekom.



Slika 6. Strukturne formule RAPTA C, B, T i Im kompleksa. Preuzeto i modifikovano iz [87].

U *in vitro* ispitivanjima antikancerske aktivnosti RAPTA jedinjenja je pokazano da RAPTA T ($[\text{Ru}(\eta^6\text{-toluen})\text{Cl}_2(\text{PTA})]$) i RAPTA Im ($[\text{Ru}(\eta^6\text{-1,2-dimetil-3-(4 metilfenetil)-1H-3\lambda 4\text{-imidazol})\text{Cl}_2(\text{PTA})][\text{BF}_4]$), koji su takođe prikazani na Slici 6, pokazuju dobru selektivnost prema TS/A ćelijskoj liniji adenokarcinoma, u poređenju sa netumorogenom HBL-100 epitelijalnom ćelijskom linijom (IC_{50} 74 i 66 μM vs. > 300 μM , respektivno) [82]. *In vivo* studija na miševima obolelim od karcinoma dojke je pokazala da RAPTA B i RAPTA C ne pokazuju aktivnost naspram primarnih tumora, ali da su efikasni u redukovanju metastaza poreklom od primarnog tumora [87]. Ovi obećavajući rezultati su ukazali na potencijal za upotrebu RAPTA jedinjenja kao antimetastatskih agenasa.

2.1.2.1.1 Mehanizam dejstva RAPTA kompleksa

Kako je RAPTA T pokazao najveću selektivnost u pogledu citotoksičnosti prema kancerskim ćelijskim linijama (u odnosu na zdrave ćelije), urađena je detaljna evaluacija njegove antimetastatske aktivnosti u seriji *in vitro* i *in vivo* eksperimenata. Ne-kancerogene HBL-100, ne-invazivne MCF-7 (humani kancer dojke) i visoko invazivne MDA-MB-231 (kancer dojke) ćelijske linije su korišćene u *in vitro* eksperimentima koji su obuhvatili simulaciju metastatske progresije i to odvajanja, pokretljivosti, invazije i ćelijske adhezivnosti [88]. U poređenju sa kontrolom, MDA-MB-231 ćelijska linija je po tretmanu RAPTA T kompleksom postala rezistentnija na odvajanje od fibronektin i kolagen IV supstrata. Takođe, primećena je i smanjena adhezivnost i redukovana sposobnost migracije MDA-MB-231 ćelija. Takav efekat nije primećen kod HBL-100 i MCF-7 ćelijskih linija [88]. Slični rezultati koji pokazuju antimetastatsku aktivnost RAPTA T, uz zanemarljivu redukciju primarnog tumora, su dobijeni i *in vivo* pri tretmanu miševa obolelih od karcinoma dojke [87].

Kompleks RAPTA T ispoljava određenu selektivnost prema invazivnim kancerskim ćelijama i metastatskim tumorima što je, makar delimično, posledica dejstva kompleksa na površinske molekule tumorskih ćelija. Takođe, smatra se da zbog interakcija kompleksa sa citoskeletom ćelije postaju rigidne, što za posledicu ima smanjenje njihove adhezivne sposobnosti.

Prekliničko ispitivanje dejstva RAPTA C na modelu humanog A2780 kancera jajnika je pokazalo da RAPTA C inhibira rast tumora za oko 75% pri dozi od $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ po danu, tokom pet dana [89]. Na isečcima tkiva tretiranog tumora su se mogle uočiti velike oblasti neproliferišućih tumorskih ćelija i značajno redukovana gustina mikro krvnih sudova, u poređenju sa dobro vaskularizovanim tumorskim tkivom kontrole. Na mišijem modelu LS174T kolorektalnog adenokarcinoma, tretman kompleksom RAPTA C pri dozi od 100 mg kg^{-1} po danu, tokom jedanaest dana, je inhibirao rast tumora za oko 50% u poređenju sa kontrolom [89]. Inhibicija rasta tumora nije primećena pri dozama od 10 i 40 mg kg^{-1} . Analiza tretiranog tumorskog tkiva je pokazala jaku anti-angiogenu aktivnost RAPTA C, karakterisanu značajnim smanjenjem gustine mikro krvnih sudova. Ovi rezultati su konzistentni sa drugim studijama koje opisuju anti-angiogenu aktivnost RAPTA C i RAPTA T upotrebom različitih ćelijskih eseja [90]. Toksičnost nije povezana sa tretmanom mišijeg modela kompleksom RAPTA C, a ispitivanje biodistribucije rutenijuma 2 h nakon tretmana je potvrdilo brzu renalnu ekskreciju metala bez značajne akumulacije u vitalnim organima. Ovi rezultati pokazuju da, uz odgovarajuću dozu, RAPTA C može biti veoma efikasan u redukciji primarnih tumora, efektom koji se delimično objašnjava anti-angiogenim osobinama kompleksa. Najefikasnije dejstvo RAPTA C *in vivo* je potvrđeno u kombinaciji sa drugim lekovima kao što su inhibitori receptora za endotelijalni faktor rasta [87].

Pored interakcija sa komponentama ekstracelularnog matriksa, poznato je da se RAPTA C vezuje za ćelijske proteine i histone nukleozoma, za razliku od njegovog strukturnog analoga RAED C ($[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-cimen})(\text{en})\text{Cl}]\text{PF}_6$) koji se u većoj meri vezuje za DNK [91]. Pokazano je da veći udeo RAED C oformi adukte sa DNK (6,4%) nego što je to slučaj sa cisplatinom (4,1%). Takođe, RAED C i kompleksi platine se vezuju za različita mesta na DNK, pri čemu RAED C ispoljava veću selektivnost. Naime, za razliku od platinskih lekova koji neselektivno formiraju adukte sa dostupnim guaninskim bazama, RAED C se vezuje samo za najisturenije regione unutar jezgra

nukleozoma. Za kancerske ćelije su karakteristične brojne strukturne i hemijske abnormalnosti hromatina koje uključuju razlike u kompaktnosti, organizaciji nukleozoma, metilaciji DNK, varijacijama histona i njihovih post-translacionih modifikacija. Šta više, istraživanja su pokazala da sub-populacija kancerskih ćelija rezistentnih na lekove može biti utvrđena preko epigenetskih modifikacija hromatina [92]. Sposobnost RAPTA C i RAED C da prepoznaju ne samo hemijske već i strukturne osobine nukleozoma je obećavajuće otkriće koje ukazuje na potencijal ovih i drugih rutenijumovih kompleksa da ciljaju epigenetski “slabe tačke” kancerskih ćelija [91]. Pored toga, suptilne razlike (jedan ligand) između ova dva strukturno slična kompleksa koje za posledicu imaju različit odabir vezivnih partnera i, posledično, drugačiji mehanizam dejstva, ukazuju na značaj utvrđivanja veze između strukture i funkcije kompleksa metala sa ciljem dizajniranja novih, efikasnijih antikancerskih agenasa.

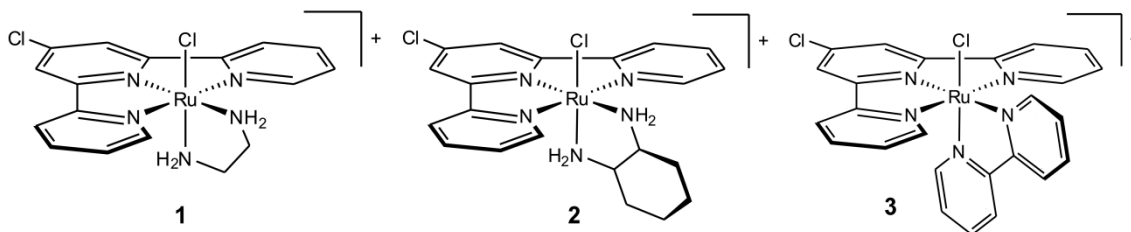
2.1.2.2 Rutenijum(II) polipiridinski kompleksi

Rutenijumovi kompleksi sa polipiridinskim ligandima su posebno interesantni zbog lakoće dizajna i korisnih fotofizičkih osobina. Polipiridinski ligandi su veliki, rigidni, multidentatni i daju rutenijumovim kompleksima oblik i hiralnost, što može biti iskorišćeno za postizanje predefinisanih osobina za vezivanje za DNK [10]. Pored toga što mogu interkalirati u DNK molekul, pokazano je i da se mogu koordinativno vezati za nukleobaze na sličan način kao i cisplatin [93]. Rutenijumovi kompleksi koji sadrže fenilazopiridinske (azpy) ligande, tipa $[\text{Ru}(\text{azpy})_2\text{Cl}_2]$ su privukli pažnju zbog obećavajuće citotoksične aktivnosti koja je zavisna od njihove strukture, i to na način da α i γ izomeri pokazuju veću toksičnost od β izomera [94]. Niske IC_{50} vrednosti su izračunate i za kompleks *mer*- $[\text{Ru}(\text{tpy})\text{Cl}_3]$ (tpy = 2,2':6',2''-terpiridin), za koji je pokazano da se u trans konfiguraciji za DNK vezuje interlančano, preko dva derivata guanina [32].

U literaturi je opisana sinteza i karakterizacija brojnih Ru(II) kompleksa tipa *mer*- $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{N-N})\text{Cl}]^+$ koji sadrže različite N-donorske helatne ligande, uključujući bipiridinske i fenantrolinske derivate [35], [95], [96]. Ovi helatni ligandi ne poseduju sposobnost građenja jakih vodoničnih veza. Kompleksi ovog tipa se za DNK vezuju kovalentno gradeći monofunkcionalne adukte, a za neke je pokazano i da mogu zaustaviti replikaciju DNK [31]. Nađeno je i da se *fac* kompleksi Ru(II) iste opšte

formule $[\text{Ru}(\text{L}_3)(\text{N-N})\text{X}]^+$ (L_3 – tridentatni ligand), kao što je $[\text{Ru}([\text{9}]\text{aneS3})-(\text{N-N})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ ($[\text{9}]\text{aneS3}$ - 1,4,7-tritiaciklononan), vezuju za DNK i pokazuju citotoksičnu aktivnost, ali samo u slučajevima kada N-donorski helatni ligandi poseduju sposobnost građenja vodoničnih veza [97]–[99]. Iako su i *fac* i *mer* kompleksi ovog tipa pokazali obećavajuću aktivnost, problemi sa rastvorljivošću terpiridinskih derivata su smanjili interesovanje za *mer* klasu jedinjenja, te su znatno manje ispitivani od onih sa facijalnom geometrijom [31], [32], [35].

Kako bi se prevazišli neki od navedenih problema, sintetisani su monofunkcionalni kompleksi opšte formule *mer*- $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{N-N})\text{Cl}]\text{Cl}$ (Cl-tpy - 4'-hloro-2,2':6',2''-terpiridin; N-N - 1,2-diaminoethane (en), 1,2-diaminocikloheksan (dach) ili 2,2'-bipiridin (bipy)) [36], prikazani na Slici 7.



Slika 7. Strukturne formule kompleksa $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{en})\text{Cl}]^+$ (**1**), $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{dach})\text{Cl}]^+$ (**2**) i $[\text{Ru}(\text{Cl-tpy})(\text{bipy})\text{Cl}]^+$ (**3**).

Helatni bidentatni ligandi en i dach poseduju sposobnost građenja vodoničnih veza, kao i Cl-tpy derivat terpiridina čiji Cl može služiti kao akceptor vodoničnih veza formiranih sa donorskim atomima biomolekula. Sva tri kompleksa su pokazala visoku rastvorljivost u vodi (> 25 mg/mL). Po rastvaranju dolazi do hidrolize Cl liganda i formiranja akva vrsta, dok brzina hidrolize zavisi od prirode bidentatnog liganda (minuti za en i dach, sati za bipy). Stepenn hidrolize je sličan za sva tri jedinjenja, pri čemu se ravnoteža dostiže pri odnosu hloro i akva vrsta od 1:9. Ispitivanje vezivanja kompleksa za derivate guanina, 9-metilguanin i 5'-guanozin monofosfat su pokazala da po inkubaciji dolazi do formiranja monofunkcionalnih adukata preko N7 atoma, pri čemu brzine reakcije zavise od helatnog liganda ($\mathbf{1} \approx \mathbf{2} \gg \mathbf{3}$) [36]. Dobijeni podaci sugerišu da bi ispitivani kompleksi mogli ispoljiti citotoksično dejstvo preko interakcija sa DNK u kancerskim ćelijama. Međutim, citotoksičnost ovih jedinjenja je nedovoljno ispitana, a informacije o njihovom vezivanju za proteine nisu dostupne.

2.2 Transportni proteini seruma

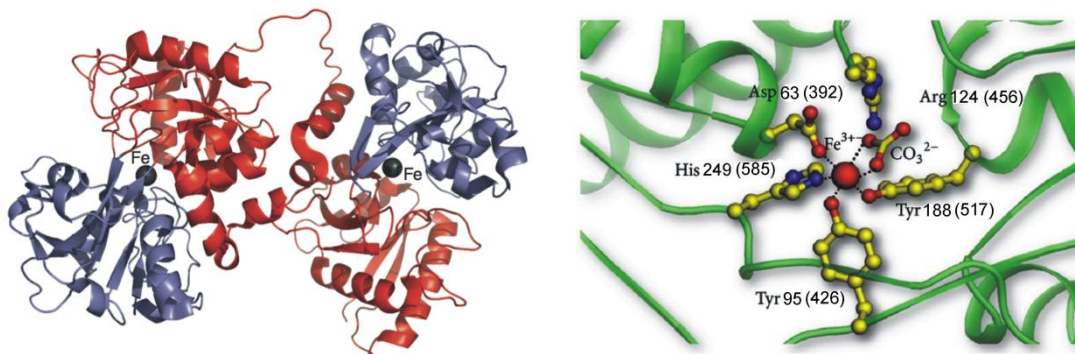
Normalna koncentracija ukupnih proteina u humanom serumu iznosi 63-83 g/L. Glavne vrste proteina seruma su albumin, globulini, fibrinogen i različiti regulatorni proteini. Albumin čini 55% ukupnih proteina seruma i ima ulogu u održavanju osmotskog pritiska i transportu različitih malih molekula i lekova [11]. Budući da se antikancerski kompleksi na bazi metala u organizam unose intravenozno, albumin je najznačajniji protein sa potencijalom za njihov transport. Pored albumina, transferin je drugi po redu protein seruma koji je od značaja za transport kompleksa metala, zbog svoje uloge u transportu gvožđa [13].

2.2.1 Humani serum transferin

Transferin (Tf) je jednolančani glikoprotein koji se sastoji od 700 amino kiselina i ima molekulsku masu od oko 80 kDa. Sintetišu ga hepatociti. Koncentracija Tf u plazmi iznosi 2,5-3,5 mg/mL od čega je 30% zasićeno gvožđem [100]. U serumu, Tf se može naći u tri oblika: bez Fe^{3+} (apotransferin), sa jednim vezanim Fe^{3+} i kao zasićeni oblik sa dva vezana Fe^{3+} (holotransferin). Ovaj protein ima ulogu u prenošenju gvožđa od mesta preuzimanja sistemskom cirkulacijom do ćelija i tkiva [101]. Takođe, Tf je najverovatnije uključen i u transport drugih metala, uključujući terapijske (Bi(III)), radio-dijagnostičke ($^{67}\text{Ga(III)}$, $^{111}\text{In(III)}$), kao i neke toksične jone metala (Al(III), Pu(IV)) [102].

Polipeptidni lanac transferina je uvijen na način da formira dva strukturno slična ali funkcionalno različita lobusa, koji se označavaju kao N- i C-lobus. Ova dva lobusa imaju po jedno vezivno mesto za Fe^{3+} i međusobno su spojeni kratkim peptidnim segmentom (Slika 8). Svaki lobus se sastoji od dva domena koja ograđuju duboki hidrofobni deo u kom se nalazi mesto za vezivanje gvožđa. Na svakom vezivnom mestu, Fe^{3+} se koordiniše za dva kiseonika iz Tyr, jedan azot iz His, jedan kiseonik iz Asp, i dva kiseonika iz bidentatnog karbonata (sinergistički anjon), formirajući iskrivljenu oktaedarnu geometriju (Slika 8). Ligandi su poreklom iz dva domena i dva polipeptidna dela, koja se međusobno ukrštaju na stražnjoj strani mesta za vezivanje Fe^{3+} . Ovakva vrsta strukturnog uređenja je od ključnog značaja kako bi bilo omogućeno rastavljanje domena i formiranje otvorene konformacije, što dovodi do

oslobađanja gvožđa. Bikarbonat je esencijalan za jako vezivanje gvožđa za specifično mesto na transferinu, a može imati ulogu i u njegovom oslobađanju . Pored gvožđa, nađeno je da se i mnogi drugi metali vezuju za ovo mesto, stoga se Tf dovodi u vezu sa transportom i drugih jona metala [102], [103].



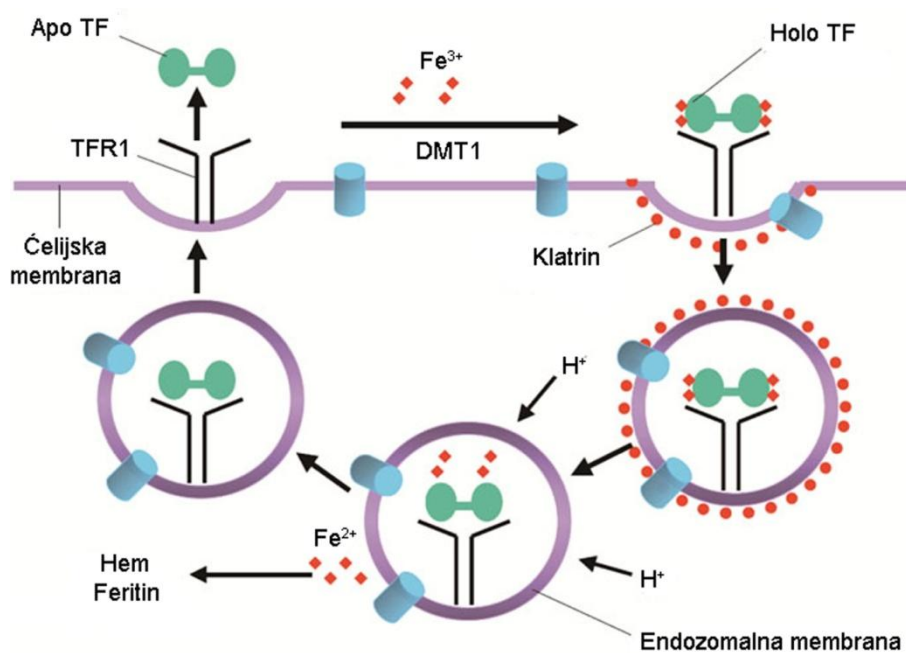
Slika 8. Struktura humanog serum transferina (levo). Preuzeto sa www.chemtube3d.com . Mesto za vezivanje Fe³⁺ (desno). Preuzeto i modifikovano iz [104].

Transferin podleže konformacionim promenama tokom preuzimanja i oslobađanja Fe³⁺ koje su od ključne važnosti za selektivno prepoznavanje od strane transferinskog receptora (TfR). Iako je sam mehanizam otvaranja i zatvaranja lobusa Tf ekstenzivno proučavan, do danas nije u potpunosti rasvetljen.

Transferinski receptor 1 je transmembranski homodimer koji se sastoji od dva identična monomera sa molekulskom masom od oko 90 kDa. Svaki monomer sadrži dva disulfidna mosta, kratak NH₂-terminalni citoplazmatski region, jedan transmembranski deo i veliki ekstracelularni deo (ektodomen) koji je rastvoran i sadrži mesto za vezivanje Tf. Ekstracelularni domen sadrži i tri N-vezana mesta za glikozilaciju na Asn251, Asn317, i Asn727 i jednu O-vezano mesto za glikozilaciju na Thr104 [105]. Smatra se da su ova mesta krucijalna za funkciju TfR1. Mutacije na mestu N-glikozilacije smanjuju vezivanje Tf. Slično, eliminacija O-glikozilacije na Thr104 podstiče hidrolizu TfR1 i promoviše oslobađanje njegovog ektodomena [106]. Iako se Tf može vezati za TfR1 u bilo kom obliku, afinitet vezivanja je najveći u slučaju holotransferina [102].

2.2.1.1 Transport gvožđa i kompleksa metala posredstvom transferinskog ciklusa

Interakcija između Tf i TfR1 na površini ćelije omogućava unos gvožđa u ćeliju preko ćelijske membrane, posredstvom endocitoze. Najpre dolazi do internalizacije čitavog Tf-TfR1 kompleksa u endozomalne vezikule u kojima, zahvaljujući radu protonskih pumpi u membrani, pH značajno opada u odnosu na fiziološku vrednost (pH 7,4). Nastala kisela sredina pH 5,5 omogućava disocijaciju Fe^{3+} jona od Tf-TfR1 kompleksa [107]. Zatim se Fe^{3+} redukuje do Fe^{2+} dejstvom enzima ferireduktaze, a nakon toga biva transportovan iz endozoma u citoplazmu preko transportera za dvovalentne jone metala (*engl.* divalent metal transporter-1, DMT1). Nastali apo-Tf-TfR1 kompleks se reciklira do površine ćelije, a apo-Tf se oslobađa u krvotok [108], [109] (Slika 9).



Slika 9. Transferinski ciklus i ćelijsko preuzimanje gvožđa posredovano TfR1. Preuzeto i modifikovano iz [109].

U literaturi postoji veliki broj radova koji potvrđuju povećano prisustvo TfR1 na površini kancerskih ćelija [109]–[111]. Takođe, pokazano je i povećano prisustvo feritina, proteina koji ima funkciju u skladištenju gvožđa, što ukazuje na povećanu

potrebu kancerskih ćelija za gvožđem [110]. Iz toga je proistekla ideja o upotrebi Tf kao sistema za selektivnu dostavu antikancerskih lekova na bazi metala do tumorskih ćelija. Efikasnost ovakvog pristupa je pokazana testiranjem dejstva adukta između Tf i platine (MPTC-63) [109]. Nađeni su jaki dokazi da MPTC-63 smanjuje sintezu metalotioneina, što za rezultat ima smanjenje aktivnosti superoksid dizmutaze (SOD). Smanjena aktivnost SOD unutar ćelije dovodi do povećane proizvodnje hidroksil radikala, kao i drugih slobodnih radikala koji oštećuju ćelije i ćelijske komponente. Prednost transporta kompleksa prelaznih metala posredovanog transferinom je selektivnost, budući da je štetan efekat na zdrave ćelije minimalan [109].

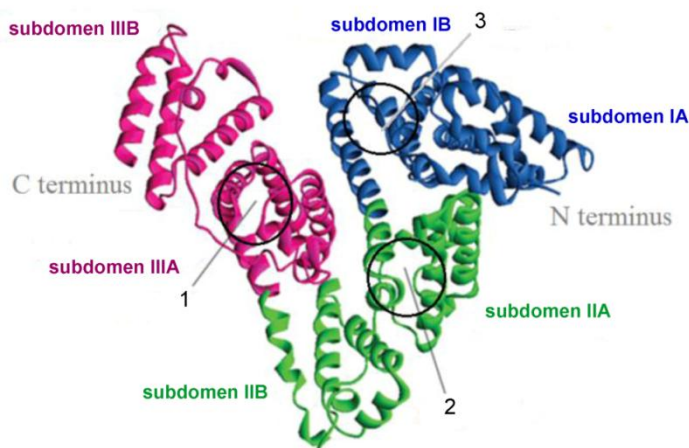
Kako se gvožđe i rutenijum nalaze u istoj grupi elemenata periodnog sistema, ispitivanje potencijala Tf za transport rutenijumovih kompleksa do kancerskih ćelija je izazvalo posebno interesovanje. U literaturi je pokazano da je količina Ru u ćelijama SW480 linije kancera debelog creva 2,5 puta veća kada se one tretiraju KP1019-Fe³⁺-Tf konjugatima, nego slobodnim kompleksom [112]. Slični rezultati su dobijeni i na SW707 ćelijskoj liniji (takođe kancer debelog creva) po inkubaciji sa konjugatom KP1019 i holo-Tf [113]. Toksičnost ovog kompleksa se pokazala većom i na HL60 ćelijama promijelocitične leukemije koje prekomerno ekspimiraju TfR1, u odnosu na ćelije koje ne ekspimiraju ovaj receptor [6]. Pokazano je i da dodatak apo-Tf medijumu za uzgajanje HeLa ćelija povećava citotoksičnost KP1418 kompleksa, u odnosu na njegov slobodan oblik [114], [115]. Iako su kompleksi Ru(II) u mnogo manjoj meri ispitivani, postoje literaturni podaci o potencijalu ovih jedinjenja da koriste Tf za aktivan transport do kancerskih ćelija i tkiva. Naime, za razliku od cisplatine čija se citotoksičnost prema ispitanjoj MCF-7 ćelijskoj liniji drastično smanjuje kada je u obliku konjugata sa Tf, konjugati Tf i [Ru(η⁶-aren)(en)Cl]⁺ pokazuju sličnu citotoksičnost kao i slobodni kompleksi, što ukazuje na to da ova Ru(II) jedinjenja mogu koristiti Tf za ulazak u ćeliju i da vezivanje za protein ne dovodi do njihove inaktivacije [116].

Potvrđeno je da se kompleksi rutenijuma za Tf mogu vezati specifično, za vezivna mesta za metale i/ili nespecifično, za površinske elektron-donorske amino kiselinske ostatke [117]. Iz svega priloženog, može se zaključiti da je očuvanje pravilne konformacije Tf, koja omogućava njegovo prepoznavanje od strane TfR1, osnovni preduslov za ulazak Ru jedinjenja u ćeliju preko opisanog transferinskog ciklusa.

2.2.2 Humani serum albumin

Humani serum albumin (HSA) je najzastupljeniji serumski protein čija masa iznosi 66348 Da, a koncentracija 35-50 mg/mL [118]. Primarno ga sintetiziraju hepatociti jetre koja na dnevnoj bazi sintetiziraju ~13.9 g HSA. Zastupljeniji je u ekstravaskularnom (~242 g) nego u intravaskularnom prostoru (~118 g). Iz ekstravaskularnog prostora se u cirkulaciju vraća preko limfnog sistema i u toku svog životnog veka napravi oko 28 ovakvih obrta. Prosečan poluživot HSA iznosi 19 dana. Ovaj protein je esencijalan za održavanje osmotskog pritiska u krvi i za transport različitih endogenih molekula uključujući masne kiseline, steroide, neke amino kiseline itd. Odgovoran je i za transport različitih produkata metabolizma, jona metala i egzogenih molekula kao što su lekovi [119].

Humani serum albumin je jednolančani (585 amino kiselina) helikalni protein sa višestrukim zaokretima i izduženim petljama, koji se sastoji od tri homologa domena označena sa I, II i III (Slika 10). Svaki domen je sačinjen od dva helikalna subdomena (A i B), koja su povezana nasumičnim namotajima. Iako modularna strukturna organizacija HSA obezbeđuje raznovrsnost u pogledu potencijalnih vezivnih mesta za lekove, tri glavna vezivna mesta su identifikovana na subdomenima IIA (Sudlovo mesto I), IIIA (Sudlovo mesto II) i IB [11].

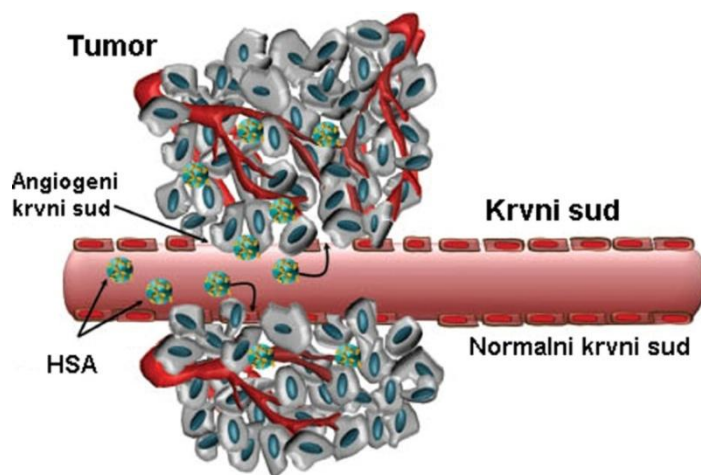


Slika 10. Struktura HSA sa istaknutim glavnim vezivnim mestima za lekove. Sudlova mesta su označena brojevima 1 i 2, dok je treće vezivno mesto na subdomenu IB označeno brojem 3. Preuzeto i modifikovano iz [120].

Za Sudlovo mesto I se pretežno vezuju veliki heterociklični anjoni, a poznato je i po vezivanju antikoagulantna varfarina. Za Sudlovo mesto II se vezuje ibuprofen, nesteroidni anti-inflamatorni agens, a uopšteno ga preferiraju aromatični karboksilati [11]. Treći vezivni region za lekove na subdomenu IB je poznat po vezivanju biliverdina, a nađeno je da se za njega vezuju i mnogi drugi molekuli i lekovi, uključujući i antikancerske agense (doksorubicin, daunorubicin, suramin, tenipozid itd.) [121].

2.2.2.1 Transport antitumorskih lekova posredstvom HSA

Smatra se da je dostava medikamenata do tumorskog tkiva posredstvom HSA omogućena efektom povećane permeabilnosti i retencije (*engl.* enhanced permeability and retention, EPR) [122]. Naime, tumorska tkiva poseduju defektnu vaskulaturu, sa brojnim "pukotinama" i razmacima između endotelijalnih ćelija krvnih sudova. Ovakva organizacija omogućava visoku propustljivost i akumulaciju makromolekula (>40 kDa) u tumorskom tkivu. Nedostatak efikasne limfne drenaže onemogućava uklanjanje akumuliranih makromolekula, tako da se prolongira njihovo zadržavanje u tumorskom tkivu [122], [123]. Pored proteina seruma koji na ovaj način učestvuju u dostavi različitih lekova, EPR efekat se koristi i u strategiji dostave različitih formulacija uključujući micide, razne biopolimere i nanočestice [119]. Prikaz EPR efekta je ilustrovan na Slici 11.



Slika 11. Ilustrativni prikaz efekta povećane permeabilnosti i retencije (EPR). Defektna vaskulatura tumora omogućava prolaz HSA iz cirkulacije u tkivo, dok je kod normalnih krvnih sudova kod kojih su endotelijalne ćelije usko povezane, takav prolaz onemogućen. Preuzeto i modifikovano iz [124].

Brojne studije sugerišu da su tumorska tkiva mesta ubrzanog katabolizma albumina [125]–[127]. Npr., nađeno je da, nakon ubrizgavanja albumina obeleženog H^3 rafinozom u miševе obolele od sarkoma, 2-3 puta više H^3 završi u tumorskim u poređenju sa lizozomima zdravog tkiva [125]. Pored toga, pokazano je i da albumin ima kraći poluživot i veći broj obrta u tumorskim u poređenju sa zdravim tkivima, bez obzira na ubranu kompenzatornu sintezu u jetri. Iz priloženog se može pretpostaviti da tumori koriste albumin kao izvor energije, razlažući ga do amino kiselina koje kancerske ćelije koriste za ubran rast. Ova pretpostavka je i potvrđena hipoalbuminemijom koja se često sreće kod pacijenata obolelih od kancera [127]. Takođe, pokazano je i da ekstracelularna suplementacija albuminom reverzibilno deluje na smanjenu proliferaciju onkogenih Ras-ekspimirajućih ćelija do koje dolazi usled potrošnje glutamina [128].

Kako se antikancerski agensi na bazi metala u organizam unose intravenozno, ispitivanje interakcija sa HSA kao najzastupljenijim proteinom seruma su od izuzetnog značaja. U literaturi je detaljno opisano vezivanje HSA za mnoge rutenijumove komplekse, uključujući KP1019, KP418, RAPTA C, NAMI A, $[Ru(\eta^6\text{-p-cimen})(\text{aceton})_3](CF_3COO)_2$ [129]. Kako je za većinu ovih jedinjenja HSA identifikovan kao glavni vezivni partner u serumu, važno je ispitati potencijal ovog proteina za njihov transport i dostavu. Smatra se da klinički relevantni lekovi, KP1019 i njegov analog NKP-1339, ispoljavaju svoju antitumorsku aktivnost upravo posredstvom HSA i EPR efekta [17].

Sa ciljem eksploatacije EPR efekta, sintetisani su i različiti konjugati rutenijumovih kompleksa sa HSA. Npr., RAPTA kompleks je za HSA vezan hidrazinskim linkerom, radi specifične dostave do tumorskog tkiva. Kako je oformljena veza između proteina i kompleksa labilna u kiselim uslovima, očekuje se da po ulasku u ćeliju dođe do otpuštanja RAPTA. Zaista, pokazano je da konjugat HSA-RAPTA ispoljava značajno veću citotoksičnost prema A2780 ćelijskoj liniji, nego što je to slučaj sa slobodnim kompleksom [130]. Smanjenje IC_{50} vrednosti na istoj ćelijskoj liniji je primećeno i kod konjugata HSA i kompleksa tipa $[Ru(\eta^6\text{-aren})Cl(L)]Cl$ (gde je aren 4-formilfenoksiacetil- η^6 -benzilamid, a L inhibitor ciklin-zavisne kinaze) [131].

Ispitivanje citotoksičnosti adukata nastalih inkubacijom HSA i $[RuCl_5(\text{ind})]^{2-}$ prema MGC-803, HCT-15, SKOV-3 i MDA-MB-231 kancerskim ćelijskim linijama je

pokazalo da su IC_{50} vrednosti HSA-[RuCl₅(ind)]²⁻ dva do pet puta manje nego što je to slučaj kod slobodnog kompleksa. Interesantno je da ni sam [RuCl₅(ind)]²⁻ ni HSA-[RuCl₅(ind)]²⁻ nisu pokazali značajan efekat na zdravu ćelijsku liniju, HL-7702. Takođe, u poređenju sa slobodnim kompleksom, HSA-[RuCl₅(ind)]²⁻ podstiče apoptozu MGC-803 ćelija i ima jači kapacitet za zaustavljanje ćelijskog ciklusa u G2 fazi [132]. Pokazano je i da adukti piridinskih derivata KP1019 i KP1339 sa HSA povećavaju citotoksičnost prema SW480 ćelijskoj liniji [133]. Ispitivanje uticaja adukta BSA-Ru^{III}, nastalog po inkubaciji proteina sa NAMI A, na adheziju, pokretljivost i invazivnost A459 ćelijske linije kancera pluća je pokazalo da BSA-Ru^{III} adukt ima sličnu aktivnost kao i slobodan kompleks, tj. da deluje inhibitorno na sve tri ispitivane osobine [134]. Smatra se da ovakav efekat osnova anti-metastatske aktivnosti NAMI A *in vivo*.

2.3 Masena spektrometrija u analizi interakcija kompleksa metala sa proteinima

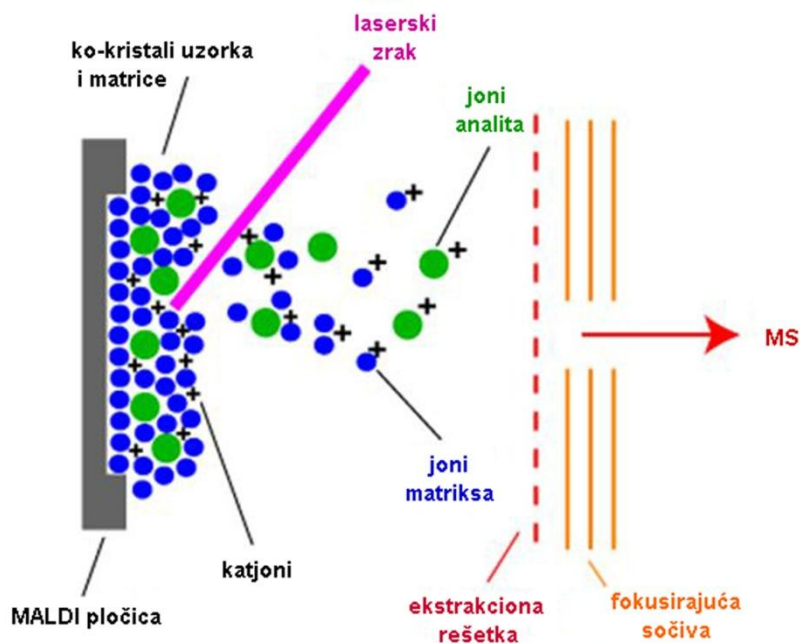
Tehnike masene spektrometrije (MS) su od izuzetnog značaja za proučavanje anti-kancerskih kompleksa metala u složenim biološkim uzorcima, kao i za karakterizaciju interakcija koje ova jedinjenja ostvaruju sa biomolekulima. Princip rada MS tehnika se zasniva na detekciji pozitivnih ili negativnih jona, koji se u gasnoj fazi razdvajaju u na osnovu odnosa mase prema naelektrisanju. Najčešće korišćene jonizacione tehnike za proučavanje interakcija kompleksa metala sa biološkim molekulima su: matriksom-pomognuta laserska desorpcija i jonizacija (*engl.* matrix-assisted laser desorption and ionization, MALDI), elektrosprej jonizacija (*engl.* electrospray ionization, ESI) i indukcijom kuplovana plazma (*engl.* inductively coupled plasma, ICP). Svaka od ovih jonizacionih metoda daje različite, karakteristične masene spektre:

- MALDI produkuje pretežno jednostruko naelektrisane vrste, npr. jone nastale formiranjem adukata između proteina i kompleksa metala.
- ESI generiše jednostruko do višestruko naelektrisane jone preko formiranja adukata sa protonima, metalima ili deprotonacijom.
- ICP uglavnom produkuje jednostruko naelektrisane vrste usled atomizacije i jonizacije u plazmi.

ICP masena spektrometrija se najčešće koristi za kvantifikaciju metala u biološkim uzorcima, ali ne daje strukturne informacije kakve se mogu dobiti upotrebom mekih jonizacionih tehnika, kakve su ESI i MALDI [22]. Iako postoje i druge metode poput rendgenske kristalografije [15]–[17] i nuklearne magnetne rezonancije (NMR) [18], [19], koje se mogu koristiti za strukturnu karakterizaciju i određivanje mesta za vezivanje kompleksa metala na proteinima, MS ima brojne prednosti. Nasuprot NMR spektroskopiji i rendgenskoj kristalografiji, MS analiza zahteva znatno manju količinu uzorka kao i kraće vreme potrebno za analizu i interpretaciju rezultata. U slučajevima kada je dostupna ograničena količina uzorka, nano-ESI MS osigurava maksimalnu osetljivost. Kuplovana sa nano-tečnom hromatografijom (*engl.* liquid chromatography, LC), ova metoda je gotovo nezaobilazna u bioanalitici i proteomici [135]. Pored toga, maseno-spektrometrijske metode su pogodne za analizu šireg spektra različitih proteina dok je npr. kod rendgenske kristalografije analiza fleksibilnih ili membranskih proteina koji nisu podložni kristalizaciji jako otežana ili nemoguća [136]. Uz sve navedeno, MS metode se karakterišu izuzetnom tačnošću i specifičnošću, kao i mogućnošću simultane analize smeše različitih proteina.

2.3.1 MALDI jonizacija

U MALDI izvoru dolazi do desorpcije i jonizacije uzorka u čvrstoj fazi. Najpre se uzorak rastvara i meša sa odgovarajućom matricom koja se dodaje u višku u odnosu na analit, a zatim se nanosi na MALDI pločicu i suši. Na MALDI pločici dolazi do ko-kristalizacije uzorka i matrice, a komponente te smeše se u gasnu fazu uvode dejstvom lasera. Najčešće se koristi azotni laser na 337 nm ili NdYag laser na 355 nm. Matrice su uglavnom mali organski molekuli koji apsorbuju energiju lasera i prenose je na analit, što dovodi do desorpcije i jonizacije uzorka. Odabir matrice zavisi od analiziranog uzorka, pa se tako za analizu celih proteina najčešće koristi sinapinska kiselina, za analizu lipida 2,5-dihidroksibenzojeva kiselina (DHB), a za peptide α -cijano-hidroksicimetna kiselina (CHCA). Ilustrativni prikaz MALDI jonizacije je prikazan na Slici 12 [137].



Slika 12. Ilustrativni prikaz MALDI jonizacije. Dejstvom laserskog zraka na ko-kristale uzorka i matrice dolazi do njihove desorpcije i jonizacije u izvoru, nakon čega se joni usmeravaju ka analizatoru masenog spektrometra. Preuzeto i modifikovano iz [138].

Glavna prednost MALDI jonizacije je brzina snimanja, kao i izvesna tolerancija na soli, detergente i različite nečistoće u uzorku. Takođe, za razliku od ESI MS, MALDI MS analizom se detektuju pretežno jednostruko naelektrisane vrste, što je od značaja za identifikaciju molekulskih jona analiziranih molekula. Karas i saradnici su formiranje jednostruko naelektrisanih vrsta objasnili hipotezom da u MALDI izvoru višestruko naelektrisani joni bivaju neutralisani elektronima koji nastaju u procesu fotojonizacije [139]. Zbog visokog vakuuma u kom se izvor nalazi, MALDI MS se ne može direktno povezati sa nekom od separacionih tehnika. Još jedna mana MALDI MS je nemogućnost kvantitativne analize (iako se tehnika može smatrati semi-kvantitativnom), koja je posledica hetrogenosti oformljenih kristala uzorka i matrice [137].

2.3.2 Jonizacija na atmosferskom pritisku

U elektrosprej izvoru se jonizacija uzorka dešava na atmosferskom pritisku (AP), nakon čega produkovani joni bivaju prebačeni u maseni spektrometar. Kako je u analizatoru masenog spektrometra vakuum veoma visok (10^{-5} Torr), obično se dva

središnja vakuum odeljka postavljaju između izvora i analizatora zbog velike razlike u pritiscima. Odeljci su povezani sočivima koja na sebi imaju veoma male otvore (tzv. konuse) kroz koje joni putuju do analizatora. Pritisci središnjih vakuum odeljaka se postepeno redukuju uz pomoć nekoliko diferencijalnih faza rada pumpi visokog kapaciteta (tzv. turbomolekularne pumpe). Takođe, središnji odeljci su snabdeveni i optičkim sistemom za transfer koji uključuje fokusirajuća sočiva sa ulogom efektnog usmeravanja jona ka otvorima [140].

