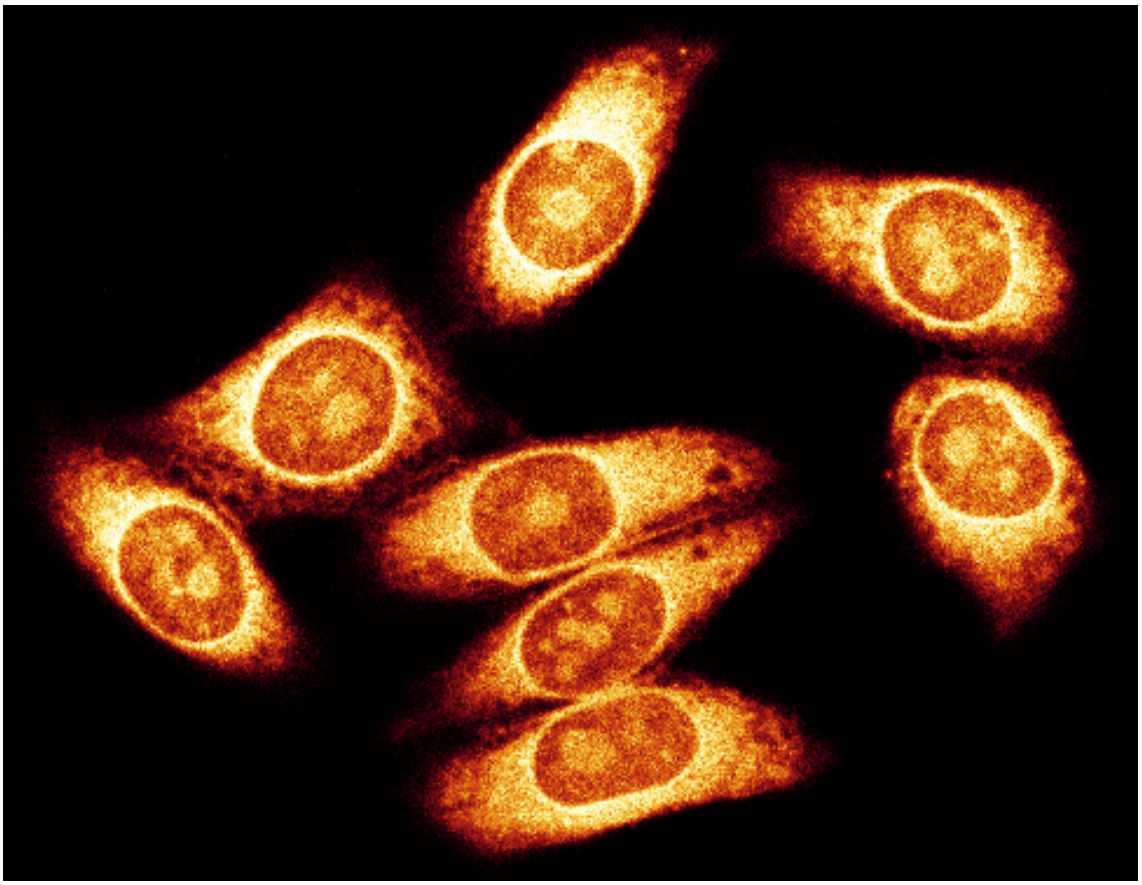
CHALMERS



Ruteniumkomplex som cellfärger
- Effekter av kiralitet och lipofilicitet

Kandidatarbete inom civilingenjörsprogrammen i Bioteknik och Kemiteknik

MARTIN AXELSSON, ANNA-MARIA DÉNES, ISABELLE HOLM,
EMIL NILSSON, PONTUS NORELL & JOAKIM OLSSON

Handledare: Per Lincoln & Maria Matson

Institutionen för Kemi- och Bioteknik
CHALMERS TEKNISKA HÖGSKOLA
Göteborg, Sverige 2012
KBTX01-12-06

Ruthenium complexes as cellular dyes
- Effects of chirality and lipophilicity

Försättsbilden visar metanolfixerade CHO-K1-celler infärgade med ΛD3 och visualiserade med konfokalmikroskop.

Sammanfattning

Färgämnen med förmågan att binda till olika cellstrukturer har många potentiella tillämpningar då de kan användas för att visualisera celler samt ge värdefull information om biologiskt relevanta molekyler i cellulära processer. För studier som dessa innebär det stora fördelar att kunna synliggöra cellen både i sin helhet och mer detaljerat, något som kan möjliggöras med konfokalmikroskopi och fluorescenta prober. Ruteniumkomplex med liganden dipyridofenazin (dppz) har i tidigare studier visat sig ha lovande egenskaper för att kunna fungera som sådana prober. En relevant egenskap är den så kallade *light switch*-effekten som gör att de emitterar starkt i hydrofoba miljöer, medan de inte emitterar alls i vattenlösning och på så sätt inte ger någon bakgrundsemission.

I detta kandidatarbete studeras hur interaktionen med cellens olika beståndsdelar påverkas av lipofiliciteten samt stereokemin för fyra sådana ruteniumkomplex, där två alkyleterkedjor, antingen propoxymetyl (D3) eller butoxymetyl (D4), adderats till dppz-liganden. D3-komplexets båda enantiomerer, Λ och Δ, syntetiserades och jämfördes med de två enantiomererna för de tidigare studerade D4-komplexen. Detta gjordes med hjälp av spektroskopimätningar, där affiniteten till DNA, RNA och membran undersöktes. Komplexen studerades även med konfokalmikroskopi för att se var i cellen de ackumulerades.

Resultaten visar skillnader i hur de olika enantiomererna av komplexen interagerar med olika cellkomponenter. Δ-komplexen visar stark infärgning till cellkärnan, och därmed till DNA, och uppvisar endast svag luminiscens i nukleol samt cytoplasma medan det motsatta gäller för Λ-komplexen. Effekten av lipofilicitet är inte lika tydlig, dock ses en ökad preferens för membranstrukturer för D4. Emissionmätningarna visade resultat som bekräftade mikroskopistudien. Detta arbete har följaktligen visat att lipofiliciteten samt stereokemin hos dessa komplex har stor betydelse för interaktioner i cellen och kan tillsammans med tidigare studier användas för utveckling av nya metallkomplex som kan användas som cellfärger i framtiden.

Abstract

Cellular dyes with the ability to bind to different cellular structures have many important applications as they can be used for visualizing cells or displaying cellular processes with biologically relevant molecules. In studies like these it is of great advantage to be able to picture the cell not only as an entity but also in a more detailed manner, which is possible with confocal microscopy and fluorescent probes. Ruthenium complexes with a dipyridophenazine (dppz) ligand have been shown to have promising properties as molecular dyes for cellular imaging due to their so called *light-switch effect*. This effect makes the complexes highly emissive in hydrophobic environment but in H_2O solution the complexes show no emission and hence gives no background emission.

This study evaluates how the interaction with the different components of a cell is affected by the liphofilicity and the stereochemistry for four ruthenium complexes of this kind, where two alkyl ether chains, either propoxy methyl (D3) or butoxy methyl (D4), are added to the dppz ligand. Initially the enantiomers of D3 were synthetized to be compared with the enantiomers of the previously studied D4. This was performed by spectroscopy, where the affinity to DNA, RNA and membrane structures were studied. The complexes were also studied by confocal microscopy to investigate where in the cell they accumulate.

The results show that there are differences in how the enantiomers interact with different cell components. The Δ-complexes stain the nucleus, and hence the DNA, and shows only weak luminescense in the nucleoli and the cytoplasm, while the opposite is seen for the Λ-complexes. The effect of lipophilicity is not as obvious, but an increased preference for membrane structures is seen for D4. This study has shown that there is a significant effect of the lipophilicity and the stereochemistry of these complexes for cellular staining and can therefore, along with earlier studies, be used for the development of new metal complexes as cellular dyes.

Innehåll

1 Introduktion **1**

2 Teori **3**
2.1 Cellen . . . 3
2.1.1 Nukleinsyror . . . 4
2.1.2 Biologiska membran . . . 4
2.1.3 Membranmodeller . . . 5
2.2 Ruteniumkomplex . . . 6
2.2.1 Kiralitet . . . 6
2.2.2 Ru(II)dppz-komplex i biologiska system . . . 7
2.3 Spektroskopi . . . 7
2.3.1 Fluorescens och fosforescens . . . 8
2.3.2 Ru(II)dppz-komplexens fotofysikaliska egenskaper . . . 10
2.3.3 Cirkulär dikroism-spektroskopi . . . 10
2.3.4 Nuclear Magnetic Resonance . . . 10
2.4 Konfokalmikroskopi . . . 11

3 Metod **12**
3.1 Syntes . . . 12
3.1.1 $Ru(phen)_2Cl_2$ – (I)Cl_2 . . . 12
3.1.2 Rac-[$Ru(phen)_2pq]Cl_2$ – Rac-(II)Cl_2 . . . 13
3.1.3 Λ-(II)arsenylartrat – Λ-(III) . . . 13
3.1.4 Rening av Λ-(III) . . . 13
3.1.5 Behandling av moderlut . . . 13
3.1.6 Konvertering av Λ-formen till Λ-(II)$(PF_6)_2$ – Λ-(IV) . . . 13
3.1.7 Λ-D3$(BF_4)_2$ –Λ-(V) . . . 14
3.1.8 Kromatografi . . . 14
3.1.9 Δ-produkten . . . 14
3.2 Emissionsspektroskopi . . . 14
3.2.1 Tillredning av buffert . . . 15
3.2.2 Tillredning av liposomlösning . . . 15
3.2.3 Tillredning av DNA-lösning . . . 15
3.2.4 Tillredning av RNA-lösning . . . 16
3.3 Konfokalmikroskopi . . . 16
3.4 CD-spektroskopi . . . 16

4 Resultat **17**
4.1 Syntes . . . 17
4.2 Emissionsspektroskopi . . . 17
4.3 Konfokalmikroskopi . . . 19

5 Diskussion **21**
5.1 Mikroskopianalys . . . 21
5.2 Analys av titreringsförsöken . . . 21
5.2.1 Analys av ΔD3 . . . 22
5.2.2 Analys av ΛD3 . . . 22
5.2.3 Analys av ΔD4 . . . 23
5.2.4 Analys av ΛD4 . . . 23

5.3 Sammanställning av analyserna 24
5.3.1 Kiralitet och bindning 24
5.3.2 Lipofilicitet och bindning 24
5.3.3 Hur kan kunskapen komma att användas i vidare studier? 25
5.3.4 Kan Ru(II)-dppz-komplex användas som cellfärger? 25

6 Slutsatser **26**

Referenser **27**

Bilaga A: Syntesschema

Bilaga B: NMR

Bilaga C: Titreringsförsök med emissionsspektroskopi

Begreppslista

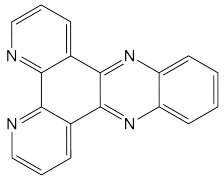
Bidentat ligand En molekyl som via två säten binder till en metallatom eller -jon. Tillsammans med metallatomen och andra ligander bildas ett koordinationskomplex.

Bilager Ett dubbellager av lipider där de opolära delarna vänds mot varandra och de polära delarna vänds utåt och har kontakt med vattenmiljöerna på bilagrets båda sidor.

Cytoplasma Det viskösa innehållet som finns innanför cellmembranet, men utanför cellkärnan i en cell.

Cytosol Vätskan i cytoplasman som omger organellerna i cellen.

dppz Dipyridofenazin, organisk molekyl med strukturformeln $C_{18}H_{10}N_4$.



Enantiomer Molekyler som har identisk sammansättning, men är varandras spegelbilder.

Fosfolipid En fosfatester av glycerol som bygger upp cellens membran. Består av en hydrofob kolvätesvans och ett polärt hydrofilt huvud.

Ligand En molekyl eller jon som binder till en metallatom eller -jon och bildar ett koordinationskomplex.

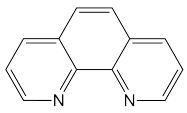
Lipider En grupp ämnen bestående av fetter och fettliknande ämnen som är olösliga vatten, men lösliga i opolär miljö. Har viktig funktion för strukturen i biologiska membran.

Monokromator En optisk enhet, till exempel ett prisma, som från ett brett ljusspektrum väljer ut våglängder i ett specifikt intervall för att producera enfärgat ljus.

Nukleol En sfärisk och membranlös suborganell som är rik på RNA och finns i cellkärnan.

Organell Membranavgränsad enhet med specifika funktioner i en cell. Finns i cytoplasman hos eukaryota celler.

phen Fenantrolin, organisk molekyl med strukturformeln $C_{12}H_8N_2$.



Planpolariserat ljus Ljus vars svängningar är begränsat till ett plan.

Prob En molekyl som används för att detektera andra molekyler eller cellulära strukturer.

Racemisk blandning En blandning innehållandes lika delar av en molekyls båda enantiomerer.

Serum Blod utan blodkroppar och koaguleringsfaktorer. Bra medium för odling av celler.

Zwitterjon En utåt sett neutral molekyl, men som innehåller separerade delar med positiv respektive negativ elektrisk laddning.