Još jedan od problema jonizacije na atmosferskom pritisku (*engl.* atmospheric pressure ionization, API) leži u hlađenju uzrokovanom uzorkom i adijabatskom širenju rastvarača koje favorizuje stvaranje jonskih klastera. Posledično, desolvacija jona je takođe važan aspekt u dizajnu AP interfejsa. Efikasna desolvacija se obezbeđuje uvođenjem zagrejane metalizirane cevi za transfer (oko 200°C) ili uvođenjem zagrejanog gasa suprotnog protoka. Desolvacija se takođe poboljšava ubrzavanjem jona u regionu interfejsa u kom je pritisak u milibarskom opsegu. Ubrzavanje se postiže primenom napona između različitih sočiva za ekstrakciju. Joni se sudaraju sa rezidualnim molekulima gasa što povećava njihovu unutrašnju energiju i indukuje finalnu desolvaciju, sprečavajući nastanak jonskih klastera. Međutim, ovakvi sudari mogu dovesti do povećanja energije dovoljnog da izazove fragmentaciju jona. Ovakva vrsta fragmentacije se zove fragmentacija u izvoru (*engl.* in-source fragmentation). Inicijalno je API dizajn podrazumevao aksijalnu konfiguraciju, međutim, danas je ona uglavnom ortogonalna. Glavna prednost ovakve konfiguracije je to što konus više nije zasićen rastvaračem. Umesto toga, samo joni bivaju usmereni ka ulasku u maseni spektrometar. Posledično, konusi mogu biti veći nego kod aksijalne konfiguracije. Kombinacija većih konusa i redukcije šuma u velikoj meri kompenzuje transmisionu gubitke nastale usled ortogonalne geometrije, što rezultuje velikim porastom osetljivosti. Još jedna prednost ove konfiguracije je mogućnost povećanja brzine protoka. Na kraju, ova konfiguracija pruža bolju zaštitu konusa od kontaminacije i začepeljivanja, što povećava robustnost sistema [140].

Najvažnija prednost API izvora je lakoća direktnog onlajn kuplovanja tehnika za razdvajanje (HPLC, μ HPLC, CE, itd.) za maseni spektrometar. Još jedan pozitivan aspekt ovih izvora je lakoća uvođenja uzorka u maseni spektrometar zato što delovanje

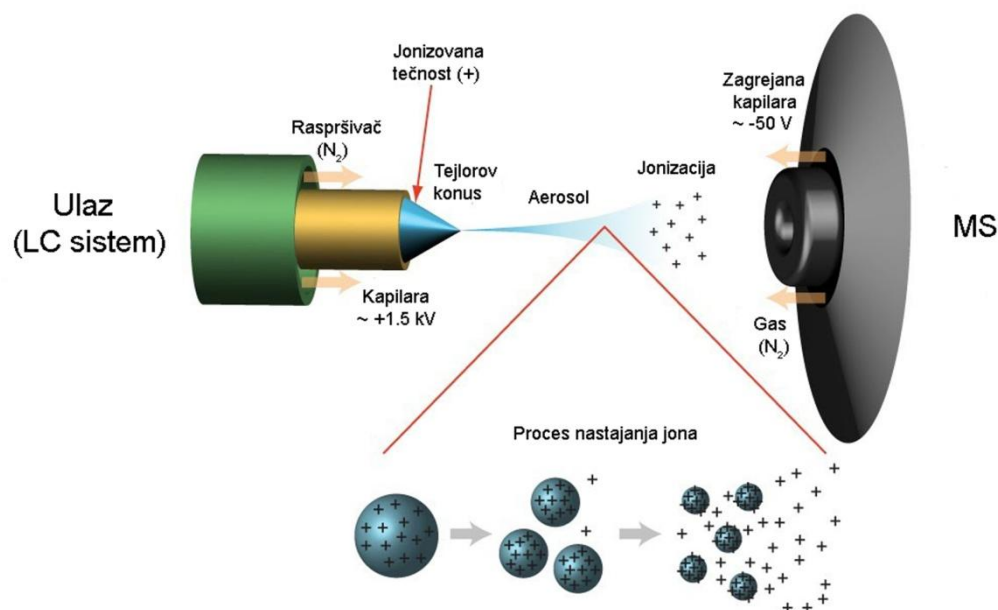
na AP van masenog spektrometra eliminiše komplikovane procedure uvođenja uzorka u visoki vakuum.

2.3.2.1 Elektrosprej jonizacija

Popularnost elektrosprej jonizacije (*engl.* electrospray ionization, ESI) je počela kada su Fen i saradnici [141] pokazali da proteini mogu biti detektovani kao višestruko naelektrisani joni, što je omogućilo određivanje njihove molekulske mase korišćenjem instrumenata čiji je maseni opseg detekcije nizak. Kasnije je upotreba ESI proširena ne samo na druge polimere i biopolimere, već i na analizu malih polarnih molekula. Principi i biološke primene ESI MS su naširoko proučavane [142].

Elektrosprej [143] se postiže primenom jakog električnog polja, pri AP, na tečnost koja prolazi kroz kapilarnu cev niskim protokom (obično $1-10 \mu\text{min}^{-1}$). Električno polje se stvara usled razlike potencijala od 3-6 kV između kapilare i kontra-elektrode koje na međusobnom odstojanju od 0,3-2 cm, proizvode električno polje reda veličine 10^6Vm^{-1} . Ovo polje indukuje akumulaciju naelektrisanja na površini tečnosti locirane na vrhu kapilare, koja se dalje raspada formirajući visoko naelektrisane kapljice. Gas koji se uvodi koaksijalno i pri niskom protoku omogućava da disperzija spreja bude ograničena u prostoru. Oformljene kapljice zatim prolaze ili kroz zavesu zagrejanog inertnog gasa, najčešće azota, ili kroz zagrejanu kapilaru, kako bi se uklonili rezidualni molekuli rastvarača [140]. Ilustrativni prikaz ES jonizacije je predstavljen na Slici 13.

Sprej se uspostavlja na početnoj (*engl.* onset) voltaži koja, za dati izvor, zavisi od površinskog napona rastvarača. U izvoru koji ima početnu voltažu 4 kV za vodu (površinskog napona $0,073 \text{Nm}^{-2}$), 2,2 kV je procenjeno za metanol ($0,023 \text{Nm}^{-2}$), 2,5 kV za acetonitril ($0,030 \text{Nm}^{-2}$) i 3 kV za dimetilsulfoksid ($0,043 \text{Nm}^{-2}$) [144]. Pri niskom naponu, kapljica koja se formira na vrhu kapilare izgleda sferično, a zatim se u jačem električnom polju izdužuje pod pritiskom akumuliranog naelektrisanja; kada se probije površinski napon, oblik kapljice se menja u tzv. "Tejlorov konus" i sprej se pojavljuje.



Slika 13. Ilustrativni prikaz elektrosprej jonizacije. Pod dejstvom električnog polja, naelektrisani molekuli se akumuliraju na površini oformljenih kapljica koje se dalje raspadaju na iduću generaciju kapljica sa većim naelektrisanjem po jedinici zapremine. Ovaj proces, praćen isparavanjem rastvarača, se ponavlja do desorpcije jona koji se po napuštanju izvora razdvajaju u analizatoru masenog spektrometra.

Pokazano je da raspad kapljica može da se dogodi pre Rayleigh-ove granice, zato što se kapljice mehanički deformišu, na taj način redukujući repulziju koja je neophodna za raspad kapljice [145]. Rastvarač iz kapljica isparava, što izaziva njihovo skupljanje i povećava naelektrisanje po jedinici zapremine. Kapljica se izdužuje pod uticajem sile nastale kao rezultat akumulacije naelektrisanja, slično onome što se dešava na vrhu kapilare, i finalno produkuje novi Tejlorov konus. Iz formiranog Tejlorovog konusa, oslobađa se oko 20 manjih kapljica. Obično prva generacija kapljica iz kapilare ima dijametar od oko $1,5 \mu\text{m}$ i nosi oko 50 000 elementarnog naelektrisanja, ili oko 10^{-14} C. Novonastale kapljice imaju dijametar od $0,1 \mu\text{m}$ i nose 300 do 400 elementarnog naelektrisanja. Ukupna zapremina svake novonastale kapljice iznosi oko 2% prekursorsne kapljice ali sadrži 15% naelektrisanja. Naelektrisanje po jedinici zapremine se stoga množi faktorom sedam. Prekursorna kapljica se dalje skuplja usled evaporacije rastvarača i produkuje novu generaciju potomaka. Ove male, visoko naelektrisane kapljice nastavljaju da gube rastvarač, i kada električno polje na njihovoj površini postane dovoljno jako, joni se desorbuju sa površine [144]. Joni poreklom od velikih

molekula se najverovatnije oslobađaju evaporacijom i nose veći broj naelektrisanja ukoliko je prisutno nekoliko potencijalnih jonizabilnih mesta.

2.3.2.1.1 Nano-elektrosprej jonizacija u negativnom jonskom modu

Mogućnost direktnog povezivanja LC za ESI MS je ovu metodu u većini slučajeva učinila metodom izbora u proteomici, zbog mogućnosti direktne analize kompleksnih smeša peptida. Pored toga, uvođenje mikro- i nano-LC/nano-ESI MS sistema [146] je značajno povećalo procenat identifikovanih peptida niske zastupljenosti. Povećana osetljivost se pripisuje efikasnijem uzorkovanju jona usled formiranja manjih elektrosprej kapljica. Do sada, ESI MS analiza peptida se gotovo isključivo radila u pozitivnom jonskom modu, sa izuzetkom post-translaciono modifikovanih peptida koji sadrže negativno naelektrisane grupe [147]. Suprotno tome, analiza peptida u negativnom jonskom modu je zanemarena iz nekoliko razloga koji uključuju slabu mogućnost jonizacije pri niskim brzinama protoka ($< 5 \mu\text{L}/\text{min}$), nisku osetljivost triptičkih peptida (Lys i Arg ostaci su pozitivno naelektrisani pri kiselom pH) i izraženu zavisnost od prirode analita. U tom kontekstu, negativna jonizacija se pokazala korisnom u analizi različitih molekula koji nose negativno naelektrisane grupe, kao što su karboksilna, fosfatna i sulfatna grupa [148]. U literaturi se može naći svega nekoliko radova koji opisuju detekciju peptida u negativnom jonskom modu, ali su oni ograničeni na specifičan amino-kiselinski sastav peptida [149], što znači da se mogu koristiti za ciljanu analizu, ali da nisu za širu upotrebu u proteomici.

Optimalna elektrosprej jonizacija u pozitivnom jonskom modu zahteva rastvarače različitih fizičko-hemijskih karakteristika od jonizacije u negativnom jonskom modu [148]. Stoga, sistem rastvarača odabran za pozitivni jonski mod može suprimirati formiranje negativnih jona (i obrnuto), a može dovesti i do električnog pražnjenja [150] nakon promene polarnosti na instrumentu. Šta više, činjenica da su mobilne faze prilagođene formiranju pozitivnih jona takođe prilagođene i visoko-efikasnom hromatografskom razdvajanju peptida još više otežava uspostavljanje efikasne negativne jonizacije pod istim eksperimentalnim uslovima. Tokom električnog pražnjenja u jonskom izvoru dolazi do neželjene hemijske jonizacije molekula uzorka i rastvarača, što za rezultat ima spektre lošeg kvaliteta sa visokim i neuniformnim

pozadinskim signalom. Pored toga, varničenje može dovesti do gubitka ESI struje, a prisustvo vodenih ili visoko provodljivih rastvora dodatno doprinosi nestabilnosti elektrospreja [148]. Efekat je pojačan pri niskim protocima ($< 5 \mu\text{L}/\text{min}$): nizak protok i mali prečnik vrha kapilare ($< 50 \text{ nm}$) dovode do produkcije uskog i konvergentnog spreja sačinjenog od kapljica male zapremine (konvencionalni ESI izvor proizvodi kapljice veličine 1-2 μm , dok se u nano-ESI izvoru proizvode kapljice veličine 100-200 nm). Sprej takvih karakteristika je izuzetno osetljiv i na najmanje promene u geometriji izvora, temperaturi, naponu, protoku azota ili sastavu rastvora. Budući da se vrednost električnog napona elektrospreja koja je neophodna za jonizaciju povećava sa kvadratnim korenom površinskog napona [151], rastvori visokog površinskog napona imaju veću tendenciju da dovedu do električnog pražnjenja koje može narušiti ESI proces. Stoga bi post-kolonski dodatak hemijski inertnog rastvarača koji je mešljiv sa vodom, lako isparljiv i ima nizak površinski napon, mogao doprineti ES stabilnosti. Izopropanol (IPA) zadovoljava sve navedene uslove i već je pokazano da može stabilizovati ES suprimiranjem električnog pražnjenja [152]. Na žalost, acetonitril i metanol koji najčešće ulaze u sastav mobilnih faza ne mogu biti zamenjeni sa IPA u tečnoj hromatografiji (IPA je viskoznan rastvarač koji generiše relativno visok pritisak u sistemu). Imajući to u vidu, IPA bi bio idealan izbor kao post-kolonski modifikator za poboljšanje ES stabilnosti, bez uticaja na hromatografsko razdvajanje. Pored upotrebe nepolarnih ili rastvarača koji sadrže Cl, pokušaji rešavanja problema negativne jonizacije su uključivali i upotrebu „elektron-skevindžing“ gasova [152], ali ni jedan od ovih pokušaja nije rešio problem neadekvatne ES negativne jonizacije peptida pri mikro i nano brzinama protoka. Takođe, nekoliko pokušaja poboljšanja negativne jonizacije je uključivalo upotrebu modifikatora mobilne faze. Wu i saradnici su ispitivali efekte nekoliko baza, neutralnih soli i slabih kiselina kao modifikatora negativne jonizacije u analizi modulatora androgenih receptora [153]. Ovaj rad je pokazao da, za razliku od neutralnih soli i baza, slabe kiseline poboljšavaju negativni odgovor, u skladu sa „obrnutim“ ESI konceptom [154]. Takođe, nađeno je da formaldehid (FA) pri koncentracijama od 10-100 mM povećava ESI odgovor testiranih analita. Kao glavno objašnjenje pozitivnog efekta FA, kao i slabih kiselina male molekulske mase, je navedena mala veličina njegovog anjona koji ima manje supresivan efekat na negativan ESI odgovor hidrofилnih jedinjenja koja se akumuliraju na površini ES kapljica.

Međutim, dato objašnjenje bi trebalo reevaluirati u kontekstu hemije gasne faze, sa predloženim reakcionim mehanizmom.

2.3.3 Maseni analizatori

Maseni analizator je sastavni deo masenog spektrometra, u kom se razdvajanje jona vrši na osnovu m/z vrednosti. Najčešće korišćeni tipovi masenih analizatora su kvadrupol (Q), kvadrupol jonski trap (QIT), analizator koji razdvaja jone na osnovu vremena preleta (*engl.* time of flight, TOF) i jon ciklotronska rezonancija sa Furijeovom transformacijom (*engl.* Fourier transform ion cyclotron resonance, FT-ICR). Ovi analizatori se razlikuju u pogledu veličine, rezolucije, masenog opsega i mogućnosti za tandem masenu analizu (MS/MS). Tako se uređaji sa QIT analizatorom mogu koristiti za višestruku tandem masenu analizu (MSⁿ), dok su FT-ICR uređaji pogodni za merenje tačne mase [137].

U kvadrupolnom masenom analizatoru, joni različitih m/z vrednosti se razdvajaju na osnovu stabilnosti njihovih trajektorija u oscilujućem električnom polju. Kvadrupolni analizatori se često kombinuju sa TOF analizatorima kod kojih se princip razdvajanja jona zasniva na vremenu preleta, gradeći qTOF hibridni analizator. Za razliku od qTOF analizatora koji se vezuju za ESI jonski izvor, TOF/TOF hibridni analizatori se najčešće sreću kod uređaja sa MALDI izvorom jonizacije [137].

3. Naši radovi

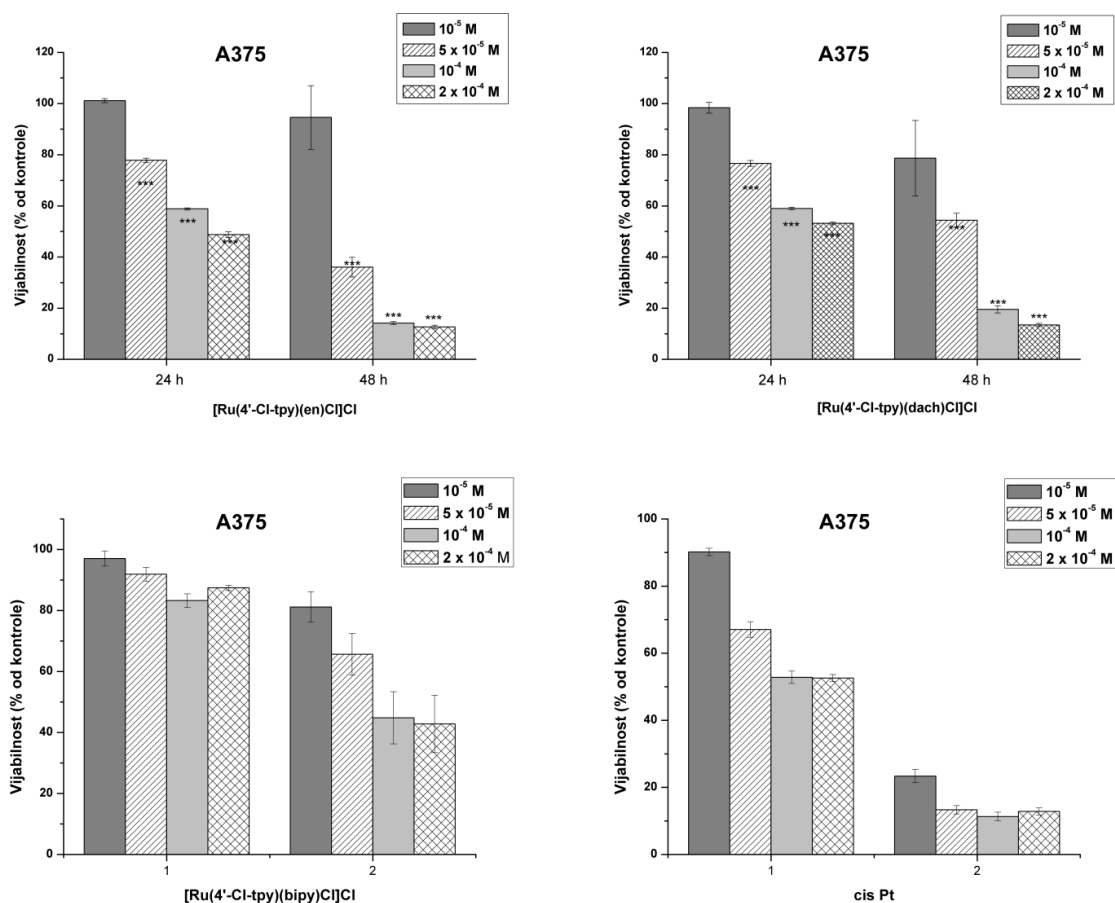
Kompleksi rutenijuma poseduju veliki potencijal za korišćenje u terapiji primarnih kancera i kancerskih metastaza. Mehanizam dejstva kompleksa rutenijuma zavisi od njihove strukture i sposobnosti da interaguju sa DNK i/ili proteinima. Kako se antikancerski agensi na bazi metala u organizam unose intravenozno, vezivanje kompleksa za proteine seruma značajno utiče na njihovu biodistribuciju i efikasnost. Iz tog razloga je ispitivanje interakcija kompleksa metala sa proteinima seruma od izuzetnog značaja.

U ovoj disertaciji su prikazani rezultati dobijeni ispitivanjem interakcija tri kompleksa Ru(II): *mer*-[Ru(Cl-tpy)(en)Cl]Cl (**1**), *mer*-[Ru(Cl-tpy)(dach)Cl]Cl (**2**) i *mer*-[Ru(Cl-tpy)(bipy)Cl]Cl (**3**) sa transportnim proteinima seruma, humanim serum albuminom (HSA) i transferinom (Tf). U literaturi je pokazan potencijal ovih jedinjenja za vezivanje za DNK molekul, ali interakcije sa proteinima nisu ispitane.

Kako bi se stekao uvid u biološku aktivnost odabranih kompleksa, najpre je ispitana njihova citotoksičnost na kancerskim ćelijskim linijama. Nakon toga, ispitan je potencijal kompleksa za vezivanje za odabrane proteine seruma. U okviru toga su određeni: stehiometrija vezivanja, konstante vezivanja, kao i uticaj vezivanja kompleksa **1**, **2** i **3** na sekundarnu i tercijarnu strukturu HSA i Tf. Određivanje mesta vezivanja je urađeno uz pomoć mekih jonizacionih tehnika masene spektrometrije. U okviru toga, mesta vezivanja kompleksa na transferinu su određena upotrebom MALDI MS, a na albuminu uz pomoć nano-ESI MS. Sa ciljem unapređenja i pojednostavljenja upotrebe masene spektrometrije u odnosu na postojeće pristupe u strukturnoj karakterizaciji interakcija kompleksa metala sa proteinima, razvijena je i optimizovana metoda nano-ESI MS u negativnom jonskom modu. Pored navedenog, urađena je i doking studija koja teorijski predviđa mesta vezivanja za protein koji se pokazao kao glavni vezivni partner za odabrane komplekse. U okviru toga, ispitan je uticaj oblika (hloro, akva i hidrokso) kompleksa na odabir mesta vezivanja za protein.

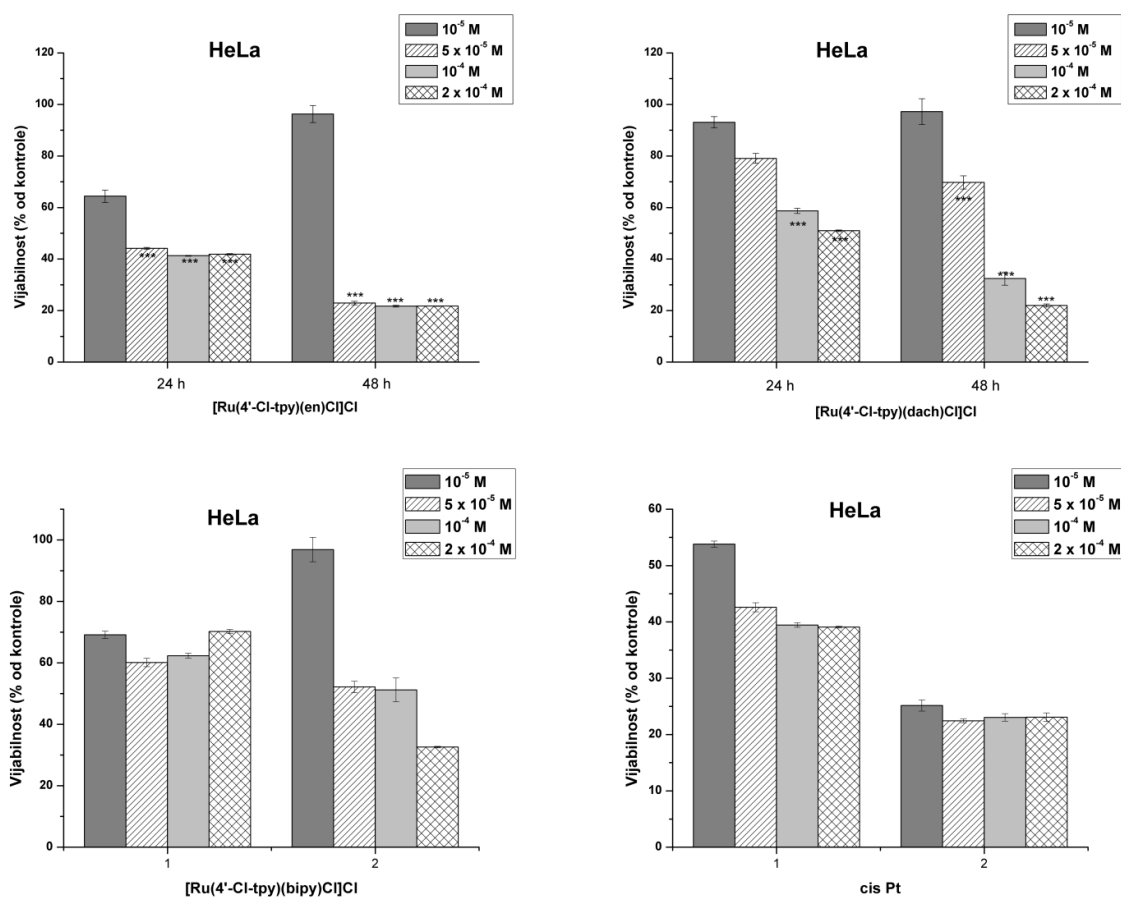
3.1 Ispitivanje citotoksičnosti terpiridinskih kompleksa Ru(II)

Citotoksičnost Ru(II) jedinjenja je ispitana na tri kancerske ćelijske linije: HeLa (kancer grlića materice), A375 (melanom) i SKBR3 (kancer dojke), nakon 24 h i 48 h inkubacije sa kompleksima. Dobijeni rezultati su upoređeni sa rezultatima koji su pod istim uslovima dobijeni za cisplatinu (*cis*-Pt). Histogrami koji prikazuju dejstvo ispitivanih koncentracija [Ru(Cl-tpy)(en)Cl]Cl (**1**), [Ru(Cl-tpy)(dach)Cl]Cl (**2**), [Ru(Cl-tpy)(bipy)Cl]Cl (**3**) i *cis*-Pt, na vijabilnost A375 ćelijske linije su prikazani na Slici 14. Tokom prva 24 h, jedinjenja **1** i **2** su pokazala relativno sličnu efikasnost kao i *cis*-Pt, dok se jedinjenje **3** pokazalo najmanje efikasnim i pri najvećoj koncentraciji nije dovelo do značajnog pada vijabilnosti ispitivane ćelijske linije. Nakon 48 h, vijabilnost ćelija je pod dejstvom većih koncentracija (100 i 200 μ M) **3** pala ispod 50% u odnosu na kontrolu. Zabeležen pad vijabilnosti pri istim koncentracijama je znatno izraženiji u slučaju **1**, **2** i *cis*-Pt, koja je i pri nižim koncentracijama (10 i 50 μ M) dovela do pada vijabilnosti ispod 25% u odnosu na kontrolu.



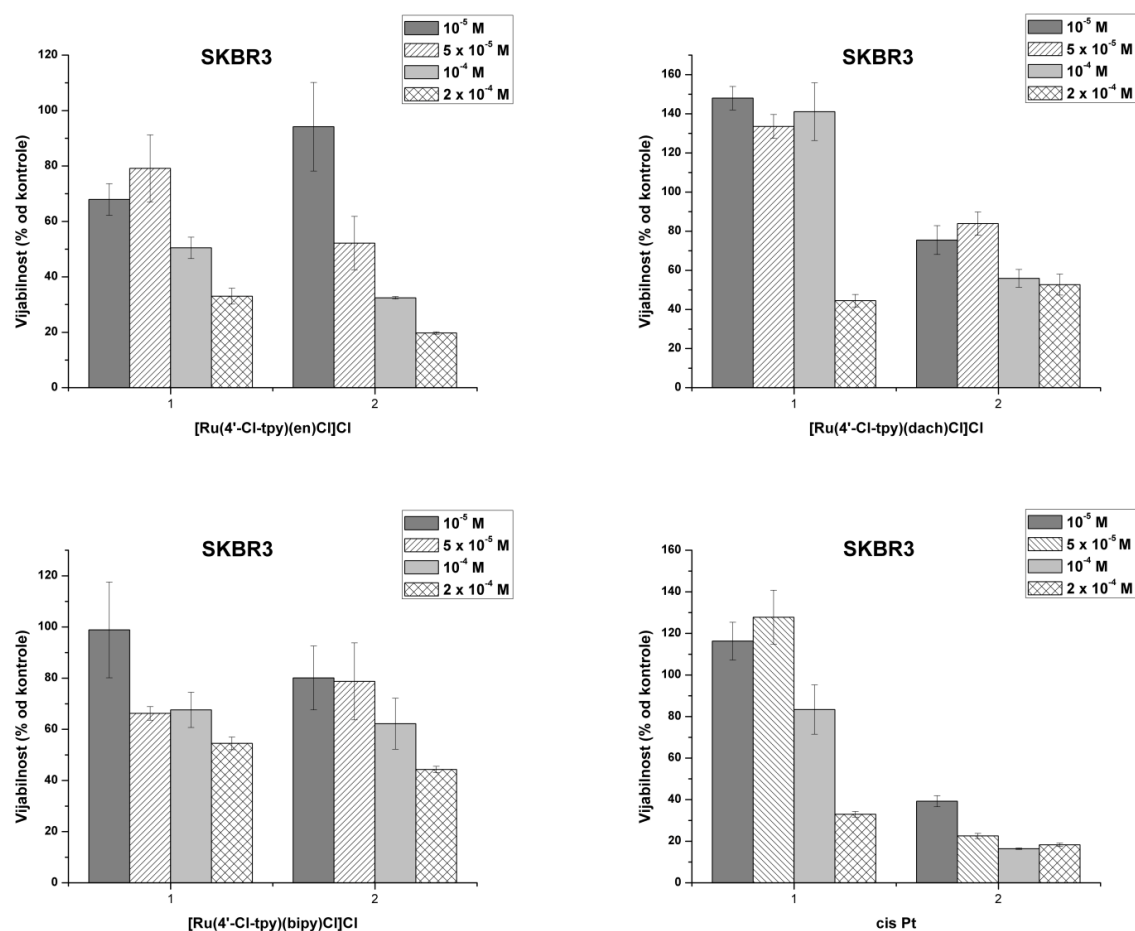
Slika 14. Histogramski prikaz efekta različitih koncentracija kompleksa **1**, **2**, **3** i *cis*-Pt na vijabilnost A375 ćelijske linije, nakon 24 h i 48 h inkubacije.

Histogrami koji prikazuju efekat različitih koncentracija ispitivanih jedinjenja na vijabilnost HeLa ćelijske linije su prikazani na Slici 15. Jedinjenje **1** je pri gotovo svim koncentracijama pokazalo veću efikasnost na HeLa ćelije nego na A375. Postignuti efekat je sličan kao i sa *cis*-Pt, već posle 24 h. Jedinjenje **2** se, kao i u slučaju A375, pokazalo nešto manje efikasnim od **1** i *cis*-Pt. Izražen pad vijabilnosti ćelija se primećuje nakon 48 h. Jedinjenje **3** se, u poređenju sa ostalim kompleksima, pokazalo najmanje efikasnim.



Slika 15. Histogramski prikaz efekta različitih koncentracija kompleksa **1**, **2**, **3** i *cis*-Pt na vijabilnost HeLa ćelijske linije, nakon 24 h i 48 h inkubacije.

Histogramski prikaz efekta ispitivanih jedinjenja na vijabilnost SKBR3 ćelijske linije je prikazan na Slici 16. Pri nižim koncentracijama, jedinjenje **1** je nakon 24 h pokazalo bolji efekat od *cis*-Pt, dok se nakon 48 h *cis*-Pt pokazala efikasnijom. Kao i u slučaju A375 i HeLa ćelijskih linija, jedinjenje **2** je pokazalo slabiji efekat na vijabilnost u poređenju sa **1** i *cis*-Pt, dok se jedinjenje **3** pokazalo najmanje efikasnim.



Slika 16. Histogramski prikaz efekta različitih koncentracija **1**, **2**, **3** i *cis*-Pt na vijabilnost HeLa ćelijske linije, nakon 24 h i 48 h inkubacije.

Dobijene IC_{50} vrednosti za efekat svakog ispitivanog jedinjenja na vijabilnost A375, HeLa i SKBR3 ćelijskih linija su prikazane u Tabeli 1.

Tabela 1. IC_{50} vrednosti (μM) za **1**, **2**, **3** i *cis*-Pt na različitim kancerskim ćelijskim linijama.

Ćelijska linija	Vreme inkubacije	1	2	3	<i>cis</i> -Pt
HeLa	24	39,2	>100	>100	23,6
	48 h	35,0	76,0	>100	<10
A375	24 h	>100	>100	>100	>100
	48 h	40,2	55,6	87,7	<10
SKBR3	24 h	>100	>100	>100	>100
	48h	55,6	>100	>100	<10

Iz dobijenih rezultata se može zaključiti da ispitivani kompleksi pokazuju manju citotoksičnu aktivnost u poređenju sa *cis*-Pt. Takođe, njihova aktivnost najverovatnije zavisi od prirode helatnog liganda: kompleksi sa en i dach ligandima, koji mogu da grade vodonične veze, su se pokazali efikasnijim. Sudeći po većoj citotoksičnosti kompleksa **1**, verovatno je i da veličina helatnog liganda ima uticaja na citotoksičnost, te da je manja veličina en u poređenju sa dach ligandom, odgovorna za nešto veću citotoksičnu aktivnost. Pored toga, mogu se uočiti i razlike u efikasnosti u zavisnosti od ispitivane ćelijske linije. Kompleks **1** se pokazao najefikasnijim u tretmanu HeLa ćelija, dok su kompleksi **2** i **3** pokazali veću citotoksičnost prema A375 ćelijama.

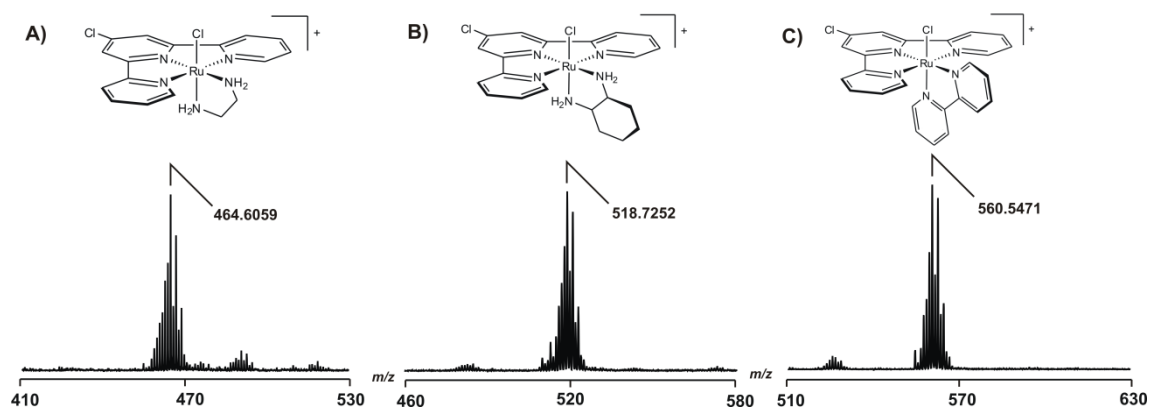
Iako se citotoksičnost novih kompleksa metala standardno poredi sa *cis*-Pt, lekom koji je najduže u kliničkoj upotrebi, treba imati u vidu da se mehanizmi dejstva kompleksa metala mogu značajno razlikovati i da rezultati citotoksičnosti ne moraju obavezno korelirati sa efikasnošću ispitivanog agensa. Preciznije, smatra se da citotoksičnost pozitivno korelira sa sposobnošću kompleksa da interaguje sa DNK molekulom. Kao što je i navedeno u uvodnom delu ove disertacije, pojedini kompleksi rutenijuma koji su odabrani kao kandidati za klinička ispitivanja imaju alternativan mehanizam dejstva i gotovo da ne pokazuju citotoksičnost prema kancerskim ćelijskim linijama.

3.2 Karakterizacija terpiridinskih kompleksa Ru(II) upotrebom MALDI MS

Upotreba MALDI MS za analizu kompleksa prelaznih metala se pokazala veoma korisnom, zato što omogućava dobijanje važnih informacija o strukturi ovih jedinjenja [155], [156]. Dobar odabir matrice je od ključnog značaja za analizu budući da mnoge matrice pokazuju tendenciju ka građenju adukata sa kompleksima metala. Pored toga, signali poreklom od matrice se najčešće detektuju u niskom m/z opsegu ($m/z < 1000$) koji je od interesa u analizi, pa je preklapanje sa signalima uzoraka malih masa veoma često. Pored toga, može doći i do suprimiranja signala od interesa zbog velikog viška matrice u smeši. Efikasnost matrice u apsorbovanju energije lasera i prenošenju iste na uzorak je takođe veoma značajno jer može doći do njegove fragmentacije što, uz već napomenute faktore, značajno otežava interpretaciju dobijenih

MS spektara. Jačina lasera treba da bude podešena u skladu sa radnim vekom lasera (pri kraju iskorištenja lasera, podešena vrednost intenziteta mora biti veća) i tipom upotrebljivane matrice. Nalaženje granice između ova dva parametra pod eksperimentalnim uslovima je ključno za produkciju MS spektara bez neželjenih fragmenata i adukata.

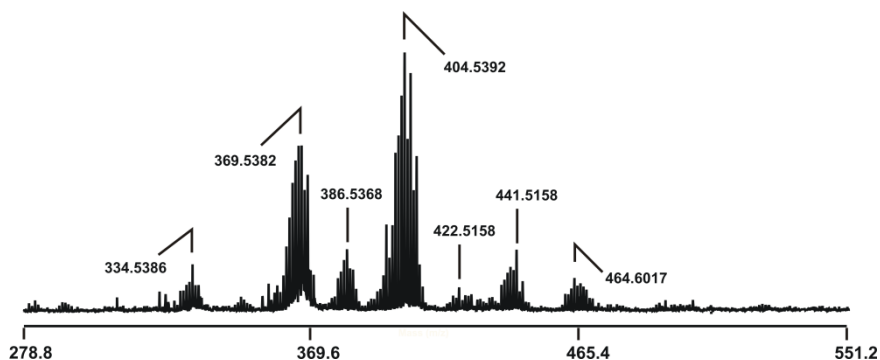
U cilju pronalaska idealne matrice i instrumentalnih uslova za analizu **1**, **2** i **3**, testirani su ditranol, mezo-tetrakis(pentafluorofenil)porfirin (MTPP), DHB i CHCA matrice. Maseni spektri su snimljeni pri različitim intenzitetima lasera kako bi se stekao uvid u fragmentaciju ispitivanih jedinjenja. Identifikacija glavnih fragmenata je bila važna za dalju upotrebu MALDI MS u identifikaciji ciljnih sekvencija kod ispitivanja interakcija **1**, **2** i **3** sa proteinima (Poglavlje 3.7.2). Primenom intenziteta lasera blago iznad praga jonizacije, koji je u ovom slučaju iznosio 50% relativnog intenziteta, bilo je moguće dobiti signale poreklom od intaktnih **1**, **2** i **3** (Slika 17) samo u slučaju kada je ditranol korišćen kao matrica.



Slika 17. MALDI MS spektri jedinjenja **1** (A), **2** (B) i **3** (C) pri 50% relativnog intenziteta lasera, sa ditranolom kao matricom. Strukturne formule kompleksa su prikazane iznad detektovanih signala.

Povećanjem relativnog intenziteta lasera na 80%, detektovana su dva glavna signala koja odgovaraju $[\text{Ru}(4' \text{ Cl-tpy})\text{Cl}]^+$ i $[\text{Ru}(4' \text{ Cl-tpy})]^+$ fragmentima u slučaju sva tri ispitivana kompleksa. Spektar jedinjenja **1** sa signalima na m/z 404 i m/z 369 koji odgovaraju opisanim fragmentima, prikazan je na Slici 18. Ovi fragmenti su nastali gubitkom en/dach/bipy, odnosno en/dach/bipy i Cl liganada. Pored njih, u spektru je detektovano još nekoliko signala koji odgovaraju $[\text{Ru}(\text{tpy})]^+$ (m/z 334), $[\text{Ru}(4' \text{ Cl-}$

$\text{tpy})(\text{H}_2\text{O})]^+$ (m/z 386), $[\text{Ru}(4' \text{ Cl-tpy})(\text{H}_2\text{O})\text{Cl}]^+$ (m/z 422) i $[\text{Ru}(4' \text{ Cl-tpy})(\text{H}_2\text{O})_2\text{Cl}]^+$ (m/z 441), koji se takođe mogu videti na Slici 18.



Slika 18. MALDI MS spektar jedinjenja **1** pri 80% relativnog intenziteta lasera, sa ditranolom kao matricom.

Adukti sa matricom nisu detektovani pri ispitivanim eksperimentalnim uslovima. Pik na m/z 227 poreklom od ditranola, nije ometao analizu. Sličan efekat je primećen i u analizi relativne jačine vezivanja kod serije terpiridinskih kompleksa metala korišćenjem MALDI MS [157]. U toj studiji je pokazano da su kompleksi koji su za metalni jon imali Cd, Co, Cu, Fe, Mn ili Ni gradili adukte sa ditranolom. Međutim, adukti Ru kompleksa sa istom matricom nisu detektovani. Korišćenjem MTPP i DHB matrice, jedinjenja **1**, **2** i **3** su na isti način fragmentisala već pri relativnom intenzitetu lasera od 50%, dok je kod CHCA matrice pored fragmentacije došlo i do formiranja adukata sa ispitivanim jedinjenjima [158]. Detektovane vrste su iste i u slučaju **2** i **3**. Na osnovu navedenog se može zaključiti da se intaktne vrste kompleksa koje sadrže helatne ligande mogu detektovati samo sa ditranolom, pri nižim intenzitetima lasera ($\sim 50\%$ relativnog intenziteta). Ovi rezultati mogu biti od značaja i za analizu drugih kompleksa rutenijuma, naročito u slučajevima kada se MALDI MS koristi za određivanje tačne mase sa svrhom potvrde sinteze novih jedinjenja.

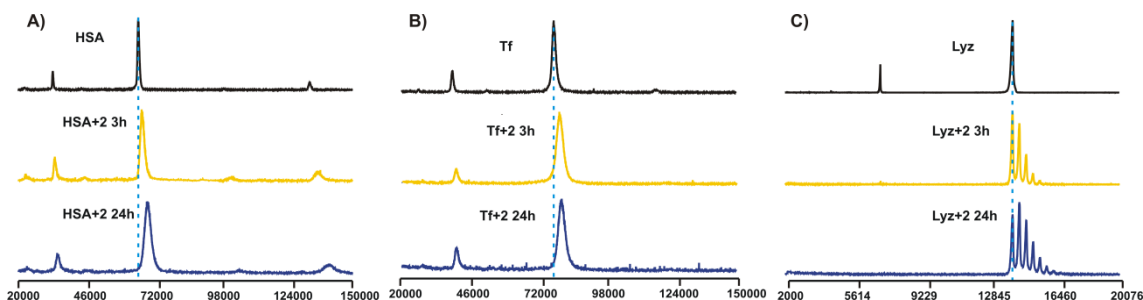
3.3 Ispitivanje vezivanja terpiridinskih kompleksa Ru(II) za HSA i Tf upotrebom MALDI MS

U literaturi postoji nekolicina radova u kojima je MALDI MS korišćen za ispitivanje vezivanja kompleksa metala za proteine male [159] i velike [160] molekulske mase. Kod analize proteina u nižem m/z opsegu, rezolucija instrumenta

omogućava razlikovanje signala poreklom od vezanog i nevezanog proteina. Kako bi se ispitala pouzdanost metode za detekciju proizvoda interakcije ispitivanih Ru(II) kompleksa sa proteinima, najpre je ispitano vezivanje kompleksa **2** za lizozim (Lyz), model protein male molekulske mase (14 kDa). Na Slici 19C je prikazan spektar lizozima i njegovih adukata sa kompleksom **2** nakon 3 h i 24 h inkubacije. Na spektrima se jasno razlikuje signal poreklom od Lyz za koji kompleks nije vezan, od signala Lyz za koji je vezano pet (3 h) ili sedam (24 h) molekula **2**. Takođe, uočljive su razlike u intenzitetu signala sa porastom vremena inkubacije, tako da, posle 24 h, slobodan lizozim više nije najzastupljenija vrsta, već njegov adukt sa vezanim jednim molekulom kompleksa **2**. Razlike u masi između pikova ukazuju na to da se vezani kompleks detektuje u vidu fragmenta $[\text{Ru}(4' \text{ Cl-tpy})]^{2+}$.

Vezivanje odabranih Ru(II) jedinjenja za HSA i Tf je takođe ispitano i potvrđeno MALDI MS-om u linearnom modu, koji se najčešće i koristi za analizu celih proteina i jedinjenja velikih molekulske masa. Na Slici 19A su prikazani spektri samog HSA i njegovih adukata sa jedinjenjem **2**, nakon 3 h i 24 h inkubacije pri molarnom odnosu proteina prema kompleksu od 1:10. Na spektrima adukata se mogu primetiti promene koje uključuju pomeraj ka višim m/z vrednostima prilikom porasta vremena inkubacije, kao i širenje pika u odnosu na slobodan protein. Na osnovu razlike između detektovane mase slobodnog proteina (66483 Da) i njegovih adukata sa kompleksom **2** (68213 Da nakon 3h i 69902 Da nakon 24 h), može se steći uvid u broj vezanih molekula kompleksa. Uzimajući u obzir masu $[\text{Ru}(4' \text{ Cl-tpy})(\text{dach})]^{2+}$ i njegovog fragmenta $[\text{Ru}(4' \text{ Cl-tpy})]^{2+}$, dobijena razlika odgovara vezivanju 4-5 molekula nakon 3 h, odnosno 8-9 molekula kompleksa **2** nakon 24 h. U slučaju jedinjenja **1**, dobijene vrednosti su 4-5 molekula nakon 3 h i 7-8 molekula nakon 24 h. Pri vezivanju jedinjenja **3** su detektovani najmanji pomeraji, koji odgovaraju vezivanju 1 ili 2 molekula, čak i nakon 24 h inkubacije.

Na isti način je detektovano vezivanje ispitivanih jedinjenja za Tf (Slika 19B). Detektovana masa samog Tf iznosi 79136 Da, dok su mase njegovih adukata sa kompleksom detektovane na 80029 Da (3 h) i 80722 Da (24 h), što odgovara vezivanju 2-3, odnosno 3-4 molekula **2**. U slučaju jedinjenja **1**, vrednosti su 1-2, odnosno 2-3 nakon 3 h i 24 h, respektivno. Nakon inkubacije Tf sa jedinjenjem **3** nisu primećene značajne razlike, što može značiti da je interakcija ovog kompleksa sa proteinom slaba.



Slika 19. MALDI MS spektri HSA (A), Tf (B) i Lyz (C) i njihovih adukata sa **2**, oformljenih nakon 3 h i 24 h inkubacije. Spektri su snimljeni u linearnom jonskom modu, a kao matrica je korišćena sinapinska kiselina.

Kod analize proteina veće molekulske mase, kakvi su HSA i Tf, kompleksnost izotopske raspodele onemogućava razlikovanje signala poreklom od proteina za koje su vezani i onih za koje nisu vezani kompleksi. Međutim, jasno je da takva mikroheterogenost uzorka postoji i da je to uzrok širenja pikova HSA i Tf nakon inkubacije sa kompleksima. Fragmentacija kompleksa, kao i greška merenja na velikim masama su dodatni uzroci zbog kog se tačna stehiometrija vezivanja ne može odrediti ovom metodom, na način na koji je određena za lizozim. Međutim, kao što je i pokazano, ova metoda može služiti za brzu potvrdu vezivanja i aproksimativnu procenu broja vezanih molekula. U ovom slučaju, najveći maseni pomerači su detektovani kod vezivanja jedinjenja **2**, i za HSA i za Tf. Za određivanje preciznije stehiometrije vezivanja su korišćene druge metode, o čemu će biti reči u narednom delu disertacije.

3.4 Određivanje stehiometrije vezivanja terpiridinskih kompleksa Ru(II) za HSA i Tf

Optička emisiona spektroskopija sa induktivno kuplovanom plazmom (*engl.* Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy, ICP OES) je korišćena za određivanje stehiometrije vezivanja jedinjenja **1**, **2** i **3** za HSA i Tf. Radi poređenja, stehiometrija vezivanja za ispitivane proteine je određena i za *cis*-Pt.

Metoda se zasniva na uvođenju uzorka u plazmu koja dostiže temperature i do 10 000 K, a u kojoj dolazi do njihovog razlaganja do atoma i jona. Daljom kolizionom ekscitacijom, dobijene vrste prelaze u pobuđeno stanje. Pri spontanom prelasku iz pobuđenog u osnovno stanje dolazi do emisije fotona, čije se talasne dužine koriste za

identifikaciju elemenata od kojih vode poreklo. Dakle, svaki element prisutan u plazmi se karakteriše talasnom dužinom emisione linije na osnovu koje se vrši kvalitativna analiza, dok se kvantitativna analiza vrši na osnovu intenziteta linija [161].

Sva tri Ru(II) jedinjenja i *cis*-Pt su zasebno inkubirana sa HSA i Tf u molarnom odnosu proteina prema kompleksu od 1:10, tokom 24 h. U slučaju HSA, alikvot je uzet za analizu i nakon 3 h inkubacije. Nevezani kompleksi su uklonjeni ultrafiltracijom. ICP OES analiza adukata proteina i ispitivanih kompleksa je pokazala da se sva tri Ru(II) jedinjenja vezuju za metal-transportne proteine: HSA i Tf, premda u različitoj meri (Tabela 2).

Tabela 2. Sadržaj metala (Ru/Pt) u aduktima HSA/Tf sa **1**, **2**, **3** i *cis* Pt određen ICP OES-om. r_i predstavlja početni molarni odnos proteina prema kompleksu u inkubacionoj smeši; r_b označava količinu Ru/Pt u aduktima izraženu u molima metala po molu proteina \pm SD triplikata merenja.

r_i		r_b			
HSA/metal	1	2	3	cisplatina	
1:10 (3h)	4,60 \pm 0,12	5,30 \pm 0,20	1,11 \pm 0,22	1,28 \pm 0,05	
1:10 (24h)	6,92 \pm 0,42	8,35 \pm 0,25	1,51 \pm 0,15	4,00 \pm 0,01	
Tf/metal	1	2	3	cisplatina	
1:10 (24h)	2,75 \pm 0,30	3,36 \pm 0,10	0,35 \pm 0,01	2,00 \pm 0,01	

Kako se broj vezanih molekula kompleksa za HSA povećava sa vremenom inkubacije, može se zaključiti da 3 h inkubacije nije dovoljno dug vremenski period za kompletno vezivanje proučavanih jedinjenja za ovaj protein. Pokazano je da se jedinjenje **2** u najvećoj meri vezuje za oba ispitivana proteina, kao i da HSA pokazuje veći vezivni kapacitet od Tf u slučaju sva tri Ru(II) kompleksa (Tabela 2). Izračunata stehiometrija vezivanja *cis*-Pt za HSA i Tf je u dobrom slaganju sa literaturnim vrednostima u kojima se navodi da pri molarnom odnosu proteina prema leku od 1:10, HSA vezuje~ 4 molekula *cis*-Pt, kao i da pri molarnom odnosu proteina prema leku od 1:5, Tf vezuje~2 molekula *cis*-Pt [116], [162].

Budući da biološka sudbina potencijalnog leka na bazi kompleksa metala u velikoj meri zavisi od raspodele između njegovog slobodnog i vezanog oblika, mera u kojoj se neki lek vezuje za glavne proteine plazme utiče na njegovo biološko dejstvo

[163], [164]. Informacije o stehiometriji vezivanja Ru(III) kompleksa za proteine humanog seruma su dostupne u većem broju naučnih radova, dok su Ru(II) kompleksi u tom kontekstu znatno manje proučavani. Npr., pokazano je da Tf može vezati najmanje pet ekvivalenata KP1019 [112]. Dobijeni rezultati po inkubaciji sa **1** i **2** pokazuju da je sardžaj Ru vezanog za Tf približno tri puta veći nego što je to slučaj sa Ru(II) jedinjenjima tipa $[\text{Ru}(\eta^6\text{-aren})(\text{en})\text{Cl}][\text{PF}_6]$ [116].

Rezultati dobijeni u ovom eksperimentu su u dobrom slaganju sa procenom vezivanja dobijenom uz pomoć MALDI MS. Iako je ICP OES metoda dala preciznije rezultate, treba imati u vidu da i ova metoda daje samo prosečnu vrednost vezanih molekula kompleksa. Kao što je i pokazano ispitivanjem vezivanja kompleksa za lizozim upotrebom MALDI MS, neki molekuli proteina u ispitivanoj smeši imaju manje, dok neki imaju više vezanih molekula kompleksa.

3.5 Određivanje afiniteta vezivanja terpiridinskih kompleksa Ru(II) za HSA i Tf

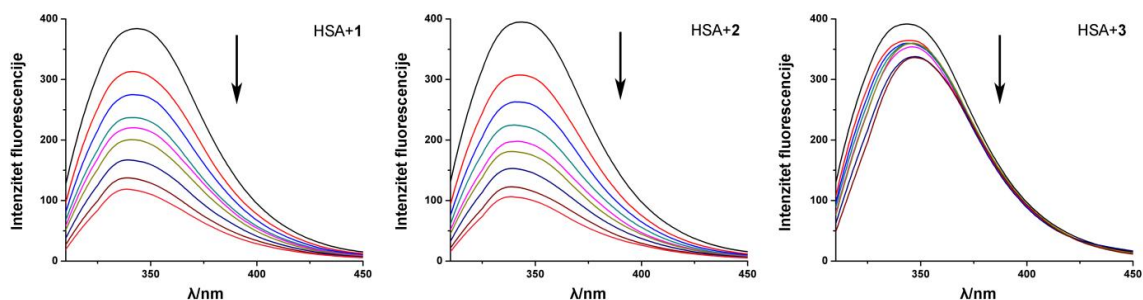
Pored stehiometrije vezivanja, na biološku aktivnost potencijalnih antitumorskih lekova na bazi metala utiče i jačina interakcije koju ostvaruju sa glavnim transportnim proteinima seruma. Od ovog parametra zavisi i koncentracija otpuštenog leka u tumorskom tkivu. Shodno tome, uz pomoć fluorescencije su određeni relativni afiniteti vezivanja ispitivanih kompleksa za HSA i Tf (izraženi kao konstante vezivanja, K_b). Ekscitaciona talasna dužina na 295 nm je odabrana jer odgovara isključivo ekscitaciji ostataka Trp u proteinima [165], [166].

3.5.1 Vezivanje kompleksa Ru(II) za HSA

Eksperimenti gašenja fluorescencije su urađeni nakon što su različite količine jedinjenja **1**, **2** i **3** (0-31,25 μM) dodate rastvoru HSA (2,5 μM) u 20 mM PBS-u pH 7,4, i inkubirane 24 h na 37 °C. Slika 20 pokazuje promene u intenzitetu fluorescencije HSA u prisustvu rastuće količine ispitivanih jedinjenja **1** (HSA+**1**), **2** (HSA+**2**) i **3** (HSA+**3**). Znatan, koncentraciono zavisani, pad HSA fluorescencije je detektovan u slučaju jedinjenja **1** i **2**. Pri molarnom odnosu proteina prema kompleksu od 1:5, jedinjenja **1** i **2** gase fluorescenciju HSA tako da vrednosti intenziteta fluorescencije iznose 53% (**1**),

odnosno 47% (**2**) od početne vrednosti. Jako gašenje fluorescencije Trp-214 ostatka ukazuje na konformacione promene u hidrofobnoj šupljini subdomena IIA, gde se ovaj ostatak i nalazi na proteinu [166]. Ove promene su najverovatnije posledica vezivanja kompleksa **1** i **2** za HSA. Po ekscitaciji na 295 nm, ni jedno od tri ispitivana jedinjenja nije pokazalo emisiju fluorescencije u opsegu od 310 do 450 nm.

Karakteristični HSA emisioni maksimum se pomera sa 347 nm na 342 nm za HSA+**1**, odnosno 339 nm za HSA+**2** (Slika 20). Detektovani plavi pomeraj se neretko uočava kod formiranja adukata HSA i Ru koordinacionih jedinjenja. Do pomeraja dolazi usled vezivanja jedinjenja, što utiče na mikrookolinu Trp-214 na način da ona postaje hidrofobnija [167]. U poređenju sa **1** i **2**, jedinjenje **3** je u mnogo manjoj meri dovelo do gašenja fluorescencije HSA: pri molarnom odnosu HSA prema **3** od 1:10, jedinjenje **3** je snizilo intenzitet fluorescencije HSA na oko 90% od početne vrednosti. Plavi pomeraj u ovom slučaju nije detektovan.



Slika 20. Emisioni spektri fluorescencije HSA i njegovih adukata sa Ru(II) terpiridinskim jedinjenjima **1** (HSA+**1**), **2** (HSA+**2**) i **3** (HSA+**3**). Emisioni intenziteti su korigovani za unutrašnji filter efekat. Na spektrima se uočava gašenje fluorescencije proteina u prisustvu rastuće koncentracije kompleksa, što ukazuje na vezivanje kompleksa za protein.

Intenziteti fluorescencije su korigovani za unutrašnji filter efekat korišćenjem jednačine (1).

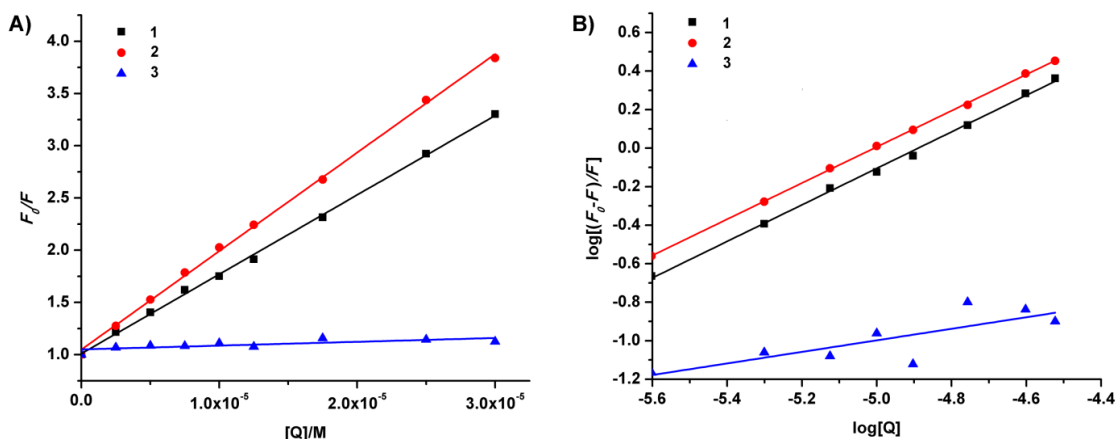
$$F_{cor} = F_{obs} \times 10^{\frac{A_{ex} + A_{em}}{2}} \dots\dots\dots(1)$$

Skraćenice F_{cor} i F_{obs} se odnose na korigovane i izmerene vrednosti intenziteta fluorescencije, dok su A_{ex} i A_{em} ekscitaciona i emisiona talasna dužina.

Stern-Volmerova konstanta je izračunata preko jednačine (2):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \dots \dots \dots (2)$$

F_0 i F su intenziteti fluorescencije u odsustvu i prisustvu gasitelja (ispitivanih Ru jedinjenja), K_q je biomolekularna konstanta gašenja, τ_0 poluživot fluorofore u odsustvu gasitelja, $[Q]$ je koncentracija gasitelja, a K_{SV} Stern-Volmerova konstanta.



Slika 21. Stern-Volmerov grafik zavisnosti F_0/F od koncentracije ispitivanih Ru(II) jedinjenja (A) i zavisnost $\log(F_0-F)/F$ od $\log[Q]$ za vezivanje jedinjenja **1**, **2** i **3** za HSA (B).

Kako je Stern-Volmerov grafik linearan (Slika 21A) u opsegu koncentracija gasitelja od najmanje 12,5 puta viška u odnosu na koncentraciju HSA, može se pretpostaviti da je u slučaju sva tri jedinjenja prisutna jedna vrsta gašenja [165]. Izračunate Stern-Volmerove konstante su prikazane u Tabeli 3. Vrednosti K_{SV} su takve da je $2 > 1 \gg 3$.

Tabela 3. Vrednosti K_{SV} , K_q i R dobijeni iz eksperimenata gašenja fluorescencije HSA.

Ru(II) kompleks	$K_{SV} (10^4 M^{-1})$	$K_q (10^{12} M^{-1} s^{-1})$	R
1	$7,25 \pm 0,13$	$12,08 \pm 0,21$	0,9989
2	$8,7 \pm 0,16$	$14,48 \pm 0,27$	0,9988
3	$0,37 \pm 0,73$	$0,62 \pm 0,12$	0,9009

Bimolekularna konstanta gašenja, K_q je izračunata iz K_{SV} konstante uz pomoć jednačine (2) i pretpostavke da je $\tau_o = 6$ ns za HSA. Maksimalna vrednost K_q koja može biti rezultat kolizionog gašenja biopolimera je $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [165]. Kako su dobijene vrednosti K_q znatno veće od ove vrednosti, pogotovo u slučaju **1** i **2**, može se zaključiti da je u reakciji ispitivanih jedinjenja predominantno statičko gašenje fluorescencije HSA (tj. formiranje kompleksa u osnovnom stanju).

Konstante vezivanja (K_b) i broj mesta vezivanja (n) jedinjenja **1**, **2** i **3** na HSA su izračunati iz jednačine (3):

$$\log \frac{F_o - F}{F} = \log K + n \log [Q] \dots \dots \dots (3)$$

K_b su izračunate iz odsečaka, a n iz nagiba pravih na grafiku zavisnosti $\log F_o - F/F$ od $\log [Q]$ (Slika 21B). Njihove vrednosti su prikazane u Tabeli 4.

Tabela 4. Konstante vezivanja (K_b) i broj mesta vezivanja (n) jedinjenja **1**, **2** i **3** za HSA.

Ru(II) kompleks	K_b (M^{-1})	n	R
1	$(7,19 \pm 0,0001) \times 10^4$	$1,00 \pm 0,02$	0,9985
2	$(8,59 \pm 0,0001) \times 10^4$	$1,00 \pm 0,01$	0,9994
3	$6,72 \pm 3,87$	$0,41 \pm 0,12$	0,8193

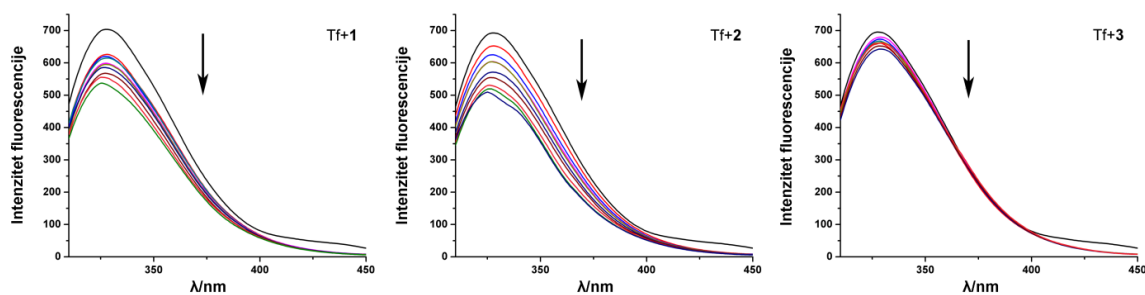
Iako su vrednosti K_b i za **1** i za **2** u okviru 10^4 - 10^5 M^{-1} , **2** se pokazao kao nešto bolji vezivni partner za HSA od jedinjenja **1** (Tabela 4). Kako je jedinjenje **3** pokazalo veoma slabu efikasnost u gašenju fluorescencije HSA, njegova veoma niska konstanta vezivanja je očekivana. Relativno visoke vrednosti K_b za **1** i **2** reflektuju umerene do jake interakcije između ovih jedinjenja i HSA, što ukazuje na formiranje stabilnih adukata. Nasuprot njima, niska K_b za **3** ukazuje na njegovo slabo vezivanje za ispitivani protein i, posledično, lošu distribuciju u plazmi.

U literaturi se mogu naći slične vrednosti za K_b , u opsegu od 10^4 do 10^5 M^{-1} , za vezivanje Ru(II) arenskih jedinjenja za HSA [168]. Takođe, Ru(II) polipiridil jedinjenja koja poseduju bipy ili phen ligande se za HSA vezuju konstantom reda veličine 10^5 M^{-1} [169]. U skladu sa literaturnim podacima, fluorescencijom je određeno jedno vezivno mesto za **1** i **2** na HSA. Međutim, treba imati u vidu da broj mesta vezivanja određen na

ovakav način reflektuje samo ona vezivna mesta koja se nalaze u blizini Trp ostataka i ne isključuje postojanje većeg broja vezivnih mesta, kao što je u slučaju ovih jedinjenja i dokazano drugim metodama opisanim u ovom radu.

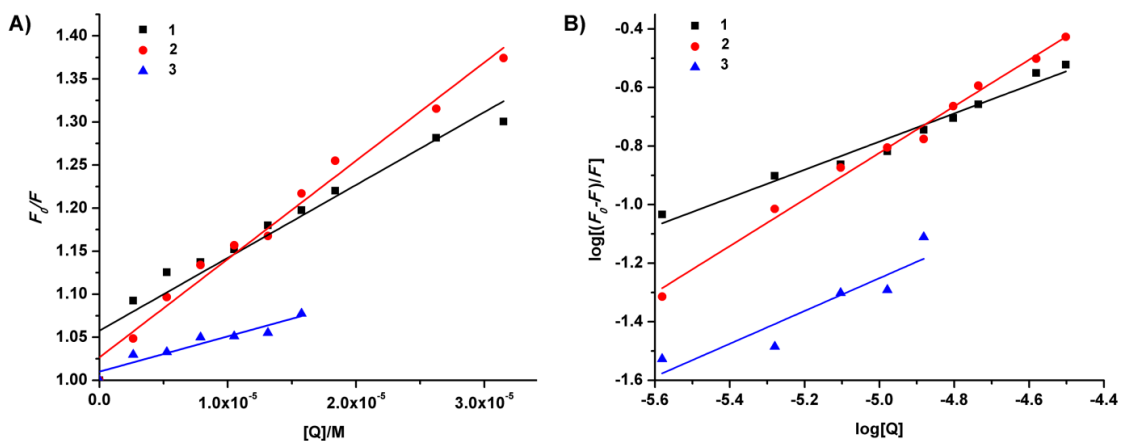
3.5.2 Vezivanje kompleksa Ru(II) za Tf

Merenja intenziteta fluorescencije su urađena nakon inkubacije (24 h, 37 °C) rastvora Tf (2,6 μM) sa različitim količinama jedinjenja **1**, **2** i **3**. Intravenozna administracija natrijumove soli indazolium *trans*-[tetrahlorobid(1*H*-indazol) rutenat(III)] (KP1339) rezultuje u dvadesetostrukom molarnom višku ovog jedinjenja u odnosu na Tf u krvi [8]. Stoga je i u ovom eksperimentu korišćen sličan molarni odnos Tf prema svakom od ispitivanih jedinjenja. Slika 22 prikazuje gašenje intenziteta fluorescencije Tf sa porastom koncentracije Ru(II) jedinjenja. U slučaju **1** i **2**, intenzitet fluorescencije na emisionom maksimumu (327 nm) pri molarnom odnosu od 1:10 opada na 81% i 77% početne vrednosti. Jedinjenje **2** pokazuje nešto veći vezivni afinitet za Tf nego **1**, dok se vezivanje **3** može smatrati zanemarljivim budući da pri maksimalnom gašenju intenzitet iznosi 97% vrednosti F_0 . Prestanak gašenja fluorescencije Tf je detektovan pri molarnim odnosima većim od 1:12,5 (Tf+**2**), 1:10 (Tf+**1**) i 1:7 (Tf+**3**).



Slika 22. Emisioni spektri fluorescencije Tf i njegovih adukata sa Ru(II) terpiridinskim jedinjenjima **1** (Tf+**1**), **2** (Tf+**2**) i **3** (Tf+**3**). Emisioni intenziteti su korigovani za unutrašnji filter efekat.

Izmereni intenziteti fluorescencije su korigovani za unutrašnji filter efekat uz pomoć jednačine (1). Stern-Volmerove konstante su izračunate iz jednačine (2). Linearni oblik grafika (Slika 23A) ukazuje na prisustvo jednog tipa gašenja [170]. K_{sv} konstante su, kao i u slučaju HSA, izračunate iz nagiba pravih.



Slika 23. Stern-Volmerov grafik zavisnosti F_0/F od koncentracije ispitivanih Ru(II) jedinjenja (A) i zavisnost $\log F_0-F/F$ od $\log[Q]$ za vezivanje jedinjenja **1**, **2** i **3** za Tf (B).

Pod pretpostavkom da je $\tau_0 = 6$ ns za Tf [170], izračunate su vrednosti za K_q (Tabela 5). Prema jednačini (3) (grafički prikaz na Slici 23B) izračunati su konstanta asocijacije (K_{app}) i broj mesta vezivanja n (Tabela 5).

Tabela 5. Vrednosti K_{SV} , K_q , K_{app} i n za vezivanje ispitivanih Ru(II) jedinjenja za Tf.

Ru(II) kompleks	$K_{SV} (10^3 M^{-1})$	$K_q (10^{12} M^{-1} s^{-1})$	R	$K_{app} (10^2 M^{-1})$	n	R
1	$7,51 \pm 0,60$	$1,25 \pm 0,09$	0,9782	$0,64 \pm 0,02$	$0,54 \pm 0,04$	0,9793
2	$11,52 \pm 0,41$	$1,90 \pm 0,07$	0,9949	$10,00 \pm 0,01$	$0,77 \pm 0,04$	0,9916
3	$2,39 \pm 0,55$	$0,40 \pm 0,09$	0,8878	$0,025 \pm 0,03$	$0,36 \pm 0,08$	0,9298

Dobijene vrednosti K_{SV} za jedinjenja **1** i **2** su relativno slične vrednostima dobijenim za vezivanje NAMI-A za apo-Tf ($12,8 \times 10^3 M^{-1}$) [170]. Vrednost K_q reda veličine $10^{12} M^{-1} s^{-1}$ sugeriše isti tip vezivanja **1** i **2** za Tf. Razlog slabog vezivanja kompleksa **3** za protein je verovatno u prirodi bipy liganada, odnosno nemogućnosti istog da gradi klasične vodonične veze sa amino-kiselinskim ostacima na proteinu.

Nasuprot HSA, koji ima samo jedan Trp-214 kao fluoroforu, humani Tf poseduje osam ostataka Trp [171]. Budući da su svi ovi ostaci manje ili više osetljivi na

promene u mikrookolini, analiza fluorescencijom je teža. Vezivanje koje bi dovelo do gašenja fluorescencije svih Trp ostataka nije verovatno [170]. Ovo je evidentno i iz samog poređenja snimljenih emisionih spektara koji pokazuju različitu efikasnost gašenja fluorescencije vezivanjem ispitivanih kompleksa za HSA i Tf. Stoga, izračunate vrednosti za vezivne konstante ne predstavljaju istinske K_b , već rađe K_{app} .

Osim par izuzetaka koji se tiču jedinjenja koja su ušla u klinička istraživanja, postoji jako malo literaturnih podataka o K_{app} za vezivanje Ru koordinacionih jedinjenja za Tf. Jedan od primera je KP1019 koji se vezuje za Tf konstantom asocijacije od 5,6-6,5 x 10³ M⁻¹ [172], [173]. Od ispitivanih kompleksa **1**, **2** i **3**, vrednost K_{app} za kompleks **2** je najbliža vrednosti dobijenoj za KP1019, dok je vezivanje kompleksa **1** i **3** znatno slabije.

Iz podataka dobijenih fluorescencijom se može zaključiti da ispitivani Ru(II) kompleksi imaju znatno veći afinitet prema HSA u poređenju sa Tf, koji je u oba slučaja **2** > **1** >> **3**.

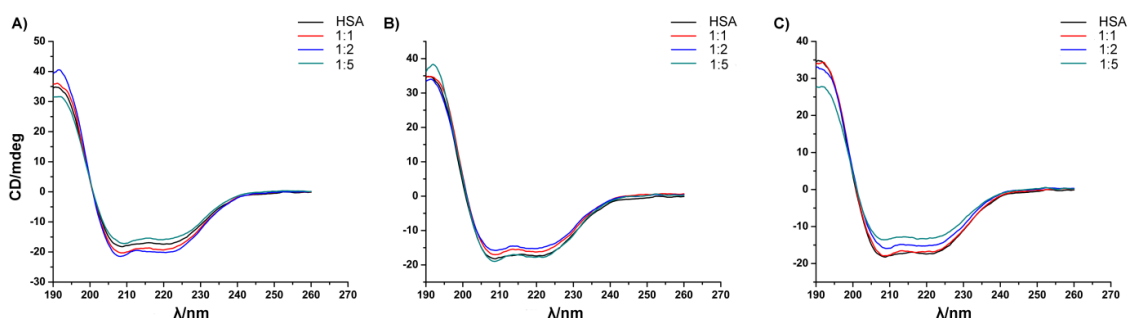
3.6 Ispitivanje uticaja vezivanja terpiridinskih kompleksa Ru(II) na konformacione promene HSA i Tf

Vezivanje kompleksa za proteine može dovesti do promena u njihovoj strukturi. Promene u nativnoj konformaciji proteina mogu uticati na njegovu funkciju, a velike promene su najčešće biološki signal za degradaciju proteina. Imajući to u vidu, uticaj vezivanja jedinjenja **1**, **2** i **3** na sekundarnu i tercijarnu strukturu HSA i Tf je ispitan CD spektroskopijom.

Efekat cirkularnog dihroizma se zasniva na različitoj apsorpciji levo i desno cirkularno polarizovane svetlosti i javlja se kod hiralnih (optički aktivnih) jedinjenja. Kod proteina, hromofore od interesa uključuju peptidnu vezu (apsorpcija ispod 240 nm), ostatke aromatičnih amino kiselina (apsorpcija u opsegu od 260 nm do 320 nm) i disulfidne veze (blaga široka apsorpciona traka centrirana na oko 260 nm) [174].

3.6.1 Uticaj vezivanja kompleksa na sekundardnu strukturu HSA i Tf

CD spektri samog HSA i njegovih adukata sa ispitivanim Ru(II) kompleksima su prikazani na Slici 24. Spektri su snimljeni u dalekoj UV oblasti i reflektuju sekundardnu strukturu proteina, kao i promene nastale kao posledica vezivanja Ru(II) jedinjenja.

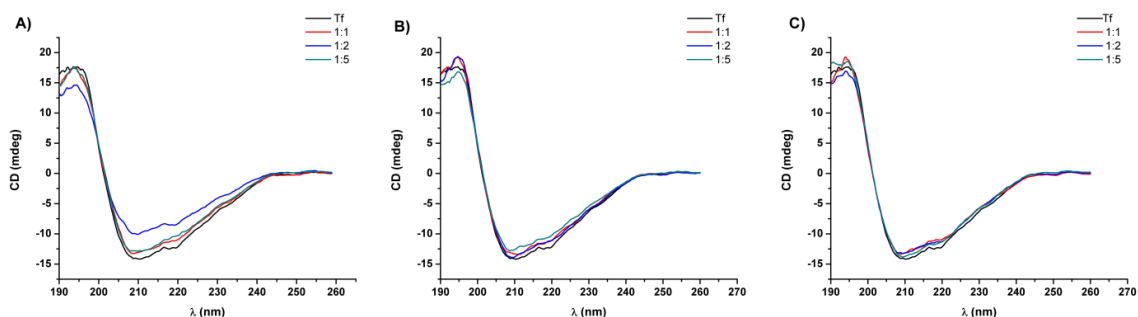


Slika 24. Spektri humanog serum albumina i njegovih adukata sa Ru(II) terpiridinskim jedinjenjima **1** (A), **2** (B), and **3** (C), snimljeni u dalekoj UV oblasti. Promene u sekundarnoj strukturi su praćene po inkubaciji različitih molarnih odnosa proteina i kompleksa.

Na CD spektru slobodnog HSA se uočava intenzivna negativna traka sa dva signala na 209 i 222 nm, što je u dobrom slaganju sa literaturnim podacima za ovaj protein [175], [176]. Kako je prisustvo negativnih maksimuma na oko 208 i 228 nm karakteristično za α heliks [177], može se zaključiti da dobijeni spektar reflektuje pretežno α helikalnu strukturu proteina.

Poređenjem spektra slobodnog HSA sa spektrima njegovih adukata sa Ru(II) kompleksima, može se primetiti da ne dolazi do značajnih promena u sekundarnoj strukturi nakon vezivanja ispitivanih Ru(II) jedinjenja, te da spektri adukata zadržavaju isti oblik kao i u slučaju slobodnog proteina. Intenzitet negativnih pikova na 209 i 222 nm pokazuje vrlo diskretne promene nakon formiranja adukata (Tabela 1, Prilog 1). Maksimalna razlika između dva merenja istog uzorka, uzrokovana komplikovanim pakovanjem u rasklopivu kivetu, je iznosila 2,6 mdeg. Sve razlike u elipticitetu koje su veće od ove vrednosti se mogu smatrati promenama u sekundarnoj strukturi. Shodno tome, dve minimalne promene su detektovane u slučaju HSA/**1** adukta pri molarnom odnosu 1:2 (blago stabilišuća) i HSA/**3** adukta pri odnosu 1:5 (blago destabilišuća).

U slučaju slobodnog Tf, na CD spektru se takođe može uočiti intenzivna negativna traka sa dva signala na 209 i 222 nm (Slika 25). Oblik spektra pokazuje da je sekundarna struktura Tf pretežno sačinjena od naizmenično postavljenih α heliksa i β pločica [102], što je u dobrom slaganju sa literaturnim podacima [178]. Vezivanje jedinjenja **2** i **3** skoro da nije dovelo do promena u sekundarnoj strukturi Tf (Tabela 2, Prilog 1). Nedostatak bilo kakvih promena u slučaju jedinjenja **3** je očekivan, shodno veoma niskoj vrednosti K_{app} (Tabela 5) i niskoj stehiometriji vezivanja (Tabela 2). Blaga destabilizacija α heliksa je detektovana samo u slučaju jedinjenja **1**, pri molarnom odnosu proteina prema kompleksu od 1:2.

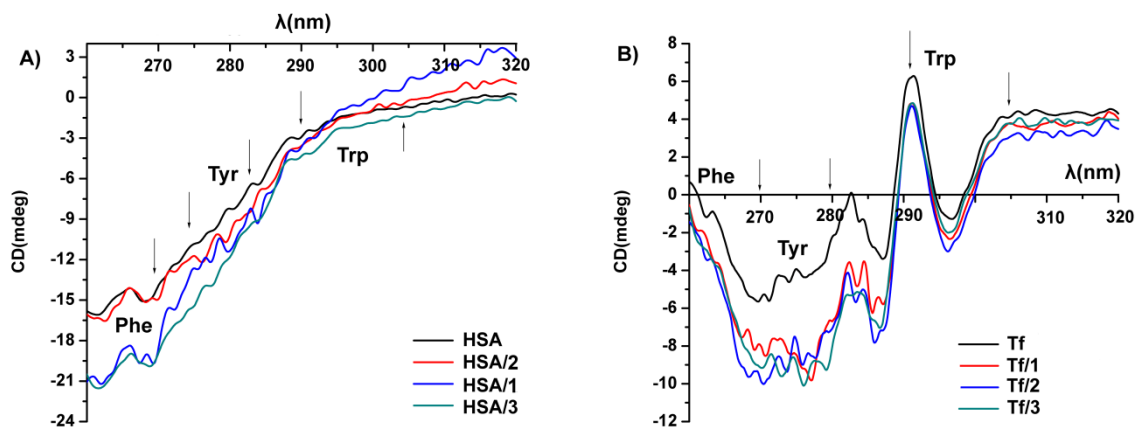


Slika 25. CD spektri transferina i njegovih adukata sa Ru(II) terpiridinskim jedinjenjima **1** (A), **2** (B), and **3** (C), snimljeni u dalekoj UV oblasti. Promene u sekundarnoj strukturi su praćene po inkubaciji različitih molarnih odnosa proteina i kompleksa.

3.6.2 Uticaj vezivanja kompleksa na terciarnu strukturu HSA i Tf

CD spektar proteina u bliskoj UV oblasti (320-260 nm) predstavlja otisak prsta terciarne strukture proteina i reflektuje disulfidne veze i mikrookolinu aromatičnih amino-kiselinskih ostataka. Aromatične amino kiseline daju karakteristične maksimume u opsegu talasnih dužina od: 270-290 nm i 290-305 nm za Trp; 270-280 nm za Tyr; 255-270 nm za Phe [177], [179]. Slika 26A pokazuje CD spektre intaktnog HSA i njegovih adukata sa **1**, **2** i **3**, snimljene u bliskoj UV oblasti. Izgled spektra HSA je u dobrom slaganju sa literaturnim podacima [175]. Od sva tri ispitivana kompleksa, **2** je izazvao najmanje promene u terciarnoj strukturi HSA. Spektar HSA se od spektara adukata HSA/**1** i HSA/**3** razlikuje pretežno u opsegu talasnih dužina od 260-280 nm, poreklom od Phe i Trp ostataka. Detektovani negativni porast signala po vezivanju Ru(II) jedinjenja ukazuje na kompaktniju strukturu HSA adukata u odnosu na njegov

nativan oblik [176]. Kako značajne promene signala nisu detektovane, može se zaključiti da je vezivanje ispitivanih jedinjenja dovelo do diskretnih promena u tercijsnoj strukturi HSA.



Slika 26. CD spektri intaktnog humanog serum albumina (A), transferina (B), i njihovih adukata sa kompleksima **1**, **2** i **3**, snimljeni u bliskoj UV oblasti. Spektri su snimljeni nakon 24 h inkubacije proteina i kompleksa u molarnom odnosu od 1:2.

CD spektar intaktnog Tf i njegovih adukata sa **1**, **2** i **3** u bliskoj UV oblasti je prikazan na Slici 26B. Spektar intaktnog Tf sa karakterističnim maksimumom na oko 290 nm odgovara literaturnim podacima [180]. Iako spektri adukata Tf sa Ru(II) jedinjenjima zadržavaju sličan oblik kao i nativan protein, razlike u intenzitetu signala ukazuju na promene u tercijsnoj strukturi. Ove promene su izraženije u oblasti signala poreklom od Tyr, u odnosu na Trp. U slučaju jedinjenja **1** i **2**, veći molarni odnos proteina prema kompleksu nije snimljen zbog visokih vrednosti napona na detektoru. Jedinjenje **3** nije dovelo do promena u tercijsnoj strukturi ni pri molarnom odnosu 1:10, što potencijalno ukazuje na postojanje malog broja mesta za vezivanje ovog kompleksa za Tf i u skladu je sa rezultatima ICP OES analize (Tabela 2).

3.7 Strukturna karakterizacija proizvoda interakcije kompleksa Ru(II) sa HSA i Tf metodama tačne hromatografije i masene spektrometrije

U prethodnom delu ove disertacije su prikazani rezultati eksperimenata koji su omogućili potvrdu vezivanja ispitivanih Ru(II) jedinjenja za HSA i Tf, kao i dobijanje važnih informacija o stehiometriji, jačini i uticaju vezivanja na nativnu strukturu proteina. Međutim, iz do sada prikazanih rezultata se ne mogu dobiti informacije o

prirodi interakcije između kompleksa i proteina, kao ni o mestima na kojima se ispitivani kompleksi vezuju za odabrane proteine. U tu svrhu su korišćene metode tečne hromatografije i masene spektrometrije. Kako se meke jonizacione tehnike MALDI i ESI MS najčešće koriste za analizu bioloških molekula, ispitana je njihova pogodnost za strukturnu karakterizaciju vezivanja kompleksa **1**, **2** i **3** za odabrane proteine. Za određivanje mesta vezivanja kompleksa na Tf je upotrebljen LC/MALDI pristup, a na HSA nano-LC/nano-ESI MS pristup.