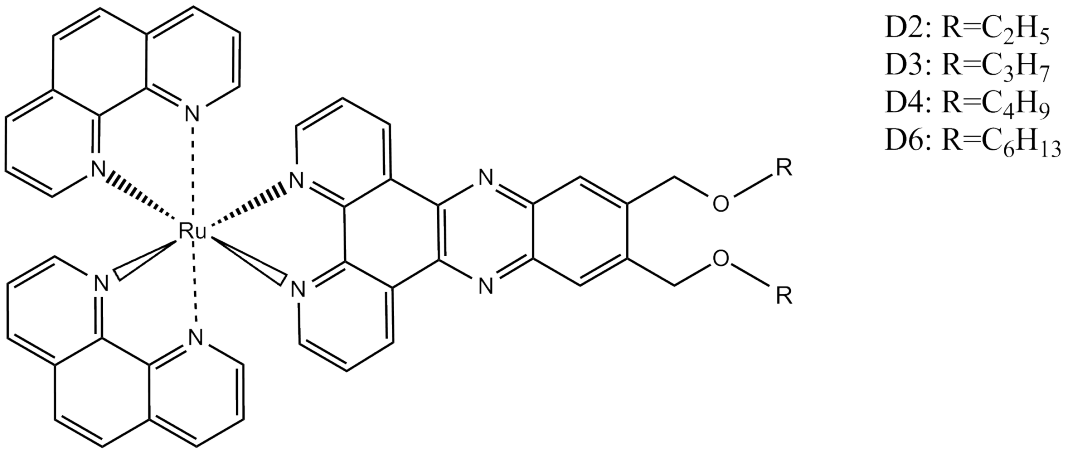
1 Introduktion

Färgämnen med förmågan att binda till olika cellstrukturer har många potentiella tillämpningar där de används som molekylära prober, det vill säga molekyler som genererar signaler, för att visualisera celler. Vid cellstudier innebär det stora fördelar att kunna synliggöra celler på ett tydligt sätt och på så sätt kunna urskilja dem både i sin helhet och mer detaljerat [1]. Att genom infärgning utmärka olika delar av en cell möjliggör studier inom många olika forskningsområden, till exempel kan det vara möjligt att undersöka var i cellen ett läkemedel verkar i förhållande till de infärgade områdena. Prober med mycket specifika affiniteter kan även komma att användas till att leda och binda in läkemedel till önskade platser eller att färga in skadliga makromolekyler [2].

Fluorescens är en egenskap som kan vara fördelaktig för molekyler som används som prober. Det innebär att en molekyl, efter att först ha absorberat ljus genom elektronexcitation, emitterar ljus när elektronen faller tillbaka till sin ursprungliga energinivå [3]. Det emitterade ljuset kan detekteras med spektroskopi och kan även användas för att konstruera bilder med hjälp av mikroskopi. Vanliga ljusmikroskop har länge använts för att studera celler, men med hjälp av fluorescenta prober kan en annan kvalitet på visualiseringen möjliggöras genom konfokalmikroskopi [1].

För att kunna använda och utveckla nya prober behövs förståelse för hur och var dessa interagerar med de olika beståndsdelarna i en cell [4]. Det är fördelaktigt om dessa prober endast emitterar ljus då de är bundna till någon cellkomponent, för att undvika effekten av bakgrundsemission. Det är också önskvärt att emissionen varierar beroende på vilken miljö molekylen befinner sig i.

En molekyl med ovannämnda egenskaper är koordinationskomplexet av övergångsmetallen rutenium med liganden dipyridofenazin (dppz), $[Ru(phen)_2dppz]^{2+}$. Detta komplex har en så kallad *light switch*-effekt, vilket innebär att miljöns polaritet avgör om emission sker eller ej [2]. Studier har tidigare utförts på tre varianter av detta komplex som gjorts mer eller mindre lipofila med alkyleterkedjor av olika längd, se Figur 1, och där de har undersökts med avseende på affinitet till RNA, DNA och fosfolipidmembran *in vitro* samt hur de lokaliseras i celler.



Figur 1: Strukturformel för de tidigare studerade D2, D4 och D6 samt det komplex som studerades i detta kandidatarbete, D3.

Resultaten visade att kolkedjans längd påverkar var komplexet återfinns i cellen, då det minst lipofila ruteniumkomplexet (D2) har störst affinitet till DNA, det mer lipofila komplexet (D4) har störst affinitet till RNA och membranstrukturer medan det mest lipofila komplexet (D6) föredrar membranstrukturer [4, 5]. Det fanns ett intresse att utöka denna systematiska studie med komplexet D3 för att undersöka hur detta komplex skulle uppföra sig under liknande förhållanden. Tidigare studier av andra, liknande ruteniumkomplex har visat att skillnad i affinitet till RNA och DNA påverkas av komplexets stereokemi [6–9]. Det var därför även intressant att undersöka om det finns skillnader i interaktionen med DNA, RNA och membranstrukturer för de olika enantiomererna av D3 och D4.

Syftet med detta kandidatarbete var att erhålla ny kunskap kring hur ruteniumkomplexens struktur och stereokemi påverkar deras egenskaper som fluorescenta cellfärger. Målsättningen var att undersöka bindningsaffinitet av D3-komplexen till DNA, RNA respektive membranstrukturer jämfört med de tidigare studerade D4-komplexen. Studierna utfördes *in vitro* med hjälp av emissionsspektroskopi, vilket sedan jämfördes med mikroskopistudier, där det undersöktes vilka delar av cellen komplexen färgade in. Resultatet ska i framtiden tillsammans med tidigare studier kunna användas för utveckling av nya ruteniumkomplex som kan användas som cellfärger.

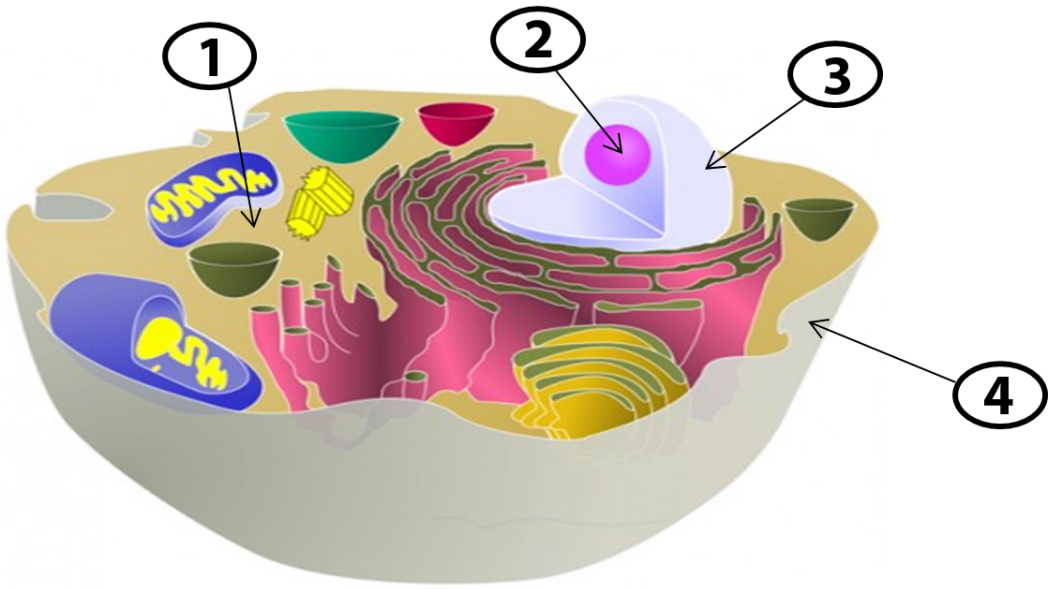
2 Teori

Detta avsnitt syftar till att ge en bakgrund till de centrala begreppen i studien. Relevanta koncept inom cellbiologi och fysikalisk kemi förklaras och det ges en fördjupande introduktion till tidigare studier av liknande ruteniumkomplex, deras interaktioner med biomolekyler samt deras fotofysikaliska egenskaper.

2.1 Cellen

Celler, som är livets byggstenar, utgör den strukturella och funktionella enheten i alla levande organismer. En animalisk cell, se Figur 2, omges av ett cellmembran vars funktion är att transportera viktiga ämnen in och ut ur cellen samt separera cellens inre från den omgivande miljön.

Innanför cellmembranet finns cytoplasman som utgörs av cytosolen samt organeller, vilka är membranomslutna enheter med varierande funktioner och kan ses som cellens motsvarighet till organ. En viktig organell är cellkärnan som innehåller den ärftliga informationen i form av DNA samt en eller flera nukleoler. Dessa består huvudsakligen av RNA och proteiner som även finns i cytoplasman [10].

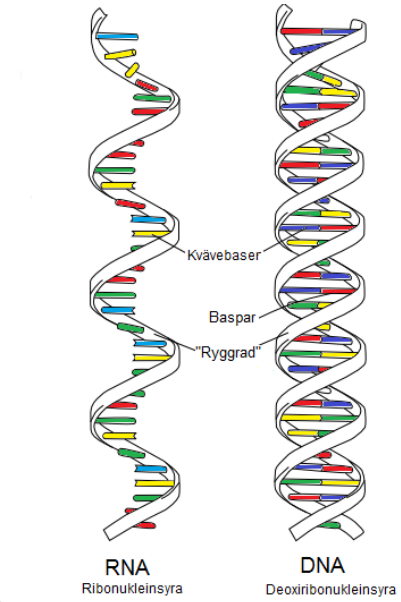


Figur 2: Förenklad bild av en animalisk cell. De numrerade pilarna visar viktiga komponenter och organeller. (1) Cytosplasma (2) Nukleol (3) Cellkärna (4) Cellmembran. Bild från [11], modifierad med siffror för förtydligande.

2.1.1 Nukleinsyror

DNA, som lagrar den genetiska informationen, utgörs av nukleotider vilka består av deoxyribos och en fosfatgrupp kovalent bundet till någon av de fyra kvävebaserna adenin (A), cytosin (C), guanin (G) och tymin (T). Tillsammans bildar nukleotiderna långa kedjor som kan uppgå till flera miljoner långa nukleotidsekvenser. Två sådana kedjor bildar en dubbel helixstruktur, där kvävebaserna A och T respektive G och C vätebinder till varandra i så kallade baspar. Eftersom att varje fosfatgrupp har ett negativt laddat syre får DNA en negativ laddning per bas.

De största skillnaderna mellan DNA och RNA är att RNA är enkelsträngat samt att kvävebasen tymin är utbytt mot uracil (U). Baserna i RNA kan interagera och bilda många olika sekundärstrukturer som är viktiga för dess funktioner, exempelvis kan två strängar komplementärbinda till varandra alternativt kan en sträng komplementärbinda till sig själv [10]. Figur 3 visar strukturerna för RNA och DNA.



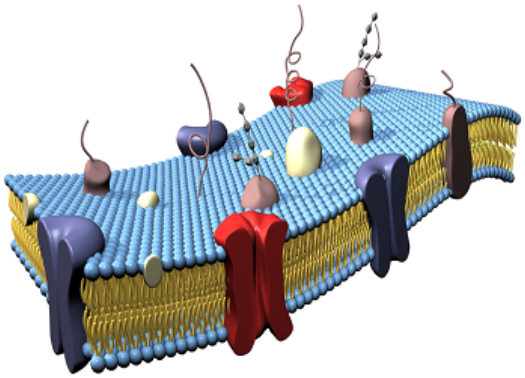
Figur 3: Strukturer för nukleinsyrorna RNA och DNA där ryggraden består av deoxyribos och fosfatgrupper. De fem färgerna representerar de olika kvävebaserna adenin, cytosin, guanin, tymin samt (endast i RNA) uracil. Bild från [11], modifierad med färg och text för förtydligande.

2.1.2 Biologiska membran

Biologiska membran består i huvdsak av lipider och proteiner. Förhållandet mellan mängd proteiner och lipider varierar beroende på membrantyp, men generellt sett är det ungefär lika mängd av varje. De tre vanligaste membranlipiderna är fosfolipider, kolesterol och glykolipider, där fosfolipider förekommer till störst del. Fosfolipider kännetecknas av att de har en opolär och en polär del. Den opolära delen består av en svans av två kolvätekedjor, medan den polära huvudgruppen hos de vanligaste fosfolipiderna består av en negativ fosfatgrupp och en positiv eller zwitterjonisk grupp. Detta innebär att det i biologiska membran framförallt finns fosfolipider som har neutral eller negativ nettoladdning.

Fosfolipiderna är tillsammans med andra lipider arrangerade i ett dubbellager, kallat bilager, som är impermeabelt för de flesta vattenlösliga molekyler. Bilagret bildas spontant i vattenlösning tack vare att fosfolipidernas kolvätesvansar packar ihop sig för att undvika kontakt med vattnet, medan huvudgrupperna lämnas exponerade utåt mot vattenytan.

Mellan lipiderna i bilagret återfinns olika typer av proteiner som ger membranet dess funktionella egenskaper, se Figur 4. Exempelvis är det proteinernas uppgift att samverka mellan membranet och cellens yttre respektive inre omgivning genom att katalysera olika reaktioner vid membranytan samt att transportera molekyler över membranet [10].

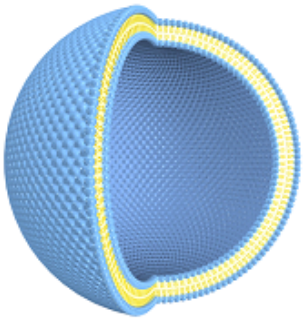


Figur 4: Schematisk bild av ett cellmembran bestående av membranlipider i ett bilager samt membranproteiner [2].

2.1.3 Membranmodeller

För att studera cellmembran används ofta olika typer av membranmodeller [12]. En viktig anledning till detta är att det kan vara svårt att dra tillförlitliga slutsatser angående interaktioner med lipider från studier med biologiska membran då strukturerna för dessa är mer komplexa. En användbar modell är liposomen, som är en bilagerstruktur av fosfolipider, vilken omsluter en volym, se Figur 5. De mest användbara liposomerna är de som består av enbart ett bilager och dessa kan ha olika storlekar beroende på framställningsmetod. De större (50 nm-500 nm i diameter) brukar kallas *large unilamellar vesicles* (LUV) [12]. I denna studie har LUV av storleken 100 nm använts.