3.7.1 Identifikacija mesta za vezivanje kompleksa Ru(II) na BSA i Tf upotrebom HPLC/MALDI MS

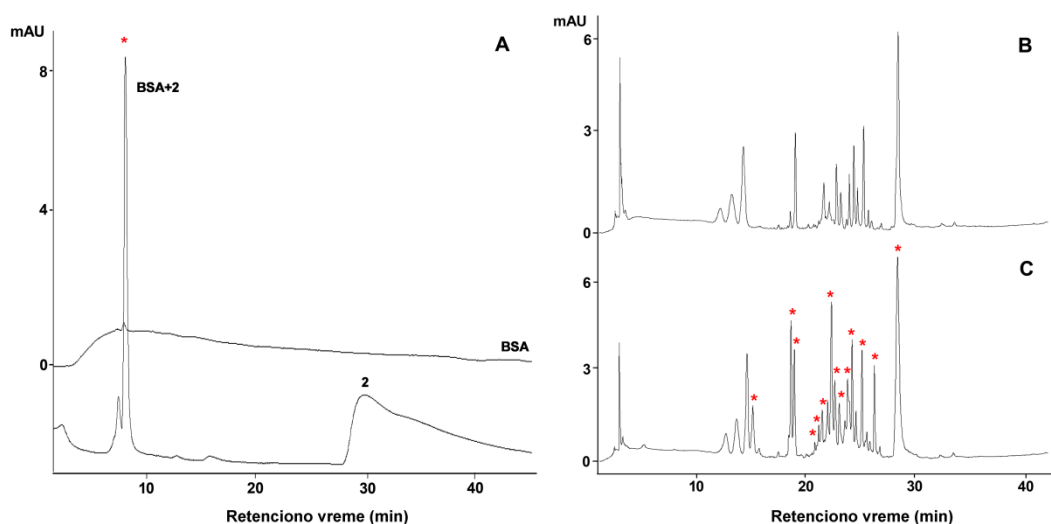
Sa ciljem određivanja prirode interakcije i mesta vezivanja kompleksa za proteine, optimizovana je “*bottom-up*” HPLC/MALDI MS metoda. Metoda se zasniva na razdvajanju i detekciji rutenovanih vrsta. Najpre je testirana na model proteinu, goveđem serum albuminu (*engl.* bovine serum albumin, BSA), a zatim je iskorišćena za detaljnu strukturnu karakterizaciju proizvoda interakcije ispitivanih Ru(II) kompleksa sa Tf.

3.7.1.1 Ispitivanje vezivanja i hromatografsko razdvajanje rutenovanih vrsta

Kao što je prethodno i opisano [36], jedinjenja **1** i **2** imaju gotovo identične UV/VIS spektre (Slika 1, Prilog 1) sa nekoliko intenzivnih maksimuma u UV oblasti (200-330 nm) koje odgovaraju transferu naelektrisanja unutar liganada (*engl.* intraligand charge transfer), kao i širokom trakom u VIS oblasti (490-550 nm), poreklom od transfera naelektrisanja od metala ka ligandima (*engl.* metal-to-ligand charge transfer, MLCT). Spektar jedinjenja **3** se od spektara **1** i **2** razlikuje po položaju (apsorpcionom maksimumu) i izgledu MLCT trake. Budući da proteini apsorbuju na 215 nm (peptidna veza) i 280 nm (aromatične amino kiseline), razlike u talasnim dužinama na kojima apsorbuju proteini i kompleksi su iskorišćene za praćenje vezivanja upotrebom tečne hromatografije sa UV/VIS detekcijom.

Formiranje adukata između odabranih proteina i kompleksa je potvrđeno HPLC-om, korišćenjem gel-hromatografske (*engl.* size exclusion, SEC) kolone za razdvajanje nevezanih Ru(II) jedinjenja od frakcije koja je vezana za proteine. Za detekciju

formiranih adukata je odabran apsorpcioni maksimum kompleksa na 316 nm. Kao što se vidi na Slici 27A, retenciono vreme adukta BSA (koji je korišćen kao model sistem umesto HSA) sa kompleksom **2** je iznosilo 7,6 min (8,1 min za Tf), a slobodnih kompleksa 27,7 min (Slika 27A). Takvi maksimumi nisu zabeleženi na spektru kontrolnih proteina, budući da ne apsorbuju na odabranoj talasnoj dužini od 316 nm.

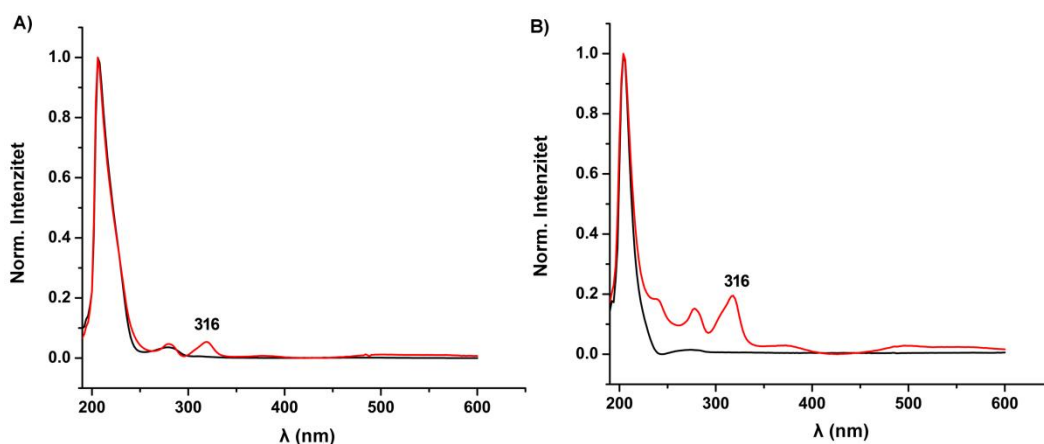


Slika 27. Preklapljeni SEC HPLC hromatogrami BSA i njegovog adukta sa **2** na 316 nm (A): za razliku od samog BSA, njegov adukt sa **2** apsorbuje na 316 nm i označen je zvezdicom; RP HPLC hromatogram peptida BSA (B); RP HPLC hromatogram peptida adukta BSA i **2** na 280 nm: rutenovane frakcije su označene zvezdicom.

Apsorpcioni maksimum na 316 nm, poreklom od vezanih molekula kompleksa, se jasno može videti na UV/VIS spektru BSA nakon hromatografskog razdvajanja (Slika 29A) potvrđujući interakciju Ru(II) kompleksa sa proteinom u rastvoru.

Sa ciljem detekcije pojedinačnih peptidnih frakcija koje sadrže komplekse, urađena je tripsinska digestija formiranih adukata. Nakon digestije, dobijeni peptidi su razdvojeni na reverzno-faznoj (*engl.* reversed phase, RP) LC koloni (Slika 27C), a dobijeni hromatogram je upoređen sa kontrolnim BSA peptidima (Slika 27B). Peptidne frakcije na čijim spektrima se mogao uočiti isti karakteristični maksimum na 316 nm su obeležene zvezdicom na Slici 27C. Većina razdvojenih peptidnih frakcija je sadržala peptide sa vezanim molekulima kompleksa **1** i **2**, iz čega se može zaključiti da BSA ima visok vezivni kapacitet za ove komplekse. Ovaj rezultat je u dobrom slaganju sa

rezultatima dobijenim ICP OES metodom (Poglavlje 3.4). Primer spektra peptidne frakcije koja sadrži peptide koji su vezali kompleks **2** je prikazan na Slici 28B.



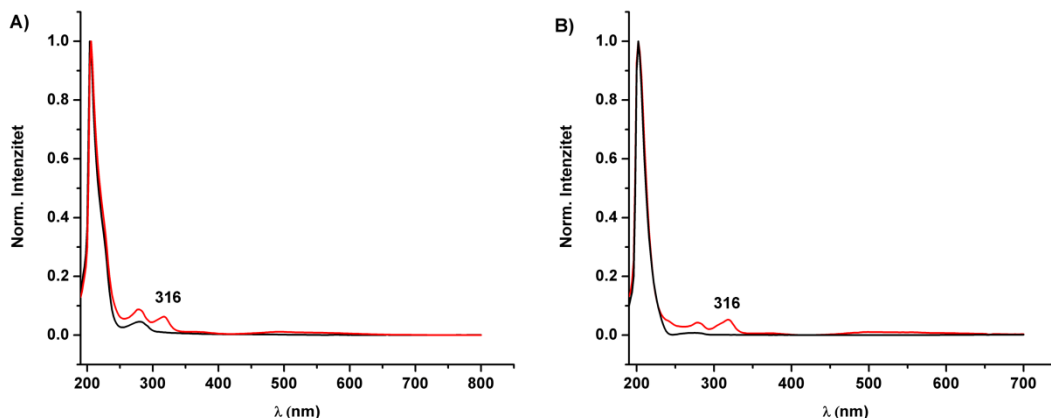
Slika 28. UV/VIS spektri: BSA (crno) i adukta BSA sa **2** (crveno) dobijeni nakon SEC HPLC separacije (A) i BSA peptida (crno) i peptida adukata BSA sa **2** (crveno), dobijeni nakon RP HPLC separacije (B).

Uočljivo je da se, pored maksimuma na 316 nm, na spektru pojavljuje i MLCT traka na 490-550 nm, koja dodatno potvrđuje prisustvo kompleksa. Takvi apsorpcioni maksimumi nisu detektovani u kontrolnoj peptidnoj frakciji (Slika 28B). Ove razlike u apsorpciji između rutenovanih i kontrolnih peptida su omogućile sakupljanje samo onih frakcija koje sadrže peptide koji su vezali kompleks. Ovo je važno jer hromatografsko razdvajanje peptida koje prethodi MS analizi omogućava snimanje spektara koji nisu pretrpani signalima i smanjuje mogućnost njihovog preklapanja, odnosno omogućava pouzdaniju detekciju i identifikaciju. Pored toga, detekcija rutenovanih vrsta u rastvoru predstavlja direktan dokaz da rezultati dobijeni MS analizom nisu posledica nespecifičnog vezivanja kompleksa u gasnoj fazi masenog spektrometra.

Ovim eksperimentima je pokazano: a) da je veza između rutenijumovih kompleksa i ciljanih sekvencija na proteinima stabilna, te da digestija tripsinom ne dovodi do otpuštanja vezanih kompleksa i b) da je moguće razlikovati rutenovane peptide dobijene nakon digestije proteina od kontrolnih i drugih slobodnih peptida u uzorku. Uzimajući u obzir i rezultate koji su dobijeni na celim proteinima, može se zaključiti da metoda poseduje potencijal za razdvajanje i detekciju ciljanih peptida i/ili proteina i u kompleksnijim uzorcima.

Nakon što je metoda testirana na BSA, na isti način je ispitano vezivanje kompleksa **1** i **2** za Tf. Preklopljeni spektri samog Tf i njegovog adukta sa kompleksom

1 su prikazani na Slici 29A, dok se spektar odabrane peptidne frakcije koja sadrži peptide Tf sa vezanim kompleksom **1** može videti na Slici 29B. Izgled dobijenih spektara je sličan kao i kod BSA.



Slika 29. UV/VIS spektri: Tf (crno) i adukta Tf sa **1** (crveno) dobijeni nakon SEC HPLC separacije (A) i Tf peptida (crno) i peptida adukata Tf sa **1** (crveno), dobijeni nakon RP HPLC separacije (B).

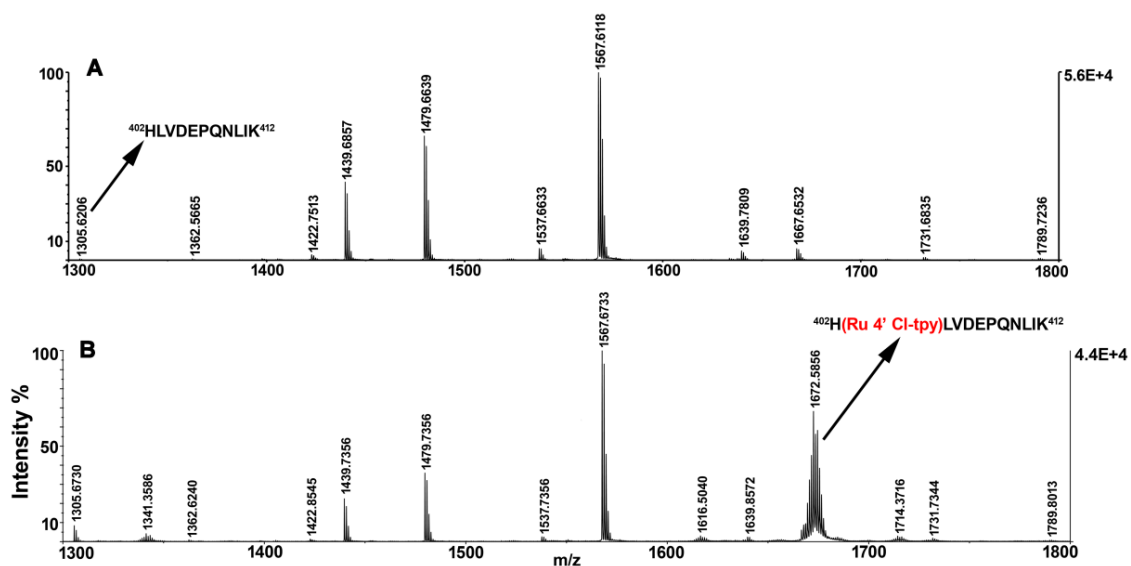
Iako kompleks **3**, kao i kompleksi **1** i **2**, poseduje intenzivan maksimum na 316 nm, vezivanje **3** za ispitivane proteine nije moglo biti detektovano na ovaj način, što sugeriše nizak vezivni kapacitet proteina prema ovom kompleksu. Ovaj rezultat je u skladu sa prikazanim rezultatima koji su dobijeni fluorescencijom i ICP OES metodom (Poglavlja 3.4 i 3.5), a koji ukazuju na nizak vezivni afinitet i nisku vrednost stehiometrije vezivanja kompleksa **3** za ispitivane proteine.

3.7.1.2 Detekcija i identifikacija rutenovanih vrsta upotrebom MALDI MS

Upotreba MALDI MS za identifikaciju mesta vezivanja ispitivanih Ru(II) kompleksa “*bottom-up*” pristupom je testirana na BSA, pri čemu je detaljno opisana identifikacija peptida sa vezanim kompleksima na osnovu masenog pomeraja, izotopske raspodele i fragmentacionog (MS/MS) spektra. Metoda je zatim primenjena i za identifikaciju vezivnih mesta kompleksa na transferinu.

3.7.1.2.1 Identifikacija ciljnih sekvencija za vezivanje kompleksa Ru(II) na BSA

Frakcije peptida dobijenih digestijom adukata BSA sa kompleksima **1** i **2** su, nakon elucije sa RP hromatografske kolone, analizirane MALDI masenom spektrometrijom. Na spektrima su detektovani signali poreklom od nekoliko peptidnih sekvencija koje imaju vezane ispitivane komplekse rutenijuma. Analiza spektara je bila značajno olakšana zbog karakteristične izotopske raspodele Ru, koja je omogućila nedvosmisleni identifikaciju ciljnih sekvencija usled jasnih razlika između izotopske raspodele slobodnih peptida i onih koji nose vezane molekule kompleksa. Ovo je naročito izraženo u slučaju peptida čiji su signali detektovani u m/z opsegu do 2000, jer su razlike u izotopskoj raspodeli tad najočiglednije. Kod većih peptida raste procenat manje zastupljenih izotopa, pa raspodela poprima Gausovski oblik koji je sličan raspodeli Ru. Na Slici 30B je prikazan primer MALDI MS spektra u kom se vidi signal peptida koji ima izotopsku raspodelu karakterističnu za rutenijum. Kako je to bio najintenzivniji takav signal u spektrima peptida adukta BSA sa kompleksima **1** i **2**, odabran je za detaljniju analizu.



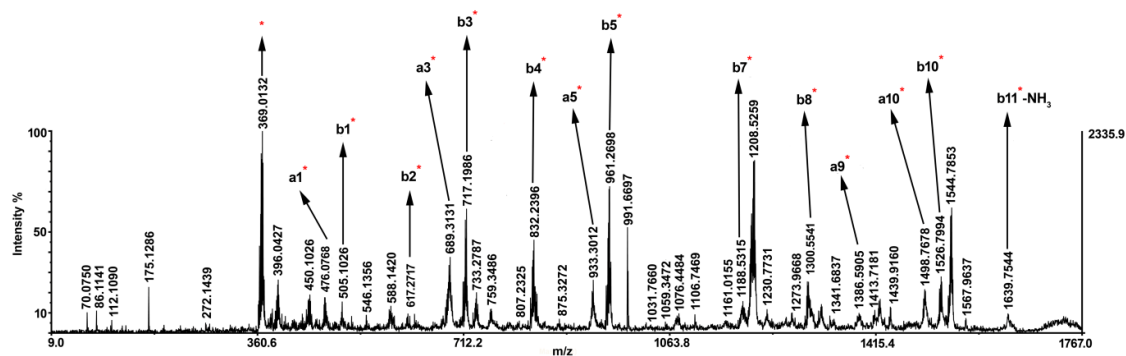
Slika 30. MALDI TOF/TOF MS spektar peptida BSA (A) i peptida BSA adukta sa **1** (B). Spektar je snimljen u pozitivnom jonskom modu sa CHCA matricom.

Region spektra (m/z 1300-1800) koji prikazuje odabrani, najintenzivniji signal na m/z 1672 je prikazan na Slici 30B. Kao što se može videti, pik nije detektovan na

kontrolnom uzorku BSA (Slika 30A) koji sadrži peptide eluirane na istom retencionom vremenu na kom su eluirani i peptidi adukta BSA i **1**. Na osnovu masenog pomeraja koji odgovara fragmentu ispitivanih kompleksa, $[\text{Ru}(4' \text{ Cl-tpy})]^+$, je predložena ciljna sekvencija $^{402}\text{HLVDEPQNLIK}^{412}$ (m/z 1305). Kao što je već opisano (Poglavlje 3.2), $[\text{Ru}(4' \text{ Cl-tpy})]^+$ nastaje fragmentacijom **1** i **2** u izvoru masenog spektrometra, pri jačim intenzitetima lasera kakvi se upotrebljavaju za efikasnu jonizaciju peptida u prisustvu CHCA matrice. Dodatni dokaz da je fragmentacija liganada zaista uzrokovana laserom, a ne disocijacijom u rastvoru, predstavlja prisustvo MLCT trake na UV/VIS spektru rutenovane frakcije peptida dobijene nakon RP LC separacije (Slika 29B). Iako je do fragmentacije došlo tokom MALDI analize, ona nije onemogućila određivanje vezivne sekvencije, budući da je veza između metala i peptida ostala očuvana.

3.7.1.2.2 Identifikacija ciljne amino-kiseline za vezivanje kompleksa Ru(II) na BSA

Kako bi se potvrdio identitet predložene sekvencije, kao i ciljna amino-kiselina za vezivanje kompleksa, urađena je tandem masena analiza odabranog peptida BSA na m/z 1672. Analiza fragmenata dobijenih u MS/MS spektru (Slika 31) je omogućila nedvosmisleno identifikaciju predložene ciljne sekvencije i otkrila histidin kao ciljnu amino-kiselinu za vezivanje ispitivanog kompleksa. Odabrani prekursor na m/z 1672 je neutralni peptid sa koordinovanim $[\text{Ru}(4' \text{ Cl tpy})]^+$. Kako naelektrisanje potiče od jona metala, fragmentacija peptida je dirigovana položajem vezivnog mesta za metal u sekvenciji [181], [182]. Primarni produkti fragmentacije su rutenovani $[\text{a}_n\text{-H}]^+$ i $[\text{b}_n\text{-H}]^+$ joni. Fenomen gubitka protona tokom koliziono idukovane disocijacije (*engl.* collision induced dissociation, CID) u analizi peptida koji na sebi imaju vezan metal je opisan u literaturi (44). Radi uprošćavanja, deprotonacija fragmentnih jona nije naznačena na Slici 31. Na vezivanje **1** za His402 ukazuje prisustvo rutenovanih a_1 i b_1 jona. Budući da je His lociran na N-terminalnoj strani vezujuće sekvencije, svi a_n i b_n joni nastali C-terminalnim raskidanjem nose vezani fragment Ru(II) kompleksa. Signal na m/z 369, poreklom od $[\text{Ru}(4' \text{ Cl tpy})]^+$, se takođe može videti u spektru.



Slika 31. MALDI TOF/TOF MS/MS spektar $^{402}\text{HLVDEPQNLIK}^{412} + [\text{Ru}(4' \text{ Cl-tpy})]^+$. Identifikovani rutenovani fragmentni joni peptida su označeni crvenom zvezdicom, koja odgovara $[\text{Ru}(4' \text{ Cl-tpy})]^+$. Peptidni fragmenti poreklom od MPCTEDYLSLILNR sekvencije m/z 1667,8) se takođe mogu videti u spektru, zbog širine prozora za odabir prekursora od 5 Da.

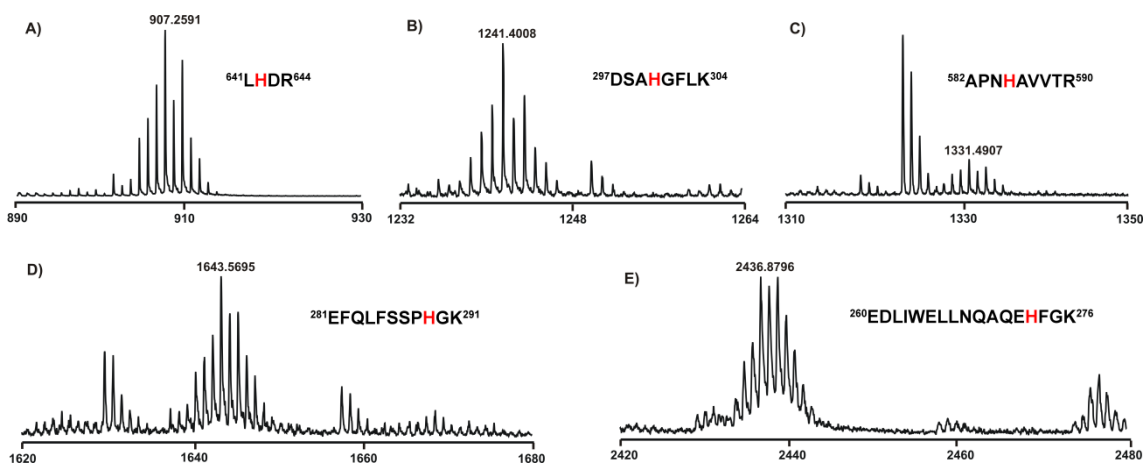
Najintenzivniji signal u spektru, poreklom od rutenovanog peptidnog fragmenta je detektovan na m/z 1208. Na osnovu širine pika i njegove izotopske raspodele, može se zaključiti da potiče od preklapljenih fragmentnih jona. Predložena su dva moguća objašnjenja detekcije signala na m/z 1205: mogao bi se pripisati rutenovanom $[\text{c}_7 + \text{H}]^+$, fragmentnom jonu nastalom cepanjem HN-CH(R) veze asparagina (N), ili rutenovanom $[\text{b}_7\text{-H} + \text{NH}_3]^+$ jonu. Još dva signala koja odgovaraju rutenovanim $[\text{c}_n + \text{H}]^+$ jonima su vidljiva u spektru: $[\text{c}_6 + \text{H}]^+$ (m/z 1076) i $[\text{c}_{10} + \text{H}]^+$ (m/z 1545) koji su nastali raskidanjem HN-CH veze glutamina (Q) i lizina (K). Alternativno, opisani joni se mogu pripisati i odgovarajućim $[\text{b}_n\text{-H} + \text{NH}_3]^+$ jonima. Predloženi identitet fragmentnih jona je baziran na studiji fragmentacije Cu-vezivnih peptida kod kojih je jon metala vezan za N-terminalni arginin (45). Studija je otkrila da je predloženo raskidanje veza c-tipa favorizovano na Q, K i N ostatacima. Predloženo objašnjenje uključuje transfer NH_2 grupe Q, N i K na metal preko bidentatnih interakcija peptida sa metalom. Budući da kod Ru-vezanih kompleksa dolazi do gubitka bidentatnih liganada (en i dach) indukovanog laserom, dostupna su dva moguća koordinaciona mesta na Ru; stoga transfer NH_2 grupe tokom CID-a može objasniti opisanu fragmentaciju c-tipa. Međutim, predloženi mehanizam uključuje transfer protona sa bočnih lanaca na amidni azot, što verovatnije slabi amidnu vezu i dovodi do njenog raskidanja (b joni), nego raskidanja susedne HN-CH(R) veze (c joni). Predloženi mehanizam za b tip fragmentacije uključuje transfer protona sa N-terminusa na NH_2 grupu bočnih lanaca Q, N i K. Raskidanje bočnog lanca ostavlja NH_3 grupu vezanu za metalni centar, dok se $[\text{b}_n\text{-H} +$

NH_3^+ joni formiraju raskidanjem amidne veze. Iako je ovaj mehanizam verovatniji, udaljenost Q, N i K od N-terminalno vezanog Ru(II) kompleksa u ciljnoj sekvenciji ga čini upitnim. Stoga se sa sigurnošću ne može isključiti ni jedan od ova dva predložena mehanizma za nastajanje detektovanog jona.

3.7.1.2.3 Identifikacija ciljnih sekvencija i ciljnih amino-kiselina za vezivanje kompleksa Ru(II) na Tf

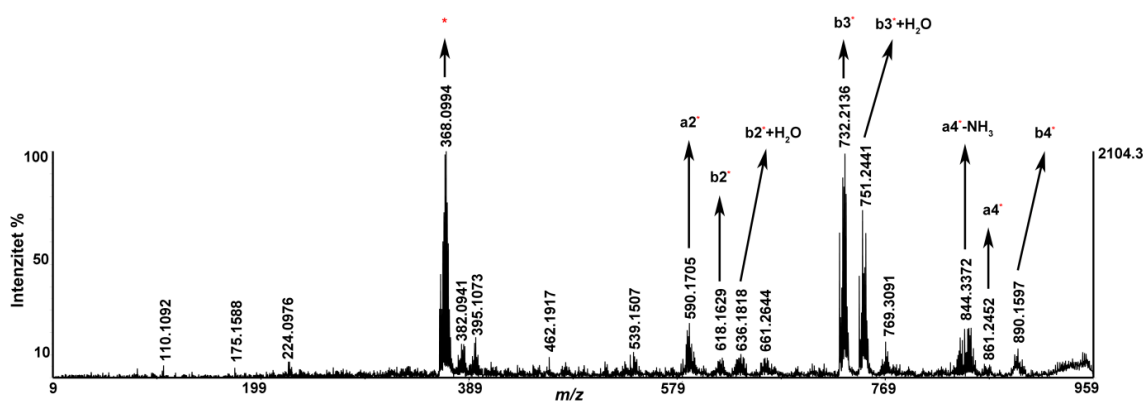
Na primeru BSA je pokazano da je MALDI MS pogodna metoda za ispitivanje vezivanja Ru(II) jedinjenja za proteine, pa je primenjena i za detaljno određivanje mesta vezivanja kompleksa **1** i **2** na Tf. Eksperimentalni pristup je bio identičan kao i kod prethodnog proteina: nakon HPLC razdvajanja, sakupljene su frakcije peptida dobijenih digestijom adukata Tf kod kojih je detektovano prisustvo kompleksa, nakon čega su snimljeni njihovi MALDI MS spektri.

Identifikovano je pet peptidnih sekvencija za vezivanje jedinjenja **1** i **2** (Slika 32). Budući da zbog fragmentacije helatnih liganada sekvencije na sebi nose $[\text{Ru}(4' \text{ Cl-tpy})]^+$, detektovane mase su iste za oba kompleksa. Na signalima ciljnih sekvencija se primećuje izotopska raspodela karakteristična za rutenijum.



Slika 32. MALDI MS spektri ciljnih sekvencija Tf za vezivanje jedinjenja **1** i **2**: $\text{LHDR}+[\text{Ru}(4' \text{ Cl-tpy})]^+$ (A), $\text{DSAHGFLK}+[\text{Ru}(4' \text{ Cl-tpy})]^+$ (B), $\text{APNHAVVTR}+[\text{Ru}(4' \text{ Cl-tpy})]^+$ (C), $\text{EFQLFSSPHGK}+[\text{Ru}(4' \text{ Cl-tpy})]^+$ (D) i $\text{EDLIWELLNQAQEHFGK}+[\text{Ru}(4' \text{ Cl-tpy})]^+$ (E). Spektri su snimljeni u pozitivnom jonskom modu sa CHCA matricom.

Potvrda identiteta predloženih sekvencija, kao i ciljne amino kiseline za koje se kompleksi vezuju su određene MS/MS analizom. Spektar koji prikazuje fragmentne jone LHDR+[Ru(4' Cl-tpy)]⁺ sekvencije je prikazan na Slici 33. Identifikovani su joni a i b serije (za nomenklaturu fragmentacije peptida videti Poglavlje 4.7.1.2), na osnovu kojih se može zaključiti da se kompleksi vezuju za His642.



Slika 33. MALDI TOF/TOF MS/MS spektar LHDR+[Ru(4' Cl-tpy)]⁺ sekvencije Tf. Identifikovani rutenovani fragmentni joni peptida su označeni crvenom zvezdicom, koja odgovara [Ru(4' Cl-tpy)]⁺.

Identifikovani joni nastali fragmentacijom preostalih vezivnih sekvencija su prikazani u Tabeli 6. Rezultati potvrđuju da se **1** i **2**, pored His642, vezuju još i za His300, His585, His289 i His273, iz čega se može zaključiti da ispitivani kompleksi pokazuju izražen afinitet prema histidinu.

Tabela 6. MALDI MS/MS analizom identifikovani fragmentni joni ciljnih sekvencija za vezivanje jedinjenja **1** i **2** na Tf. * predstavlja [Ru(4' Cl-tpy)]⁺.

Peptidna sekvencija	Identifikovani fragmentni joni
⁶⁴¹ LHDR ⁶⁴⁴	*, a ₂ *, b ₂ *, b ₂ *+H ₂ O, b ₃ *, b ₃ *+H ₂ O, a ₄ *, a ₄ *-NH ₃
²⁹⁷ DSAHGFLK ³⁰⁴	*, a ₄ *, b ₄ *, y ₅ *-NH ₃ , y ₆ *, y ₇ *, b ₆ *, b ₇ *-H ₂ O, a ₈ *-NH ₃ , a ₈ *, b ₈ *
⁵⁸² APNHAVVTR ⁵⁹⁰	*, H*, b ₄ *, a ₉ *-NH ₃ , a ₉ *, b ₉ *
²⁸¹ EFQLFSSPHGK ²⁹¹	*, b ₁₁ *, y ₁₀ *, b-H ₂ O (QLFSSPHG), y ₅ *, y ₄ *, y ₃ *
²⁶⁰ EDLIWELLNQAQEHEFGK ²⁷⁶	*, y ₁₇ *, b ₁₇ *, b ₁₆ *+H ₂ O, b ₁₆ *, a ₁₆ *-NH ₃ , y ₁₅ *, y ₁₄ *, a ₁₄ *, y ₁₃ *, y ₉ *-NH ₃ , y ₈ *, y ₇ *, y ₅ *, y ₄ *, y ₄ *-NH ₃

Poređenjem dobijenih rezultata sa literaturnim podacima o vezivanju kompleksa rutenijuma za Tf, zapažene su određene sličnosti. Naime, analiza kristalne strukture

adukta laktotransferina i KP1019 je pokazala da postoje visoko i nisko afinitetna mesta za vezivanje ispitivanog Ru(III) kompleksa na proteinu. Visoko afinitetna mesta uključuju mesta za vezivanje gvožđa, locirana na N i C lobusu. Iako je potvrđeno samo vezivanje za His253 na N lobusu, smatra se da dolazi i do ekvivalentnog vezivanja za His597 na C lobusu, ali ono nije moglo biti potvrđeno zbog njegove zatvorene konformacije u kristalnoj strukturi proteina. Pored visoko afinitetnih, identifikovana su i dva nisko afinitetna mesta za vezivanje koja uključuju ostatke His590 i His654, a smatra se da i ostali ostaci His koji su locirani pri površini proteina mogu biti potencijalne mete za vezivanje Ru kompleksa [117]. Slično navedenom, iz rezultata dobijenih u ovoj disertaciji se vidi da se **1** i **2** za protein mogu vezati i specifično, za mesto za vezivanje Fe^{3+} , i nespecifično, za površinske ostatke His. Identifikovano mesto za vezivanje Fe^{3+} uključuje His585 ostatak na C lobusu koje ujedno ima i najjači afinitet za vezivanje ovog metala. Ovakav rezultat ukazuje na potencijal ispitivanih kompleksa Ru(II) da zamene Fe^{3+} i koriste Tf kao aktivnu rutu ulaska u kancerske ćelije.

Vezivanje kompleksa Ru(II) za Tf je u mnogo manjoj meri ispitivano nego što je to slučaj sa kompleksima Ru(III). Međutim, postoje podaci o vezivnim mestima Ru(II) kompleksa tipa $[(\eta^6\text{-aren})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}]^+$ na apo- i holo-transferinu. Pored toga što nisu pronađene razlike u vezivnim mestima između ova dva oblika Tf, nađeno je da se ovi kompleksi vezuju pretežno za površinske ostatke His, i to His242, His273, His578 i His606 [116]. Od identifikovanih nespecifičnih mesta za vezivanje **1** i **2** na Tf, vezivanje za His273 je u skladu sa rezultatima dobijenim na kompleksima tipa $[(\eta^6\text{-aren})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}]^+$. Takođe, ova amino kiselina je identifikovana i kao vezivno mesto za cisplatinu na Tf [116].

Rezultati eksperimenata koji su predstavljeni u ovoj disertaciji su rađeni na humanom serum Tf koji je parcijalno zasićen gvožđem, kako bi što bolje reflektovali vezivanje ispitivanih jedinjenja u kontaktu sa Tf u serumu, odnosno kako bi se dobio uvid u proces vezivanja pod fiziološkim uslovima. Na osnovu identifikovanih mesta za vezivanje, može se zaključiti da se ispitivani kompleksi za apo-Tf mogu vezati i specifično i nespecifično, dok je vezivanje za holo-Tf koji je zasićen Fe^{3+} isključivo nespecifično.

Neophodno je naglasiti da je očuvanje pravilne konformacije Tf veoma važno za prepoznavanje proteina od strane TfR1 i ulaska kompleksa metala u kancerske ćelije

koje prekomerno eksprimiraju ovaj receptor. Iz rezultata dobijenih CD spektroskopijom (Poglavlje 3.6) se vidi da pri vezivanju **1** i **2** za definisana mesta ne dolazi do velikih promena na strukturi Tf, što ukazuje na potencijal ispitivanih jedinjenja za eksploataciju transferinske rute aktivnog transporta metala u ćelije.

3.7.2 Identifikacija mesta za vezivanje kompleksa Ru(II) na HSA upotrebom nano-LC/nano-ESI MS

Detekcija peptida pri mikrolitarskim i nanolitarskim protocima je do sada bila moguća samo u pozitivnom jonskom modu, dok su problemi negativne elektrosprej jonizacije ostali neprevaziđeni (Poglavlje 2.3.2.1.1). Identifikacija peptida (proteina) se vrši automatski, uz pomoć softvera za analizu dobijenih podataka. Međutim, kada se ESI MS u pozitivnom jonskom modu primeni za određivanje mesta za vezivanje kompleksa rutenijuma proteomskim “*bottom-up*” pristupom, potrebno je ručno pronaći ciljne sekvencije i identifikovati fragmentne jone iz tandem masenih spektara, kako bi se odredila vezivna amino-kiselina. Iako isti postupak važi i za MALDI analizu, ESI proizvodi višestruko naelektrisane jone peptida pa su razlike u izotopskoj raspodeli između jona peptida koji imaju i onih koji nemaju vezane komplekse znatno diskretnije, što otežava identifikaciju ciljnih sekvencija i tumačenje tandem masenih spektara. Određivanje ciljnih sekvencija za vezivanje kompleksa metala primenom ESI MS u negativnom jonskom modu do sada nije opisano u literaturi.

Sa ciljem određivanja mesta vezivanja ispitivanih kompleksa na HSA i poboljšanja upotrebe nano-ESI MS za ispitivanje vezivanja kompleksa metala za peptide/proteine, kao i pojednostavljenja interpretacije rezultata, u narednim poglavljima će biti opisani:

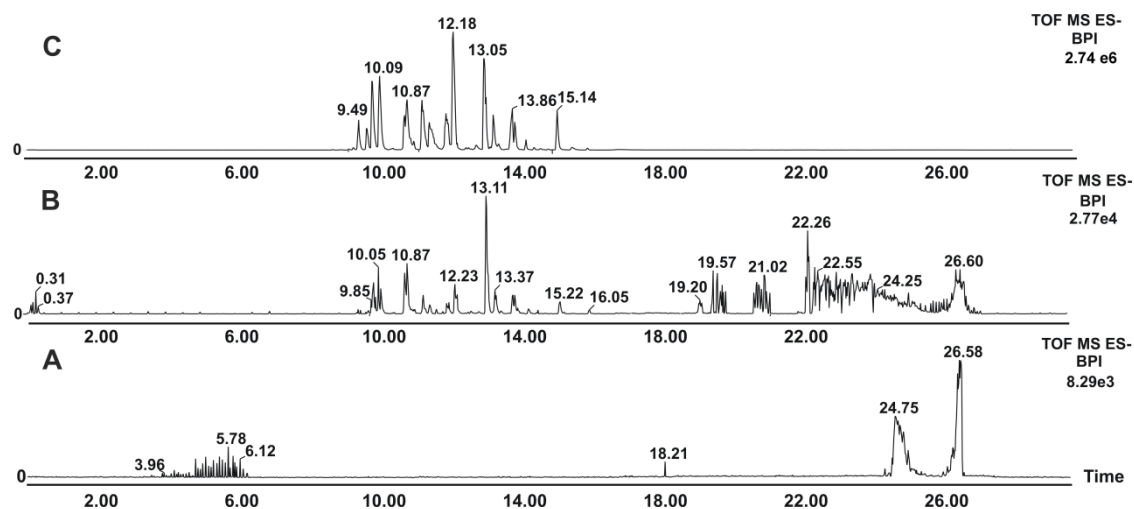
- Razvoj i optimizacija metode za poboljšanje negativne jonizacije peptida upotrebom nano-ESI MS
- Ispitivanje vezivanja kompleksa Ru(II) za model peptid, angiotenzin II, u pozitivnom i negativnom jonskom modu
- Automatska identifikacija mesta vezivanja Ru(II) kompleksa na HSA u pozitivnom jonskom modu

- Identifikacija ciljnih sekvencija za vezivanje Ru(II) kompleksa za HSA u negativnom jonskom modu

3.7.2.1 Ispitivanje efikasnosti formaldehida kao modifikatora negativne jonizacije peptida

Na osnovu literaturnih podataka predstavljenih u uvodnom delu ove disertacije (Poglavlje 2.3.2.1.1), formaldehid (FA) je odabran kao modifikator mobilne faze sa svrhom poboljšanja negativne ES jonizacije peptida pri nanolitarskim i mikrolitarskim protocima. Ispitana je efikasnost nekoliko različitih koncentracija rastvora FA u izopropanolu (IPA). Svaki ispitivani rastvor se u izvor masenog spektrometra uvodio post-kolonski, na način koji je omogućio njegovo mešanje sa mobilnom fazom i analitima eluiranim sa nano-LC kolone. Kao model sistem za praćenje efikasnosti jonizacije su korišćeni peptidi dobijeni tripsinskom digestijom BSA.

Hromatogram dobijen nakon razdvajanja i detekcije peptida BSA u negativnom jonskom modu bez post-kolonskog dodatka FA je prikazan na Slici 34A. Sa Slike se vidi da ne dolazi do deprotonovanja uzorka u negativnom jonskom modu, pri uslovima koji se standardno koriste za detekciju u pozitivnom jonskom modu. Podešavanje parametara poput napona kapilare i konusa, ili geometrije izvora nije uticalo na poboljšanje negativne jonizacije. Post-kolonski dodatak IPA (Slika 34B) poboljšava detekciju negativnih jona, zahvaljujući povoljnim fizičko-hemijskim osobinama IPA koje omogućavaju uspostavljanje stabilnog spreja pri niskom početnom potencijalu i omogućavaju rad pri višim vrednostima napona, bez električnog pražnjenja [152]. Iako IPA značajno doprinosi stabilnosti elektrospreja i efikasnosti negativne jonizacije, tek po dodatku FA dolazi do jonizacije uzorka u negativnom jonskom modu čija je efikasnost uporediva sa jonizacijom u pozitivnom jonskom modu. Hromatogram peptida BSA dobijen nakon post-kolonskog dodatka 5 mM FA u IPA je prikazan na Slici 34C. Iz dobijenih rezultata se može zaključiti da sinergistički efekat FA i IPA dovodi do efikasne negativne jonizacije peptida koja se može koristiti u proteomici, kao komplement analizi u pozitivnom jonskom modu.



Slika 34. BPI hromatogrami peptida BSA dobijeni bez post-kolonskog dodatka modifikatora (A), nakon post-kolonskog dodatka IPA (B) i nakon post-kolonskog dodatka 5 mM FA u IPA (C).

Tri koncentracije FA, 5 mM, 10 mM i 20 mM, su ispitane sa ciljem pronalaska optimalne, tj. najniže koncentracije koja daje najveći porast negativne jonizacije peptida. Intenziteti TIC (*engl.* total ion current) i BPI (*engl.* base peak intensity) hromatograma dobijeni pri svakoj od ispitivanih koncentracija su prikazani u Tabeli 7. Intenzitet TIC hromatograma predstavlja ukupnu struju jona koja dolazi do detektora, tj. sumu signala i šuma, dok BPI intenzitet predstavlja ekstrahovanu vrednost najintenzivnijih signala u svakoj tački TIC hromatograma.

Tabela 7. Intenziteti TIC i BPI hromatograma dobijeni nakon post-kolonskog dodatka različitih koncentracija formaldehida (5 mM, 10 mM i 20 mM).