De mest stabila liposomerna är de som består av en andel laddade fosfolipider av samma laddning, då dessa ger upphov till elektrostatisk repulsion som motverkar aggregering av bilagrerna [13]. En betydande skillnad mellan liposomer och biologiska membran är att liposomer inte innehåller de proteiner som reglerar de biologiska membranens funktion. En annan viktig skillnad är att lipiderna inom ett biologiskt membran är asymmetriskt fördelade, medan en liposom har en symmetrisk lipidfördelning [10].

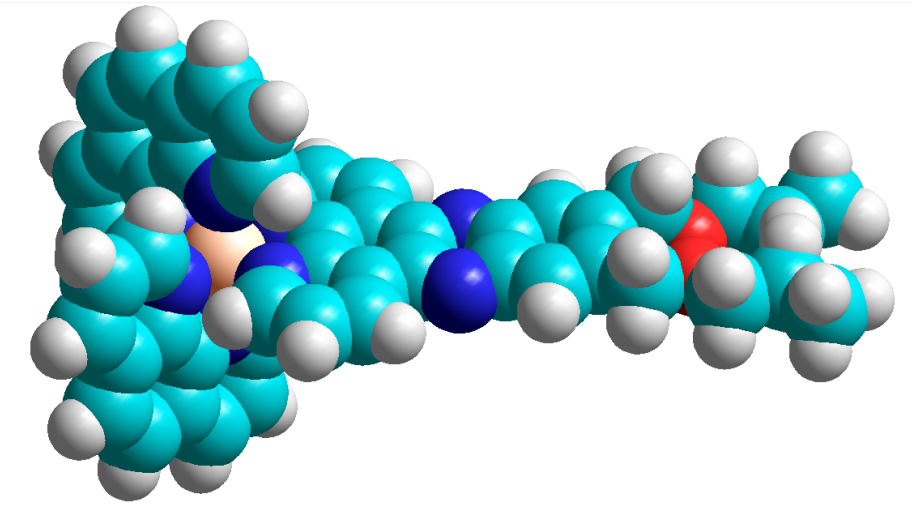


Figur 5: Förenklad bild av en liposom bestående av fosfolipider. De polära huvudgrupperna (blå) täcker insidan och utsidan medan de opolära svansarna (gula) är vända in mot varandra. Bild från [2], modifierad med ändrad färg.

2.2 Ruteniumkomplex

Bland övergångsmetallerna under kategorin platinametaller i det periodiska systemet finns rutenium. I sitt grundtillstånd är rutenium en fast vit metall som är mycket sällsynt och endast förekommer i mycket små mängder vid malmbrytning.

När en metall komplexbinder till ett antal ligander, det vill säga molekyler eller anjoner, bildas så kallade koordinationskomplex. Rutenium bildar i de flesta fall sex koordinationsbindningar och genererar därför oktaedriska koordinationskomplex, se Figur 6. Rutenium är en av få metaller som kan förekomma i alla oxidationstal och det bildar mycket stabila komplex [14]. Beroende på struktur och sammansättningen hos liganderna, kan komplexets egenskaper och roll alterneras.



Figur 6: 3D-struktur av ΛD3. Ruteniumkärnan koordinerar tre bidentata ligander vilket resulterar i ett oktaedriskt koordinationskomplex.

Studien i denna rapport behandlar rutenium(II)komplex som består av en ruteniumjon omgiven av bidentata ligander i form av två fenantrolinligander (phen) samt en dipyridofenazinligand (dppz). Detta innebär att komplexet får en oktaedrisk geometri. På dppzliganden sitter två alkyleterkedjor, vilka kan varieras i längd för att förändra lipofiliciteten hos komplexet.

2.2.1 Kiralitet

Inom stereokemin finns begreppet kiralitet och optiska isomerer. Vanliga steriska isomerer är olika molekyler med samma kemiska summaformel där rymdkonformationen på molekylerna skiljer sig. Optiska isomerer har identisk konformation, men är kirala, det vill säga spegelbilder av varandra. En propeller, en skruv och människans händer är exempel på ting som inte är identiska med sin spegelbild och kan beskrivas som kirala [15]. I den metallorganiska kemin betecknas enantiomerer med Λ (vänstervriden) eller Δ (högervriden) som är spegelbilder av samma kemiska komplex [16]. Kiralitet är en viktig egenskap inom kemin då optiska isomerer kan ha helt olika egenskaper och vridning vilket gör att molekylernas affinitet mot andra kirala molekyler skiljer sig åt avsevärt [17]. Jämförelse kan göras med ett handslag mellan två högerhänder och ett handslag med en höger och en vänsterhand. Vid reaktioner som bildar metalliska komplex erhålls ofta en racemisk

blandning bestående av både Λ och Δ, vilka måste renas från varandra om man specifikt är ute efter någon av dem [18].

2.2.2 Ru(II)dppz-komplex i biologiska system

Tidigare studier har genomförts på Ru(II)dppz-komplex för att utröna hur dessa binder till DNA. Resultaten visar att inbindningen sker genom så kallad interkalering, [19] vilket innebär att komplexet binder in till den hydrofoba miljön mellan två angränsande baspar i DNA [20]. Eftersom ruteniumkomplexen är positivt laddade sker bindningen också genom elektrostatisk attraktion eftersom DNA och RNA är negativt laddat [4]. Medan det har gjorts flera omfattande studier om ruteniumkomplexens DNA-bindande egenskaper, finns få studier om komplexens RNA- och membranbindning. Till fosfolipidmembran har dock Ru(II)-dppzkomplex med alkyleterkedjor visat sig binda genom att dppz-liganden bäddas in i bilagret parallellt med lipiderna, medan den positivt laddade ruteniumatomen, med de två fenantrolinliganderna, är placerad vid gränsytan mellan den hydrofoba och hydrofila miljön [9].

Det har tidigare visats att då längden på alkyleterkedjan i Ru(II)-dppzkomplexet varieras resulterar detta i en ändring av affinitet till olika cellkomponenter. När den lipofila karaktären hos komplexen förstärks, ökar inbindningen till membranstrukturer. Ru(II)-dppzkomplex med en hexoxykedja adderad till liganden (D6) föredrar att binda till membran jämfört med mindre lipofila komplex. D4-komplexet däremot föredrar RNA och membran medan D2-komplexet binder starkast till DNA [4, 5, 9]. Det är inte bara skillnader i lipofilicitet som påverkar affiniteten, även det faktum att komplexen existerar i två olika enantiomerer är en bidragande faktor. En studie av D4-komplexets två enantiomerer, Λ och Δ, visar att det är en markant skillnad i hur de färgar in celler. Infärgningsmönstren för de två enantiomererna kan ses som varandras motsatser, då Λ visar stark emission bundet till RNA medan Δ visar stark emission bundet till DNA [21]. Stereokemin har även i studier av andra komplex visat sig ha en betydande roll för bindningsaffinitet till olika biomolekyler och cellstrukturer [6–8].

2.3 Spektroskopi

Spektroskopi är ett samlingsnamn för olika metoder där materia undersöks genom att dess egenskaper studeras i det elektromagnetiska spektrumet. För att bestämma koncentrationen, c, av ett specifikt ämne i en lösning kan absorbansspektroskopi användas. Det är en teknik som bygger på att intensiteten, I_0, hos infallande ljus, som har passerat en monokromator, jämförs med intensiteten hos utfallande ljus som har passerat lösningen, I [22]. Då kan absorbansen, A, beräknas enligt ekvation (1).

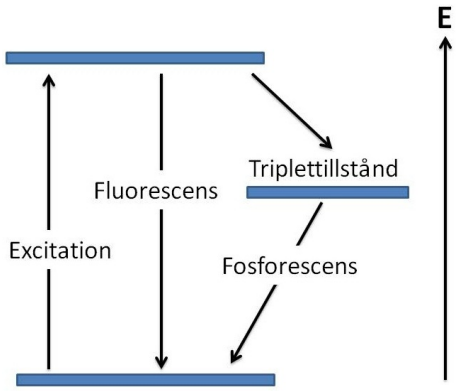
$$A = log\frac{I_0}{I} = \epsilon\, c\, l \tag{1}$$

där ϵ är den så kallade *extinktionskoefficienten*, som är specifik för den molekyl absorbansen mäts på och beror på våglängden samt hur väl molekylen absorberar ljus vid en viss våglängd. l är längden, i cm, som ljuset passerar i provet; vanlig kyvettlängd är 1 cm. Högerledet i ekvation (1) kallas Lambert-Beers lag.

2.3.1 Fluorescens och fosforescens

Fluorescens är det fysikaliska fenomen som uppstår när en elektron, i en molekyl som blivit exciterad av ljus, avger energi i form av en foton då elektronen återgår till sitt grundtillstånd. Eftersom en viss del av det exciterande ljusets energi konverteras till vibrationsenergi hos molekylen har det emitterade ljuset en lägre frekvens, det vill säga längre våglängd, än det infallande ljuset. Denna skillnad i våglängd möjliggör analys av det emitterade ljuset, som enbart kommer från molekylen i fråga och inte det infallande ljuset [22].

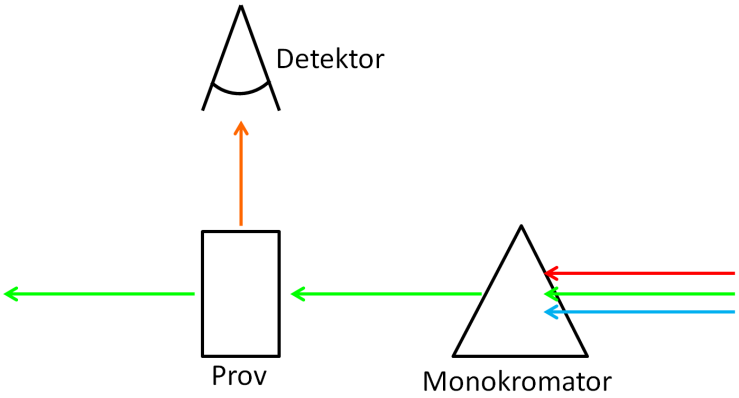
Fosforescens liknar fluorescens men pågår under en längre tid. Till skillnad från fluorescens, där den exciterade elektronen går tillbaka till sitt grundtillstånd på bara några nanosekunder, passerar den exciterade elektronen ett så kallat triplettillstånd på sin väg tillbaka till grundtillståndet, se Figur 7. När elektronen antar triplettilståndet måste den byta spin, vilket enligt kvantmekaniska lagar är förbjudet. Att byta spin kostar energi, därför har triplettilståndet lägre energi än det exciterade tillståndet. På grund av denna tvåstegsdeexcitation kan fosforescens pågå i flera sekunder [22].



Figur 7: Energidiagram för excitation som resulterar i fluorescens eller fosforescens.

En rad olika molekylära interaktioner kan leda till utsläckning av det emitterade ljusets intensitet från ett fluorescerande prov [23]. Detta kan vara en oönskad sidoeffekt men även ett sätt att mäta skillnader i fluorescens under olika betingelser.

Principerna för att mäta emission liknar de för att mäta absorbans med den stora skillnaden att molekylerna i provet exciteras med monokromatiskt ljus varpå intensiteten hos emitterat ljus mäts [22], se Figur 8. För att få en så stark emissionssignal som möjligt i förhållande till bakgrundsljus mäts intensiteten vinkelrätt från ljuskällans riktning. Typiskt exciteras molekylerna vid en specifik våglängd, medan emissionsintensiteten avläses över ett brett spektrum. Genom analys av dessa emissionsspektra kan olika slutsatser dras om egenskaperna hos molekylerna i provet, till exempel vad molekylerna är bundna till [23].



Figur 8: Schematisk bild av principen för emissionsspektroskopi. Monokromatorn separerar ljuset till en enda våglängd som sedan får passera igenom provet. Intensiteten hos det ljus som emitteras vinkelrätt från provet uppmäts.

2.3.2 Ru(II)dppz-komplexens fotofysikaliska egenskaper

Ru(II)dppz-komplexen har fotofysikaliska egenskaper som gör dem attraktiva att använda som molekylära prober för att visualisera celler. När ett ruteniumkomplex exciteras med hjälp av ljus av rätt våglängd kommer en elektron från metallens d-orbital förflyttas till den ligand vars antibindande π-orbital har lägst energi. Detta fenomen kallas *metal-to-ligand charge-transfer*. Emissionen av ruteniumkomplex är speciell och ses som ett slags mellanting mellan fluorescens och fosforescens, varför det hädanefter benämns luminiscens [2].

Luminiscensen hos dppz-komplex har visats variera med den lokala miljön. Komplexen har en light switch-effekt som ses genom att komplexen inte emitterar ljus i vattenlösning medan de luminiscerar starkt i lipofila miljöer. Då komplexen exciteras i vattenlösning utsläcks emissionen på grund av de vätebindningar som uppstår mellan dppz-ligandens kväveatomer och vattenmolekylerna vilket gör ruteniumkomplexen mycket känsliga för hydrofila miljöer [24]. Intensiteten liksom våglängden för emissionen hos dessa komplex har också visat sig variera med den lokala miljön. Ett skift på omkring 25 nm, för våglängden vid emissionsmaximum, uppstår då komplexen binder in till liposomer jämfört med nukleinsyror vilket gör det lättare att avgöra till vilken cellkomponent komplexet är bundet [2, 4, 5].

2.3.3 Cirkulär dikroism-spektroskopi

Cirkulär dikroism (CD) är en analysmetod som bygger på absorbansspektroskopi och kan användas för att urskilja optiska isomerer [25, 26]. Enantiomerers fysikaliska och kemiska egenskaper skiljer sig endast på två punkter, hur de interagerar med polariserat ljus samt hur de interagerar med andra kirala molekyler [17]. Då horisontellt och vertikalt polariserat ljus med identisk amplitud och fas infaller samtidigt skapar det ett 45 grader vinklat polariserat ljus. Då detta ljus fasförskjuts med ett kvarts varv skapas en helix. Fasförskjutningen kan ske så att vänstervridet eller högervridet cirkulärt polariserat ljus bildas [27]. Vid CD-spektroskopi mäts absorbansen av vänster- och högervridet cirkulärt polariserat ljus och skillnaden mellan dem defineras som $CD = A_L - A_R$. Enantiomerer absorberar det polariserade ljuset olika vilket resulterar i två unika spektra [28], där en av

enantiomererna ger ett spektrum med positivt utslag medan den andra ger ett spektrum med ett negativt utslag [17]. Metoden kan användas för att analysera alla kirala molekyler men används mest för stora biologiska molekyler som proteiner [26]. CD användes i denna studie för att säkerställa stereokemin hos de syntetiserade ruteniumkomplexen.

2.3.4 Nuclear Magnetic Resonance

Nuclear Magnetic Resonance (NMR), eller kärnmagnetisk resonans, är en metod som urskiljer atomkärnor samt vilken miljö de befinner sig i inom en molekyl. Metoden används vid strukturbestämning av okända molekyler eller verifiering av en syntetiserad molekyl. Den vanligaste typen av NMR är ^{1}H NMR, där skillnaden mellan molekylens olika väteatomer och deras respektive miljö uppmäts och registreras [29].

Vid NMR används ett starkt magnetfält tillsammans med radiovågor för att undersöka protoner. Eftersom energin i en proton är kvantiserad kan den bara anta två olika energinivåer så när en molekyl adderas till ett magnetfält kan protonerna därför ställa sig i riktning med eller emot magnetfältet. Det krävs högre energi för kärnan att ställa sig mot magnetfältet, därför har kärnorna en preferens för den lägre energinivån. Radiovågor används för att excitera protonen från den lägre energinivån till den högre. När kärnan sedan återgår till sitt grundtillstånd utsänds energin i form av en puls elektromagnetisk strålning som detekteras. Intensitetstopparna för den utsända strålningen plottas mot deras respektive frekvens i ett spektrum och topparna kan sedan jämföras med teoretiska frekvenser för väten i olika miljöer. Detta ger information om alla olika väten i en molekyl vilket underlättar strukturbestämningen [29]. I den här studien användes NMR till att verifiera syntesprodukten.

2.4 Konfokalmikroskopi

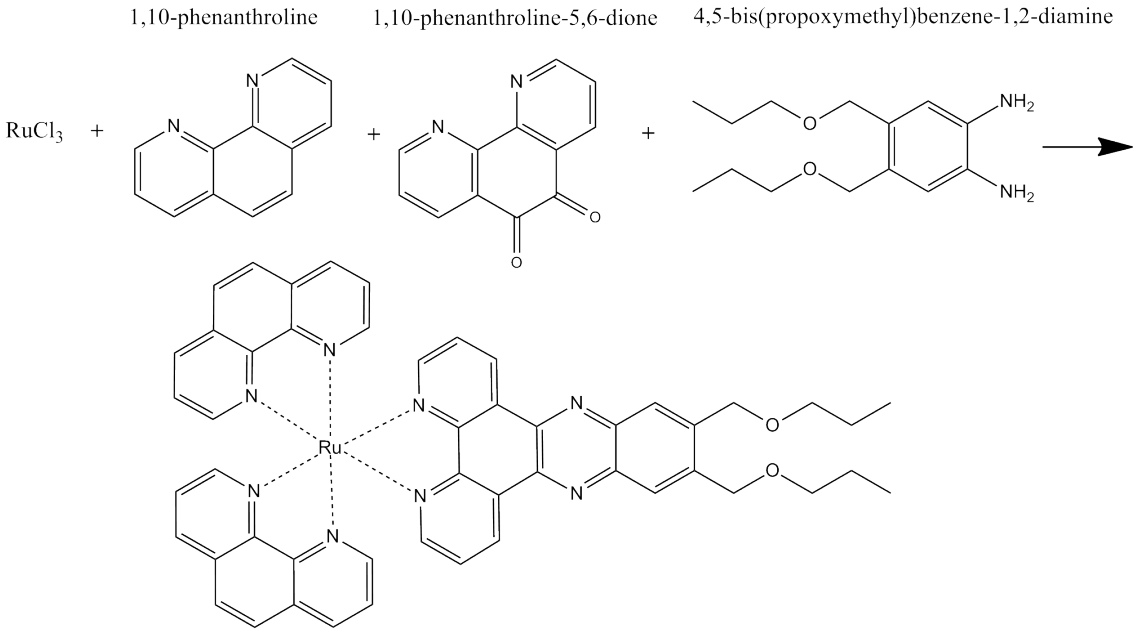
Confocal laser scanning microskopy (CLSM) används för att skapa bilder av prover som är infärgade med en eller flera fluorescerande prober. Med optik fokuseras laserljus, med en våglängd som exciterar proben, i en punkt av provet som då fluorescerar. Det utsända ljuset fokuseras mot detektorn av en lins, men innan ljuset når detektorn måste det passera genom en liten bländare. Bländaren är placerad på ett sådant sätt att i stort sett endast ljuset från fokuseringspunkten släpps igenom. Genom att successivt byta fokuspunkter i ett förutbestämt mönster, byggs en bild av provet upp. Eftersom fokuspunkten även kan förflyttas i djupled i provet kan 3-dimensionella bilder byggas upp. Då ljuset från fokuspunkten avskiljs från bakgrundsbruset i bländaren ger metoden mycket skarpa bilder jämfört med vanlig fluorescensmikroskopi, där allt ljus detekteras [10,30]. Konfokalmikroskopi användes i projektets cellstudier för att undersöka ruteniumkomplexens infärgning i celler.

3 Metod

Detta avsnitt innefattar metod och genomförande för syntesen av D3 och verifiering med CD och NMR. Dessutom behandlas metoden för emissionsspektroskopi, cellstudier och konfokalmikroskopi.

3.1 Syntes

D3-komplexets enantiomerer syntetiserades från ruteniumtriklorid där först fenatrolin och fenantrolindion stegvis bands till ruteniumet och dipropoxymetylbensendiamin sist fick reagera med diongruppen. Reaktioner och rening skedde i åtta steg och ett förenklat syntesschema visas i Figur 9 nedan. Ett mer utförligt syntesschema finns i Bilaga B, Figur 15.



Figur 9: Förenklad schematisk bild över syntesvägen. Syntesen utgick från ruteniumklorid där ett antal ligander adderades för att erhålla D3.

3.1.1 $Ru(phen)_2Cl_2 - (I)Cl_2$

$RuCl_3 \cdot H_2O$ (2,8 gram 12 mmol) torkades i ugn (120°C) över natt. Saltet mortlades varefter, $RuCl_3$(2,5 gram 12 mmol), 1,10-fenantrolin (2,5 gram 14 mmol) och LiCl (4,2 gram 100 mmol) löstes i 20 ml dimetylformamid till en mörkgrön lösning. Lösningen kokades under omrörning i 8 timmar varvid färgen övergick i mörkviolett. Slurryn som bildades adderades till 80 ml aceton och blandningen, en kaffeliknande sörja, förvarades i frys (−20°C) över natten. Produkten sugfiltrerades och tvättades med kall aceton. Svarta glittrande kristaller erhölls och dessa tvättades tills filtratet övergått från en brunlila till klarlila lösning. Filterkakan tvättades sedan i kallt vatten tills filtratet blivit ljusgult och överfördes sedan till E-kolv. Produkten, som ser ut som jord, suspenderades i 100 ml vatten och 100 ml varm etanol, detta kokades tills fullständig upplösning. Den varma lösningen filtrerades och LiCl (24 gram 0,57 mol) tillsattes sedan försiktigt under omröring. Bägaren lämnades

öppen en vecka för att tillåta avdunstning av etanolen. Därefter värmdes bägaren för att ånga av ytterligare etanol. Lösningen var nu lila med svarta kristaller. Dessa sugfiltrerades och tvättades med kallt vatten samt en etanol-eter blandning. Kristallerna tvättades sedan med enbart eter och torkades. Erhållet **(I)**Cl_2 (1,9 gram 3,6 mmol).

3.1.2 Rac-[Ru(phen)$_2$pq]Cl$_2$ – Rac-(II)Cl$_2$

Till **(I)** Ru(phen)$_2$Cl$_2$ (1,12 gram 2,1 mmol) och fenantrolindion (0,57 gram 2,7 mmol) sattes 40 ml vatten-etanol [1:1]. Detta kokades under omrörning 3,5 timmar. Varmt vatten tillsattes successivt för att hålla konstant volym. Lösningen filtrerades varpå filtret tvättades med vatten. Rac-**(II)**Cl_2 erhölls i filtratet som en vattenlösning.

3.1.3 Λ-(II)arsenylartrat – Λ-(III)

Filtratet (lösningen av rac-**(II)** från 3.1.2) kokades upp och L(+)-natriumarsenyltartrat (3,1 gram 13 mmol, löst i 30 ml kokande vatten) tillsattes. Kristallisering inleddes genom skrapning med glasstav längs E-kolvens insida. Lösningen fick svalna långsamt i kylskåp ett par dygn för kristallisering av Λ-**(III)**.

3.1.4 Rening av Λ-(III)

Bruna kristaller av Λ-**(III)** fanns nu i lösningen som filtrerades. Filtratet (moderluten) sparades och kristallerna tvättades med kallt vatten och etanol. Alla obundna eventuella fenantrolinligander bör ha tvättats bort då de är lösliga i etanol. Kristallerna tvättades med eter och torkades varvid de övergick till ljusbrunt. Dessa löstes i 25 ml dimetylsulfoxid på varm platta. 80 ml kokande vatten och L(+)-arsenyltartrat (0,85 gram 3,5 mmol, löst i 10 ml varmt vatten) tillsattes. Kristallisation initierades likt ovan varpå lösningen placerades i kyl.

3.1.5 Behandling av moderlut

Moderluten från 3.1.4 värmdes till kokning och 30 ml etanol tillsattes. Kaliumhexafluorofosfat (1,5 gram 8 mmol, löst i 25 ml vatten) tillfördes droppvis. Etanolen tilläts dunsta bort innan blandningen placerades i kyl under lock i två timmar. Kristallerna filtrerades av och tvättades med vatten och en etanol-eter blandning. Dessa löstes i 15 ml aceton och tetra-n-butylammoniumklorid (0,55 gram 2 mmol, löst i 4 ml aceton) adderades droppvis, en ljus fällning som övergår till en tjock slurry bildades. Denna filtrerades och tvättades med aceton. Det torkade kloridsaltet löstes i 65 ml kokande vatten och D(-)-natriumarsenyltartrat (1,2 gram 5 mmol, löst i 10 ml varmt vatten) tillsattes och kristallisering initierades. Lösningen placerades i kylen.

3.1.6 Konvertering av Λ-formen till Λ-(II)(PF$_6$)$_2$ – Λ-(IV)

De bruna kristallerna av Λ-**(III)** från 3.1.4 filtrerades av och tvättades med iskallt vatten. Kristallerna löstes i 30 ml 50 %-ig ättiksyra under uppvärmning. Kaliumhexafluorofosfat (0,85 gram 4,6 mmol, löst i 10 ml vatten) sattes till lösningen och ljusa kristaller bildades,

lösningen svalnade i rumstemperatur. Lösningen filtrerades och tvättades med kallt vatten, etanol och eter. Erhållet: 0,7 gram Λ-**(IV)** i form av brungrå kristaller.

3.1.7 Λ-D3$(BF_4)_2$ –Λ-(V)

Λ-**(IV)** (0,1 gram 0,1 mmol) och 4,5-dipropoxymetylbensen-1,2-diamin (0,05 gram 0,2 mmol) löstes i 2 ml acetonitril och en droppe ättiksyra, lösningen blir röd. Detta värmdes i varmt kranvatten. Ammoniumtetrafluoroborat (1 gram 10 mmol, löst i 15 ml vatten) tillsattes droppvis och produkten fälldes ut. Denna filtrerades av och produkten tvättades med kallt vatten, etanol och eter. Λ-**(V)** kristallerna löstes upp i acetonitril (cirka 2 ml) och en koncentrerad stamlösning skapades av det som fanns kvar i filtret.

3.1.8 Kromatografi

Kolonnen preparerades med Al_2O_3 och acetonitril. Lösningen från 3.1.7 Λ-**(V)** tillsattes och eluerades genom kolonnen som ett rött band, detta samlades upp och tetrabutylammoniumklorid (1 gram 3,7 mmol, löst i 20 ml aceton) tillsattes droppvis, ingen utfällning. Provet rullindunstades och aceton tillsattes igen, denna gång erhölls utfällning. Lösningen filtrerades och kakan tvättades med aceton. Erhållet: 0,03 gram Λ-D3 som kloridsalt.