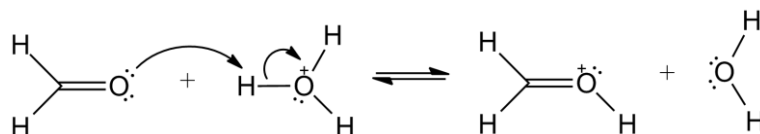
Formaldehid (mM)	TIC/10 ⁷	BPI/10 ⁶
5 mM	6,93	2,74
	8,25	2,58
	7,59	2,62
\bar{x}	7,59	2,65
%RSD	8,70	3,15
10 mM	7,95	2,76
	6,93	2,46
	7,51	2,60
\bar{x}	7,46	2,61
%RSD	6,85	5,76
20 mM	9,49	2,32
	8,61	2,63
	9,01	2,49
\bar{x}	9,04	2,48
%RSD	4,88	6,26

Budući da ispitane koncentracije FA manje od 5 mM nisu dovele do uspostavljanja stabilnog spreja (tj. nije bilo moguće postići efikasnu jonizaciju), ova koncentracija se smatra najnižom mogućom koncentracijom FA koja se može koristiti kao modifikator mobilne faze za poboljšanje negativne jonizacije peptida. Kao što se vidi iz Tabele 7, povećanje koncentracije FA nije dovelo do poboljšanja u negativnom ESI odgovoru, pa se koncentracija FA od 5 mM ujedno pokazala i kao optimalna. Iz tog razloga je korišćena u daljim analizama. Korišćenje što niže koncentracije modifikatora je važno zato što se na taj način smanjuje mogućnost kontaminacije izvora masenog spektrometra, što za rezultat ima kvalitetnije spektre sa velikim odnosom signala prema šumu.

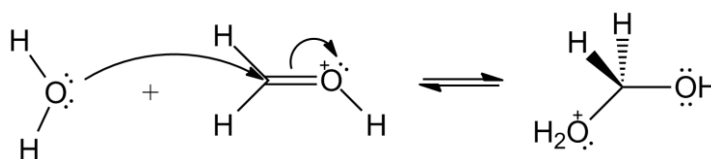
3.7.2.1.1 Mehanizam transfera protona formaldehida

U kiselim uslovima, kakvi su prisutni u LC mobilnoj fazi, FA podleže reakciji formiranja metandiola [183]. Reakcioni mehanizam se sastoji od tri koraka koja su prikazana na Shemi 1.

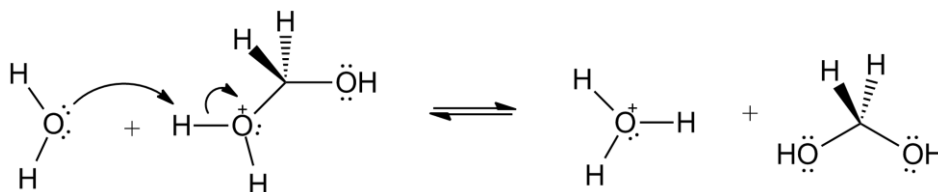
- 1) Protonovanje karbonilnog kiseonika:



- 2) Nukleofilna adicija na protonovani formaldehid:



- 3) Transfer protona sa protonovanog geminalnog diola na molekul vode:



Shema 1. Reakcioni mehanizam transfera protona formaldehida

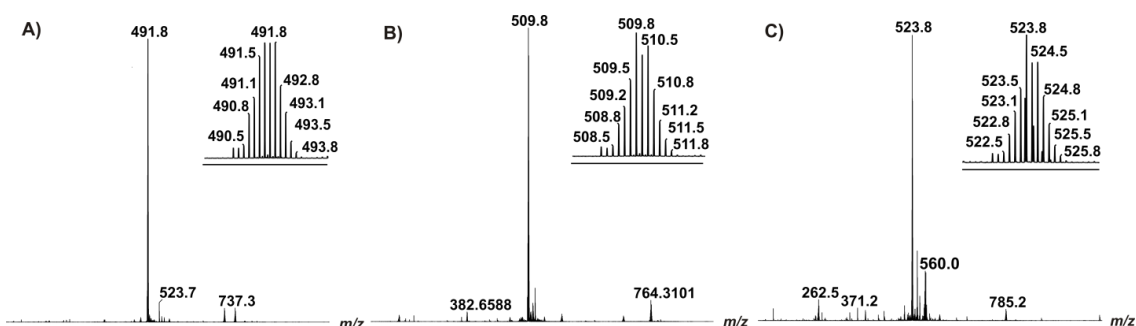
Ključ pozitivnog efekta FA kao poboljšivača negativne jonizacije peptida je u tome što protoni koji ometaju proces formiranja negativno naelektrisanih jona, u prisustvu FA podležu reverzibilnoj reakciji stvaranja metandiola, što olakšava proces negativne jonizacije.

3.7.2.2 Ispitivanje vezivanja kompleksa Ru(II) za angiotenzin II: poređenje pozitivnog i negativnog moda

Sa ciljem ispitivanja adukata kompleksa **1**, **2** i **3** sa peptidima u uslovima elektrosprej jonizacije, MS spektri su snimljeni u pozitivnom i negativnom jonskom modu nakon inkubacije svakog od ispitivanih jedinjenja sa model peptidom, angiotenzinom II (DRVYIHPF). Jedinjenja se za peptid najverovatnije vezuju preko koordinacije azota iz ostatka histidina, nakon hidrolize hloridnog liganda.

- *Analiza MS spektara u pozitivnom jonskom modu*

Pri vezivanju kompleksa za peptid dolazi do blokiranja mesta za protonovanje His, ali peptid dobija dva dodatna pozitivna naelektrisanja poreklom od metala. Pored toga, peptid sadrži arginin koji je pozitivno naelektrisan, dok su asparaginska kiselina i tirozin protovani na niskom pH. Stoga je, usled viška pozitivnog naelektrisanja, favorizovano formiranje višestruko naelektrisanih vrsta u pozitivnom jonskom modu. Na Slici 35 su prikazani spektri angiotenzina sa vezanim kompleksima **1**, **2** i **3**. Kao što je i očekivano, adukti peptida su detektovani kao trostruko naelektrisani joni.

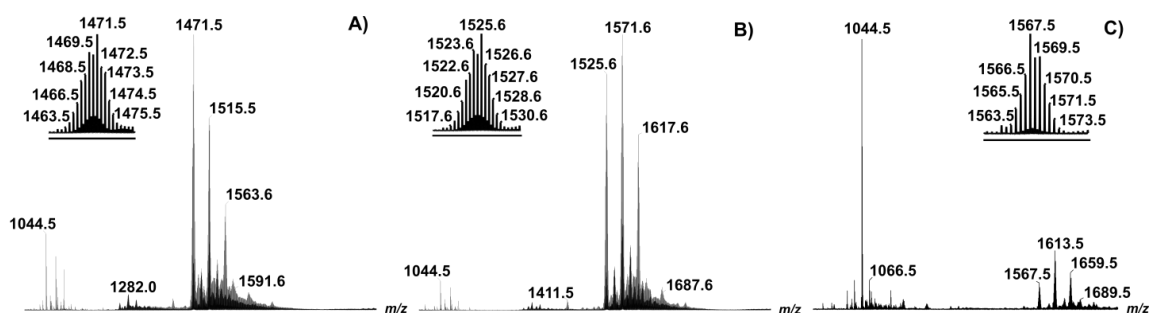


Slika 35. ESI MS spektri adukta angiotenzina II sa kompleksima **1** (A), **2** (B) i **3** (C) u pozitivnom jonskom modu. Inset u svakom spektru pokazuje izotopsku raspodelu detektovanog trostruko pozitivno naelektrisanog jona.

Iz razlike u masi između detektovanih adukata i slobodnog peptida (monoizotopske mase 1045,5423 Da) se vidi da dobijena vrednost odgovara masama kompleksa bez odlazećeg hloridnog liganda. Važno je istaći da, za razliku od MALDI analize, upotreba ESI MS ne dovodi do fragmentacije i gubitka bidentatnih liganada. Shodno tome, nije potrebno upotrebljavati dodatnu metodu detekcije kako bi se dobile kompletne i nedvosmislene informacije o obliku u kom se kompleksi vezuju za peptid. Kod MALDI analize je bilo potrebno dokazati da do gubitka helatnih liganada dolazi fragmentacijom u izvoru masenog spektrometra, a ne hidrolizom u rastvoru (što je i potvrđeno fragmentacionom analizom kompleksa i prisustvom MLCT trake na peptidnim frakcijama detektovanim nakon hromatografskog razdvajanja).

- *Analiza spektara u negativnom jonskom modu*

Spektri adukata peptida sa ispitivanim Ru(II) kompleksima su u negativnom jonskom modu snimljeni nakon post-kolonskog dodatka 5 mM rastvora formaldehida u izopropanolu. Signali poreklom od adukata su detektovani kao jednostruko naelektrisani joni (Slika 36). Dva dodatna signala veća za po 46 Da, odnosno 92 Da, od osnovnog signala koji odgovara svakom oformljenom aduktu se mogu primetiti u spektrima. Ovi signali su poreklom od mono- i di- adukata sa mravljom kiselinom, prisutnom u mobilnoj fazi. Kako je ukupno naelektrisanje rutenovanog angiotenzina pozitivno, građenje adukata sa mravljom kiselinom predstavlja način na koji se negativna jonizacija analita olakšava. Pored adukata, u spektrima se vidi i signal na m/z 1044,5 koji odgovara slobodnom angiotenzinu. Ovaj signal je najintenzivniji u slučaju kompleksa **3**, što ukazuje na nizak vezivni afinitet prema peptidu. U slučaju jedinjenja **1** i **2**, intenzitet signala poreklom od slobodnog angiotenzina je značajno niži, pogotovo u slučaju **2** gde je najveći udeo peptida detektovan u rutenovanom obliku. Ovi rezultati su u dobroj korelaciji sa prethodno određenim afinitetom vezivanja ispitivanih Ru(II) jedinjenja za proteine (**3** \ll **1** < **2**).



Slika 36. ESI MS spektri adukta angiotenzina II sa kompleksima **1** (A), **2** (B) i **3** (C) u negativnom jonskom modu. Inset u svakom spektru pokazuje izotopsku raspodelu detektovanog jednostruko negativno naelektrisanog jona.

Detekcija jednostruko naelektrisanih jona se može objasniti pozitivnim naelektrisanjem rutenovanog peptida koje otežava nastanak višestruko naelektrisanih vrsta u negativnom jonskom modu. Stoga se korišćenje negativne jonizacije može posmatrati kao način za redukciju naelektrisanja, što značajno pojednostavljuje interpretaciju rezultata. Tačnije, kao rezultat ovakve analize se dobijaju ESI spektri nalik MALDI spektrima. Na ovaj način se, u jednom eksperimentu, prednost nastajanja jednostruko naelektrisanih jona karakteristična za MALDI analizu spaja sa prednošću ESI analize u pogledu mekoće jonizacije i očuvanja oformljenog rutenovanog peptida u intaktnom obliku, bez neželjene fragmentacije u izvoru.

3.7.2.3 Identifikacija mesta za vezivanje kompleksa Ru(II) na HSA u pozitivnom jonskom modu

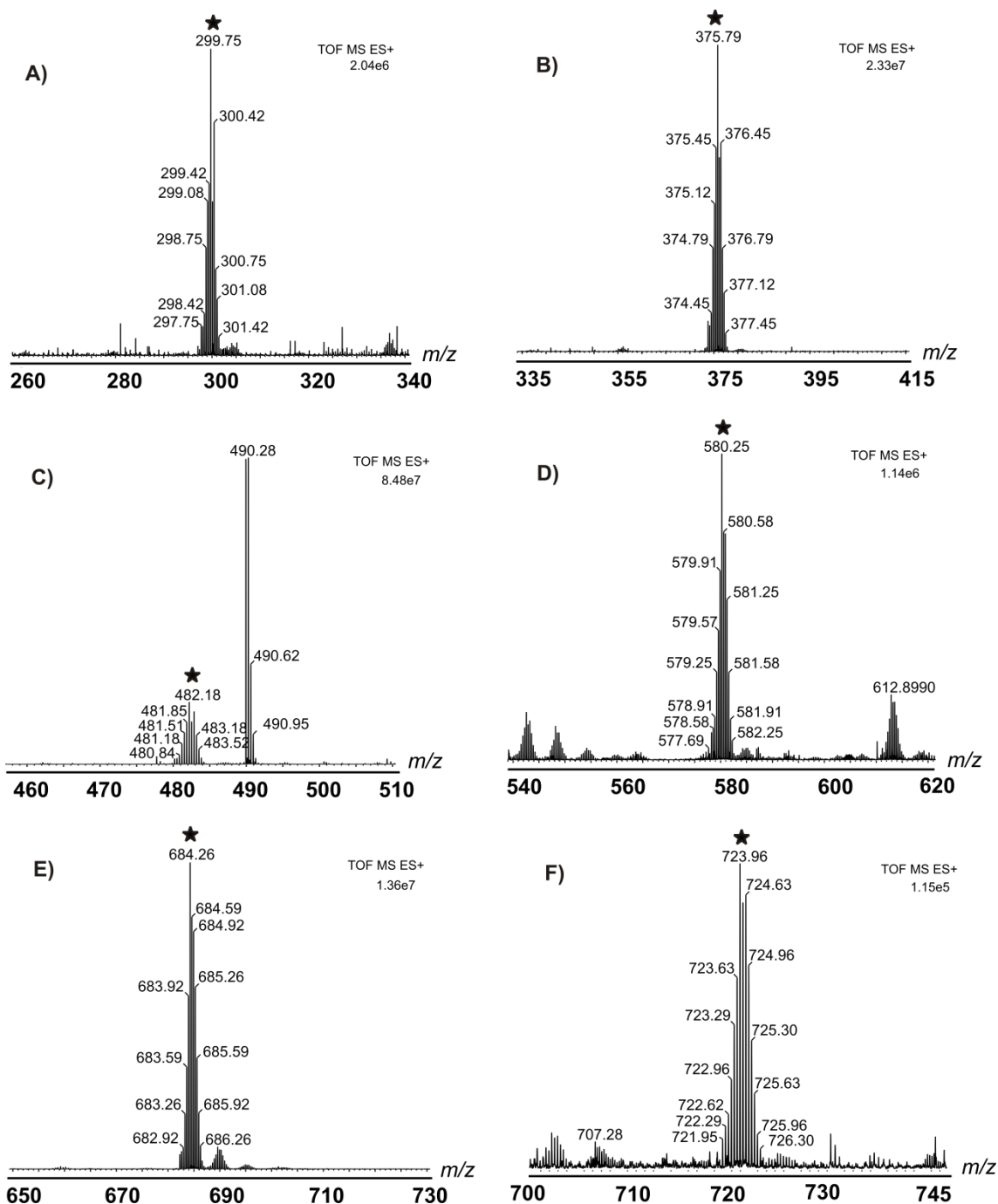
Sa ciljem optimizacije nano-ESI MS pristupa za olakšanu identifikaciju ciljnih sekvencija, MS^E spektri peptida HSA adukata sa ispitivanim kompleksima su snimljeni u pozitivnom jonskom modu, nakon razdvajanja na RP nano-LC koloni. Snimanje spektara u MS^E modu omogućava simultanu detekciju jona pri niskoj i visokoj vrednosti kolizione energije, tako da se tokom jednog hromatografskog razdvajanja dobiju informacije o peptidima prisutnim u smeši (MS) i njihovim fragmentnim jonima (MS/MS) [184]. Slika 2A (Prilog 1) prikazuje hromatogram peptida HSA adukata sa **1**, snimljenih u pozitivnom jonskom modu. Prethodno opisan problem manuelne identifikacije ciljnih sekvencija je prevaziđen tako što su monoizotopske mase kompleksa (bez odlazećeg Cl liganda) podešene kao amino-kiselinske modifikacije bočnog lanca, a podaci obrađeni upotrebom ProteinLynx Global Server (PLGS)

softvera. Budući da se MS^E podaci sastoje od spektara snimljenih pri niskoj energiji (*engl.* low energy, LE) i spektara snimljenih pri visokoj energiji (*engl.* high energy, HE), i ciljne sekvencije i ciljne amino kiseline za vezivanje Ru(II) jedinjenja su u analiziranim uzorcima određene iz jednog seta podataka. To znači da nije bilo neophodno ručno identifikovati ciljne sekvencije, tj. odabrati prekursore za tandem masenu analizu i određivanje vezivnih amino-kiselina.

Za vezivanje jedinjenja **1** (Slika 37) i **2** (Slika 3, Prilog 1) je pronađeno 6 ciljnih sekvencija, dok je jedinjenje **3** (Slika 4, Prilog 1) pokazalo niži vezivni afinitet sa četiri identifikovane ciljne sekvencije. Razlog verovatno leži u prirodi bipy liganda koji nema sposobnost građenja klasičnih vodoničnih veza sa okolnim amino-kiselinskim ostacima na proteinu. Kako en i dach ligandi sadrže NH grupe koje mogu imati ulogu donora u formiranju vodoničnih veza, lakše ostvaruju interakcije sa amino-kiselinama polipeptidnog lanca. Odsustvo ovih grupa kod bipy liganda smanjuje sposobnost formiranja vodoničnih veza, dok je tendencija ka „steking“ interakcijama povećana. Identifikovane ciljne sekvencije za sva tri Ru(II) kompleksa su sumirane u Tabeli 8.

Tabela 8. Lista identifikovanih ciljnih peptidnih sekvencija HSA za vezivanje **1**, **2** i **3**. Ciljne amino-kiseline su podvučene u svakoj sekvenciji. Monoizotopske *m/z* su navedene u pozitivnom (3+) i negativnom (1-) jonskom modu.

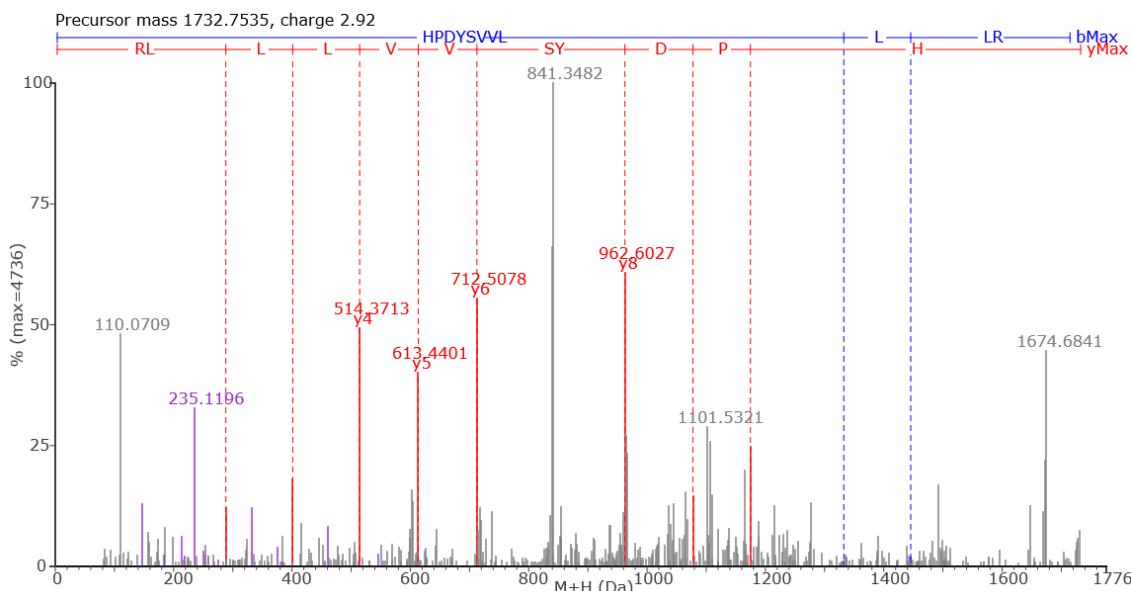
Peptidna sekvencija	Jedinjenje 1		Jedinjenje 2		Jedinjenje 3	
	3+	1-	3+	1-	3+	1-
¹ DA <u>H</u> K ⁴	297,7527	887,2069	315,7621	941,2589	329,7509	985,2335
⁵ SEVA <u>H</u> R ¹⁰	373,7895	1115,3309	391,7990	1171,3953	405,7886	1211,0553
⁶⁵ SL <u>H</u> TLFGDK ⁷³	480,1825	1434,5259	498,1963	1489,5558	512,1762	1532,5255
¹⁴⁶ HPYFYAPE <u>L</u> LLFFAK ¹⁵⁹	721,9536	2161,9209	739,9736	2215,9282	-	-
³²⁴ DVFLGMFLY <u>E</u> YAR ³³⁶	682,2635	2042,7911	700,2694	2096,8191	714,2571	2138,7625
³³⁸ HPDYSV <u>L</u> LLLR ³⁴⁸	578,2404	1730,7406	596,2534	1783,7639	-	-



Slika 37. LE MS^E spektri [Ru(Cl-tpy)(en)]-vezanih HSA sekvencija: DAHK (A), SEVAHR (B), SLHTLFGDK (C), HPDYSVLLLR (D), DVFLGMFLYEYAR (E) i HPYFYAPELLFFAK (F), u pozitivnom jonskom modu. Ciljne sekvencije su označene zvezdicom u svakom spektru.

Ciljne amino-kiseline za koje su Ru(II) jedinjenja vezana u svakoj identifikovanoj sekvenciji su određene softverski, na osnovu identifikovanih jona nastalih fragmentacijom peptida pri visokoj kolizionoj energiji. Primer PLGS generisanog HE MS^E spektra na kome je prikazana fragmentacija adukta

$^{338}\text{HPDYSVLLLLR}^{348}$ sekvencije sa jedinjenjem **1** je prikazan na Slici 38. Nađeno je da se jedinjenja **1** i **2** vezuju za ukupno pet bočnih ostataka histidina i jedan ostatak asparaginske kiseline, dok jedinjenje **3** vezuje tri His i jedan Asp.



Slika 38. PLGS generisan HE MS^E spektar adukta $^{338}\text{HPDYSVLLLLR}^{348}$ sekvencije HSA sa jedinjenjem **1**. Identifikovani prekursor je trostruko pozitivno naelektrisan jon i ima masu od 1732 Da. Identifikovana masa odgovara masi adukta peptida sa **1**, nakon hidrolize Cl liganda.

Kako sva tri kompleksa imaju zajedničke ciljane sekvencije, broj i identitet fragmentnih jona sekvencija za vezivanje odabranog kompleksa **2** je prikazan u Tabeli 9. Među identifikovanim sekvencijama, DAHK sekvencija je pronađena ručno, te će rezultati tandem masenih eksperimenata za nju biti prikazani u narednom odeljku.

Tabela 9. Fragmentni joni u LE MS^E spektrima, identifikovani uz pomoć PLGS softvera. ° označava neutralni gubitak (H₂O, NH₃).

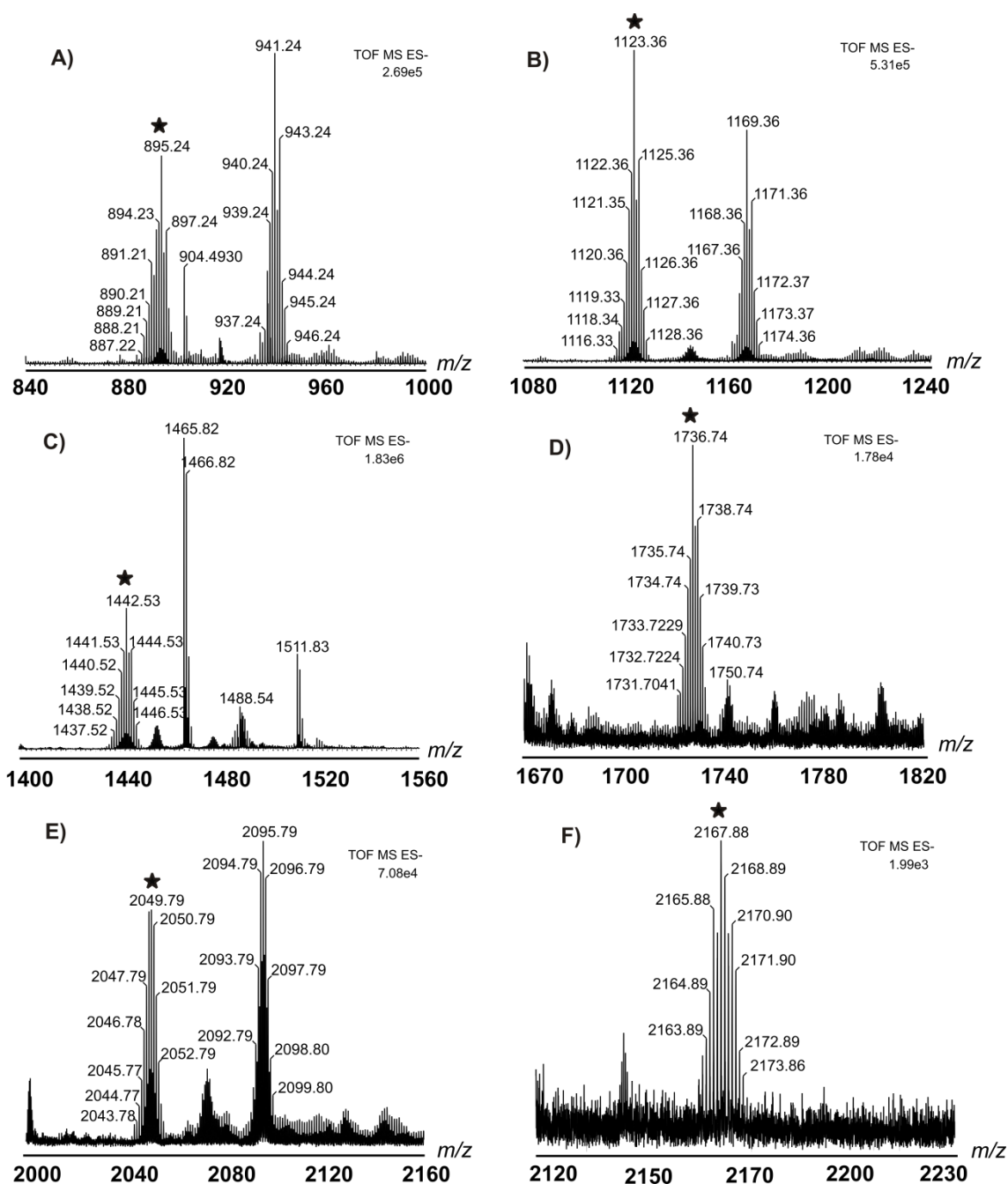
Peptidna sekvencija	Broj jona	Identitet fragmentnih jona
$^5\text{SEVAHR}^{10}$	12	b ₂ , b ₃ , b ₃ [°] , b ₄ , b ₄ [°] , b ₅ , y ₂ , y ₃ , y ₄ , y ₅ , y ₅ [°] , y ₆
$^{65}\text{SLHTLFGDK}^{73}$	9	y ₂ , y ₂ [°] , y ₃ , y ₃ [°] , y ₄ , y ₅ , y ₆ , y ₇ , y ₇ [°]
$^{146}\text{HPYFYAPELLFFAK}^{159}$	10	b ₁₀ [°] , y ₂ , y ₃ , y ₄ , y ₆ , y ₇ , y ₈ , y ₁₂ , y ₁₃ , y ₁₄
$^{324}\text{DVFLGMFLYEYAR}^{336}$	7	b ₁ , b ₁₁ [°] , y ₈ , y ₉ , y ₁₀ , y ₁₁ , y ₁₂
$^{338}\text{HPDYSVLLLLR}^{348}$	13	b ₂ , b ₅ [°] , y ₂ , y ₃ , y ₄ , y ₅ , y ₆ , y ₇ , y ₈ , y ₈ [°] , y ₉ , y ₁₀ , y ₁₁

Na osnovu dobijenih rezultata, može se pretpostaviti da opisani pristup poseduje potencijal za identifikaciju ciljnih proteina za vezivanje kompleksa metala i u kompleksnijim uzorcima. Primenom sličnog pristupa, Will i saradnici su uspeli da odrede ciljne proteine za vezivanje *cis*-Pt i $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimen})(\text{DMSO})\text{Cl}_2]$ u ćelijskom ekstraktu *Echerichia Coli* [185], [186]. Prednost pristupa koji je opisan u ovoj disertaciji je upotreba nano-LC/nano-ESI MS sistema koji zahteva znatno manju količinu uzorka i pokazuje povećanu osetljivost u odnosu na konvencionalne ESI masene spektrometre. Navedene prednosti mogu biti od ključne važnosti, budući da su relevantne mete lekova uglavnom proteini niske zastupljenosti kao i da je količina uzorka dostupnog za analizu neretko mala. Pored toga, snimanje MS^E spektara omogućava dobijanje svih potrebnih informacija tokom jednog hromatografskog razdvajanja, što značajno skraćuje vreme potrebno za analizu. Međutim, treba imati u vidu da softverski paketi koji su dostupni za obradu MS rezultata u proteomici ne uzimaju u obzir izotopsku raspodelu jona metala već samo raspodelu standardnih elemenata koji čine prosečnu amino-kiselinu. Iz tog razloga je poželjno vizuelno proveriti izgled spektara identifikovanih sekvencija, kako bi se minimizovale eventualne greške.

3.7.2.4 Identifikacija mesta za vezivanje kompleksa Ru(II) na HSA u negativnom jonskom modu

Sposobnost peptida i metalo-peptida da jonizuju u negativnom jonskom modu pri mikrolitarskim i nanolitarskim brzinama protoka je pripisana efektu brzog uklanjanja protona od strane FA i elektrosprej stabilizujućem efektu IPA. Post-kolonski dodatak FA ne utiče na hromatografsko razdvajanje ili jonizacionu efikasnost uzorka u pozitivnom jonskom modu, tako da komplementarni set podataka može biti dobijen bez dodatnih izmena u podešavanjima instrumenta osim zamene polarnosti (Slika 2B, Prilog 1). Stoga bi dobijanje rezultata u negativnom jonskom modu predstavljalo direktnu potvrdu rezultata dobijenih u pozitivnom jonskom modu, i obrnuto. S tim u vidu, ciljne sekvencije za vezivanje ispitivanih jedinjenja su ručno identifikovane u snimljenim MS^E spektrima (Slika 39 i Slike 5 i 6, Prilog 1). Kao i u slučaju angiotenzina, u većini spektara se mogu videti dodatni signali, mase veće za 46 Da, koji odgovaraju aduktima

sa mravljom kiselinom. Identifikovane ciljne sekvencije za sva tri Ru(II) kompleksa su sumirane u Tabeli 8.

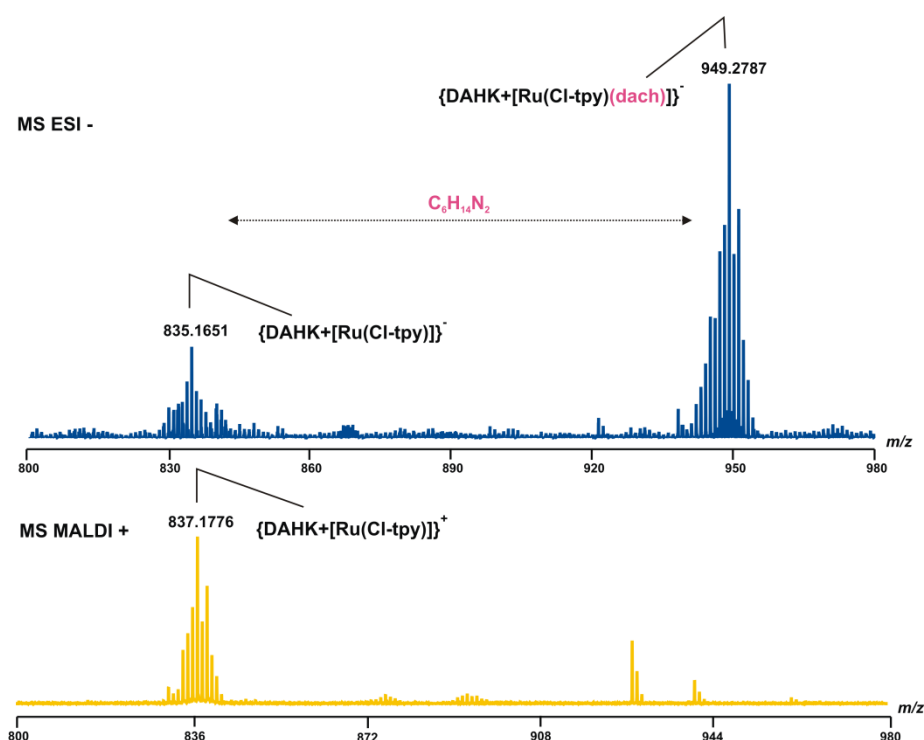


Slika 39. LE MS^E spektri [Ru(Cl-tpy)(en)]-vezanih HSA sekvencija: DAHK (A), SEVAHR (B), SLHTLFGDK (C), HPDYSVLLLR (D), DVFLGMFLYFYAR (E) i HPYFYAPELLFFAK (F) u negativnom jonskom modu. Ciljne sekvencije su označene zvezdicom u svakom spektru.

Na spektrima su detektovani signali kod kojih se primećuje redukovano prisustvo višestruko naelektrisanih, odnosno predominantno prisustvo jednostruko

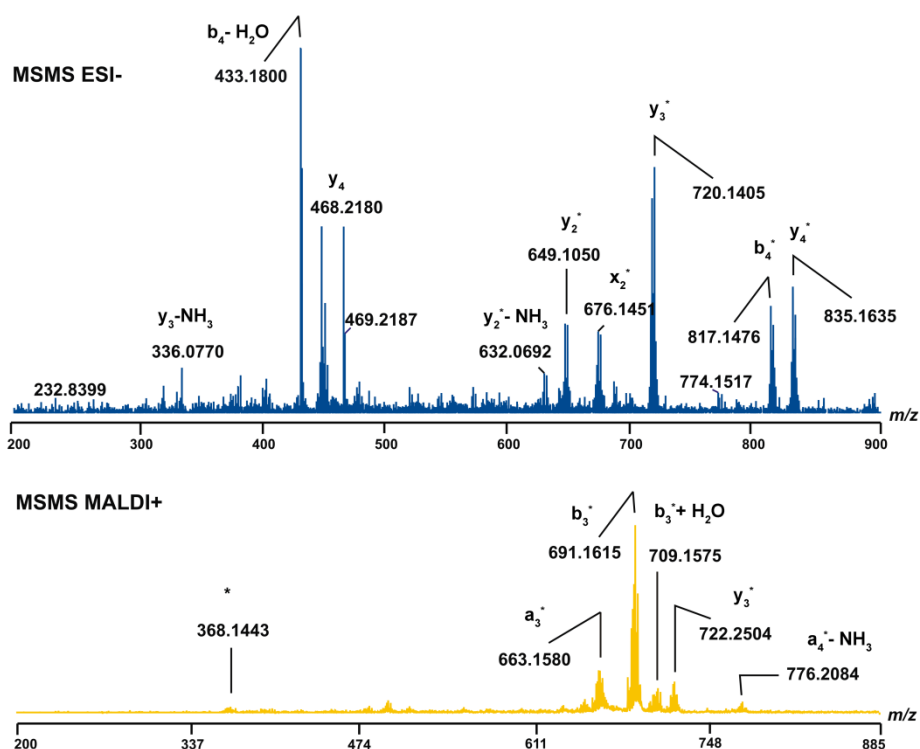
naelektrisanih vrsta. Posledično, očigledne razlike između izotopske raspodele slobodnih peptida i peptida koji imaju vezane Ru(II) komplekse značajno olakšavaju identifikaciju ciljnih sekvencija. Iako intenzitet jona snimljenih u negativnom modu, kao i kvalitet spektara, opada u poređenju sa pozitivnim jonskim modom (naročito sa rastućim m/z), dobijeni su zadovoljavajući rezultati. Šta više, postignuta je dobra komplementarnost pozitivnog i negativnog jonskog moda, tj. istih šest ciljnih sekvencija je identifikovano i u pozitivu i u negativu.

Sličnost ESI MS spektara snimljenih u negativnom jonskom modu sa MALDI MS spektrima u pozitivnom modu je ilustrovana na primeru adukta DAHK sekvencije sa kompleksom **2** (Slika 40). Na spektrima se vidi da MALDI analiza dovodi do potpunog gubitka helatnog liganda, dok kod ESI analize dach pretežno ostaje koordinovan za Ru centar. Iako je i na primeru Tf pokazano da MALDI MS⁺ može biti korišćen za ispitivanje vezivanja ovih kompleksa za proteine, upotreba ESI MS⁻ daje kompletniju sliku i ne zahteva dodatnu metodu kojom bi se potvrdilo da do gubitka helatnih liganada dolazi u izvoru masenog spektrometra, a ne hidrolizom u rastvoru.



Slika 40. Poređenje ESI MS⁻ i MALDI MS⁺ spektara adukta DAHK sekvencije HSA sa kompleksom **2**. Za razliku od MALDI MS⁺ analize koja u potpunosti dovodi do fragmentacije, pri ESI MS⁻ analizi helatni ligandi ostaju koordinovani za Ru centar.

Budući da je DAHK sekvencija u pozitivnom modu identifikovana ručno na osnovu masenog pomeraja, a ne softverski na osnovu fragmentacijskog spektra, nisu dobijeni podaci o vezivnoj amino-kiselini, kao ni tačna potvrda identiteta predložene sekvencije. Iz tog razloga je urađena tandem masena analiza prekursora koji po masi odgovara aduktu DAHK peptida i kompleksa **2**. Kao i u slučaju MS analize, MS/MS spektar dobijen uz pomoć ESI analize u negativnom modu je upoređen sa MS/MS spektrom dobijenim MALDI analizom u pozitivnom jonskom modu (Slika 41).



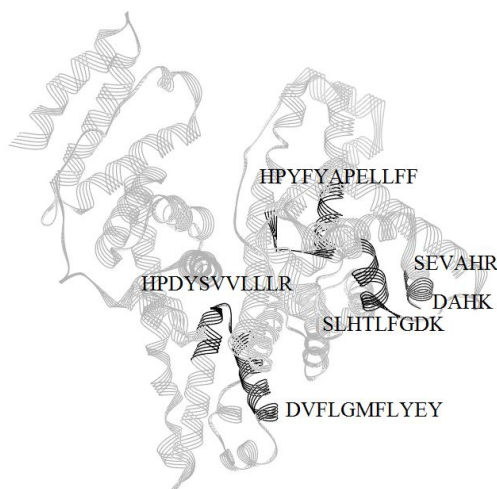
Slika 41. Poređenje MS/MS spektara adukta DAHK sekvencije HSA sa kompleksom **2**, snimljenih u ESI⁻ i MALDI⁺ jonskom modu. Detektovani su različiti fragmentni joni koji, u oba slučaja, ukazuju na vezivanje kompleksa za His3. * označava [Ru(Cl-tpy)]⁺.

Za razliku od MS analize, tokom fragmentacije peptida u negativnom ESI jonskom modu dolazi do gubitka helatnih liganada kao i kod MALDI analize. Svi fragmentni joni u oba spektra su jednostruko naelektrisani ali se međusobno razlikuju. Naime, u ESI spektru je prisutan veći broj fragmentnih jona pretežno y serije, dok su u MALDI spektru dominantniji fragmenti a i b serije. Prisustvo rutenovanih y₂ i x₂ jona u ESI, odnosno b₃ i a₃ jona u MALDI spektru ukazuje na vezivanje kompleksa za His3. Razlike u načinu fragmentacije između pozitivnog i negativnog jonskog moda, kao i tipa korišćenog izvora jonizacije (MALDI vs. ESI) ukazuju na metodološku

komplementarnost. To znači da se određeno mesto vezivanja kompleksa može potvrditi komplementarnim pristupom, kao i da, u slučajevima kada se iz detektovanih jona dobijenih jednom metodom ne može nedvosmisleno odrediti vezivno mesto, drugačiji tip fragmentacije omogućava dobijanje dodatnih informacija.