3.1.9 Δ-produkten

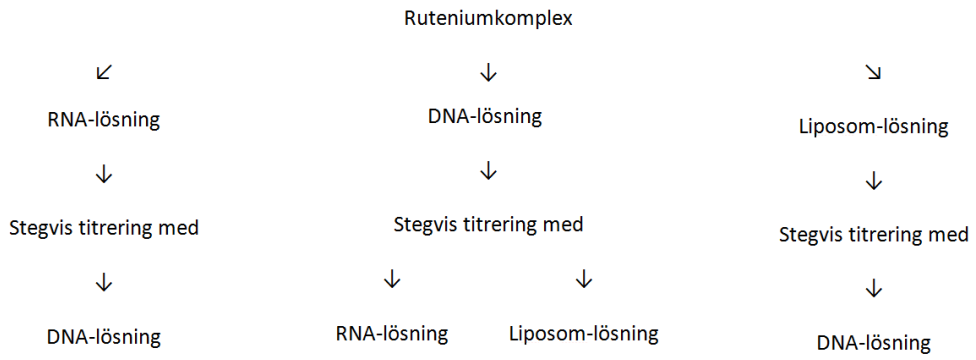
Δ-**(III)**kristallerna från 3.1.5 filtrerades av och renades enligt samma tillvägagångssätt som Λ-kristallerna, dock användes D(-)-arsenyltartrat (0,85 gram 3,5 mmol, löst i 10 ml varmt vatten) istället för L(+)-arsenyltartrat. Konvertering till Δ-(II)$(PF_6)_2$ **(IV)** skedde på samma sätt som Λ-**(V)**. Resterande steg, Δ-**(V)** och kromatografi skedde enligt beskrivningen för Λ-produkten. Erhållet: 0,007 gram.

3.2 Emissionsspektroskopi

För att undersöka de olika ruteniumkomplexens affinitet till olika cellkomponenter utfördes emissionsmätningar hos respektive ruteniumkomplex i lösningar med DNA, RNA och liposomer. Emissionen mättes i titreringsförsök där en lösning med en cellkomponent tillsammans med ett av ruteniumkomplexen stegvis tillsattes till en av de andra cellkomponenterna. Emissionen mättes efter varje tillsats. Detta gjordes för att kunna se en stegvis förändring av affiniteten. En schematisk bild av upplägget illustreras i Figur 10. Varierande koncentrationer vid titreringsförsöken skulle kunna medföra vissa fel, men alla värden som jämförs har normerats för att minimera dessa fel.

Ett titreringsförsök såg ut på följande vis: till kyvetten, innehållande buffert, ett ruteniumkomplex och en av cellkomponenterna, tillsattes små volymer av en andra cellkomponent (ca 20 tillsatser) tills en total volym på 1 ml uppnåtts. Då var slutkoncentrationerna 4 μM ruteniumkomplex, 40 μM DNA-baser, 40 μM RNA-baser och/eller 200 μM lipider, efter varje tillsats mättes emissionen av ruteniumkomplexet.

På grund av att det inte fanns tillräckligt med RNA-lösning fullföljdes inte en del titreringsförsök om det vid de första titreringarna inte skedde några större emissionsförändringar. Av samma anledning valdes de åtta titreringsförsök då komplexen undersöktes gentemot



Figur 10: Schematisk illustrering av de olika titreringsförsöken vid emissionsmätningarna.

RNA och liposomer bort. För försöken med RNA användes RNAse-fri buffert och kyvetterna tvättades med RNAse-fritt mQ-vatten.

Emissionen mättes med en Cary Eclipse-fluorimeter (Agilent Technologies, USA). Excitationen skedde vid 440 nm och emissionen mättes i intervallet 500-800 nm. Övriga inställningar anpassades beroende på intensiteten. För att bestämma de olika komponenternas koncentrationer utfördes absorbansmätningar med en Cary 50 Bio-spektrofotometer (Agilent Technologies, USA) innan och efter titreringsförsöken.

3.2.1 Tillredning av buffert

150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 16 mM HEPES löstes i mq-vatten. pH ställdes till 7,4 med NaOH-lösning och slutligen partikelfiltrerades bufferten. För att få RNAse-fri buffert tillsattes dietylpyrokarbonat (0,05 volym-%) till bufferten som fick stå över natt och sedan autoklaveras. RNAse-fritt mQ-vatten tillreddes på samma sätt.

3.2.2 Tillredning av liposomlösning

Den negativt laddade lipiden DOPG (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfoglycerol) och den zwitterjoniska lipiden DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-fosfokolin) från Aventi Polar Lipids (USA), lösta i kloroform, blandades till ett 4:1 förhållande för att få 20 % negativ laddning. Lipidlösningarna rullindunstades och vakuumtorkades över natt. En lipidfilm erhölls och löstes i buffert. Lösningen frystes med flytande kväve för att sedan tinas upp i 37°C. Denna procedur upprepades fem gånger och vid sista upprepningen skedde upptinandet vid rumstemperatur. Lösningen filtrerades sedan 21 gånger genom två polykarbonatfilter (Hand-held syringe LiposoFast-Pneumatic extruder (Avestin, Canada)) med porstorlek 100 nm för att erhålla liposomer med samma storlek. Liposomernas storlek och storleksfördelning kontrollerades med dynamisk ljusspridning med en Zeta Sizer Nano Series (Malvern).

3.2.3 Tillredning av DNA-lösning

Det DNA som användes kom från kalvbräss och köptes av Sigma. DNA löstes i buffert och koncentrationen i mol baser per liter mättes med absorbansspektrometer av typen Nano-

drop 1000 (Thermo Scientific, USA) i intervallet 200–400 nm ($\epsilon_{258nm} = 6600\,M^{-1}cm^{-1}$).

3.2.4 Tillredning av RNA-lösning

Det RNA som användes var rRNA från lever hos nötkreatur och köptes av Sigma. RNA löstes i RNAse-fri buffert. Koncentrationen mättes med spektrofotomerer av typen Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, USA) i intervallet 200–400 nm ($\epsilon_{258nm} = 8487,5\,M^{-1}cm^{-1}$).

3.3 Konfokalmikroskopi

För att undersöka de olika ruteniumkomplexen i verkliga celler och på så sätt få ett komplement till emissionsspektroskopistudien utfördes en studie med konfokalmikroskopi. Cellerna som användes var från mammaliecellinjen CHO-K1. Dessa såddes ut på mikroskopiskålar, två dagar innan själva mikroskopin, med cirka 80000 celler per mikroskopiskål. Cellerna odlades i tillväxtmediet HAM'S F12 berikat med 10 % serum och 2 mM L-glutamin vid 37°C och 5 % CO_2.

Vilka cellkomponenter de olika ruteniumkomplexen binder till undersöktes med konfokalmikroskopi på celler fixerade med iskall metanol i tio minuter. För att lättare kunna se hur ruteniumkomplexen färgade in jämfördes de med en kommersiell prob för RNA, *SytoRNA Select*, genom samtidig infärgning. Efter fixeringen tvättades cellerna med serumfritt medium innan nytt serumfritt medium innehållande 10 μM ruteniumkomplex och 1 μM SytoRNA Select tillsattes.

Konfokalmikroskopet som användes var av märket Leica TCS SP2 RS (Leica Microsystems, Tyskland), med ett 63x/1.32 objektiv. Ruteniumkomplexen och SytoRNA select exciterades med 488 nm Ar-laser och emissionsmätningen skedde i intervallet 650-700 nm för ruteniumkomplexen och 510-540 nm för SytoRNA Select. Inställningar för detektionen (PMT och gain) optimerades för varje bild.

3.4 CD-spektroskopi

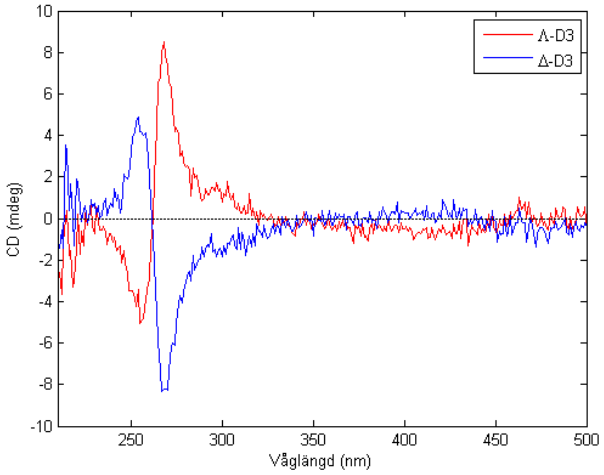
CD-mätningar av ΛD3 och ΔD3 utfördes i Chrirascan CD-spektrometer (Applied Photophysics, USA). Absorbansen av båda proverna mättes med Cary 50 Bio-spektrofotometer (Agilent Technologies, USA) och skillnaden användes för att normera CD-spektrat.

4 Resultat

Detta avsnitt presenterar resultaten från emissionsspektroskopin och konfokalmikroskopin. Dessutom redovisas verifieringen av de syntetiserade produkternas renhet.

4.1 Syntes

Produkterna ΔD3 och ΛD3 syntetiserades och 0,033 gram (utbyte: 26 %) respektive 0,0075 gram (utbyte: 6 %) erhölls. Strukturen på produkterna verifierades med hjälp av NMR genom att jämföra spektrat för D3 med det kända spektrat för $[Ru(phen)_2dppz]^{2+}$. De båda spektrumen skilde sig med tre toppar som kunde identifieras som protonerna i propoxymetylgrupperna med rätt antal protoner och skift, se Figur 16 och 17 i Bilaga B. Spår av vatten och aceton, som inte dunstat bort vid torkningen i syntesen, kan också ses i spektrat för D3 som två separata toppar. För att undersöka om rena enantiomerer av komplexet syntetiserats gjordes en analys med CD-spektroskopi, se Figur 11. Ur grafen kan det tydligt ses hur enantiomererna absorberar cirkulär polariserat ljus olika och bildar grafer som är speglade i x-axeln med lika stor intensitet vilket visar att rena isomerer erhållits.



Figur 11: CD-spektrum för ΛD3 och ΔD3.

4.2 Emissionsspektroskopi

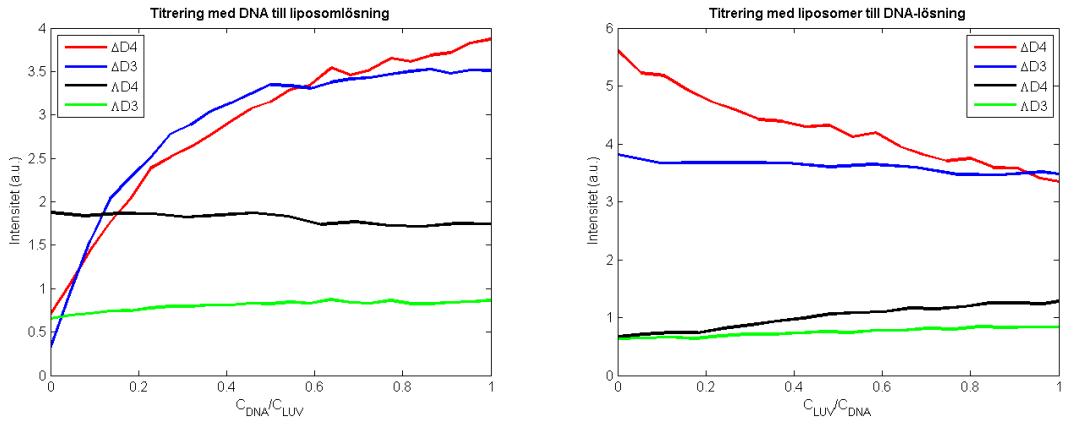
I spektroskopistudien undersöktes de olika ruteniumkomplexens affinitet till DNA, RNA och liposomer, genom att mäta emissionsförändringar i försök där en lösning med en cellkomponent tillsammans med ett av ruteniumkomplexen stegvis titrerades med en av de andra cellkomponenterna. Samtliga försök har normerats med avseende på fluorimeterns inställningar samt på koncentrationen av ruteniumkomplex.

Figur 12 och 13 visar hur den uppmätta intensiteten på det emitterade ljuset i proverna varierade med ökad mängd tillsatt komponent, vid den våglängd som uppvisade starkast emission under titreringen. Notera att liposomkoncentrationen anger koncentrationen av negativa laddningar, som är en femtedel av den totala lipidkoncentrationen då den negativa

nettoladdningen var 20 %. För fullständiga emissionsspektran från samtliga titreringsförsök och samtliga komplex, se Figur 18–21 i Bilaga C.

I Figur 12a syns intensitetsförändringen för proven med ruteniumkomplex och liposomer som titrerades med DNA. För Δ-komplexen syns en markant ökning i emission då DNA-koncentrationen ökar medan det för Λ-komplexen skedde små förändringar. Detta tyder på att Δ-komplexen föredrar DNA framför liposomer medan Λ-komplexen istället föredrar liposomer.

Figur 12b visar intensitetsförändringen för det motsatta försöket, där liposomer titrerades till en lösning med ruteniumkomplex och DNA. ΔD4 uppvisar en minskning i intensitet med ökad liposomkoncentration vilket antyder att komplexen till viss del övergår från DNA till liposomer. Som jämförelse förändrades emissionen från ΔD3 inte alls vilket tyder på en starkare affinitet till DNA jämfört med ΔD4. ΛD4 visade en liten men konsekvent ökning i emission allteftersom liposomkoncentrationen ökade medan emissionen för ΛD3 däremot inte ändrades vilket är ett tecken på DNA-preferens. Ett skift i emissionstoppens våglängd kunde däremot observeras vilket tyder på att komplexen övergick till liposomerna, se Figur 19c och 19d i Bilaga C.



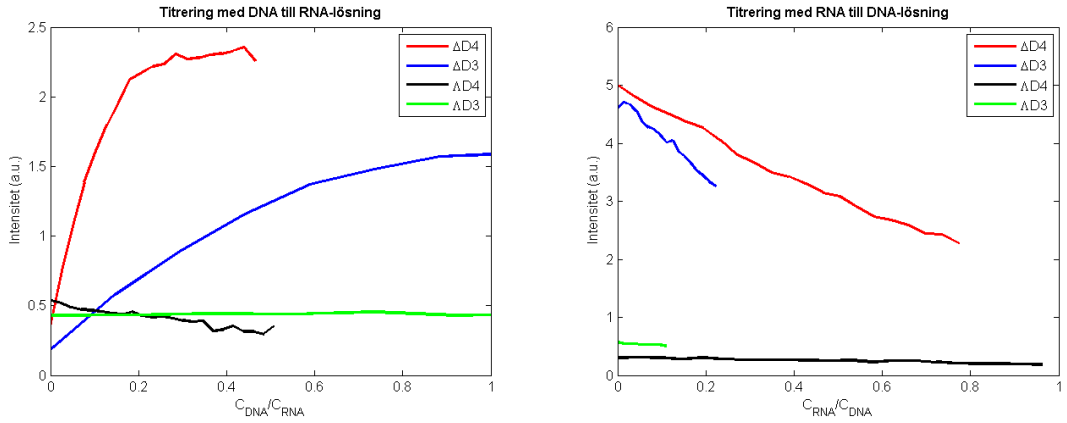
(a) **(b)**

Figur 12: **(a)** Skillnaden i intensitet vid emissionsmaximum för ruteniumkomplexen i liposomlösning som titrerades med DNA. **(b)** Skillnaden i intensitet vid emissionsmaximum för ruteniumkomplexen i DNA-lösning som titrerades med liposomer. Koncentrationsration mellan DNA och liposomer avser laddningsratio. För fullständiga emissionsprofiler, se Figur 18 och 19 i Bilaga C.

Figur 13a visar hur emissionen från en lösning med RNA och ruteniumkomplex ändras med ökande koncentration DNA. ΔD4-försöket visade en mycket kraftig ökning men på grund av en för svag DNA-lösning blev den slutgiltiga DNA-koncentrationen bara cirka hälften av den tänkta koncentrationen. Dock verkade intensiteten snabbt nå sitt maximum så att en tydlig DNA-preferens ändå kan urskiljas ur figuren. ΔD3 ökade också markant men långsammare än ΔD4. Försöket med ΛD4 gjordes, likt ΔD4-försöket, med en för svag DNA-lösning varför även den grafen slutar vid ungefär halva tänkta koncentrationen men en viss minskning i intensitet kunde ändå urskiljas vilket tyder på en svag DNA-preferens. ΛD3 visade däremot ingen förändändring i intensitet och föredrar därmed att binda till RNA.

Figur 13b visar hur emissionen från en DNA-lösning med ruteniumkomplex ändras med ökande koncentration RNA. Här visade båda Δ-komplexen en kraftig minskning i emis-

sionsintensitet vilket visar på en övergång av komplex från DNA till RNA. En felaktigt blandad RNA-lösning som visade sig ha för svag koncentration föranledde att de båda graferna för Δ-komplexen fick en felaktig slutkoncentration, men den nedåtgående trenden kan likväl observeras. De båda Λ-komplexen visade mycket liten förändring med tillsatt RNA-koncentration och med anledning av detta avbröts ΛD3-försöket. Den uteblivna förändringen tyder på att Λ-komplexen föredrar DNA. Detta är dock missvisande då det i Figur 21d i Bilaga C syns en tydlig förändring som är ett tecken på RNA-preferens.



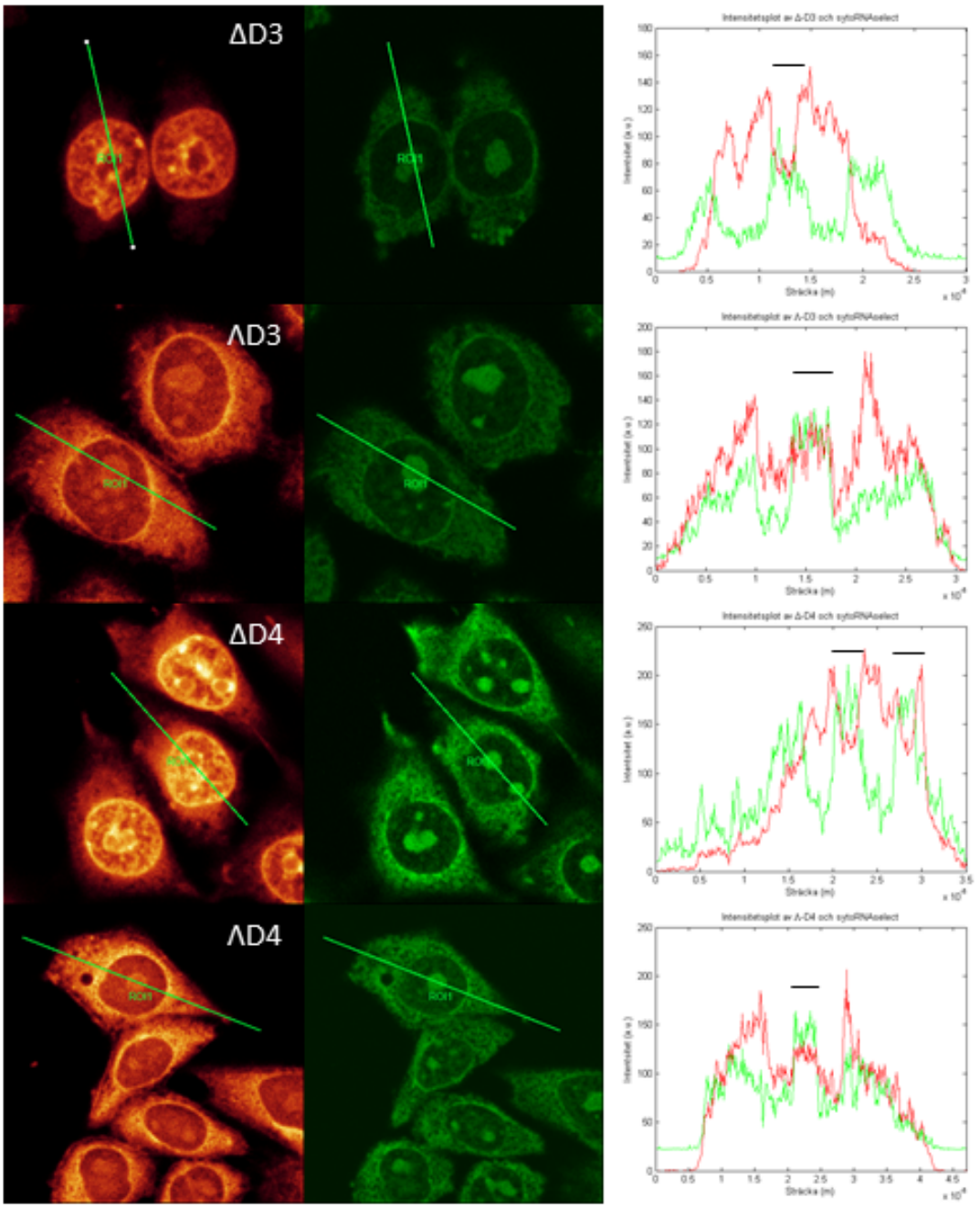
(a) **(b)**

Figur 13: **(a)** Skillnaden i intensitet vid emissionsmaximum för ruteniumkomplex i RNA-lösning som titrerades med DNA. **(b)** Skillnaden i intensitet vid emissionsmaximum för ruteniumkomplex i RNA-lösning som titrerades med DNA. Koncentration mellan DNA och RNA avser laddningsratio. För fullständiga emissionsprofiler, se Figur 20 och 21 i Bilaga C.

4.3 Konfokalmikroskopi

Ruteniumkomplexens affinitet till olika cellkomponenter i metanolfixerade CHO-K1 celler undersöktes med konfokalmikroskopi. Bilderna som erhölls visas i Figur 14. De fyra bilderna med röda celler längst till vänster visar celler infärgade med de två olika ruteniumkomplexen och deras respektive enantiomerer. ΔD3 och ΔD4 visar tydligast infärgning i cellkärnan och endast svag luminiscens i nukleolerna och cytoplasman medan ΛD3 och ΛD4 istället uppvisar starkast infärgning av nukleolerna och cytoplasman, och endast svag luminiscens i cellkärnan. Infärgningen med komplexen kan jämföras med den för RNA-proben SytoRNA Select, som tydligt färgar in nukleolerna och cytoplasman. Inställningarna för varje bild är individuellt anpassade och därför är det inte absoluta intensiteter mellan bilderna utan intensitetsskillnader inom en bild som kan jämföras.

För att tydliggöra jämförelsen av respektive komplex med RNA-proben har intensitetsplottar gjorts. De röda och gröna graferna motsvarar intensiteten från vänster till höger längs det gröna sträcket i mikroskopibilderna för ruteniumkomplex respektive RNA-prob. I plottarna har ett ungefärligt spann på var nukleolerna finns markerats med svarta linjer. Det syns tydligt att Λ-komplexen och RNA-proben har samma typ av infärgningsmönster, medan Δ-komplexen har det motsatta. Det är endast intensitetsprofilen mellan ruteniumkomplex och RNA-prob som ska jämföras och inte absoluta intensiteter.



Figur 14: Bilder från konfokalmikroskopi av metanolfixerade CHO-K1 celler infärgade med de olika ruteniumkomplexen (röda celler till vänster) och RNA-proben SytoRNA Select (gröna celler till höger). Graferna visar intensiteten från vänster till höger längs den gröna linjen i bilderna. De röda graferna motsvarar respektive ruteniumkomplex och de gröna graferna motsvarar RNAproben. Eftersom inställningar justerades för varje bild går det inte att jämföra intensiteter mellan bilder och i graferna är det därför endast intensitetsprofilen mellan ruteniumkomplex och RNA-prob som ska jämföras.

5 Diskussion

Denna studie är den första som studerat D3-komplexets egenskaper som cellfärg. En tidigare studie har genomförts på enantiomerer av D4 där de, liksom i denna studie, studerats med konfokalmikroskopi [21]. Däremot har mikroskopistudier med enantiomerer av Ru(II)dppz-komplex aldrig tidigare kopplats samman med en spektroskopistudie. Kombinationen av mikroskopi och spektroskopi har resulterat i mer omfattande data och slutsatser kring hur komplexen binder till och färgar in en cell. I detta avsnitt diskuteras och analyseras de grafer och bilder som presenterats i resultatdelen.

5.1 Mikroskopianalys

Infärgning av fixerade CHO-K1-celler med de studerade ruteniumkomplexen samt med den kommersiella RNA-proben SytoRNA Select visade att det faktiskt finns en betydande skillnad i hur enantiomererna av komplexen binder till cellerna, se Figur 14.

Vid jämförelse med RNA-proben kunde tydliga likheter ses i hur ΛD3 samt ΛD4 binder till cellen, då de visade stark inbindning till nukleol samt cytosol, medan inbindningen till övriga cellkärnan var svag. Att nukleolen färgas är ett bevis på att komplexen binder till RNA eftersom nukleolen mestadels består av detta. Även övriga cellkärnan som huvudsakligen består av DNA färgas in, men med en lägre intensitet än nukleolen, vilket indikerar att komplexet även har DNA-bindande egenskaper. Den kommersiella RNA-proben visade en mer jämn emission i cytoplasman än vad Λ-komplexen gjorde, särskilt utmed cellmembranet. Detta kan vara ett tecken på att de binder till olika komponenter, men eftersom cytoplasman är rik på både RNA, membranstrukturer samt protein är det svårt att uttala sig specifikt vilka dessa komponenter skulle kunna vara. Visserligen såg Λ-komplexen ut att färga kärnmembranet något starkare än RNA-proben, dock kan RNA-bindning i cytoplasman ej uteslutas.

För Δ-komplexen var inbindningen den motsatta jämfört med RNA-proben och Λ-komplexen, dock med en viss tendens av samma starka inbindning till kärnmembranet. Emissionen av Δ-komplexen i cellkärnan var stark, vilket kunde ses som ljusintensiva punkter runt nukleolerna. Inuti nukleolerna liksom i cytosolen, uppvisades däremot svag eller ingen emission. Möjligen visade ΔD4 något starkare emissionsintensitet i nukleolen än ΔD3. Eftersom varken nukleol eller cytoplasma färgats särskilt starkt för Δ-komplexen, medan övriga cellkärnan visar stark emission, är det tydligt att dessa komplex har en preferens för DNA.

5.2 Analys av titreringsförsöken

En serie titreringsförsök genomfördes för att undersöka de olika ruteniumkomplexens, och deras respektive enantiomerers, affinitet till cellkomponenterna DNA, RNA och liposomer. Det bör tas i beaktande att titreringskomponenterna endast ger en förenklad imitation av naturliga cellulära förhållanden. Liposomerna som används innehåller inga proteiner utan endast lipider och är 20 % negativt laddade, vilket ej är sant för verkliga cellmembran där laddningen varierar. Det RNA som används i studien är rRNA, medan det i cellen finns flera olika typer. Det är inte heller lika homogent i en cell som i dessa *in vitro*-studier. Studierna kan dock anses vara tillräckligt naturtrogna för att tillförlitliga slutsatser

ska kunna dras och jämföras med mikroskopiresultaten. Titreringarna genomfördes med emissionsspektroskopi varifrån resultaten diskuteras nedan.

5.2.1 Analys av ΔD3

ΔD3 verkar föredra att binda till DNA framför liposomer, vilket kan ses i Figur 12b, där emissionsintensiteten ej ändras vid tillsats av liposomer till DNA-lösning. I Figur 12a, där DNA titreras till liposomer, ses istället en kraftig intensitetsökning vilket även det tyder på att komplexet föredrar DNA framför liposomer. I DNA-lösning uppvisar komplexet en mer intensiv emission än i liposomlösning vilket är ett tecken på att komplexet är mer skyddat från omgivningen vid inbindning till DNA. Troligen har komplexet interkalerat med DNA, varpå emissionen skyddas från quenching ifrån den omgivande polära miljön och blir därmed mycket stark. I Figur 13a och 13b kan utläsas att komplexen binder till både DNA och RNA, eftersom intensiteterna förändrades vid titrering. Komplexet i DNA-lösning uppvisar dock en starkare emissionsintensitet än i RNA-lösning, vilket beror på att komplexet även här sitter mer skyddat i DNA genom förmodad interkalering. Dessa resultat kan förklara komplexets infärgning av cellerna, där emissionen är högst i kärnan på grund av komplexets affinitet till DNA, se Figur 14. Även om RNA-bindning kan förekomma i cellen så är dess emissionsintensitet så mycket lägre i jämförelse med den vid DNA-bindning att denna signal drunknar i den från DNA. Därför ter sig komplexets infärgning av celler som enbart DNA bindande.