3.8 Doking studija vezivanja terpiridinskih kompleksa Ru(II) za HSA

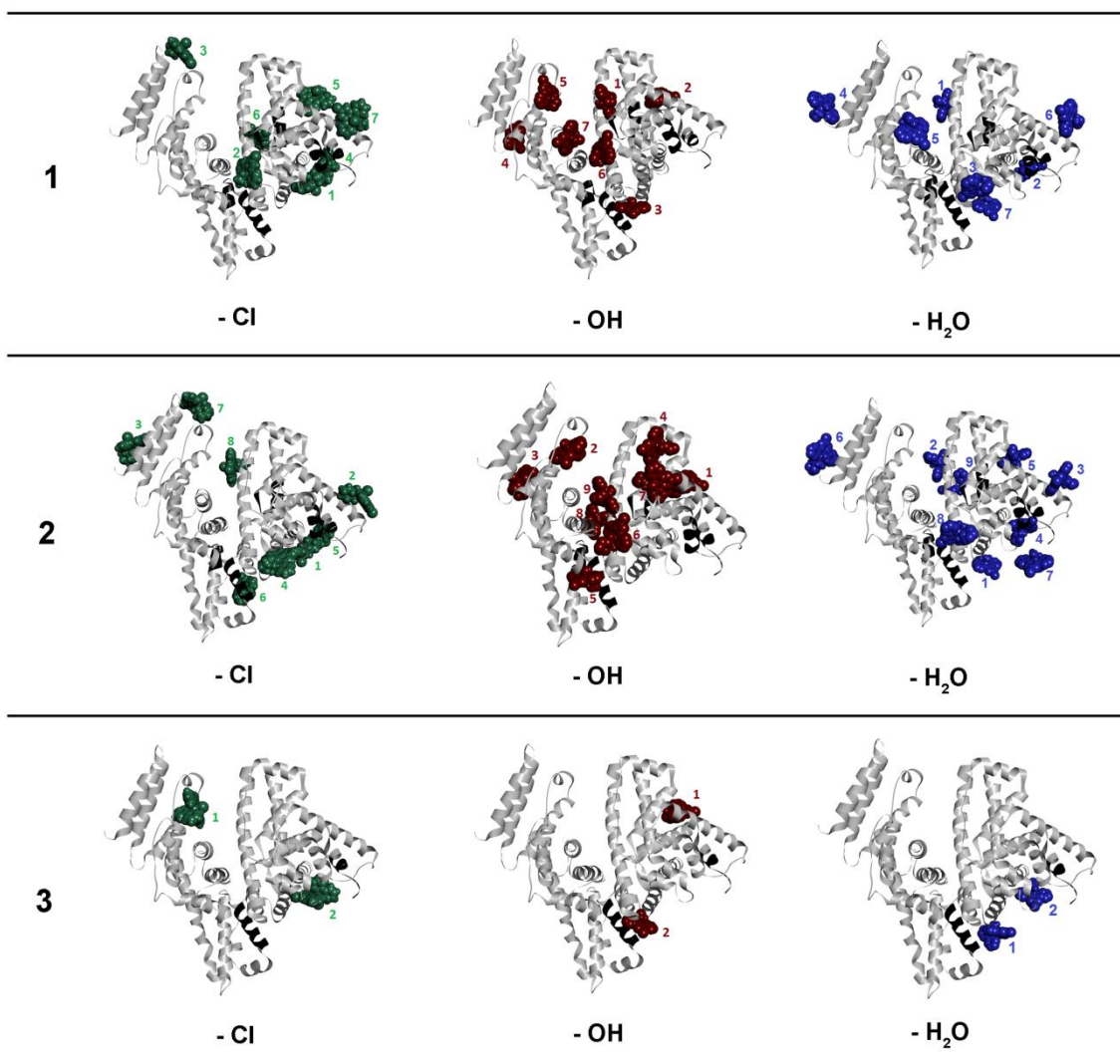
Na osnovu dobijenih MS rezultata i prostorne lokalizacije identifikovanih sekvencija, mogu se definisati tri vezivna regiona HSA za koje se ispitivani Ru(II) kompleksi mogu vezati koordinativno kovalentno (Slika 42). Prvi je lociran na domenu I, u blizini ¹⁴⁶HPYFYAPELLFFAK¹⁵⁹ sekvencije. Drugi region je lociran između subdomena IA i IIA i zauzima prostor između ¹DAHK⁴, ⁵SEVAHR¹⁰ i ⁶⁵SLHTLFGDK⁷³ sekvencija. Treći vezivni region je lociran na subdomenu IIB, između ³²⁴DVFLGMFLYEYAR³³⁶ i ³³⁸HPDYSVLLLR³⁴⁸ sekvencija. Od ova tri regiona, samo jedan pripada glavnim vezivnim mestima za lekove.



Slika 42. Pozicija ciljnih sekvencija HSA za vezivanje kompleksa 1, 2 i 3.

Po rastvaranju ispitivanih kompleksa dolazi do hidrolize Cl liganda i akvacije, pri čemu se akva ligandi lako deprotonuju formirajući hidroksno komplekse [36]. Iako ravnoteža reakcije može biti pomeren prema hlora ili akva/hidroksno kompleksima u zavisnosti od uslova sredine, sve tri vrste (Cl, H₂O i OH) su prisutne u rastvoru i stoga su uključene u doking studije. Doking je rađen na način da je za svaki od tri oblika ispitivanih kompleksa omogućeno 100 energetski najpovoljnijih protein-ligand

konformacija. Pri tumačenju rezultata razmatran je onaj broj vezivnih mesta koji odgovara prosečnom broju vezanih molekula kompleksa po molekulu proteina, određenom ICP OES metodom (sedam za kompleks **1**, devet za **2** i dva za kompleks **3**). Položaj odabranih vezivnih mesta sa najnižim energijama vezivanja je prikazan na Slici 43.



Slika 43. Vezivna mesta -Cl, -OH i -H₂O oblika kompleksa **1**, **2** i **3** na HSA. Hloro oblici kompleksa su prikazani zelenom bojom, hidroksu crvenom, dok su akva vrste prikazane plavom bojom. Ciljne sekvencije HSA određene masenom spektrometrijom su obojene crnom bojom.

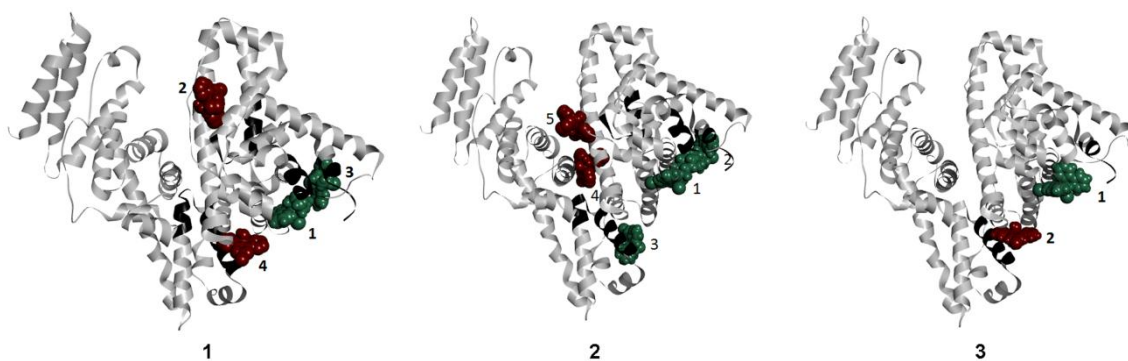
Vrednosti vezivnih energija za svako odabrano mesto za koje se kompleksi u bilo kom od svoja tri oblika mogu vezati, su prikazane u Tabeli 10. U slučaju da se dva oblika vezuju za isto mesto, prikazano je ono sa nižom energijom. Dobijene vrednosti pokazuju da se, u slučaju sva tri kompleksa, hloro oblici neznatno jače vezuju od

hidrokso kompleksa. I hidrokso i hlora oblici imaju najniže energije vezivanja za HSA u slučaju kompleksa **2**, dok su kod kompleksa **3** energije najveće. Kod kompleksa **1**, akva oblici pokazuju manji broj vezivnih mesta od Cl i OH oblika, ali su im energije vezivanja slične. Kod kompleksa **2** i **3**, energije vezivanja akva vrsta su značajno manje ($1 \gg 2 > 3$). Dakle, akva vrste se mogu vezati za najmanji broj mesta na HSA pri čemu ostvaruju nekovalentne interakcije sa dva do tri amino kiselinska ostatka i ni jedno od tih mesta ne odgovara MS određenim sekvencijama.

Tabela 10. Vezivne energije hlora, akva i hidrokso oblika **1**, **2** i **3** za svako od vezivnih mesta na HSA. Energije vezivanja hlora kompleksa koje odgovaraju MS određenim ciljnim sekvencijama su označene zelenom bojom, dok su u slučaju hidrokso kompleksa označene crvenom. Preostale vrednosti vezivnih energija koje najverovatnije odgovaraju nekovalentno vezanim kompleksima su označene crnom.

Kompleks Ru(II)	Broj vezivnog mesta	Vezivna energija (kcal/mol)		
		-Cl	-OH	-H ₂ O
1 <i>[RuL(4'-Cl-tpy)(en)]</i>	1	-8,12	-7,80	-7,90
	2	-7,27	-6,32	-7,83
	3	-7,22	-5,84	-7,40
	4	-7,09	-5,77	-
	5	-6,99	-5,42	-
	6	-6,83	-5,34	-
	7	-6,74	-5,22	-
2 <i>[RuL(4'-Cl-tpy)(dach)]</i>	1	-9,14	-8,56	-3,02
	2	-8,67	-7,75	-2,95
	3	-8,53	-7,08	-2,73
	4	-8,53	-6,93	-2,66
	5	-8,38	-6,82	-
	6	-8,37	-6,77	-
	7	-7,46	-6,55	-
	8	-7,18	-6,48	-
	9	-	-6,47	-
3 <i>[RuL(4'-Cl-tpy)(bipy)]</i>	1	-7,97	-6,33	-1,78
	2	-6,98	-5,84	-1,44

Poređenjem vezivnih mesta definisanih doking studijom sa položajem MS identifikovanih sekvencija, može se zaključiti da na HSA postoji pet mesta za koje se kompleksi **1** i **2** mogu vezati koordinativno kovalentno. U slučaju kompleksa **3** mogu se definisati dva takva vezivna mesta (Slika 44). Kompleks **1** se u hloro obliku vezuje u blizini His67, His9 i His338, dok vezivna mesta u blizini His146 i Asp324 preferiraju hidrokso oblik kompleksa. Kako je His3 u strukturi HSA lociran blizu His67, najverovatnije je da se, u nekom procentu, vezani hloro oblik kompleksa koordiniše za His3 umesto His67 što je rezultovalo MS detekcijom obe ciljane amino kiseline.



Slika 44. Strukture HSA sa naznačenim vezivnim mestima za **1**, **2** i **3**. Hloro oblici kompleksa su obojeni zelenom bojom, dok su hidrokso oblici crveni. MS indentifikovane sekvencije su obojene crnom bojom.

Kompleks **2** se u hloro obliku vezuje za mesta u blizini His67/His3, His9 i Asp324, a u hidrokso obliku za His338 i His146. Kompleks **3** se u hloro obliku vezuje za mesto u blizini His9/His3/His67, dok drugo vezivno mesto u blizini Asp324 preferira **3** u hidrokso obliku. Vrednosti energija vezivanja, oblik kompleksa i vezivne amino kiseline na mestima na kojima se ispitivani kompleksi Ru(II) za HSA mogu vezati koordinativno su sumirani u Tabeli 13. Dobijene razlike u vrednostima vezivnih energija za različite oblike kompleksa ukazuju na to da smanjenje reaktivnosti nekih kompleksa metala u krvi ne mora isključivo biti posledica manje reaktivnosti hloro oblika u odnosu na njihove akva analoge (zbog prirode odlazećeg liganda), već da na nju mogu uticati i sposobnost određenog oblika kompleksa da ostvari interakcije sa amino-kiselinskim ostacima na proteinu, kao i jačina ostvarenih interakcija (tj. energije vezivanja).

Tabela 11. Vezivne energije kompleksa **1**, **2** i **3** za svako od definisanih mesta za koje se kompleksi mogu vezati koordinativno kovalentno.

Vezivno mesto	Vezivna energija (kcal/mol)		
	1	2	3
1	-8,12 [RuCl(4'-Cl-tpy)(en)] ⁺ <i>His67, His3</i>	-9,14 [RuCl(4'-Cl-tpy)(dach)] ⁺ <i>His67, His3</i>	-6,98 [RuCl(4'-Cl-tpy)(bipy)] ⁺ <i>His9, His3, His67</i>
2	-7,80 [RuOH(4'-Cl-py)(en)] ⁺ <i>His146</i>	-8,38 [RuOH(4'-Cl-tpy)(dach)] ⁺ <i>His9</i>	-5,84 [RuOH(4'-Cl-tpy)(bipy)] ⁺ <i>Asp324</i>
3	-7,09 [RuCl(4'-Cl-tpy)(en)] ⁺ <i>His338</i>	-8,37 [RuOH(4'-Cl-tpy)(dach)] ⁺ <i>Asp324</i>	-
4	-6,83 [RuCl(4'-Cl-tpy)(en)] ⁺ <i>His9</i>	-6,48 [RuOH(4'-Cl-tpy)(dach)] ⁺ <i>His338</i>	-
5	-5,84 [RuOH(4'-Cl-tpy)(en)] ⁺ <i>Asp324</i>	-6,47 [RuOH(4'-Cl-tpy)(dach)] ⁺ <i>His146</i>	-

Sva tri kompleksa pokazuju najveći afinitet za vezivanje za vezivni region lociran između IA i IIA subdomena, koji obuhvata ¹DAHK⁴, ⁵SEVAHR¹⁰ i ⁶⁵SLHTLFGDK⁷³ sekvencije. Kompleksi **1** i **2** se u ovom regionu mogu vezati za dva vezivna mesta, dok se kompleks **3** može vezati za jedno. ¹DAHK⁴ sekvencija koja ulazi u sastav ovog vezivnog regiona je poznata kao obeležje albumina za vezivanje metala. Sastoji se od N-terminalnog mesta (*engl.* N-terminal site, NTS) za koje se metali vezuju pretežno preko koordinacije His3 koji je takođe identifikovan i kao meta za vezivanje **1**, **2** i **3**. Oko 2% NTS HSA popunjava Cu(II) što ovaj protein čini drugim najvećim skladištem bakra u humanom serumu [187], [188]. Druga sekvencija koja je deo ovog vezivnog mesta je ⁶⁵SLHTLFGDK⁷³. Ova sekvencija sadrži His67 čiji je azot imidazolovog prstena ligand za vezivanje različitih metala, i u literaturi je opisan kao HSA vezivno mesto za metale A [188]. Takođe, i His67 i His9 iz ⁵SEVAHR¹⁰ sekvencije su identifikovani kao vezivna mesta za cisplatinu na HSA [189], [190].

Vezivni region koji obuhvata ¹⁴⁶HPYFYAPELLFFAK¹⁵⁹ sekvenciju je lociran na donjem ulazu u subdomen IB, koji je pretežno sačinjen od tri α heliksa koji formiraju

hidrofobni žleb. Kompleks **1** pokazuje veći vezivni afinitet za ovo mesto od kompleksa **2**. Kako je potvrđeno MS analizom, Ru se na ovom mestu koordinuje za azot imidazola His146. Nedavno objavljeni rezultati rendgenske kristalografije pokazuju da je ova amino-kiselina meta i za vezivanje klinički relevantnog KP1910 [17].

Treći vezivni region je lociran na subdomenu IIB, i obuhvata ³²⁴DVFLGMFLYEYAR³³⁶ i ³³⁸HPDYSVLLLR³⁴⁸ sekvencije. Kompleks **1** pokazuje veći afinitet za vezivanje za His338, u poređenju sa Asp324, dok je u slučaju kompleksa **2** situacija obrnuta. Kompleks **3** se u ovom regionu vezuje samo za Asp324. Monodentatno vezivanje jedinjenja na bazi rutenijuma, kroz interakcije sa O atomima Asp ostataka je opisano u literaturi u slučaju nekoliko različitih proteina [191].

Važno je istaći da ni jedan od pet ciljnih ostataka His i jednog Asp nije direktno uključen u interakcije koje inicijalno nastaju na svakom vezivnom mestu. Pretpostavlja se da vezivanje ispitivanih Ru(II) jedinjenja, koje je pretežno bazirano na vodoničnom vezivanju, hidrofobnim i elektrostatičkim interakcijama između Ru-koordinovanih liganada i okolnih amino-kiselinskih ostataka, dovodi do diskretnih konformacionih promena koje omogućavaju koordinaciju za elektron-donorske ostatke His/Asp iz identifikovanih sekvencija na svakom vezivnom mestu. Ova pretpostavka je u skladu sa rezultatima analize promena u strukturi HSA po vezivanju kompleksa identifikovanih CD spektroskopijom.

Uzimajući u obzir mogući broj kovalentno vezanih molekula kompleksa i stehiometriju vezivanja određenu ICP OES metodom, moglo bi se zaključiti da HSA u proseku nekovalentno vezuje dva molekula kompleksa **1**, četiri molekula kompleksa **2** i ni jedan molekul kompleksa **3**. Međutim, treba imati u vidu da su ovi rezultati dobijeni pri desetostrukome višku kompleksa nakon 24 h inkubacije, kako bi se dobila kompletna slika o svim mogućim vezivnim mestima na proteinu. Iz ICP OES rezultata se vidi da se vezivanje kompleksa za protein ne završava nakon 3 h inkubacije i da se do tada, u proseku, vezuje približno pet molekula kompleksa **1** i **2**, i približno jedan molekul **3**. Na osnovu vezivnih energija prikazanih u Tabeli 12, može se videti da postoje mesta nekovalentnog vezivanja sa većim vezivnim afinitetom od pojedinih mesta na kojima se kompleksi za protein mogu vezati koordinaciono kovalentno, što znači da bi u fiziološkim uslovima dobar deo kompleksa mogao biti transportovan do tkiva i ćelija u

nekovalentno vezanom obliku, što bi potencijalno olakšalo njihovo otpuštanje sa proteina. Ovo se naročito odnosi na kompleks **2** koji je, od sva tri ispitana kompleksa, pokazao najveći vezivni kapacitet, sa najpovoljnijim vezivnim energijama. Kompleks **1** je pokazao nešto manji vezivni kapacitet sa većim brojem mesta koje imaju povoljnije vezivne energije za kovalentno vezivanje. Kompleks **3** je pokazao najmanji vezivni afinitet prema HSA. Razlog za to leži u prirodi bipy liganda koji, za razliku od en i dach liganada koji poseduju NH grupe, ne može da gradi vodonične veze sa amino-kiselinskim ostacima na proteinu. Ovaj ligand može da gradi interakcije π -tipa koje su slabije od vodoničnih veza, te je i vezivanje ovog kompleksa za protein slabije.

Uz sve navedeno, važno je istaći i da se amino-kiseline His i Asp, koje su identifikovane kao mete za vezivanje ispitivanih kompleksa, često nalaze u aktivnim centrima enzima. Vezivanje kompleksa za ove amino-kiseline ukazuje na njihov potencijal da menjaju enzimsku aktivnost, što može biti od značaja za njihov mehanizam dejstva.

3.9 Zaključci

U ovoj doktorskoj disertaciji su prikazani rezultati detaljnog ispitivanja interakcija između tri terpiridinska kompleksa Ru(II): *mer*-[Ru(Cl-tpy)(en)Cl]Cl (**1**), *mer*-[Ru(Cl-tpy)(dach)Cl]Cl (**2**) i *mer*-[Ru(Cl-tpy)(bipy)Cl]Cl (**3**) i transportnih proteina seruma, humanog serum albumina i transferina. Iz dobijenih rezultata, zaključuje se sledeće:

- Ispitivani Ru(II) kompleksi sa bidentatnim helatnim ligandima koji poseduju sposobnost građenja jakih vodoničnih veza (en i dach) pokazuju značajno veći afinitet za vezivanje transportnih proteina seruma od bipy kompleksa koji nema tu sposobnost. Postoji pozitivna korelacija između ove osobine bidentatnih liganada i citotoksičnosti (kompleksi sa en i dach ligandima su citotoksičniji od bipy kompleksa).
- Sva tri kompleksa pokazuju veći afinitet i stehiometriju vezivanja za albumin, u poređenju sa transferinom. Kako je albumin najzastupljeniji protein u serumu, transport i biodistribucija ovih kompleksa bi značajno zavisila od vezivanja za ovaj protein. U slučaju oba proteina, afinitet vezivanja je takav da je $2 > 1 \gg 3$.
- Na transferinu postoji pet ostataka histidina za koje se ispitivani Ru(II) kompleksi **1** i **2** mogu vezati koordinativno kovalentno, dok je vezivanje kompleksa **3** zanemarljivo i najverovatnije uključuje nekovalentne interakcije. Kompleksi **1** i **2** se za protein vezuju specifično, za mesto za vezivanje gvožđa, i nespecifično, za površinske ostatke histidina. S obzirom na to da vezivanje kompleksa ne dovodi do velikih promena u nativnoj strukturi proteina, pretpostavlja se da bi ovi kompleksi mogli ući u kancerske ćelije aktivnim transportom posredstvom transferinskog ciklusa.
- Na albuminu postoji pet ostataka histidina i jedan ostatak asparaginske kiseline za koje se ispitivani Ru(II) kompleksi **1** i **2** mogu vezati koordinativno kovalentno. Od toga, tri histidina i asparaginska kiselina mogu biti mete za vezivanje kompleksa **3**. Ovi amino-kiselinski ostaci ulaze u sastav pet mesta za vezivanje kompleksa **1** i **2**, i dva mesta za vezivanje kompleksa **3**. Pored toga, kompleksi se za protein mogu vezati i nekovalentnim interakcijama. Odabir

mesta za vezivanje na proteinu zavisi od toga da li se kompleksi nalaze u hloro, akva ili hidrokso obliku. Hloro oblici kompleksa se neznatno jače vezuju od hidrokso oblika, dok je vezivanje akva vrsta najslabije i uključuje nekovalentne interakcije sa amino-kiselinskim ostacima na površini proteina. Vezivanje kompleksa gotovo da nema uticaja na nativnu strukturu proteina.

- Po prvi put je pokazano da je određivanje peptidnih sekvencija i ciljnih amino-kiselina za vezivanje kompleksa metala moguće upotrebom nano-ESI MS u negativnom jonskom modu. Metoda je komplementarna postojećim pristupima i ima prednosti u odnosu na upotrebu MALDI i ESI MS u pozitivnom jonskom modu. Konkretno, u negativnom jonskom modu su detektovani jednostruko naelektrisani joni peptida sa vezanim kompleksima **1**, **2** i **3**, a da pri tom nije došlo do fragmentacije helatnih liganada u izvoru masenog spektrometra koja je karakteristična za MALDI analizu.

4. Eksperimentalni deo

Spisak korišćene opreme:

Tehnička i analitička vaga, Radwag

Centrifuga miniSpin plus, Eppendorf

Inkubator-mučkalica, Eppendorf ThermoMixer

Heraeus CO₂ inkubator za uzgoj kultura ćelija

Wallac, VICTOR2 1420 Multilabel counter, PerkinElmer

4800 Plus MALDI TOF/TOF maseni spektrometar, AB Sciex

Agilent 1100 HPLC, Agilent

SPECTROFLAME-ICP Model P, Spectro Analytical Instruments

Varian Cary Eclipse spektrofluorimetar, Agilent

J-815 CD Spektropolarimetar, Jasco

Nano-ACQUITY UPLC, Waters

SYNAPT G2-Si maseni spektrometar, Waters

4.1 Ispitivanje citotoksičnosti Ru(II) terpiridinskih jedinjenja

Ćelijske kulture humanog melanoma A375, adenokarcinoma dojke SKBR3 i cervikalnog kancera HeLa su gajene u RPMI 1640 medijumu, sa 10% fetalnim goveđim serumom i penicilin/streptomycin antibioticima, u vlažnoj atmosferi pri 5% CO₂ i 37 °C.

Ćelije su zasejane u mikrotitar pločice sa 96 bunara sa ravnim dnom, i gustom od 2×10^3 ćelija po bunaru. U eksponencijalnoj fazi rasta su izložene dejstvu različitih koncentracija ($10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$ M) **1**, **2**, **3** i cis Pt. Citotoksičnost ispitivanih Ru(II) jedinjenja je ispitana sulforodamin B (SRB) esejem, koji se zasniva na određivanju ćelijskog sadržaja proteina. Esej je urađen na osnovu metode Skehan i saradnika [192], 24 h i 48 h nakon tretmana. Ćelije su fiksirane 10% trihlorsirćetnom kiselinom (1h, 4 °C), nakon čega su pločice isprane vodom i obojene 0,4% SRB u 1% sirćetnoj kiselini, tokom 15 min na sobnoj temperaturi. Višak boje je uklonjen, a ploče su isprane 1% sirćetnom kiselinom i ostavljene da se suše na vazduhu. Boja koja se vezala za proteine je rastvorena u 10 mM rastvoru Tris, tokom 5 minuta. Apsorbance su merene na 550 nm (sa referentnom λ na 690 nm) pomoću čitača mikrotitarskih pločica.

Sva merenja su u toku jednog eksperimenta ponovljena četiri puta, dok je svaki eksperiment ponovljen dva puta. Značaj razlika između eksperimentalnih grupa je određen nezavisnim Studentovim t-testom, sa podešenim nivoom značajnosti $< 0,05$. Rezultati su prezentovani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija (S.D.).

4.2 Karakterizacija terpiridinskih kompleksa Ru(II) upotrebom MALDI MS

- *Priprema uzoraka*

Za MALDI analizu, ispitivani kompleksi su rastvoreni u dejonizovanoj vodi do koncentracije od 1 mM. Uzorci su na pločicu od nerđajućeg čelika naneti tzv. metodom osušene kapljice. Zapremina od 0,5 μ L rastvora svakog od ispitivanih kompleksa je naneta na zasebne bunare na MALDI pločici. Uzorci su osušeni na vazduhu, a zatim je jednaka zapremina (0,5 μ L) svake od ispitivanih matrica (ditranol, MTPP, DHB, CHCA), koncentracije 5 mg/mL, naneta preko uzoraka i ostavljena da se suši. Rastvori

matrica su pripremljeni rastvaranjem odmerenih supstanci u 50% acetonitrilu (CHCA) ili metanolu (DHB, MTPP, ditranol).

- *Uslovi snimanja*

Nakon sušenja, uzorci su analizirani na MALDI TOF/TOF uređaju opremljenim sa Nd:YAG laserom emisije na 355 nm i frekvencije od 200 Hz. Spektri su snimljeni u pozitivnom reflektornom jonskom modu, uprosečnjavanjem 700 udara lasera pri različitim relativnim intenzitetima (50-90%). Opseg snimanja je bio od 100 do 800 *m/z*.

4.3 Ispitivanje vezivanja terpiridinkih kompleksa Ru(II) za HSA i Tf upotrebom MALDI MS

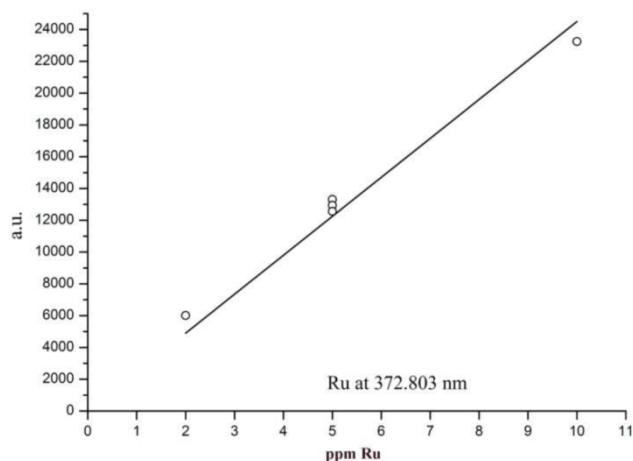
Uzorci adukata između **1**, **2** i **3** sa HSA i Tf su pripremljeni na način opisan u Poglavlju 4.4. Rastvori nativnih proteina koji su pripremljeni na isti način kao i adukti (samo bez dodatka kompleksa) su korišćeni kao kontrole. Zapremina od 0,5 μL svakog uzorka je pomešana sa 0,5 μL rastvora sinapinske kiseline (10 mg/mL u 50% acetonitrilu), naneta na MALDI pločicu i ostavljena da se suši. Spektri su snimljeni u pozitivnom linearnom jonskom modu sa 800 udara lasera, u opsegu od 20000 do 150000 Da. Vreme ekstrakcije (*engl.* extraction delay time) je podešeno na 500 ns.

4.4 Određivanje stehiometrije vezivanja terpiridinskih kompleksa Ru(II) za HSA i Tf

- *Priprema uzoraka*

Ispitivani proteini, HSA (2,0 mg) i Tf (1,66 mg), su zasebno inkubirani sa desetostrukim molarnim viškom jedinjenja **1**, **2**, **3** i cisPt u 0,5 mL 20 mM fosfatnog pufera pH 7,4. Nakon 3h (HSA) i 24 h (HSA i Tf) inkubacije uz mešanje na 37 °C, kompleksi koji se nisu vezali za proteine su od vezanih odvojeni ultrafiltracijom pomoću centrifugalnih filter jedinica (<10 000 Da) sa membranom za koncentrovanje (Microcon, Millipore Inc.). Uzorci su centrifugirani na 7000 g pri temperaturi od 10 °C, nakon čega su nekoliko puta isprani fosfatnim puferom. Dobijeni retentati proteinskih adukata sa ispitivanim kompleksima metala su digestovani preko noći u koncentrovanj azotnoj kiseline. Finalna zapremina svakog uzorka je podešena na 2,2 mL korišćenjem 2% azotne kiseline. Uzorci su potom analizirani na sadržaj metala. Uzorci HSA i Tf

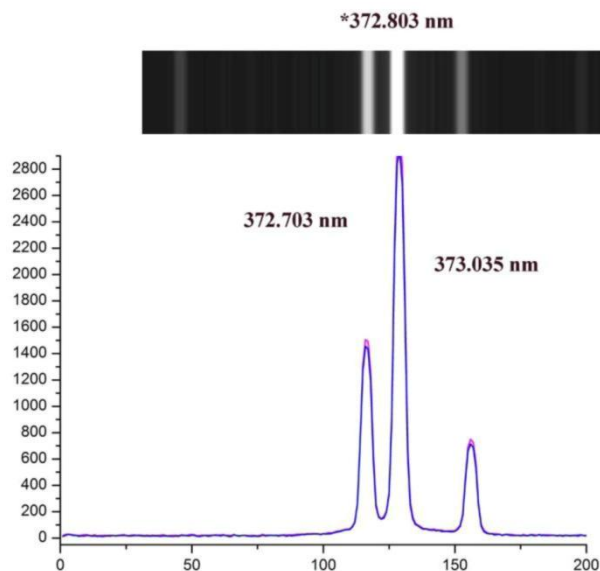
kojima nisu dodavani kompleksi, a koji su tretirani na opisan način su služili kao slepe probe. Standardi Ru i Pt (NCS Analytica Instruments, 1000 µg/mL) su razblaženi dejonizovanom vodom do koncentracije od 100 µg/mL. Od ovog štok rastvora su dalje, razblaživanjem uz pomoć 2% azotne kiseline, napravljeni rastvori za kalibraciju koncentracija 1, 2, 5 i 10 µg/mL (Slika 45).



Slika 45. Kalibraciona prava za određivanje sadržaja Ru u uzorcima rutenovanih HSA i Tf.

- *Uslovi merenja*

Za određivanje sadržaja metala u ispitivanim uzorcima je korišćen ICP OES spektrometar frekvencije generatora 27,12 MHz i izlazne snage 2,5 kW. Detektovane su tri spektralne linije rutenijuma (Slika 46). Najintenzivnija spektralna linija na 372,803 nm je korišćena i za kalibraciju i za merenja.



Slika 46. Tri spektralne linije Ru detektovane ICP OES spektrometrom. Najintenzivnija linija na 372,803 nm je označena zvezdicom. Inset pokazuje fotografiju CCD kamere.

4.5 Određivanje afiniteta vezivanja terpiridinskih kompleksa Ru(II) za HSA i Tf

Afiniteti vezivanja ispitivanih kompleksa Ru(II) za odabrane proteine su određeni uz pomoć fluorescentne spektroskopije.

- *Priprema uzoraka*

Adukti HSA ili Tf i ispitivanih Ru(II) jedinjenja su pripremljeni nakon inkubacije (uz konstantno mešanje) fiksne količine proteina sa rastućim količinama **1**, **2** i **3** u fiksnoj zapremini (2,0 mL) 20 mM PBS-a pH 7,4, tokom 24 h na 37 °C. Finalni molarni odnosi proteina prema rutenijumu su u inkubacionim smešama iznosili: 1:0 (kontrola), 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:10, 1:12.5, 1:15 i 1:20. Koncentracija HSA je iznosila 2,5 μM, a koncentracija Tf 2,6 μM.

- *Uslovi merenja*

Spektrofluorimetar je skupljao podatke na svakih 1 nm pri brzini skeniranja od 120 nm/min i vremenom usrednjavanja od 0,5 s. Širine otvora za ekscitacione i emisione snopove su podešene na 5 i 10 nm. Intenzitet fluorescencije je praćen na 25 °C

u opsegu talasnih dužina od 310-450 nm, nakon ekscitacije na 295 nm (ekscitaciona talasna dužina λ_{exc}). Korišćena je kvarcna kiveta (Hellma Analytics) dužine svetlosnog puta od 1 cm. Emisioni spektri rastvora koji sadrže samo Ru(II) jedinjenja u puferu su takođe snimljeni pod identičnim uslovima. Odgovarajuće slepe probe su korišćene za korekciju pozadinske fluorescencije. Korekcija zbog efekta razblaženja nije bila neophodna jer su veoma male zapremine (<10 μ L) koncentrovanih rastvora kompleksa dodavane u rastvore proteina. Apsorbancija svih uzoraka je izmerena u opsegu od 250 do 450 nm, a dobijene vrednosti su iskorišćene za korekciju unutrašnjeg filter efekta.

4.6 Ispitivanje uticaja vezivanja terpiridinskih kompleksa Ru(II) na konformacione promene HSA i Tf

Ispitivanje konformacionih promena HSA i Tf po vezivanju ispitivanih kompleksa je praćeno CD spektroskopijom u bliskoj i dalekoj UV oblasti.

- *Priprema uzoraka*

Jednake količine (2,5 mg) HSA i Tf su inkubirane sa rastućim koncentracijama jedinjenja **1**, **2** i **3** u 0,5 mL 20 mM fosfatnog pufera pH 7,4. Količine proteina su održavane konstantnim, dok je molarni odnos proteina prema svakom pojedinačnom kompleksu u uzorcima iznosio: 1:1, 1:2 i 1:5. Nakon 24 h inkubacije uz mešanje na 37 °C, kompleksi koji se nisu vezali za proteine su od vezanih odvojeni ultrafiltracijom pomoću centrifugalnih filter jedinica (<10 000 Da) sa membranom za koncentrovanje (Microcon, Millipore Inc.). Uzorci su centrifugirani na 7000 g, pri temperaturi od 10 °C. Dobijeni retentati (oko 0,1 mL) su nekoliko puta isprani fosfatnim puferom koji je prethodno degasiran i profiltriran kroz 0,45 μ m filtere (Sartorius). Nakon ispiranja, uzorci su istim puferom razblaženi do zapremine od 2 mL, tako da je finalna koncentracija HSA iznosila 18 μ M, a koncentracija Tf 15 μ M. Uzorci proteina kojima nisu dodavani kompleksi, a koji su tretirani na isti način, su korišćeni kao kontrole.

- *Uslovi merenja*

Spektri rutenovanih HSA i Tf, kao i kontrola, su snimljeni u dalekoj (190-260 nm) i bliskoj (260-320 nm) UV oblasti. Korišćena su dva tipa kvarcnih kiveta (Hellma): rasklopiva kiveta sa optičkom dužinom puta od 0,01 cm, za daleku oblast, i kiveta sa

optičkom dužinom puta od 1 cm za blisku UV oblast. Parametri snimanja su bili sledeći: rezolucija, 0,1 nm; brzina skeniranja, 50 nm/min; širina trake, 1 nm; odgovor, 1s. Spektri su snimljeni u triplikatu pri konstantnoj temperaturi od 25 °C i protoku azota od 5 L/min, tako da je svaki spektar bio produkt akumulacije četiri skeniranja instrumenta. Spektar radnog pufera je oduzet od svakog snimljenog uzorka. Napon na detektoru nije prelazio 0,6 kV. Instrument je kalibrisan (+)-10-kamforsulfonskom kiselinom na 290,5 nm.

4.7 Strukturna karakterizacija proizvoda interakcije kompleksa R(II) sa HSA i Tf metodama tačne hromatografije i masene spektrometrije

Sa svom identifikacije vezivnih mesta ispitivanih kompleksa na Tf i BSA, korišćene su metode HPLC i MALDI MS, dok je određivanje vezivnih mesta na HSA urađeno uz pomoć nano-UPLC/nano-ESI MS.

4.7.1 HPLC/MALDI MS

Detekcija vezivanja ispitivanih kompleksa za BSA i Tf, kao i razdvajanje rutenovanih vrsta je urađeno uz pomoć HPLC uređaja sa UV/VIS detekcijom. Identifikacija ciljnih sekvencija i amino-kiselina za vezivanje kompleksa je urađena uz pomoć MALDI MS i MS/MS analize.

4.7.1.1 Hromatografsko razdvajanje rutenovanih vrsta

- *Priprema uzoraka*

Štok rastvor BSA/Tf je pripremljen rastvaranjem proteina u amonijum bikarbonatnom puferu pH 7,2 do 37,5 μ M koncentracije. Alikvot štok rastvora je pomešan sa vodenim rastvorom svakog kompleksa zasebno, tako da je molarni odnos proteina prema kompleksu iznosio 1:20 za BSA, odnosno 1:10 za Tf. Rastvori su razblaženi radnim puferom do koncentracije proteina od 15 μ M i inkubirani 24 h na 37 °C. Nakon inkubacije, alikvoti su iz svakog uzorka uzeti za SEC analizu (*engl.* size exclusion chromatography, SEC). Ostatak (po 0,5 mL) svake inkubacione smeše je nekoliko puta ispran puferom korišćenjem Centrikon ultrafiltracionih jedinica (<10

kDa; Milipore Co.), kako bi se uklonili nevezani kompleksi. Retentati su razblaženi do početne zapremine radnim puferom. Nakon dodatka tripsina (5 μ L, 1 mg/mL), digestija proteina se odvijala na 37 °C tokom 18 h. Dobijeni peptidi su razdvojeni na C4 RP LC koloni.

- *Uslovi HPLC razdvajanja*

Eksperimenti su urađeni na HPLC uređaju sa gradijentnom pumpom, auto-uzorkivačem, sistemom za termostatiranje kolone i DAD (*engl.* diode array detector, DAD) detekcijom.

Proteini su od nevezanih kompleksa razdvojeni na Bio-Sil SEC 250 (300 x 7,8 mm, veličina čestica 5 μ m) koloni (BioRad, Hercules, CA, USA). Na kolonu je injektovano 20 μ L svakog uzorka, a uzorci su sa kolone izokratski eluirani 0,1 M amonijum bikarbonatnim puferom pH 7,0 pri protoku od 1 mL/min.

Dobijenih triptički peptidi su razdvojeni na Xbridge BEH300 C4 RP-HPLC (150 x 4,6 mm, veličina čestica 3,5 μ m) koloni (Waters, MA, USA), pod sledećim elucionim uslovima: izokratska dostava 5% acetonitrila u 0,1% vodenom rastvoru TFA (mobilna faza A) tokom 5 min, praćena linearnim gradijentom od 5% do 82% acetonitrila u 0,1% TFA (mobilna faza B) tokom 50 min pri brzini protoka od 1 mL/min. Frakcije peptida koje su na sebi imale vezane Ru(II) komplekse su ručno sakupljene i korišćene za analizu na MALDI TOF/TOF instrumentu.

4.7.1.2 Detekcija i identifikacija rutenovanih vrsta upotrebom MALDI MS

- *Priprema uzoraka*

Sakupljene frakcije posle RP HPLC separacije koje su sadržale rutenovane peptide su osušene u vakuum koncentratoru i resuspendovane u 3,5 μ L CHCA matrice (5 mg/mL u 50% acetonitrilu). Zapremina od 0,5 μ L svakog uzorka je naneta na MALDI pločicu i ostavljena da se suši na vazduhu.

- *Uslovi snimanja*

Maseni spektri su snimljeni u pozitivnom reflektornom modu, uprosečnjavanjem 1000 udara lasera, u opsegu od 800 do 4500 *m/z*. Interna kalibracija je urađena pomoću fragmenata dobijenih autolizom tripsina. Za određivanje ciljnih amino-kiselina MS/MS

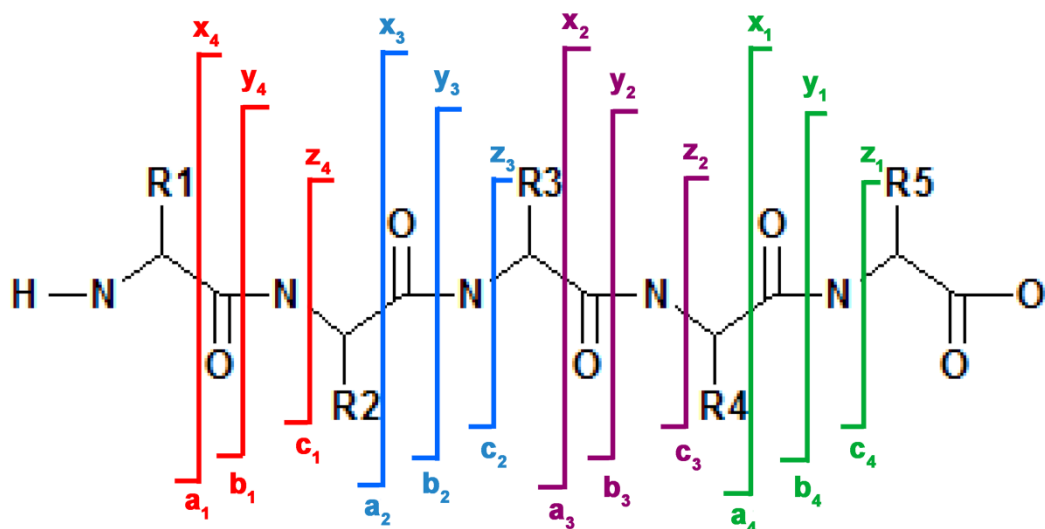
analizom, kolizijska energija je podešena na 1 keV, a spektri su snimljeni u pozitivnom jonskom modu uprosečnjavanjem 2000 udara lasera. Kao kolizijski gas je korišćen azot.

- *Obrada podataka*

Snimljeni maseni spektri su analizirani u Data Explorer softveru verzije 2.2 (Applied Biosystems, USA). Detektovani peptidi su identifikovani na osnovu rezultata dobijenih *in silico* digestijom proteinskih sekvencija preuzetih sa UniProt baze (ID P02768 za HSA i P02787 za Tf).

In silico digestija je urađena uz pomoć opcije MS digest Protein Prospector softvera v 5.19.1 (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>), sa tripsinom kao reagensom za digestiju i dve potencijalne greške. Oksidacija M i dehidracija S/T su dozvoljene kao varijabilne modifikacije bočnih amino-kiselinskih lanaca.

Nakon snimanja MS/MS spektara ciljnih sekvencija, fragmentni joni su identifikovani na osnovu *in silico* predviđenih masa izračunatih pomoću *enl. "Ion Fragmentation Calculator"* opcije u Data Explorer softveru. Tip fragmentnih jona koji može nastati u MS/MS analizi zavisi od primarne sekvencije, količine interne energije, načina na koji je energija uvedena, naelektrisanja itd. Prihvaćena nomenklatura fragmentnih jona je prvi put predložena od strane Roepstorff i Fohlman [193], a kasnije modifikovana od strane Johnson i saradnika [194]. Osnovna shema fragmentacije peptida je prikazana na Slici 47.



Slika 47. Shema fragmentacije peptida prema Roepstorff i Fohlman.

Fragmenti će biti detektovani ukoliko nose barem jedno naelektrisanje. Ukoliko se naelektrisanje zadrži na N-terminalnom fragmentu, joni su označeni kao a, b ili c. Ukoliko se zadrži na C-terminalnom fragmentu, nastaju x, y ili z joni. Subskripti na Slici 47 označavaju broj amino kiselinskih ostataka na fragmentu. Interni fragmenti sa jednim ostatkom koji nastaju kombinacijom a i y tipa cepanja se nazivaju imonijum joni i označavaju se jednim slovom koje odgovara datoj amino kiselini. Pored prikazanih, tokom fragmentacije mogu nastati i tzv. satelitni joni [195].

4.7.2 nano-UPLC/nano-ESI MS

4.7.2.1 Ispitivanje efikasnosti formaldehida kao modifikatora negativne jonizacije peptida

- *Priprema uzorka*

Protein BSA je rastvoren u 0,5 mL 25 mM amonijum bikarbonatnog pufera pH 7,8 do koncentracije od 1 mg/mL. Rastvor proteina je, nakon dodatka 5 μ L tripsina (1 mg/mL), inkubiran 18h na 37 °C uz mešanje. Alikvot (10 μ g) dobijenih BSA peptida je uparen do suva u centrifugalnom vakuum koncentratoru i resuspendovan u 0,1% mravljoj kiselini, do koncentracije od 0,1 mg/mL.

Rastvor formaldehida (FA) koncentracije 20 mM je pripremljen rastvaranjem 30,9 μ L 36% FA u 20 mL izopropanola (IPA), a od njega su razblaženjem napravljeni 10 mM i 5 mM rastvori.

- *Uslovi merenja*

Dobijeni BSA peptidi su razdvojeni na nanoACQUITY UPLC sistemu, opremljenim nanoACQUITY UPLC 2G-V/M Symmetry C₁₈ trap kolonom (100Å, 5 μ m, 180 μ m x 20 mm) i ACQUITY UPLC BEH130 C₁₈ analitičkom kolonom (130 Å, 1,7 μ m, 100 μ m x 100 mm). Kao mobilna faza A je korišćena 0,1% mravlja kiselina, a mobilna faza B 0,1% mravlja kiselina u 95% acetonitrilu. Zapremina injektovanog uzorka je iznosila 4 μ L, a temperatura kolone 40 °C. Izokratsko dopremanje mobilne faze A do trap kolone vršeno je pri protoku od 15 μ L/min, tokom 2 minuta. Peptidi su sa analitičke kolone eluirani pri brzini protoka od 1 μ L/min pomoću gradijenta: 1%-60% B (0-20 min), 60%-99% B (20-22 min), 99%-1% B (22-24 min), 1% B (24-30 min). Za

internu kalibraciju je korišćen rastvor leucin enkefalina (1 ng/ μ L u 50:50 IPA/0,1% mravlja kiselina) koji je u izvor masenog spektrometra uveden na svaki minut, kako bi se obezbedila visoka tačnost mase. Rastvori FA u IPA su u izvor masenog spektra uvedeni pri protoku od 0,4 μ L/min, iz A kanala uređaja koji je preko “T” konektora povezan sa MS izvorom na način koji omogućava mešanje modifikatora sa mobilnom fazom.

Maseni spektri su snimljeni u negativnom rezolucija modu, pri voltažama kapilare i konusa od 3,5 kV i 40 V, respektivno. Temperatura izvora je iznosila 80 °C, a pritisak gasa 1 bar. Spektri su snimljeni u opsegu od 500-4000 Da. Sva merenja su urađena u triplikatu.

4.7.2.2 Ispitivanje vezivanja kompleksa Ru(II) za angiotenzin II

- *Priprema uzoraka*

Angiotenzin II je rastvoren u 25 mM amonijum bikarbonatnom puferu pH 7,8 do koncentracije od 1 mg/mL. Rastvoru peptida je dodat petomolarni višak svakog od ispitivanih Ru(II) jedinjenja. Nakon toga, svaki rastvor je razblažen do koncentracije od 0,1 mg/mL peptida i ostavljen da se inkubira 3 h na 37 °C. Po završenoj inkubaciji, rutenovani peptidi su koncentrovani i prečišćeni na C₁₈ ZipTip kolonama od 100 μ L. Protokol za korišćenje ZipTip kolona uključuje sledeće korake:

1. Ekvilibraciju kolone: 3 x 80% acetonitril u 0,1% trifluorsirćetnoj kiselini (TFA), 3 x 50% acetonitril u 0,1% TFA i 3 x 0,1% TFA
2. Nanošenje uzorka: 10 x pipetiranje zapremine digesta (gore-dole) koja odgovara zapremini kolone (100 μ L)
3. Ispiranje: 5 x 0,1% TFA
4. Eluiranje: 80% acetonitril u 0,1% TFA (10 x gore-dole)

Nakon eluiranja sa ZipTip kolone, adukti angiotenzina sa kompleksima su upareni do suva u vakuum koncentratoru i resuspendovani u 0,1% mravljoj kiselini do koncentracije od 0,1 mg/mL.

- *Uslovi merenja*

Uslovi merenja su isti kao i za negativ (Poglavlje 4.7.2), s tim što su spektri snimljeni i u pozitivnom i u negativnom rezolucija modu.

4.7.2.3 Ispitivanje vezivanja kompleksa Ru(II) za HSA

- *Priprema uzoraka*

Humani serum albumin je rastvoren u amonijum bikarbonatnom puferu pH 7,8 do koncentracije od 1 mg/mL. Rastvor HSA je zasebno pomešan sa vodenim rastvorima **1, 2 i 3** u 1:10 molarnom odnosu proteina prema kompleksu, i razblažen do koncentracije od 0,1 mg/mL. Nakon inkubacije u trajanju od 24 h na 37° C, nevezani kompleksi su iz svake inkubacione smeše uklonjeni ultrafiltracijom korišćenjem Centricon ultrafiltracionih jedinica (<10 kDa). Preostali HSA-Ru adukti su razblaženi do početne koncentracije proteina i stavljeni na tripsinsku digestiju (5 µL 1 mg/mL tripsina) na 37° C, tokom 18 h. Dobijeni triptički digest HSA je potom uparen do suva uz pomoć centrifugalnog vakuum uparivača i razblažen 0,1% mravljom kiselinom do koncentracije od 0,1 mg/mL.

- *Uslovi merenja*

Uslovi hromatografskog razdvajanja i većina MS parametara su identični kao što je opisano u Poglavlju 4.7.2, za razdvajanje BSA peptida u negativu. Spektri su snimljeni u pozitivnom i negativnom rezolucija MS^E modu, u opsegu od 50-4000 Da. Koliziona energija je naizmenično varirala između niske (4 eV) pri kojoj se prikupljaju peptidni prekursori (MS), i visoke energije (linearno povećanje od 20 do 40 eV) kako bi se indukovala peptidna fragmentacija (MS^E). Zaseban MS/MS spektar DAHK sekvencije je snimljen u negativnom jonskom modu, fragmentacijom odabranog prekursora pri kolizionoj energiji od 35 eV.

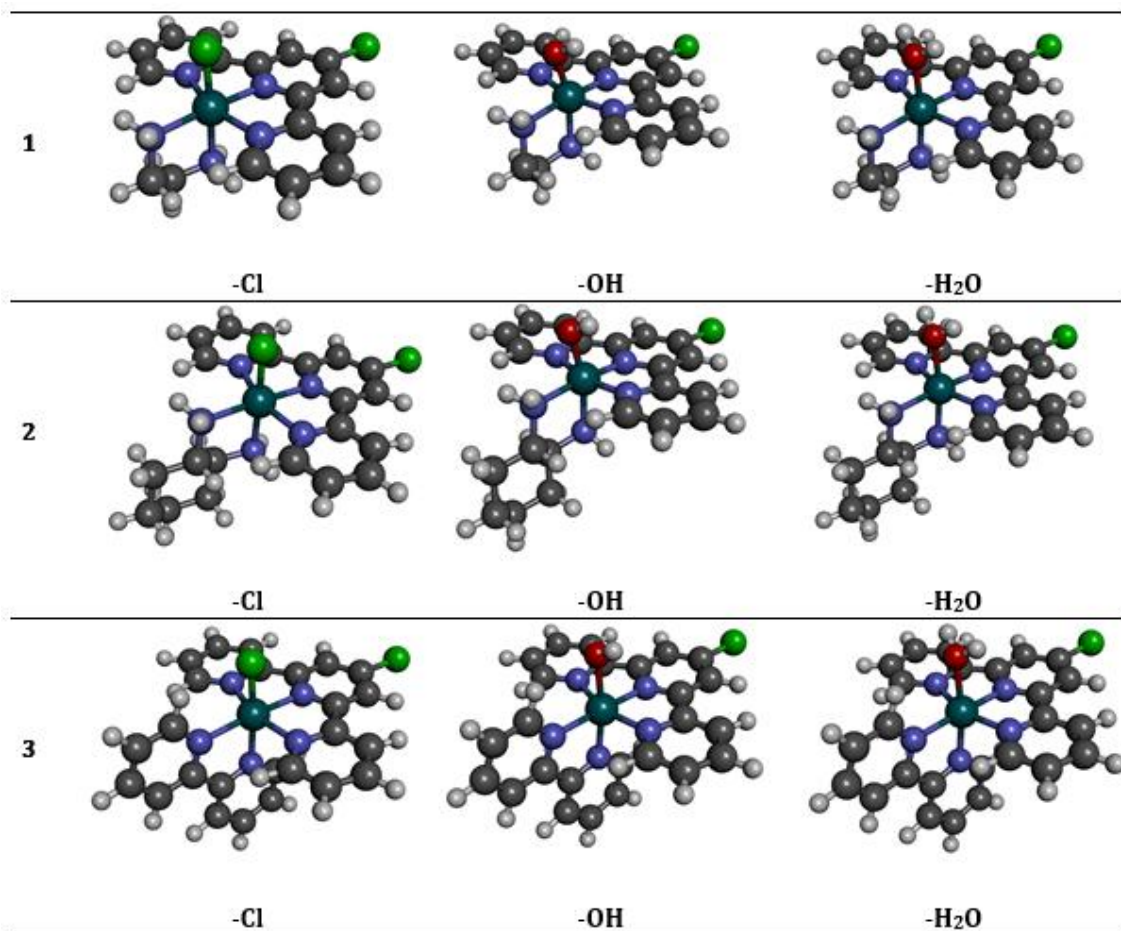
- *Obrada podataka*

Podaci dobijeni u pozitivnom MS^E modu su obrađeni pomoću PLGS (ProteinLynx Global Server) softvera (v 3.0.1, Waters, USA). Kreirana je baza podataka sa HSA sekvencom, a za pretragu podataka je korišćen tripsin kao reagens za digestiju, uz dozvoljena dva potencijalna pogrešna mesta za hidrolizu. Prihvaćena su automatska

podešavanja za toleranciju mase peptida i fragmenata. Pored oksidacije M i dehidracije S/T, monoizotopske mase svakog od ispitivanih Ru(II) jedinjenja su podešene kao varijabilne modifikacije bočnog lanca za svaki odgovarajući set podataka. Dve masene jedinice su oduzete od mase svakog kompleksa, kako bi se kompenzovalo njihovo dvostruko naelektrisanje.

4.8 Doking studija vezivanja terpiridinskih kompleksa Ru(II) za HSA

Optimizacija geometrije svih rutenijumovih kompleksa je urađena uz pomoć B3LYP metoda, uz 6-31g** basis set za sve ne-metalne atome i standardni lanl2dz basis set za rutenijumov atom (sa efektivnim potencijalom jezgra za unutrašnje elektrone). Vibracione frekvencije su izračunate na istom nivou teorije za sve optimizovane strukture, kako bi se potvrdila priroda određenih minimuma. Imaginarne frekvencije nisu nađene. Ilustrativni prikaz optimizovanih struktura je prikazan na Slici 51. Svi kvantno-hemijski proračuni, potrebni za određivanje konstanti ravnoteže, su urađeni uz pomoć *GAUSSIAN09* programskog paketa [196].



Slika 48. Optimizovane strukture ispitivanih Ru(II) kompleksa: $[\text{RuCl}/\text{OH}/\text{H}_2\text{O}(\text{en})(\text{Cl-terpy})]^+$ (1), $[\text{RuCl}/\text{OH}/\text{H}_2\text{O}(\text{dach})(\text{Cl-terpy})]^+$ (2), $[\text{RuCl}/\text{OH}/\text{H}_2\text{O}(\text{bipy})(\text{Cl-terpy})]^+$ (3).

Za potrebe doking studije, kristalna struktura HSA (PBD kod 1BM0 [197]) je preuzeta iz proteinske baze podataka (*engl.* Protein Data Bank, PBD [198]). Molekuli vode, zajedno sa svim drugim ligandima, su uklonjeni iz strukture. Optimizovane strukture metalnih kompleksa i struktura HSA su korišćene za pripremu dokinga u AutoDockTool programu, dok je sama doking studija rađena korišćenjem AutoDock programa [199]. Svi amino-kiselinski ostaci na proteinu su definisani kao rigidni, dok su pojedinačne veze liganada definisane kao rotacione. Gird doking, sa mrežom tačaka koje obuhvataju ceo protein, je korišćen sa ciljem omogućavanja slobodnog kretanja liganda tokom trajanja dokinga.

5. Literatura

- [1] D. Wang and S. J. Lippard, "Cellular processing of platinum anticancer drugs," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 4, no. 4, pp. 307–320, Apr. 2005.
- [2] Z. H. Siddik, "Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance," *Oncogene*, vol. 22, no. 47, pp. 7265–7279, Oct. 2003.
- [3] L. Kelland, "The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 7, no. 8, pp. 573–584, Aug. 2007.
- [4] E. R. Jamieson and S. J. Lippard, "Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin–DNA Adducts," *Chem. Rev.*, vol. 99, no. 9, pp. 2467–2498, Sep. 1999.
- [5] R. C. Todd and S. J. Lippard, "Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds," *Metallomics*, vol. 1, no. 4, pp. 280–291, Jul. 2009.
- [6] P. Heffeter *et al.*, "Intrinsic and Acquired Forms of Resistance against the Anticancer Ruthenium Compound KP1019 [Indazolium *trans*-[tetrachlorobis(1*H*-indazole)ruthenate (III)] (FFC14A)," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 312, no. 1, pp. 281–289, Jan. 2005.
- [7] U. Jungwirth, C. R. Kowol, B. K. Keppler, C. G. Hartinger, W. Berger, and P. Heffeter, "Anticancer Activity of Metal Complexes: Involvement of Redox Processes," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 15, no. 4, pp. 1085–1127, Jan. 2011.
- [8] R. Trondl, P. Heffeter, C. R. Kowol, M. A. Jakupec, W. Berger, and B. K. Keppler, "NKP-1339, the first ruthenium-based anticancer drug on the edge to clinical application," *Chem. Sci.*, vol. 5, no. 8, pp. 2925–2932, Jun. 2014.
- [9] I. Dragutan, V. Dragutan, and A. Demonceau, "Editorial of Special Issue Ruthenium Complex: The Expanding Chemistry of the Ruthenium Complexes," *Molecules*, vol. 20, no. 9, pp. 17244–17274, Sep. 2015.
- [10] W. M. Motswainyana and P. A. Ajibade, "Anticancer Activities of Mononuclear Ruthenium(II) Coordination Complexes," *Advances in Chemistry*, 2015. [Online]. Available: <https://www.hindawi.com/journals/ac/2015/859730/>.
- [11] M. Fasano *et al.*, "The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin," *IUBMB Life*, vol. 57, no. 12, pp. 787–796, Dec. 2005.
- [12] [Online]. Available: <https://www.jsccimedcentral.com/Oncology/oncology-2-1010.pdf>.
- [13] F. Kratz and L. Messori, "Spectral characterization of ruthenium(III) transferrin," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 49, no. 2, pp. 79–82, Feb. 1993.
- [14] C. S. Allardyce and P. J. Dyson, "Metal-based drugs that break the rules," *Dalton Trans. Camb. Engl. 2003*, vol. 45, no. 8, pp. 3201–3209, Feb. 2016.
- [15] V. Calderone, A. Casini, S. Mangani, L. Messori, and P. L. Orioli, "Structural Investigation of Cisplatin–Protein Interactions: Selective Platination of His19 in a Cuprozinc Superoxide Dismutase," *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 45, no. 8, pp. 1267–1269, Feb. 2006.
- [16] A. Casini *et al.*, "ESI mass spectrometry and X-ray diffraction studies of adducts between anticancer platinum drugs and hen egg white lysozyme," *Chem. Commun. Camb. Engl.*, no. 2, pp. 156–158, Jan. 2007.
- [17] A. Bijelic, S. Theiner, B. K. Keppler, and A. Rompel, "X-ray Structure Analysis of Indazolium *trans*-[Tetrachlorobis(1*H*-indazole)ruthenate(III)] (KP1019) Bound to Human Serum Albumin Reveals Two Ruthenium Binding Sites and Provides

- Insights into the Drug Binding Mechanism,” *J. Med. Chem.*, vol. 59, no. 12, pp. 5894–5903, Jun. 2016.
- [18] A. I. Ivanov *et al.*, “Cisplatin Binding Sites on Human Albumin,” *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 24, pp. 14721–14730, Jun. 1998.
- [19] J. Lijuan, C. Yu, T. Guozi, and T. Wenxia, “Studies on the interaction between cytochrome c and cis-PtCl₂(NH₃)₂,” *J. Inorg. Biochem.*, vol. 65, no. 2, pp. 73–77, Feb. 1997.
- [20] A. Casini *et al.*, “Exploring metallodrug-protein interactions by mass spectrometry: comparisons between platinum coordination complexes and an organometallic ruthenium compound,” *J. Biol. Inorg. Chem. JBIC Publ. Soc. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 14, no. 5, pp. 761–770, Jun. 2009.
- [21] M. Wenzel and A. Casini, “Mass spectrometry as a powerful tool to study therapeutic metallodrugs speciation mechanisms: Current frontiers and perspectives,” *Coord. Chem. Rev.*
- [22] C. G. Hartinger, M. Groessler, S. M. Meier, A. Casini, and P. J. Dyson, “Application of mass spectrometric techniques to delineate the modes-of-action of anticancer metallodrugs,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, no. 14, pp. 6186–6199, Jul. 2013.
- [23] E. Michelucci, G. Pieraccini, G. Moneti, C. Gabbiani, A. Pratesi, and L. Messori, “Mass spectrometry and metallomics: A general protocol to assess stability of metallodrug-protein adducts in bottom-up MS experiments,” *Talanta*, vol. 167, pp. 30–38, May 2017.
- [24] C. S. Allardyce, P. J. Dyson, J. Coffey, and N. Johnson, “Determination of drug binding sites to proteins by electrospray ionisation mass spectrometry: the interaction of cisplatin with transferrin,” *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 16, no. 10, pp. 933–935, May 2002.
- [25] E. Moreno-Gordaliza, B. Cañas, M. A. Palacios, and M. M. Gómez-Gómez, “Characterization of Pt-protein complexes by nHPLC–ESI–LTQ MS/MS using a gel-based bottom-up approach,” *Talanta*, vol. 88, pp. 599–608, Jan. 2012.
- [26] C. G. Hartinger, W. H. Ang, A. Casini, L. Messori, B. K. Keppler, and P. J. Dyson, “Mass spectrometric analysis of ubiquitin–platinum interactions of leading anticancer drugs: MALDI versus ESI,” *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 22, no. 8, pp. 960–967, Jul. 2007.
- [27] A. Bergamo and G. Sava, “Linking the future of anticancer metal-complexes to the therapy of tumour metastases,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 44, no. 24, pp. 8818–8835, Nov. 2015.
- [28] C. G. Hartinger *et al.*, “KP1019, a new redox-active anticancer agent--preclinical development and results of a clinical phase I study in tumor patients,” *Chem. Biodivers.*, vol. 5, no. 10, pp. 2140–2155, Oct. 2008.
- [29] D. S. Thompson *et al.*, “NKP-1339: Maximum tolerated dose defined for first-in-human GRP78 targeted agent,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 30, no. 15_suppl, pp. 3033–3033, May 2012.
- [30] C. S. Allardyce, P. J. Dyson, D. J. Ellis, and S. L. Heath, “[Ru(η⁶-p-cymene)Cl₂(pta)] (pta = 1,3,5-triaza-7-phosphatricyclo- [3.3.1.1]decane): a water soluble compound that exhibits pH dependent DNA binding providing selectivity for diseased cells,” *Chem. Commun.*, vol. 0, no. 15, pp. 1396–1397, Jan. 2001.
- [31] O. Novakova, J. Kasparkova, O. Vrana, P. M. van Vliet, J. Reedijk, and V. Brabec, “Correlation between Cytotoxicity and DNA Binding of Polypyridyl

- Ruthenium Complexes,” *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 34, no. 38, pp. 12369–12378, Sep. 1995.
- [32] P. M. van Vliet *et al.*, “mer-[Ru(terpy)Cl₃] (terpy = 2,2':6',2''-terpyridine) shows biological activity, forms interstrand cross-links in DNA and binds two guanine derivatives in a trans configuration,” *Inorganica Chim. Acta*, vol. 231, no. 1, pp. 57–64, Mar. 1995.
- [33] E. Corral, A. C. G. Hotze, A. Magistrato, and J. Reedijk, “Interaction between the DNA Model Base 9-Ethylguanine and a Group of Ruthenium Polypyridyl Complexes: Kinetics and Conformational Temperature Dependence,” *Inorg. Chem.*, vol. 46, no. 16, pp. 6715–6722, Aug. 2007.
- [34] E. Corral *et al.*, “Ruthenium polypyridyl complexes and their modes of interaction with DNA: Is there a correlation between these interactions and the antitumor activity of the compounds?,” *J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 14, no. 3, pp. 439–448, Mar. 2009.
- [35] Y. Mulyana, G. Collins, and R. Keene, “Synthesis, nucleic acid binding and cytotoxicity of oligonuclear ruthenium complexes containing labile ligands,” *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, vol. 71, no. 3–4, pp. 371–379, Dec. 2011.
- [36] A. Rilak *et al.*, “New Water-Soluble Ruthenium(II) Terpyridine Complexes for Anticancer Activity: Synthesis, Characterization, Activation Kinetics, and Interaction with Guanine Derivatives,” *Inorg. Chem.*, vol. 53, no. 12, pp. 6113–6126, Jun. 2014.
- [37] V. N. Pitchkov, “The Discovery of Ruthenium,” *Platin. Met. Rev.*, vol. 40, no. 4, pp. 181–188, Oct. 1996.
- [38] A. Levina, A. Mitra, and P. A. Lay, “Recent developments in ruthenium anticancer drugs,” *Met. Integr. Biometal Sci.*, vol. 1, no. 6, pp. 458–470, Nov. 2009.
- [39] J. R. Durig, J. Danneman, W. D. Behnke, and E. E. Mercer, “The induction of filamentous growth in *Escherichia coli* by ruthenium and palladium complexes,” *Chem. Biol. Interact.*, vol. 13, no. 3–4, pp. 287–294, Jun. 1976.
- [40] E. S. Antonarakis and A. Emadi, “Ruthenium-based chemotherapeutics: are they ready for prime time?,” *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 66, no. 1, pp. 1–9, May 2010.
- [41] M. J. Clarke, F. Zhu, and D. R. Frasca, “Non-Platinum Chemotherapeutic Metallopharmaceuticals,” *Chem. Rev.*, vol. 99, no. 9, pp. 2511–2534, Sep. 1999.
- [42] M. J. Clarke, “Ruthenium metallopharmaceuticals,” *Coord. Chem. Rev.*, vol. 232, no. 1, pp. 69–93, Oct. 2002.
- [43] F. Piccioli, S. Sabatini, L. Messori, P. Orioli, C. G. Hartinger, and B. K. Keppler, “A comparative study of adduct formation between the anticancer ruthenium(III) compound HInd trans-[RuCl₄(Ind)₂] and serum proteins,” *J. Inorg. Biochem.*, vol. 98, no. 6, pp. 1135–1142, Jun. 2004.
- [44] P. Schluga *et al.*, “Redox behavior of tumor-inhibiting ruthenium(III) complexes and effects of physiological reductants on their binding to GMP,” *Dalton Trans. Camb. Engl.* 2003, no. 14, pp. 1796–1802, Apr. 2006.
- [45] C. Bartel *et al.*, “Influence of ascorbic acid on the activity of the investigational anticancer drug KP1019,” *J. Biol. Inorg. Chem. JBIC Publ. Soc. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 16, no. 8, pp. 1205–1215, Dec. 2011.
- [46] A. A. Hummer *et al.*, “X-ray Absorption Near Edge Structure Spectroscopy to Resolve the in Vivo Chemistry of the Redox-Active Indazolium trans-

- [Tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019),” *J. Med. Chem.*, vol. 56, no. 3, pp. 1182–1196, Feb. 2013.
- [47] S. S. Aleksenko *et al.*, “Metalloomics for drug development: an integrated CE-ICP-MS and ICP-MS approach reveals the speciation changes for an investigational ruthenium(III) drug bound to holo-transferrin in simulated cancer cytosol,” *Metalloomics*, vol. 5, no. 8, pp. 955–963, Jul. 2013.
- [48] C. S. Allardyce and P. J. Dyson, “Ruthenium in Medicine: Current Clinical Uses and Future Prospects,” *Platin. Met. Rev.*, vol. 45, no. 2, pp. 62–69, Apr. 2001.
- [49] “The Chemistry of Ruthenium, Volume 19 - 1st Edition.” [Online]. Available: <https://www.elsevier.com/books/the-chemistry-of-ruthenium/clark/978-0-444-42375-7>.
- [50] E. Alessio, Ed., “Front Matter,” in *Bioinorganic Medicinal Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011, pp. I–XVIII.
- [51] A. M. Pizarro, A. Habtemariam, and P. J. Sadler, “Activation Mechanisms for Organometallic Anticancer Complexes,” in *Medicinal Organometallic Chemistry*, G. Jaouen and N. Metzler-Nolte, Eds. Springer Berlin Heidelberg, 2010, pp. 21–56.
- [52] F. Wang *et al.*, “Controlling ligand substitution reactions of organometallic complexes: Tuning cancer cell cytotoxicity,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 51, pp. 18269–18274, Dec. 2005.
- [53] B. K. Keppler and W. Rupp, “Antitumor activity of imidazolium-bisimidazole-tetrachlororuthenate (III). A representative of a new class of inorganic antitumor agents,” *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 111, no. 2, pp. 166–168, 1986.
- [54] G. Sava, I. Capozzi, K. Clerici, G. Gagliardi, E. Alessio, and G. Mestroni, “Pharmacological control of lung metastases of solid tumours by a novel ruthenium complex,” *Clin. Exp. Metastasis*, vol. 16, no. 4, pp. 371–379, May 1998.
- [55] A. Bergamo and G. Sava, “Ruthenium complexes can target determinants of tumour malignancy,” *Dalton Trans.*, vol. 0, no. 13, pp. 1267–1272, Mar. 2007.
- [56] P. Heffeter *et al.*, “Intracellular protein binding patterns of the anticancer ruthenium drugs KP1019 and KP1339,” *J. Biol. Inorg. Chem. JBIC Publ. Soc. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 15, no. 5, pp. 737–748, Jun. 2010.
- [57] B. K. Keppler, M. Henn, U. M. Juhl, M. R. Berger, R. Niebl, and F. E. Wagner, “New Ruthenium Complexes for the Treatment of Cancer,” in *Ruthenium and Other Non-Platinum Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*, Springer, Berlin, Heidelberg, 1989, pp. 41–69.
- [58] W. Peti, T. Pieper, M. Sommer, B. K. Keppler, and G. Giester, “Synthesis of Tumor-Inhibiting Complex Salts Containing the Anion trans-Tetrachlorobis(indazole)ruthenate(III) and Crystal Structure of the Tetraphenylphosphonium Salt,” *Eur. J. Inorg. Chem.*, vol. 1999, no. 9, pp. 1551–1555, Sep. 1999.
- [59] A. R. Timerbaev *et al.*, “Probing the stability of serum protein-ruthenium(III) drug adducts in the presence of extracellular reductants using CE,” *Electrophoresis*, vol. 28, no. 13, pp. 2235–2240, Jul. 2007.
- [60] M. Groessel, O. Zava, and P. J. Dyson, “Cellular uptake and subcellular distribution of ruthenium-based metallodrugs under clinical investigation versus cisplatin,” *Metalloomics*, vol. 3, no. 6, pp. 591–599, Jun. 2011.

- [61] N. R. Dickson *et al.*, “A phase I dose-escalation study of NKP-1339 in patients with advanced solid tumors refractory to treatment,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 29, no. 15_suppl, pp. 2607–2607, May 2011.
- [62] M. Ni, Y. Zhang, and A. S. Lee, “Beyond the endoplasmic reticulum: atypical GRP78 in cell viability, signalling and therapeutic targeting,” *Biochem. J.*, vol. 434, no. 2, pp. 181–188, Mar. 2011.
- [63] S. Kapitza, M. A. Jakupec, M. Uhl, B. K. Keppler, and B. Marian, “The heterocyclic ruthenium(III) complex KP1019 (FFC14A) causes DNA damage and oxidative stress in colorectal tumor cells,” *Cancer Lett.*, vol. 226, no. 2, pp. 115–121, Aug. 2005.
- [64] L. Morbidelli *et al.*, “Antiangiogenic properties of selected ruthenium(III) complexes that are nitric oxide scavengers,” *Br. J. Cancer*, vol. 88, no. 9, pp. 1484–1491, May 2003.
- [65] A. Bencini, P. Failli, B. Valtancoli, and D. Bani, “Low molecular weight compounds with transition metals as free radical scavengers and novel therapeutic agents,” *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.*, vol. 8, no. 3, pp. 128–146, Jul. 2010.
- [66] P. Heffeter *et al.*, “The ruthenium compound KP1339 potentiates the anticancer activity of sorafenib in vitro and in vivo,” *Eur. J. Cancer*, vol. 49, no. 15, pp. 3366–3375, Oct. 2013.
- [67] M. Bacac, M. Vadori, G. Sava, and S. Pacor, “Cocultures of metastatic and host immune cells: selective effects of NAMI-A for tumor cells,” *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 53, no. 12, pp. 1101–1110, Dec. 2004.
- [68] C. Riccardi, D. Musumeci, C. Irace, L. Paduano, and D. Montesarchio, “RuIII Complexes for Anticancer Therapy: The Importance of Being Nucleolipidic,” *Eur. J. Org. Chem.*, vol. 2017, no. 7, pp. 1100–1119, Feb. 2017.
- [69] E. Alessio, “Thirty Years of the Drug Candidate NAMI-A and the Myths in the Field of Ruthenium Anticancer Compounds: A Personal Perspective,” *Eur. J. Inorg. Chem.*, vol. 2017, no. 12, pp. 1549–1560, Mar. 2017.
- [70] G. Sava *et al.*, “Influence of chemical stability on the activity of the antimetastasis ruthenium compound NAMI-A,” *Eur. J. Cancer*, vol. 38, no. 3, pp. 427–435, Jan. 2002.
- [71] E. Reisner *et al.*, “Tuning of Redox Potentials for the Design of Ruthenium Anticancer Drugs – an Electrochemical Study of [trans-RuCl₄L(DMSO)]- and [trans-RuCl₄L₂]- Complexes, where L = Imidazole, 1,2,4-Triazole, Indazole,” *Inorg. Chem.*, vol. 43, no. 22, pp. 7083–7093, Nov. 2004.
- [72] M. Brindell, I. Stawoska, J. Supel, A. Skoczowski, G. Stochel, and R. van Eldik, “The reduction of (ImH)[trans-RuIII Cl₄(dmsO)(Im)] under physiological conditions: preferential reaction of the reduced complex with human serum albumin,” *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 13, no. 6, pp. 909–918, Aug. 2008.
- [73] M. I. Webb and C. J. Walsby, “EPR as a probe of the intracellular speciation of ruthenium(III) anticancer compounds,” *Metallomics*, vol. 5, no. 12, pp. 1624–1633, Nov. 2013.
- [74] G. Pintus *et al.*, “Inhibition of the MEK/ERK signaling pathway by the novel antimetastatic agent NAMI-A down regulates c-myc gene expression and endothelial cell proliferation,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 269, no. 23, pp. 5861–5870, Dec. 2002.

- [75] G. Sava *et al.*, “Dual Action of NAMI-A in Inhibition of Solid Tumor Metastasis,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 9, no. 5, pp. 1898–1905, May 2003.
- [76] C. Casarsa, M. T. Mischis, and G. Sava, “TGFbeta1 regulation and collagen-release-independent connective tissue re-modelling by the ruthenium complex NAMI-A in solid tumours,” *J. Inorg. Biochem.*, vol. 98, no. 10, pp. 1648–1654, Oct. 2004.
- [77] S. Pacor *et al.*, “Intratumoral NAMI-A treatment triggers metastasis reduction, which correlates to CD44 regulation and tumor infiltrating lymphocyte recruitment,” *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 310, no. 2, pp. 737–744, Aug. 2004.
- [78] G. Sava *et al.*, “Actin-dependent tumour cell adhesion after short-term exposure to the antimetastasis ruthenium complex NAMI-A,” *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990*, vol. 40, no. 9, pp. 1383–1396, Jun. 2004.
- [79] B. Therrien, “Functionalised η^6 -arene ruthenium complexes,” *Coord. Chem. Rev.*, vol. 253, no. 3, pp. 493–519, Feb. 2009.
- [80] G. S. Smith and B. Therrien, “Targeted and multifunctional arene ruthenium chemotherapeutics,” *Dalton Trans. Camb. Engl. 2003*, vol. 40, no. 41, pp. 10793–10800, Nov. 2011.
- [81] Y. N. Gopal, D. Jayaraju, and A. K. Kondapi, “Inhibition of topoisomerase II catalytic activity by two ruthenium compounds: a ligand-dependent mode of action,” *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 38, no. 14, pp. 4382–4388, Apr. 1999.
- [82] C. Scolaro *et al.*, “In Vitro and in Vivo Evaluation of Ruthenium(II)–Arene PTA Complexes,” *J. Med. Chem.*, vol. 48, no. 12, pp. 4161–4171, Jun. 2005.
- [83] I. Berger *et al.*, “In vitro anticancer activity and biologically relevant metabolism of organometallic ruthenium complexes with carbohydrate-based ligands,” *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.*, vol. 14, no. 29, pp. 9046–9057, 2008.
- [84] “Metal complexes based on monosaccharide bicyclic phosphites as new available chiral coordination systems.” [Online]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022328X99002454>.
- [85] C. A. Vock *et al.*, “Development of Ruthenium Antitumor Drugs that Overcome Multidrug Resistance Mechanisms,” *J. Med. Chem.*, vol. 50, no. 9, pp. 2166–2175, May 2007.
- [86] C. Gossens, A. Dorcier, P. J. Dyson, and U. Rothlisberger, “pKa Estimation of Ruthenium(II)–Arene PTA Complexes and their Hydrolysis Products via a DFT/Continuum Electrostatics Approach,” *Organometallics*, vol. 26, no. 16, pp. 3969–3975, Jul. 2007.
- [87] B. S. Murray, M. V. Babak, C. G. Hartinger, and P. J. Dyson, “The development of RAPTA compounds for the treatment of tumors,” *Coord. Chem. Rev.*, vol. 306, pp. 86–114, Jan. 2016.
- [88] A. Bergamo, A. Masi, P. J. Dyson, and G. Sava, “Modulation of the metastatic progression of breast cancer with an organometallic ruthenium compound,” *Int. J. Oncol.*, vol. 33, no. 6, pp. 1281–1289, Dec. 2008.
- [89] A. Weiss *et al.*, “In vivo anti-tumor activity of the organometallic ruthenium(II)-arene complex [Ru(η^6 -p-cymene)Cl₂(pta)] (RAPTA-C) in human ovarian and colorectal carcinomas,” *Chem. Sci.*, vol. 5, no. 12, pp. 4742–4748, Oct. 2014.
- [90] P. Nowak-Sliwinska *et al.*, “Organometallic Ruthenium(II) Arene Compounds with Antiangiogenic Activity,” *J. Med. Chem.*, vol. 54, no. 11, pp. 3895–3902, Jun. 2011.

- [91] Z. Adhireksan *et al.*, “Ligand substitutions between ruthenium-cymene compounds can control protein versus DNA targeting and anticancer activity,” *Nat. Commun.*, vol. 5, p. 3462, Mar. 2014.
- [92] S. V. Sharma *et al.*, “A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations,” *Cell*, vol. 141, no. 1, pp. 69–80, Apr. 2010.
- [93] V. Brabec and O. Nováková, “DNA binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity,” *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.*, vol. 9, no. 3, pp. 111–122, Jun. 2006.
- [94] A. H. Velders, H. Kooijman, A. L. Spek, J. G. Haasnoot, D. de Vos, and J. Reedijk, “Strong differences in the in vitro cytotoxicity of three isomeric dichlorobis(2-phenylazopyridine)ruthenium(II) complexes,” *Inorg. Chem.*, vol. 39, no. 14, pp. 2966–2967, Jul. 2000.
- [95] N. Grover, N. Gupta, and H. H. Thorp, “Stereoselective covalent binding of aquaruthenium(II) complexes to DNA,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 114, no. 9, pp. 3390–3393, Apr. 1992.
- [96] G. A. Neyhart *et al.*, “Binding and kinetics studies of oxidation of DNA by oxoruthenium(IV),” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 115, no. 11, pp. 4423–4428, Jun. 1993.
- [97] B. Serli *et al.*, “Is the Aromatic Fragment of Piano-Stool Ruthenium Compounds an Essential Feature for Anticancer Activity? The Development of New RuII-[9]aneS3 Analogues,” *Eur. J. Inorg. Chem.*, vol. 2005, no. 17, pp. 3423–3434, Sep. 2005.
- [98] I. Bratsos *et al.*, “New half sandwich Ru(II) coordination compounds for anticancer activity,” *Dalton Trans. Camb. Engl. 2003*, vol. 41, no. 24, pp. 7358–7371, Jun. 2012.
- [99] I. Bratsos *et al.*, “Half-sandwich Ru II[9]aneS3 complexes structurally similar to antitumor-active organometallic piano-stool compounds: preparation, structural characterization and in vitro cytotoxic activity,” *J. Inorg. Biochem.*, vol. 102, no. 5–6, pp. 1120–1133, Jun. 2008.
- [100] A. Leibman and P. Aisen, “Distribution of iron between the binding sites of transferrin in serum: methods and results in normal human subjects,” *Blood*, vol. 53, no. 6, pp. 1058–1065, Jun. 1979.
- [101] E. H. Morgan, “The Interaction between Rabbit, Human and Rat Transferrin and Reticulocytes,” *Br. J. Haematol.*, vol. 10, no. 4, pp. 442–452, Oct. 1964.
- [102] H. Sun, H. Li, and P. J. Sadler, “Transferrin as a metal ion mediator,” *Chem. Rev.*, vol. 99, no. 9, pp. 2817–2842, Sep. 1999.
- [103] Z. M. Qian, H. Li, H. Sun, and K. Ho, “Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway,” *Pharmacol. Rev.*, vol. 54, no. 4, pp. 561–587, Dec. 2002.
- [104] S. Sharma, M. Sinha, S. Kaushik, P. Kaur, and T. P. Singh, “C-Lobe of Lactoferrin: The Whole Story of the Half-Molecule,” *Biochemistry Research International*, 2013. [Online]. Available: <https://www.hindawi.com/journals/bri/2013/271641/>.
- [105] I. S. Trowbridge and M. B. Omary, “Human cell surface glycoprotein related to cell proliferation is the receptor for transferrin,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 78, no. 5, pp. 3039–3043, May 1981.

- [106] E. A. Rutledge and C. A. Enns, "Cleavage of the transferrin receptor is influenced by the composition of the O-linked carbohydrate at position 104," *J. Cell. Physiol.*, vol. 168, no. 2, pp. 284–293, Aug. 1996.
- [107] R. D. Klausner, G. Ashwell, J. van Renswoude, J. B. Harford, and K. R. Bridges, "Binding of apotransferrin to K562 cells: explanation of the transferrin cycle," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 80, no. 8, pp. 2263–2266, Apr. 1983.
- [108] D. R. Richardson and P. Ponka, "The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1331, no. 1, pp. 1–40, Mar. 1997.
- [109] R. L. Elliott and J. F. Head, "Cancer: Tumor Iron Metabolism, Mitochondrial Dysfunction and Tumor Immunosuppression; 'A Tight Partnership—Was Warburg Correct?,'" vol. 2012, Aug. 2012.
- [110] R. L. Elliott, M. C. Elliott, F. Wang, and J. F. Head, "Breast Carcinoma and the Role of Iron Metabolism," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 698, no. 1, pp. 159–166, Nov. 1993.
- [111] J. E. Shindelman, A. E. Ortmeyer, and H. H. Sussman, "Demonstration of the transferrin receptor in human breast cancer tissue. Potential marker for identifying dividing cells," *Int. J. Cancer*, vol. 27, no. 3, pp. 329–334, Mar. 1981.
- [112] M. Pongratz *et al.*, "Transferrin binding and transferrin-mediated cellular uptake of the ruthenium coordination compound KP1019, studied by means of AAS, ESI-MS and CD spectroscopy," *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 19, no. 1, pp. 46–51, Jan. 2004.
- [113] F. Kratz, B. K. Keppler, M. Hartmann, L. Messori, and M. R. Berger, "Comparison of the Antiproliferative Activity of Two Antitumor Ruthenium(III) Complexes With Their Apotransferrin and Transferrin-Bound Forms in a Human Colon Cancer Cell Line," *Met.-Based Drugs*, vol. 3, no. 1, pp. 15–23, 1996.
- [114] D. Frasca, J. Ciampa, J. Emerson, R. S. Umans, and M. J. Clarke, "Effects of hypoxia and transferrin on toxicity and DNA binding of ruthenium antitumor agents in hela cells," *Met.-Based Drugs*, vol. 3, no. 4, pp. 197–209, 1996.
- [115] J. B. Vincent and S. Love, "The binding and transport of alternative metals by transferrin," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1820, no. 3, pp. 362–378, Mar. 2012.
- [116] W. Guo *et al.*, "Transferrin serves as a mediator to deliver organometallic ruthenium(II) anticancer complexes into cells," *Inorg. Chem.*, vol. 52, no. 9, pp. 5328–5338, May 2013.
- [117] C. A. Smith, A. J. Sutherland-Smith, B. K. Keppler, F. Kratz, E. N. Baker, and B. H. Keppler, "Binding of ruthenium(III) anti-tumor drugs to human lactoferrin probed by high resolution X-ray crystallographic structure analyses," *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 1, no. 5, pp. 424–431, Oct. 1996.
- [118] "All About Albumin - 1st Edition." [Online]. Available: <https://www.elsevier.com/books/all-about-albumin/peters-jr/978-0-12-552110-9>.
- [119] A. M. Merlot, D. S. Kalinowski, and D. R. Richardson, "Unraveling the mysteries of serum albumin—more than just a serum protein," *Front. Physiol.*, vol. 5, 2014.
- [120] F. Berti, S. Bincoletto, I. Donati, G. Fontanive, M. Fregonese, and F. Benedetti, "Albumin-directed stereoselective reduction of 1,3-diketones and β -hydroxyketones to antidiols," *Org. Biomol. Chem.*, vol. 9, no. 6, pp. 1987–1999, Mar. 2011.