5.2.2 Analys av ΛD3

Eftersom att ΛD3 emitterar ungefär lika svagt i DNA-lösning som i liposomlösning går det ej att uttala sig om dess bindningspreferenser för dessa utifrån de bearbetade titreringsgraferna i Figur 12. Om däremot titreringsgraferna, där liposomer och DNA titreras mot varandra, studeras fås en annan bild av situationen då ett tydligt skift i den maximala emissionsvåglängden syns, se Figur 18c och Figur 19c i Bilaga C. Eftersom emissionsvåglängden varierar, beroende på vad komplexet bundit till, är skiftet i titreringsförsöken med DNA och liposomer ett tecken på att inbindningen för komplexet förändras vid titreringarna. Att bägge grafer uppvisar förändring, samt att våglängden vid lika laddningsmängd DNA och liposomer hamnar mellan den för DNA-lösning och liposomlösning, tyder på att komplexet bundit till både DNA och liposomer. Det är dock anmärkningsvärt att emissionerna ökar i de båda graferna vid titrering, eftersom att det då ej är möjligt att uttyda i vilken komponent komplexet emitterar starkast.

Vid titrering med DNA och RNA visas låga emissionsintensiteter, se Figur 13. Detta gäller generellt för samtliga titreringar med ΛD3 jämfört med övriga komplex och visar därmed att varken bindning till DNA, RNA eller liposomer skyddar komplexet lika bra från den omgivande polära miljön. I Figur 13 ges intrycket av att komplexet binder till både DNA och RNA, eftersom det inte sker någon förändring vid titrering samt att komplexet emitterar något starkare i DNA-lösning än i RNA-lösning. Dock är startkoncentrationerna ej lika, då initialkoncentrationen för RNA är ungefär en tredjedel av den för DNA, vilket förmodligen leder till missvisande initiala intensiteter. Om koncentrationerna varit lika stora skulle emissionen i RNA-lösning sannolikt varit högre än den för DNA-lösning och detta skulle i så fall stämma överens med mikroskopiresultatet, se Figur 14, där nukleolen uppvisar starkare emissionsintensitet än i övriga cellkärnan. Eftersom det ej finns DNA i nukleolen bekräftar infärgningen av denna att komplexet binder till RNA samtidigt som

den svagare infärgningen av övriga kärnan även tyder på DNA-bindning. Då bindning till både DNA samt RNA tycks ske och då nukleolen emitterar starkare än övriga kärnan bör antagandet att komplexets emission i RNA-lösning är högre än den i DNA-lösning stämma. En högre emissionsintensitet för RNA skulle även kunna förklara den kraftigare intensiteten i cytosolen. Troligt är även att ΛD3 binder till membranstrukturer i cytosolen, då detta styrks utifrån försöken med DNA och liposomer, se Figur 19c i Bilaga C. Om försök med RNA och liposomer hade kunnat utföras hade fler slutsatser kring komplexens inbindning och emission i cytosolen kunnat dras.

5.2.3 Analys av ΔD4

I Figur 12 kan utläsas att ΔD4 binder till både DNA och liposomer, eftersom tydliga förändringar kan ses i båda titreringarna. Det är dock så att vid lika delar av DNA och liposomer ligger emissionsintensiteten närmare den för DNA-lösning vilket indikerar större preferens för DNA än för liposomer. ΔD4 emitterar starkare i DNA-lösning än i liposomlösning, vilket likt fallet med ΔD3 innebär att komplexet är mer skyddat från den polära omgivningen i DNA än i liposomer, troligen genom interkalation. I Figur 13 kan ses att komplexet binder till både DNA och RNA, eftersom förändring sker vid båda titreringarna, samt att emissionen i RNA-lösning är låg. Även här är detta ett tecken på att komplexet är mer skyddat från den polära omgivningen då det är bundet till DNA än till RNA. Resultaten ovan bekräftar den starka emissionen från kärnan, jämfört med nukleol och cytoplasma, i mikroskopiresultaten, se Figur 14. Alltså kan slutsatsen dras att den starka emissionen med största sannolikhet härstammar från komplexets bindning till DNA, då emissionen från bindning till lipider och RNA är mycket svagare i jämförelse samt att komplexet visat högre affinitet för DNA-bindning.

5.2.4 Analys av ΛD4

ΛD4 tycks binda till både DNA och liposomer om enbart titreringsgraferna i Figur 12 studeras, eftersom endast en liten eller ingen effekt syns i dessa grafer då komplexet i en DNA-lösning titreras med liposomer eller vice versa. Detta beror på att både DNA- och liposombundet ΛD4 har relativt låg intensitet i jämförelse med till exempel ΔD4, som visas i samma figur, vilket gör det svårt att se förändringar i titreringarna för ΛD4. Därför måste även titreringsgraferna i Figur 18d och Figur 19d i Bilaga C studeras. I dessa grafer syns en tydlig intensitetökning samt ett våglängdsskift för emissionsmaximum då liposomer titreras i DNA-lösning, medan den omvända titreringen ej uppvisar några förändringar. Det är således tydligt att komplexet har en stark preferens för liposomer jämfört med DNA. Dock titrerades en större laddningsmängd liposomer i provet än vad som fanns DNA från början vilket ger dessa grafer en något missvisande bild av komplexens preferens. Trots detta är det uppenbart att komplexet föredrar liposomer men viss bindning till DNA förefaller trolig, eftersom det skedde en svag minskning i intensitet då liposomer titrerades med DNA. I en lösning med enbart liposomer visar komplexet hög emissionsintensitet jämfört med i DNA-lösning. Intensiteten är även högre för ΛD4 i liposomlösning jämfört med liposomlösningar av de andra komplexen, se Figur 12a, vilket innebär att ΛD4 sitter mer skyddad från den omgivande polära miljön i membranstrukturer jämfört med övriga komplex.

Vid titrering med DNA och RNA kan det i Figur 13a ses att emissionsintensiteten för ΛD4 sjunker något och i Figur 13b ses en oförändrad intensitet vid tillsats av RNA till

DNA. Detta visar på en svag preferens för DNA, men då förändringarna i titreringsförsöken är små binder komplexet med största sannolikhet till båda titreringskomponenter. I RNA-lösning visar dock komplexet ungefär dubbelt så hög emissionsintensitet jämfört med DNA-lösning. Detta skulle kunna förklara varför nukleolen i mikroskopibilden, se Figur 14, är tydligt urskiljbar trots att inbindning till både RNA samt DNA är trolig utifrån titreringsförsöken. Den större affiniteten till liposomer samt den starkare emissionen i denna miljö, som sågs i titreringsförsöken, är sannolikt anledningen till den höga emissionsintensiteten i den membranrika cytoplasman jämfört med övriga cellen. Det är dock möjligt att även bindning till RNA bidrar till infärgningen av cytoplasman.

5.3 Sammanställning av analyserna

I detta avsnitt sammanställs den information som framkommit av studien. En utförlig diskussion kring komplexens likheter och skillnader förs, samt en mer generell diskussion om användningsområden och framtida studier.

5.3.1 Kiralitet och bindning

Komplexens infärgningsegenskaper avgörs dels av deras inbindningspreferenser, men även av deras emissionsintensiteter vid inbindning till de olika titreringskomponenterna. ΔD3 är mer selektiv i sin inbindning än ΛD3. Detta eftersom ΔD3 verkar föredra nukleinsyror framför membran, medan ΛD3 verkar kunna binda till alla titreringskomponenter. ΔD4 visar snarlika inbindningspreferenser som ΔD3 och detsamma gäller sinsemellan de två Λ-komplexen. Interkalation skulle kunna vara en trolig förklaring till Δ-komplexens kraftiga emissionsintensiteter då komplexen med ett sådant bindningssätt skulle sitta väl skyddade från polär miljö mellan basparen. Eftersom Λ-komplexen ej tycks kunna binda in till DNA, på ett sådant sätt att de sitter skyddade från polär miljö, kan det tänkas att ligandvridningen hos dessa komplex utgör ett steriskt hinder gentemot α-helixen i DNA. Detta visar att ligandernas vridning påverkar komplexens emissionsegenskaper vid inbindning mer än vad som tidigare visats [21].

5.3.2 Lipofilicitet och bindning

D4-komplexen har en alkyleterkedja med en metylgrupp mer än D3 vilket gör att skillnaderna mellan dem rent molekylärt är små. ΔD3 och ΔD4 uppvisar liknande egenskaper men med små skillnader, vilket kan ses genomgående i både mikroskopi- och spektroskopiresultaten. Båda komplexen binder till nukleinsyror och visar mycket stark emissionsintensitet då de binder till DNA där ΔD4 visar högst emissionsintensitet av de två. Det är dock möjligt att uttyda att ΔD4 har något högre liposompreferens i titreringsförsöken, en egenskap som troligen uppkommer på grund av att komplexet är mer lipofilt. I mikroskopiresultaten är det emellertid svårt att spekulera i huruvida denna egenskap hos ΔD4 går att urskilja, då mätkänsligheten vid dessa mätningar varierar. För att kunna undersöka om så är fallet skulle en studie med identiska mikroskopinställningar för de olika komplexen behöva utföras.

För Λ-komplexen ses en större skillnade mellan D3 och D4. Utifrån titreringsförsöken tycks ΛD4 ha en högre bindningspreferens för liposomer än ΛD3. Dessutom uppfattas en viss skillnad mellan komplexen då ΛD4 verkar ha en svag preferens för DNA gentemot RNA.

Att ΛD4 binder till DNA, medan ΛD3 inte gör det i samma utsträckning, skulle kunna bero på att den längre kolsvansen delvis överkommer de steriska hinder som orsakas av ligandernas vridning. ΛD4 utmärker sig även med sin starka emission vid inbindning till membranstrukturer. En trolig anledning till detta är den ökade lipofiliciteten, på grund av den längre kolsvansen hos ΛD4, som ger bättre inbindning till membranstrukturer.

5.3.3 Hur kan kunskapen komma att användas i vidare studier?

Den erhållna kunskapen i denna studie kan användas som komplement till tidigare studier som gjorts kring ruteniumkomplex. Studien har också genererat upptäckter som leder till ytterligare frågeställningar i kartläggningen av komplexens egenskaper som cellfärger.

Eftersom studien visat en stor skillnad mellan Δ- och Λ-komplexens inbindning till DNA skulle det vara av intresse att studera hur inbindningen av de olika enantiomererna sker till felvridet DNA. Om Λ-komplexet då binder in starkt, medan Δ-komplexet inte binder in, skulle detta kunna vara ett ytterligare tecken på att komplexens förmåga till interkalering beror på hur ligandernas vridning passar in i DNA-helixens struktur. Det är möjligt att denna skillnad mellan enantiomerer gäller för andra typer av komplex, vilket i så fall kan vara en betydande faktor vid framställning av nya DNA-prober.

Eftersom skillnaden mellan enantiomerer i denna studie är markant, medan effekten av lipofilicitet inte är lika framträdande, vore det intressant att också jämföra enantiomerer av komplex med både kortare och längre alkyleterkedjor för att hitta skillnader i affinitet. Då skulle mer selektiva ruteniumkomplex eventuellt kunna upptäckas.

5.3.4 Kan Ru(II)-dppz-komplex användas som cellfärger?

Det finns definitivt potential för att Ru(II)-dppz-komplex skall kunna användas som fluorescerande cellfärger. Denna studie visar att komplexen uppvisar ”trender” i hur de binder in till vissa cellkomponenter och hur deras emissionsegenskaper vid inbindningen ser ut. Att komplexen besitter en light switch-effekt gör dem intressanta i cellstudier, då de inte ger bakgrundsemission. Λ-komplexens emission kan liknas vid den kommersiella RNA-probens, dock med något större emission i resten av cellkärnan, medan ΔD3 har störst potential som DNA-prob då den visar kraftig emission samt bindningspreferens till DNA. ΔD4 visar liknande egenskaper och har därför även den potential som DNA-prob. Dock visar den även viss preferens till membranstrukturer, vilket kan vara en oönskad bieffekt.

6 Slutsatser

Syftet med denna studie var att undersöka huruvida lipofilicitet och stereokemi påverkar ruteniumkomplexens egenskaper som fluorescenta cellfärger. Utifrån resultat och diskussion har följande slutsatser kunnat dras:

- Ligandernas vridning avgör vilka cellkomponenter komplexen binder till och inverkar också på deras emissionsegenskaper.
- I spektroskopistudien är Δ-komplexen mer selektiva i sin inbindning och föredrar DNA framför RNA och membran medan Λ-komplexen verkar kunna binda till alla komponenter.
- De mer lipofila D4-komplexen har högre emission i membranstrukturer jämfört med D3-komplexen.
- Resultaten från spektroskopiförsöken bekräftar mikroskopistudien, då Δ-komplexen emitterar högst i cellkärnan, men svagt eller inte alls i nukleol samt cytosol. För Λ-komplexen är fallet det motsatta och liknar infärgningsmönstret för den kommersiella RNA-proben SytoRNA Select.
- Av de fyra studerade komplexen har ΔD3 störst potential som cellfärg och då i egenskap av DNA-prob.