- [121] F. Zsila, "Subdomain IB is the third major drug binding region of human serum albumin: toward the three-sites model," *Mol. Pharm.*, vol. 10, no. 5, pp. 1668–1682, May 2013.
- [122] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, and K. Hori, "Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review," *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.*, vol. 65, no. 1–2, pp. 271–284, Mar. 2000.
- [123] K. Greish, "Enhanced permeability and retention (EPR) effect for anticancer nanomedicine drug targeting," *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 624, pp. 25–37, 2010.
- [124] D. Kozlova and M. Epple, "Biological targeting with nanoparticles: state of the art," *BioNanoMaterials*, vol. 14, no. 3–4, pp. 161–170, 2013.
- [125] C. Andersson, B. M. Iresjö, and K. Lundholm, "Identification of tissue sites for increased albumin degradation in sarcoma-bearing mice," *J. Surg. Res.*, vol. 50, no. 2, pp. 156–162, Feb. 1991.
- [126] U. Schilling, E. A. Friedrich, H. Sinn, H. H. Schrenk, J. H. Clorius, and W. Maier-Borst, "Design of compounds having enhanced tumour uptake, using serum albumin as a carrier--Part II. In vivo studies," *Int. J. Rad. Appl. Instrum. B*, vol. 19, no. 6, pp. 685–695, Aug. 1992.
- [127] G. Stehle *et al.*, "Plasma protein (albumin) catabolism by the tumor itself--implications for tumor metabolism and the genesis of cachexia," *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 26, no. 2, pp. 77–100, Jul. 1997.
- [128] C. Commisso *et al.*, "Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells," *Nature*, vol. 497, no. 7451, pp. 633–637, May 2013.
- [129] A. R. Timerbaev, C. G. Hartinger, S. S. Aleksenko, and B. K. Keppler, "Interactions of antitumor metallodrugs with serum proteins: advances in characterization using modern analytical methodology," *Chem. Rev.*, vol. 106, no. 6, pp. 2224–2248, Jun. 2006.
- [130] W. H. Ang, E. Daldini, L. Juillerat-Jeanneret, and P. J. Dyson, "Strategy to tether organometallic ruthenium-arene anticancer compounds to recombinant human serum albumin," *Inorg. Chem.*, vol. 46, no. 22, pp. 9048–9050, Oct. 2007.
- [131] A. Valente and M. H. Garcia, "Syntheses of Macromolecular Ruthenium Compounds: A New Approach for the Search of Anticancer Drugs," *Inorganics*, vol. 2, no. 1, pp. 96–114, Mar. 2014.
- [132] Y. Zhang *et al.*, "Structural basis and anticancer properties of ruthenium-based drug complexed with human serum albumin," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 86, pp. 449–455, Oct. 2014.
- [133] M. I. Webb *et al.*, "Increasing the bioavailability of Ru(III) anticancer complexes through hydrophobic albumin interactions," *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.*, vol. 19, no. 50, pp. 17031–17042, Dec. 2013.
- [134] M. Liu, Z. J. Lim, Y. Y. Gwee, A. Levina, and P. A. Lay, "Characterization of a ruthenium(III)/NAMI-A adduct with bovine serum albumin that exhibits a high anti-metastatic activity," *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, vol. 49, no. 9, pp. 1661–1664, Feb. 2010.
- [135] X. Sun, C.-N. Tsang, and H. Sun, "Identification and characterization of metallodrug binding proteins by (metallo)proteomics," *Metallomics*, vol. 1, no. 1, pp. 25–31, Jan. 2009.

- [136] J. J. Ziarek, F. C. Peterson, B. L. Lytle, and B. F. Volkman, "Binding site identification and structure determination of protein-ligand complexes by NMR a semiautomated approach," *Methods Enzymol.*, vol. 493, pp. 241–275, 2011.
- [137] A. El-Aneed, A. Cohen, and J. Banoub, "Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers," *Appl. Spectrosc. Rev.*, vol. 44, no. 3, pp. 210–230, Apr. 2009.
- [138] C. Aparna*, N. M. Latha, P. Supriya, and D. Gowrisankar, "A REVIEW ON MATRIX ASSISTED LASER DESORPTION/IONIZATION MASS SPECTROSCOPY," *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, vol. 8, no. 5, pp. 28–33, Sep. 2015.
- [139] M. Karas, M. Glückmann, and J. Schäfer, "Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors," *J. Mass Spectrom.*, vol. 35, no. 1, pp. 1–12, Jan. 2000.
- [140] "Wiley: Mass Spectrometry: Principles and Applications, 3rd Edition - Edmond de Hoffmann, Vincent Stroobant." [Online]. Available: <http://www.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-047003310X.html>.
- [141] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, and C. M. Whitehouse, "Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules," *Science*, vol. 246, no. 4926, pp. 64–71, Oct. 1989.
- [142] S. Banerjee and S. Mazumdar, "Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte," *International Journal of Analytical Chemistry*, 2012. [Online]. Available: <https://www.hindawi.com/journals/ijac/2012/282574/>.
- [143] M. Yamashita and J. B. Fenn, "Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme," *J. Phys. Chem.*, vol. 88, no. 20, pp. 4451–4459, Sep. 1984.
- [144] P. Kebarle and L. Tang, "From ions in solution to ions in the gas phase - the mechanism of electrospray mass spectrometry," *Anal. Chem.*, vol. 65, no. 22, p. 972A–986A, Nov. 1993.
- [145] A. Gomez and K. Tang, "Charge and fission of droplets in electrostatic sprays," *Phys. Fluids*, vol. 6, no. 1, pp. 404–414, Jan. 1994.
- [146] M. S. Wilm and M. Mann, "Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last?," *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, vol. 136, no. 2, pp. 167–180, Sep. 1994.
- [147] K. E. Hersberger and K. Håkansson, "Characterization of O-sulfopeptides by negative ion mode tandem mass spectrometry: superior performance of negative ion electron capture dissociation," *Anal. Chem.*, vol. 84, no. 15, pp. 6370–6377, Aug. 2012.
- [148] N. B. Cech and C. G. Enke, "Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals," *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 20, no. 6, pp. 362–387, Dec. 2001.
- [149] L. Men and Y. Wang, "Fragmentation of the deprotonated ions of peptides containing cysteine, cysteine sulfinic acid, cysteine sulfonic acid, aspartic acid, and glutamic acid," *Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM*, vol. 20, no. 5, pp. 777–784, 2006.
- [150] P. Kebarle and U. H. Verkerk, "On the Mechanism of Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESIMS)," in *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry*, R. B. Cole, Ed. John Wiley & Sons, Inc., 2010, pp. 1–48.

- [151] D. P. H. Smith, "The Electrohydrodynamic Atomization of Liquids," *IEEE Trans. Ind. Appl.*, vol. IA-22, no. 3, pp. 527–535, May 1986.
- [152] R. F. Straub and R. D. Voyksner, "Negative ion formation in electrospray mass spectrometry," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 4, no. 7, pp. 578–587, Jul. 1993.
- [153] Z. Wu, W. Gao, M. A. Phelps, D. Wu, D. D. Miller, and J. T. Dalton, "Favorable Effects of Weak Acids on Negative-Ion Electrospray Ionization Mass Spectrometry," *Anal. Chem.*, vol. 76, no. 3, pp. 839–847, Feb. 2004.
- [154] null Zhou and null Cook, "Protonation in electrospray mass spectrometry: wrong-way-round or right-way-round?," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 11, no. 11, pp. 961–966, Nov. 2000.
- [155] M. Petković, A. Vujačić, J. Schiller, Ž. Bugarčić, J. Savić, and V. Vasić, "Application of flavonoids – quercetin and rutin – as new matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis of Pt(II) and Pd(II) complexes," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 23, no. 10, pp. 1467–1475, May 2009.
- [156] A. Vujačić, Ž. D. Bugarčić, J. Schiller, V. Vasić, and M. Petković, "Matrix-assisted laser desorption and ionisation time-of-flight mass spectrometry of Pt(II) and Pd(II) complexes," *Polyhedron*, vol. 28, no. 14, pp. 2905–2912, Sep. 2009.
- [157] M. A. R. Meier, B. G. G. Lohmeijer, and U. S. Schubert, "Relative binding strength of terpyridine model complexes under matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry conditions," *J. Mass Spectrom.*, vol. 38, no. 5, pp. 510–516, May 2003.
- [158] M. Nišavić *et al.*, "Elucidation of the binding sites of two novel Ru(II) complexes on bovine serum albumin," *J. Inorg. Biochem.*, vol. 159, pp. 89–95, Jun. 2016.
- [159] T. Kamčeva, J. Flemmig, B. Damjanović, J. Arnhold, A. Mijatović, and M. Petković, "Inhibitory effect of platinum and ruthenium bipyridyl complexes on porcine pancreatic phospholipase A2," *Metallomics*, vol. 3, no. 10, pp. 1056–1063, Oct. 2011.
- [160] L. E. H. Paul, B. Therrien, and J. Furrer, "Interactions of arene ruthenium metallaprisms with human proteins," *Org. Biomol. Chem.*, vol. 13, no. 3, pp. 946–953, Dec. 2014.
- [161] X. Hou, R. S. Amais, B. T. Jones, and G. L. Donati, "Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry," in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd, 2006.
- [162] A. R. Timerbaev *et al.*, "Platinum metallodrug-protein binding studies by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry: Characterization of interactions between Pt(II) complexes and human serum albumin," *ELECTROPHORESIS*, vol. 25, no. 13, pp. 1988–1995, Jul. 2004.
- [163] A. Bergamo, L. Messori, F. Piccioli, M. Cocchietto, and G. Sava, "Biological role of adduct formation of the ruthenium(III) complex NAMI-A with serum albumin and serum transferrin," *Invest. New Drugs*, vol. 21, no. 4, pp. 401–411, Nov. 2003.
- [164] M. Groessl, M. Terenghi, A. Casini, L. Elviri, R. Lobinski, and P. J. Dyson, "Reactivity of anticancer metallodrugs with serum proteins: new insights from size exclusion chromatography-ICP-MS and ESI-MS," *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 25, no. 3, pp. 305–313, Mar. 2010.
- [165] *Principles of Fluorescence Spectroscopy* / Joseph R. Lakowicz / Springer. .

- [166] “All About Albumin: Biochemistry, Genetics, And Medical Applications By Theodore Peters Jr. (1995-12-22) PDF Kindle - DesPaulos.” [Online]. Available: <https://sites.google.com/a/newabra.us/despaulos/all-about-albumin-biochemistry-genetics-and-medical-applications-by-theodore-peters-jr-1995-12-22>. [Accessed: 11-Jul-2017].
- [167] J. T. Vivian and P. R. Callis, “Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins,” *Biophys. J.*, vol. 80, no. 5, pp. 2093–2109, May 2001.
- [168] F. A. Beckford, “Reaction of the Anticancer Organometallic Ruthenium Compound, [(η^6 -p-Cymene)Ru(ATSC)Cl]PF₆ with Human Serum Albumin,” *Int. J. Inorg. Chem.*, vol. 2010, no. 975756, pp. 1–7, Jan. 2010.
- [169] J. Sun, Y. Huang, C. Zheng, Y. Zhou, Y. Liu, and J. Liu, “Ruthenium (II) complexes interact with human serum albumin and induce apoptosis of tumor cells,” *Biol. Trace Elem. Res.*, vol. 163, no. 1–2, pp. 266–274, Feb. 2015.
- [170] O. Mazuryk, K. Kurpiewska, K. Lewiński, G. Stochel, and M. Brindell, “Interaction of apo-transferrin with anticancer ruthenium complexes NAMI-A and its reduced form,” *J. Inorg. Biochem.*, vol. 116, pp. 11–18, Nov. 2012.
- [171] R. T. MacGillivray, E. Mendez, S. K. Sinha, M. R. Sutton, J. Lineback-Zins, and K. Brew, “The complete amino acid sequence of human serum transferrin,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 79, no. 8, pp. 2504–2508, Apr. 1982.
- [172] K. Polec-Pawlak *et al.*, “Platinum group metallodrug-protein binding studies by capillary electrophoresis - inductively coupled plasma-mass spectrometry: a further insight into the reactivity of a novel antitumor ruthenium(III) complex toward human serum proteins,” *Electrophoresis*, vol. 27, no. 5–6, pp. 1128–1135, Mar. 2006.
- [173] A. R. Timerbaev, A. V. Rudnev, O. Semenova, C. G. Hartinger, and B. K. Keppler, “Comparative binding of antitumor indazolium [trans-tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] to serum transport proteins assayed by capillary zone electrophoresis,” *Anal. Biochem.*, vol. 341, no. 2, pp. 326–333, Jun. 2005.
- [174] S. M. Kelly, T. J. Jess, and N. C. Price, “How to study proteins by circular dichroism,” *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics*, vol. 1751, no. 2, pp. 119–139, Aug. 2005.
- [175] T. Q. Luong, P. K. Verma, R. K. Mitra, and M. Havenith, “Do hydration dynamics follow the structural perturbation during thermal denaturation of a protein: a terahertz absorption study,” *Biophys. J.*, vol. 101, no. 4, pp. 925–933, Aug. 2011.
- [176] S. N, M. Dd, H. S, K. Gs, and M. Rk, “Short chain polyethylene glycols unusually assist thermal unfolding of human serum albumin,” *Biochimie*, vol. 104, pp. 81–89, Sep. 2014.
- [177] S. M. Kelly and N. C. Price, “The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function,” *Curr. Protein Pept. Sci.*, vol. 1, no. 4, pp. 349–384, Dec. 2000.
- [178] X. Zhang *et al.*, “Study on the interaction of a cyanine dye with human serum transferrin,” *Lumin. J. Biol. Chem. Lumin.*, vol. 30, no. 8, pp. 1176–1183, Dec. 2015.
- [179] A. Cooper, *Biophysical Chemistry*. 2011.
- [180] S. Mehtab *et al.*, “Interaction of vanadium(IV) with human serum apo-transferrin,” *J. Inorg. Biochem.*, vol. 121, pp. 187–195, Apr. 2013.

- [181] P. Hu and J. A. Loo, "Gas-Phase Coordination Properties of Zn²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, and Co²⁺ with Histidine-Containing Peptides," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 117, no. 45, pp. 11314–11319, Nov. 1995.
- [182] J. A. Loo, P. Hu, and R. D. Smith, "Interaction of angiotensin peptides and zinc metal ions probed by electrospray ionization mass spectrometry," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 5, no. 11, pp. 959–965, Nov. 1994.
- [183] "Organic Chemistry, 6th Edition by Francis A. Carey: McGraw-Hill Companies 9780072828375 Hardcover - Ergodebooks." [Online]. Available: <https://www.abebooks.com/Organic-Chemistry-6th-Edition-Francis-Carey/10213374733/bd>.
- [184] R. H. Bateman *et al.*, "A novel precursor ion discovery method on a hybrid quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight (Q-TOF) mass spectrometer for studying protein phosphorylation," *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 13, no. 7, pp. 792–803, Jul. 2002.
- [185] J. Will, W. S. Sheldrick, and D. Wolters, "Characterisation of cisplatin coordination sites in cellular Escherichia coli DNA-binding proteins by combined biphasic liquid chromatography and ESI tandem mass spectrometry," *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 13, no. 3, pp. 421–434, Mar. 2008.
- [186] J. Will, A. Kvas, W. S. Sheldrick, and D. Wolters, "Identification of (η⁶-arene)ruthenium(II) protein binding sites in E. coli cells by combined multidimensional liquid chromatography and ESI tandem mass spectrometry: specific binding of [(η⁶-p-cymene)RuCl₂(DMSO)] to stress-regulated proteins and to helicases," *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 12, no. 6, pp. 883–894, Aug. 2007.
- [187] J. Lu, A. J. Stewart, P. J. Sadler, T. J. T. Pinheiro, and C. A. Blindauer, "Albumin as a zinc carrier: properties of its high-affinity zinc-binding site," *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 36, no. 6, pp. 1317–1321, Dec. 2008.
- [188] W. Bal, M. Sokołowska, E. Kurowska, and P. Faller, "Binding of transition metal ions to albumin: sites, affinities and rates," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1830, no. 12, pp. 5444–5455, Dec. 2013.
- [189] I. Moraleja, E. Moreno-Gordaliza, D. Esteban-Fernández, M. L. Mena, M. W. Linscheid, and M. M. Gómez-Gómez, "A shotgun approach for the identification of platinum-protein complexes," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 407, no. 9, pp. 2393–2403, Mar. 2015.
- [190] G. Ferraro, L. Massai, L. Messori, and A. Merlino, "Cisplatin binding to human serum albumin: a structural study," *Chem. Commun.*, vol. 51, no. 46, pp. 9436–9439, May 2015.
- [191] A. Merlino, "Interactions between proteins and Ru compounds of medicinal interest: A structural perspective," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 326, pp. 111–134, Nov. 2016.
- [192] P. Skehan *et al.*, "New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 82, no. 13, pp. 1107–1112, Jul. 1990.
- [193] P. Roepstorff and J. Fohlman, "Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides," *Biomed. Mass Spectrom.*, vol. 11, no. 11, p. 601, Nov. 1984.
- [194] R. S. Johnson, S. A. Martin, K. Biemann, J. T. Stults, and J. T. Watson, "Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a

- tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine,” *Anal. Chem.*, vol. 59, no. 21, pp. 2621–2625, Nov. 1987.
- [195] R. S. Johnson, S. A. Martin, and K. Biemann, “Collision-induced fragmentation of (M + H)⁺ ions of peptides. Side chain specific sequence ions,” *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, vol. 86, pp. 137–154, Dec. 1988.
- [196] M. Frisch *et al.*, “Gaussian 09, Revision B.01,” *Gaussian 09 Revis. B01 Gaussian Inc Wallingford CT*, 2009.
- [197] S. Sugio, A. Kashima, S. Mochizuki, M. Noda, and K. Kobayashi, “Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution,” *Protein Eng.*, vol. 12, no. 6, pp. 439–446, Jun. 1999.
- [198] D. S. Goodsell, “Serum Albumin,” *RCSB Protein Data Bank*, Jan. 2003.
- [199] G. M. Morris, D. S. Goodsell, R. Huey, and A. J. Olson, “Distributed automated docking of flexible ligands to proteins: parallel applications of AutoDock 2.4,” *J. Comput. Aided Mol. Des.*, vol. 10, no. 4, pp. 293–304, Aug. 1996.

Prilog 1

Tabela 1. Vrednosti CD minimuma u dalekoj UV oblasti za HSA i njegove adukte sa **1, 2 i 3** pri različitim molarnim odnosima proteina prema kompleksu.

		221,6 nm	208,8 nm
HSA alone		-17,3428	-18,2447
HSA/1	1 : 1	-18,9512	-20,2948
HSA/1	1 : 2	-20,009*	-21,3378*
HSA/1	1 : 5	-15,6569	-17,1168
HSA/2	1 : 1	-16,1224	-17,0396
HSA/2	1 : 2	-14,9821	-15,806
HSA/2	1 : 5	-17,7998	-18,9731
HSA/3	1 : 1	-16,8454	-17,8697
HSA/3	1 : 2	-15,0913	-15,8824
HSA/3	1 : 5	-13,1396*	-13,5618*

*van opsega -19,9428 do -14,7428 na 221,6 nm

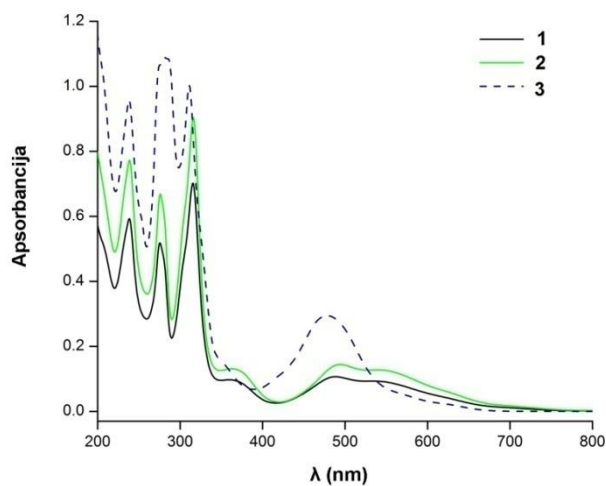
*van opsega -20,8447 do -15,7428 na 208,8 nm

Tabela 2. Vrednosti CD minimuma u dalekoj UV oblasti za Tf i njegove adukte sa **1, 2 i 3** pri različitim molarnim odnosima proteina prema kompleksu

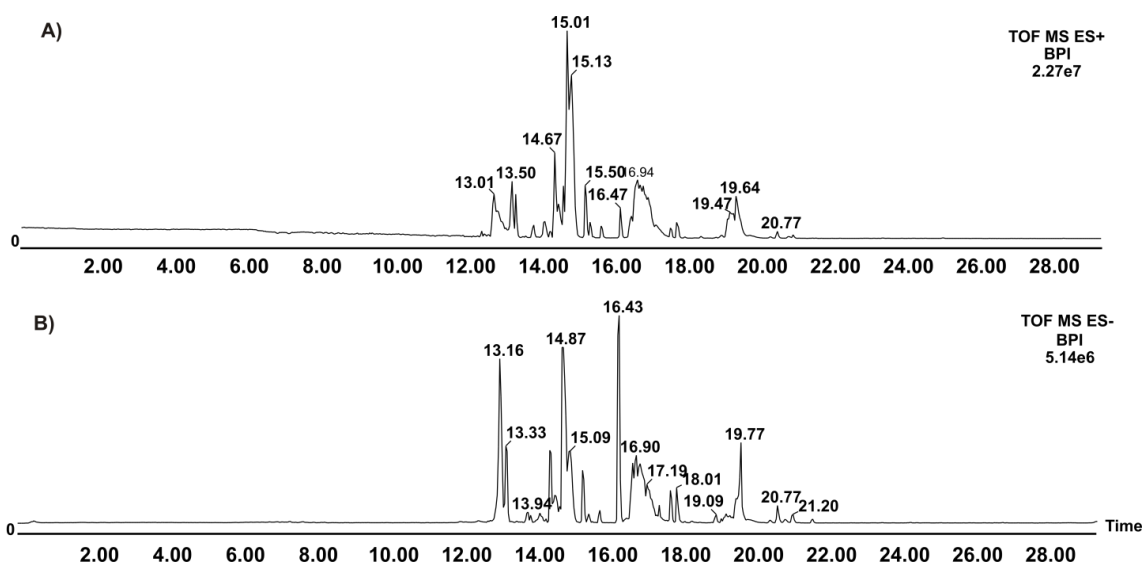
		221.5 nm	208.8 nm
Tf alone		-11,1030	-14,0780
Tf/1	1 : 1	-10,2544	-13,2645
Tf/1	1 : 2	-7,52521*	-9,96893*
Tf/1	1 : 5	-9,67111	-12,8063
Tf/2	1 : 1	-10,1923	-13,1073
Tf/2	1 : 2	-10,5168	-13,8222
Tf/2	1 : 5	-9,56893	-12,7831
Tf/3	1 : 1	-10,4399	-13,3583
Tf/3	1 : 2	-10,6526	-13,1086
Tf/3	1 : 5	-10,6627	-13,6935

*van opsega -13,703 do -8,503 na 221,5 nm

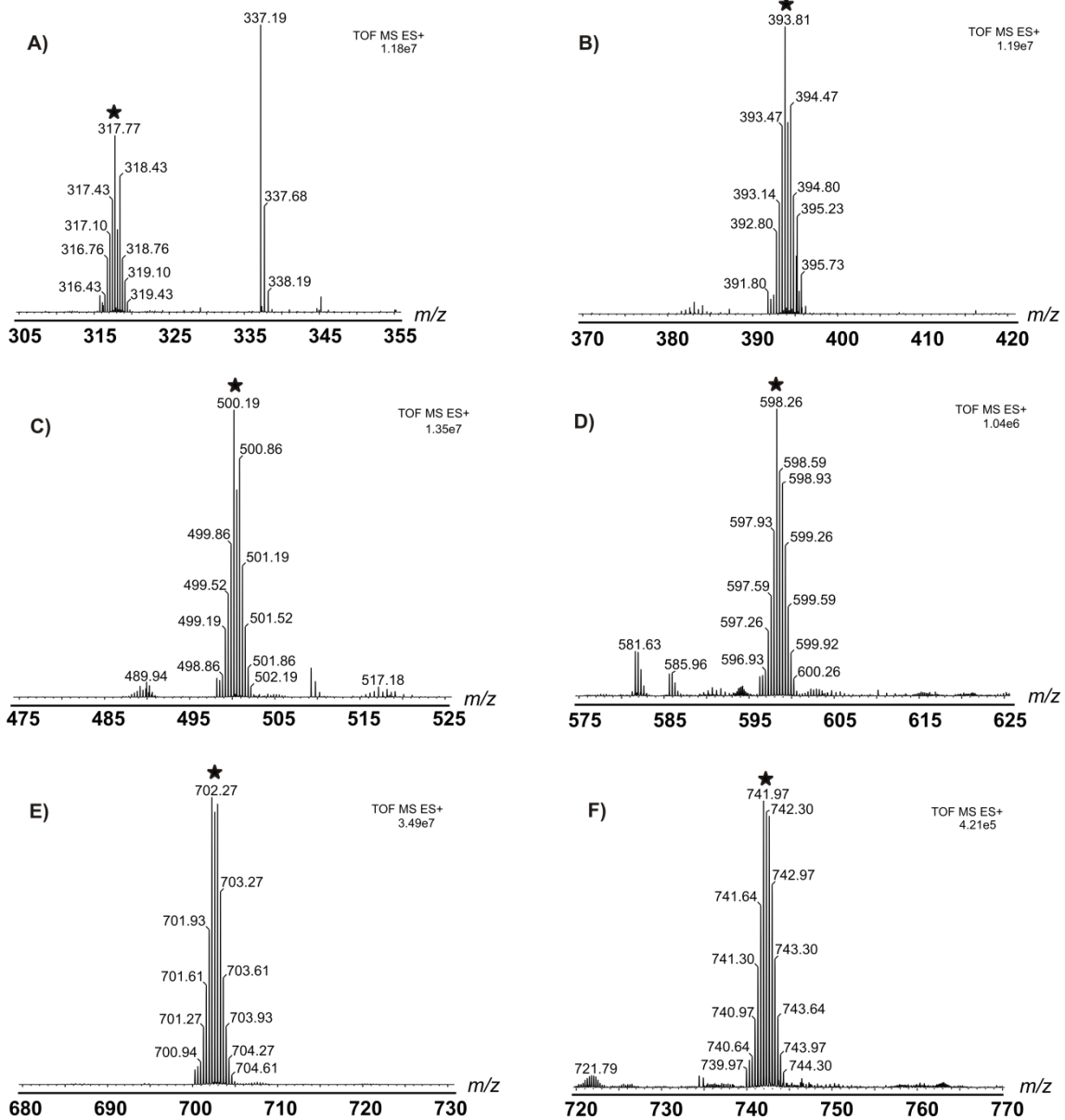
*van opsega -16,678 do -11,478 na 208,8 nm



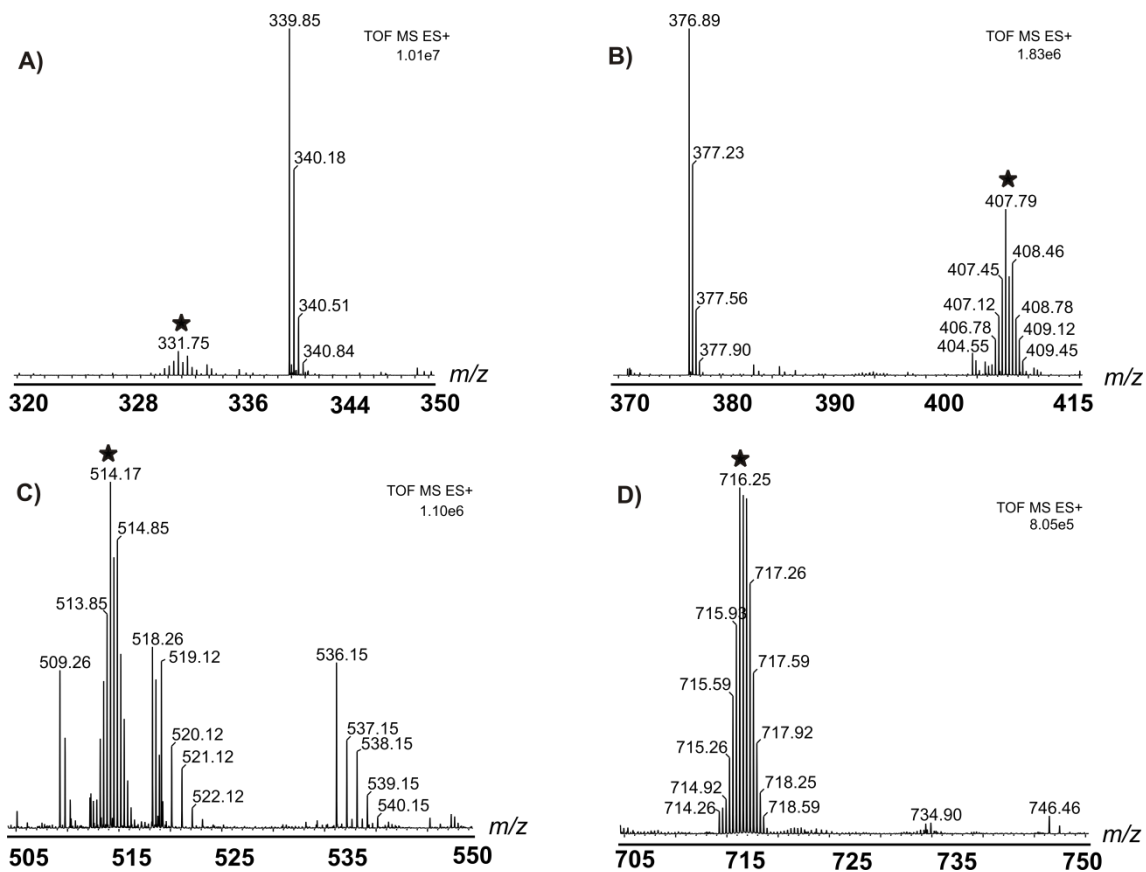
Slika 1. UV/VIS spektri jedinjenja 1, 2 i 3.



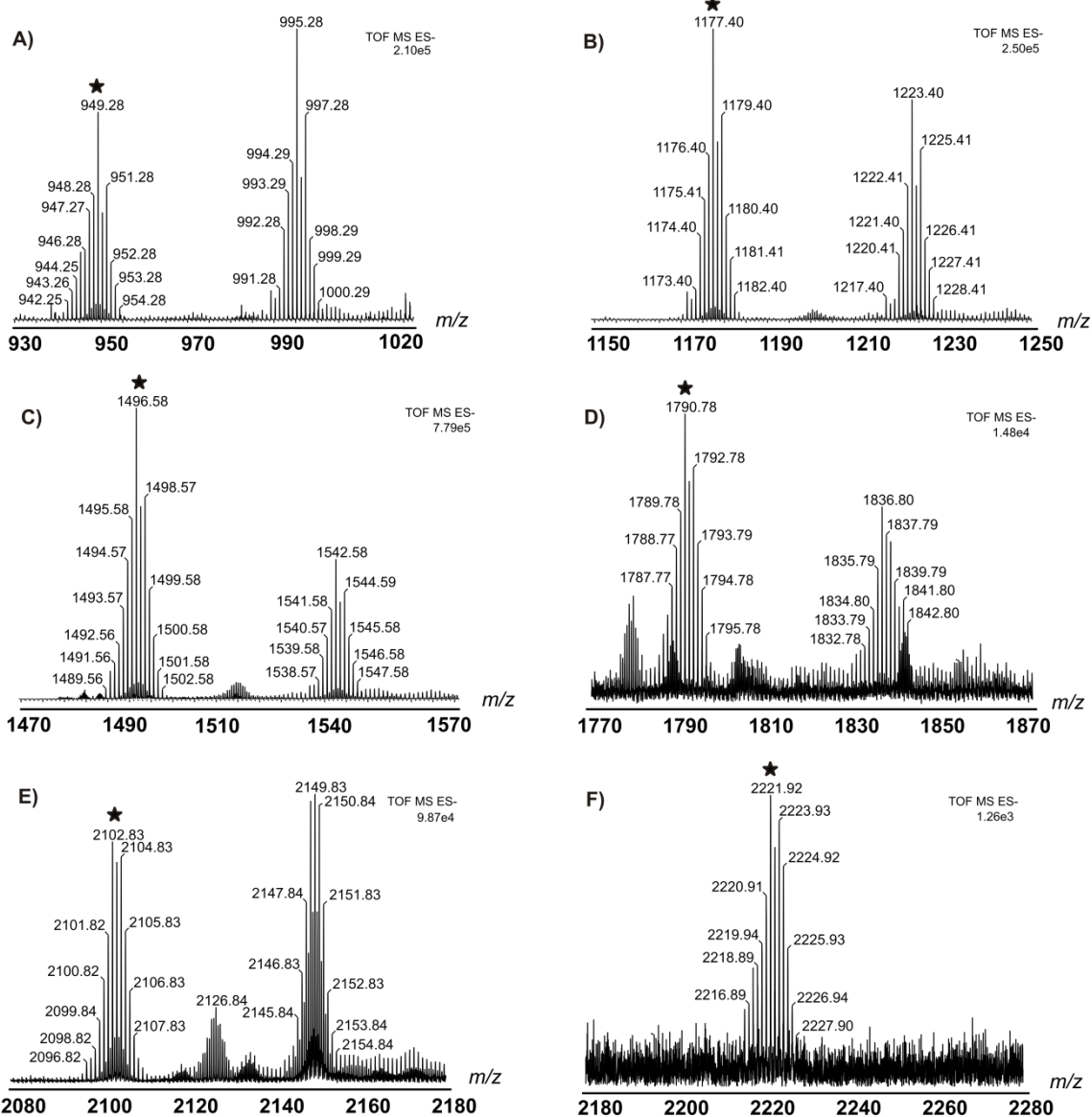
Slika 2. Nano-UPLC hromatogrami peptida HSA adukta sa **1** dobijeni u pozitivnom LE MS^E modu (A) i u negativnom LE MS^E modu (B), nakon post-kolonskog dodatka 5 mM FA rastvorenog u IPA.



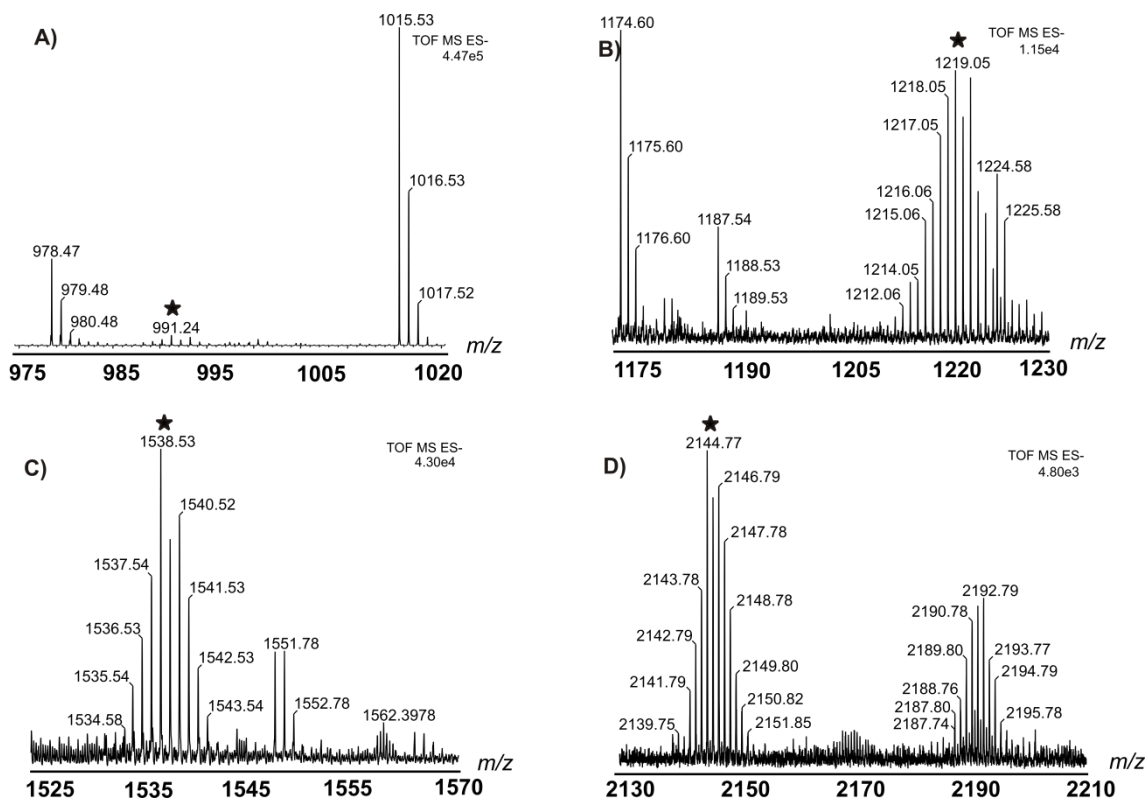
Slika 3. LE MS^E spektri [Ru(Cl-tpy)(dach)]-vezanih HSA sekvencija: DAHK (A), SEVAHR (B), SLHTLFGDK (C), HPDYSVLLLR (D), DVFLGMFLYEYAR (E) i HPHYFYAPPELLFFAK (F), u pozitivnom jonskom modu. Ciljne sekvencije su označene zvezdicom u svakom spektru.



Slika 4. . LE MS^E spektri [Ru(Cl-tpy)(bipy)]-vezanih HSA sekvencija: DAHK (A), SEVAHR (B), SLHTLFGDK (C) i DVFLGMFLYEYAR (D) u pozitivnom jonskom modu. Ciljne sekvencije su označene zvezdicom u svakom spektru.



Slika 5. LE MS^E spektri [Ru(Cl-tpy)(dach)]-vezanih HSA sekvencija DAHK (A), SEVAHR (B), SLHTLFGDK (C), HPDYSVLLLR (D), DVFLGMFLYEYAR (E) i HPHYAPPELLFFAK (F) u negativnom jonskom modu. Ciljne sekvencije su označene zvezdicom u svakom spektru.



Slika 6. LE MS^E spektri [Ru(Cl-tpy)(bipy)]-vezanih HSA sekvencija: DAHK (A), SEVAHR (B), SLHTLFGDK (C) i DVFLGMFLYEYAR (D) u negativnom jonskom modu. Ciljne sekvencije su označene zvezdicom u svakom spektru.

Biografija

Marija Nišavić je rođena 25.12.1985. godine u Lazarevcu, Republika Srbija. Hemijski fakultet, smer Diplomirani biohemičar, je upisala školske 2004/2005. godine. Diplomirala je 2011. godine sa prosečnom ocenom 8,53 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Doktorske studije na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Doktor biohemijskih nauka, upisala je školske 2011/2012. godine.

Od 01.07.2012. godine je zaposlena u Laboratoriji za fizičku hemiju, Instituta za nuklearne nauke "Vinča", na projektu koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod brojem 172011. Tokom izrade doktorske disertacije, bila je na višemesečnim boravcima u Laboratoriji za sistemsku biomedicinu, Centra za proteomiku i masenu spektrometriju Instituta "Ruđer Bošković" u Zagrebu. Dobitnica je FEBS, EBSA i pet COST stipendija za pohađanje konferencija, kurseva i kraćih studijskih boravaka u Hrvatskoj, Sloveniji, Nemačkoj i Holandiji, gde se usavršavala u oblasti masene spektrometrije.

Do sada je objavila devet naučnih radova u međunarodnim časopisima, od toga jedan u časopisu M21a, pet u časopisima M21, jedan u časopisu M22 i dva rada u časopisima M23 kategorije; šest saopštenja na skupovima međunarodnog značaja M34 i jedno saopštenje na skupu nacionalnog značaja M64.

Član je Srpskog hemijskog društva, Biohemijskog društva Srbije, Biofizičkog društva Srbije i Biofizičkog društva Hrvatske.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Марија Нишавић

Број индекса ДБ31/2011

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Испитивање интеракција терпиридинских комплекса рутенијума(II) са
транспортним протеинима серума

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 14.08.2017.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије
докторског рада**

Име и презиме аутора Марија Нишавић

Број индекса ДБ31/2011

Студијски програм доктор биохемијских наука

Наслов рада Испитивање интеракција терпиридинских комплекса рутенијума(II) са транспортним протеинима серума

Ментори р.проф.др Зоран Вујчић и виши зnanствени сурадник др Марио Циндрић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 14.08.2017.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Испитивање интеракција терпиридинских комплекса рутенијума(II) са транспортним протеинима серума

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 14.08.2017.

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.