Dessa slutsatser visar att små förändringar i strukturen som påverkar stereokemi och lipofilicitet hos ruteniumkomplexen kan ge stora förändringar i bindingsaffiniteter samt emissionsegenskaper och därmed deras egenskaper som fluorescenta cellfärger. Resultaten kan vara till nytta för framtida forskning om hur ruteniumkomplex kan användas som cellfärger.

Referenser

[1] Waggoner, A. och Tsien, R.Y. *Handbook of biological confocal microscopy.* New York: Plenum Press, 1995. pp. 267–274.

[2] F.R. Svensson. *Probing biomolecules and membranes using spectroscopy and microscopy.* Avhandling, Chalmers tekniska högskola, 2011.

[3] Mason, W.T. *Fluorescent and luminsecent probes for biological activity.* Bath: Academic Press, 1999. pp. 4–5.

[4] Matson M.; Svensson, F.R.; Nordén, B. och Lincoln, P. Correlation between cellular localization and binding preferences to RNA, DNA and phospholipid membrane for luminiscent ruthenium(II) complexes. *The Journal of Physical Chemistry*, 2010, 115(7):1706–1711.

[5] Svensson, F.R.; Matson, M.; Li, M. och Lincoln, P. Lipophilic ruthenium complexes with tuned cell membrane affinity and photoactivated uptake. *Biophysical Chemistry*, 2010, 149(3):102–106.

[6] Mei, H.Y. och Barton, J.K. Chiral probe for A-form helixes of DNA and RNA: tris(tetramethylphenanthroline)ruthenium(II). *Journal of the American Chemical Society*, 1986, 108(23):7414–7416.

[7] Luedtke, N.W.; Hwang, J.S.; Glazer, E.C.; Gut, D.; Kol, M. och Tor, Y. Eilatin Ru(II) complexes display anti-HIV activity and enantiomeric diversity in the binding of RNA. *ChemBioChem*, 2002, 3(8):766–771.

[8] Svensson, F.R.; Andersson, J.; Åmand, H.L. och Lincoln, P. Effects of chirality on the intracellular localization of binuclear ruthenium(II) polypyridyl complexes. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2012, 17(4):565–571.

[9] Svensson, F.R.; Li, M.; Nordén, B. och Lincoln, P. Luminescent dipyridophenazine-ruthenium probes for liposome membranes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2008, 112(35):10969–10975.

[10] Alberts, P.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. och Walter, P. *Molecular biology of the cell.* New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, 4th edition, 2008.

[11] Wikimedia [Internet]. `http://meta.wikimedia.org/`. 2012 [Hämtad 2012-05-04].

[12] Gennis, R.B. *Biomembranes - Molecular structure and function.* New York: Springer-verlag New York inc., 1989. pp. 75–83.

[13] Larsson, K. *Lipids-molecular orginazation, physical functions and technical applications.* Dundee: The oily press LTD, 1994. pp. 106–107, 267–274.

[14] Atkins, P. och Jones, L. *Chemical principles.* New York: W. H. Freeman and Company, 4th edition, 2008.

[15] Clark. J. Stereoisomerism – optical isomerism [Internet]. `http://www.chemguide.co.uk/basicorg/isomerism/optical.html`. 2010 [Hämtad 2012-05-04].

[16] H.S. Marion E. och Rzepa. The structure and symmetry of metal tris chelates [Internet]. http://www.people.carleton.edu/~mcass/trischelates/Index.html. [Hämtad 2012-05-04].

[17] Applied Photophysics Ltd.: The origin of optical activity [Internet]. http://www.photophysics.com/tutorials/circular-dichroism-cd-spectroscopy/2-chiral-molecules. 2011 [Hämtad 2012-05-04].

[18] J. Jr Maitland. Isomerism [Internet]. http://www.britannica.com/EBchecked/topic/296365/isomerism. 2012 [Hämtad 2012-05-04].

[19] Barton, J.K. ;Danishefsky, A. och Goldberg, J. Tris(phenanthroline)ruthenium(II): stereoselectivity in binding to DNA. *Journal of the American Chemical Society*, 1984, 106(7):2172–2176.

[20] Lerman, L.S. Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. *Journal of Molecular Biology*, Feb(3):18–30, 1961.

[21] Svensson, F.R.; Abrahamsson M.; Strömberg, N.; Ewing A.; och Lincoln, P. Ruthenium(II) complex enantiomers as cellular probes for diastereomeric interactions in confocal and fluorescent lifetime imaging microscopy. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 2011, 2(5):397–401.

[22] Atkins, P.; de Paula, J. och Friedman, R. *Quanta, matter, and change.* New York: Oxford University Press, 2009.

[23] Lakowicz, J.R. *Principles of fluorescence spectroscopy.* New York: Springer Science+Business Media B.V., 2006. pp. 277–330.

[24] Friedman, A.; Chambron, J.; Sauvage, J.; Turro, N och Barton, J. Molecular "light switch" for DNA: $ru(bpy)_2(dppz)^{2+}$. *Journal of the American Chemical Society*, 1990, 112(12):4960–4962.

[25] Nationalencyklopedin: Cirkulär dikroism [Internet]. http://www.ne.se/cirkulär-dikroism. 2012 [Hämtad 2012-05-04].

[26] Applied Photophysics Ltd.: An introduction to circular dichroism spectroscopy [Internet]. http://www.photophysics.com/tutorials/circular-dichroism-cd-spectroscopy. 2011 [Hämtad 2012-05-04].

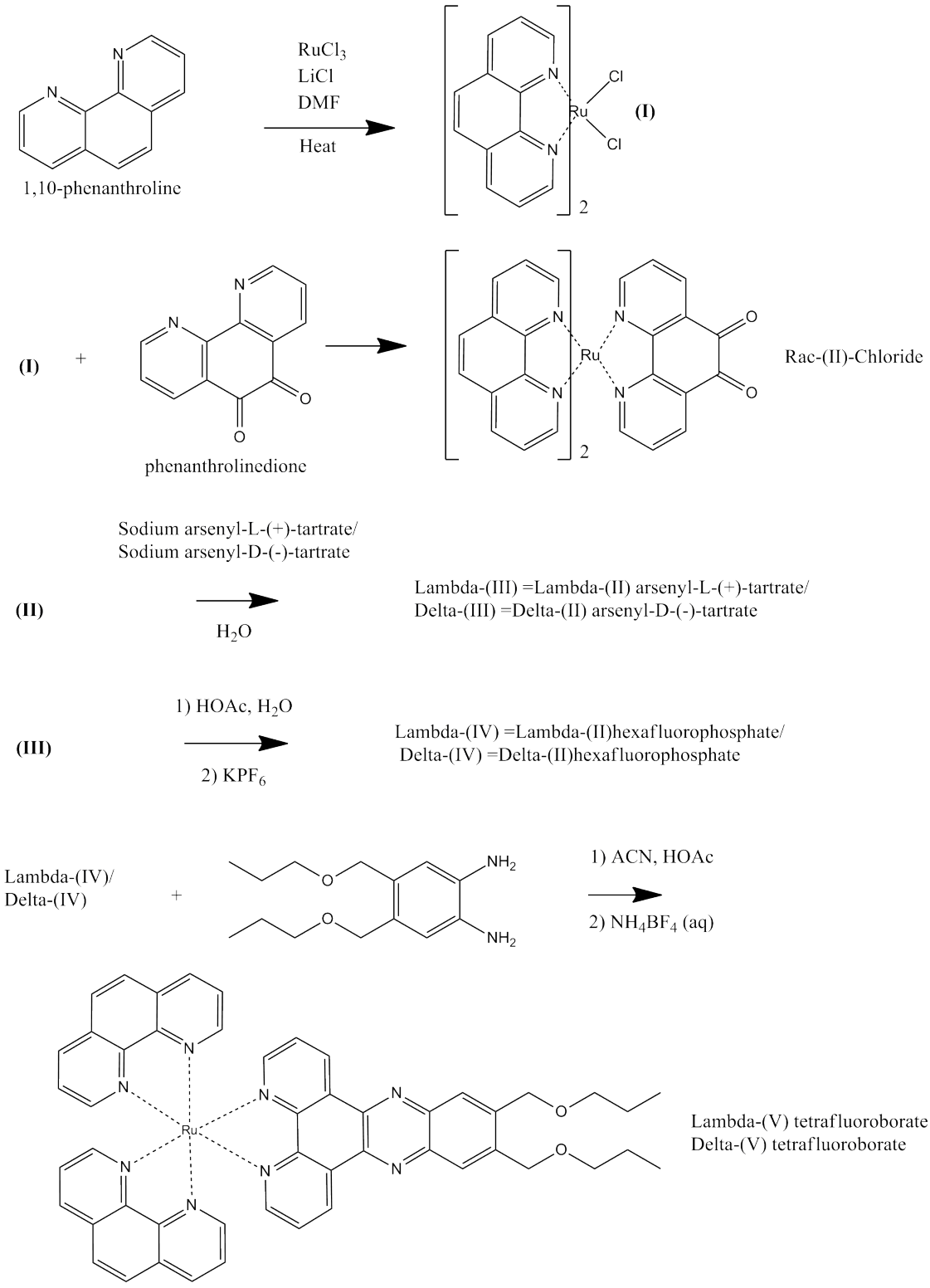
[27] Applied Photophysics Ltd.: The basics of polarisation [Internet]. http://www.photophysics.com/tutorials/circular-dichroism-cd-spectroscopy/1-understanding-circular-dichroism. 2011 [Hämtad 2012-05-04].

[28] Nationalencyklopedin: Absolutkonfiguration [Internet]. http://www.ne.se/absolutkonfiguration. 2012 [Hämtad 2012-05-04].

[29] Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S. och Wothers, P. *Organic chemistry.* Oxford: Oxford University Press, 5th edition, 2001.

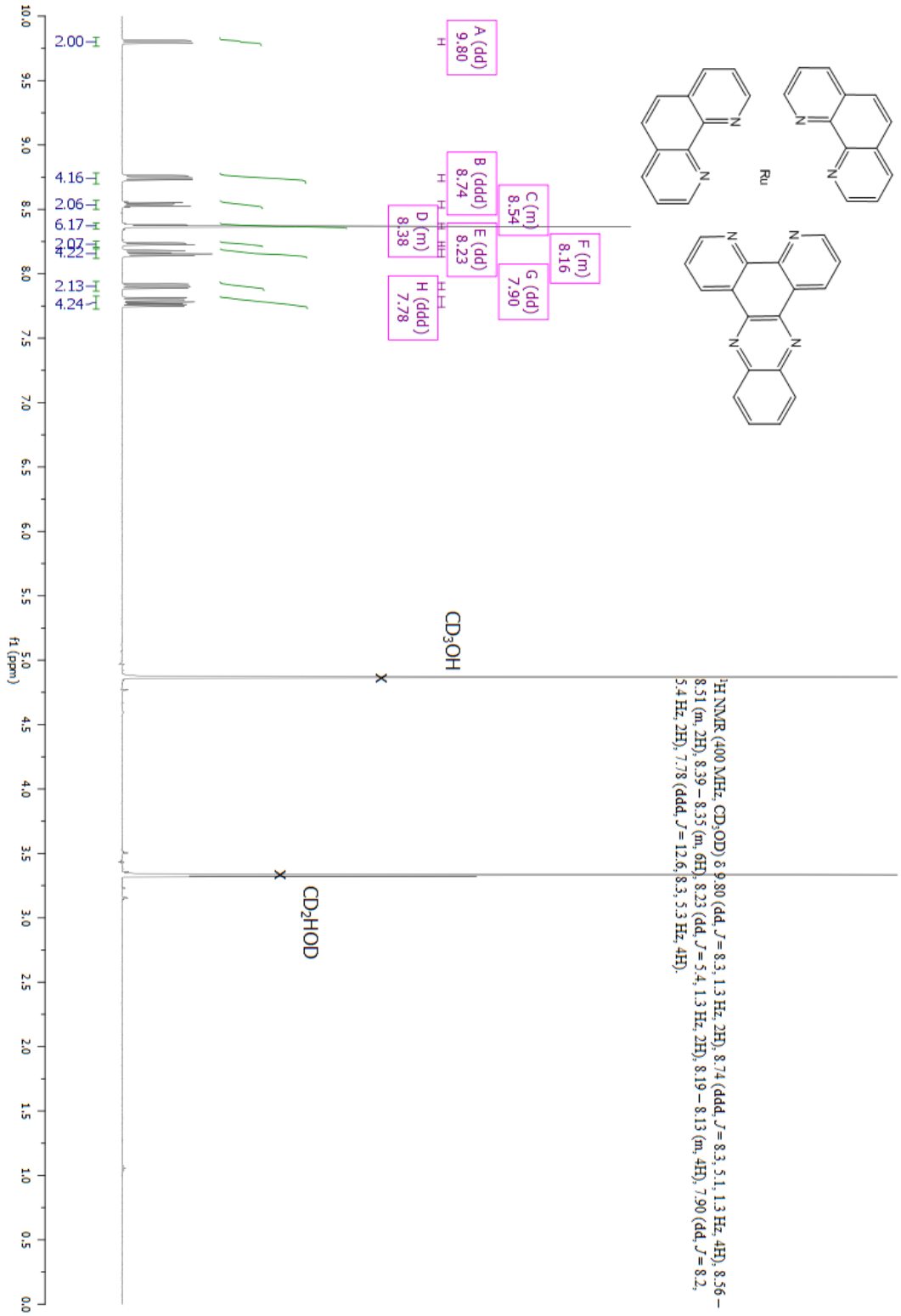
[30] Claxton, N.S.; Fellers, T.J. och Davidson, M.W. Laser scanning confocal microscopy. *Microscopy*, 1979(21):71–82.

Bilaga A: Syntesschema

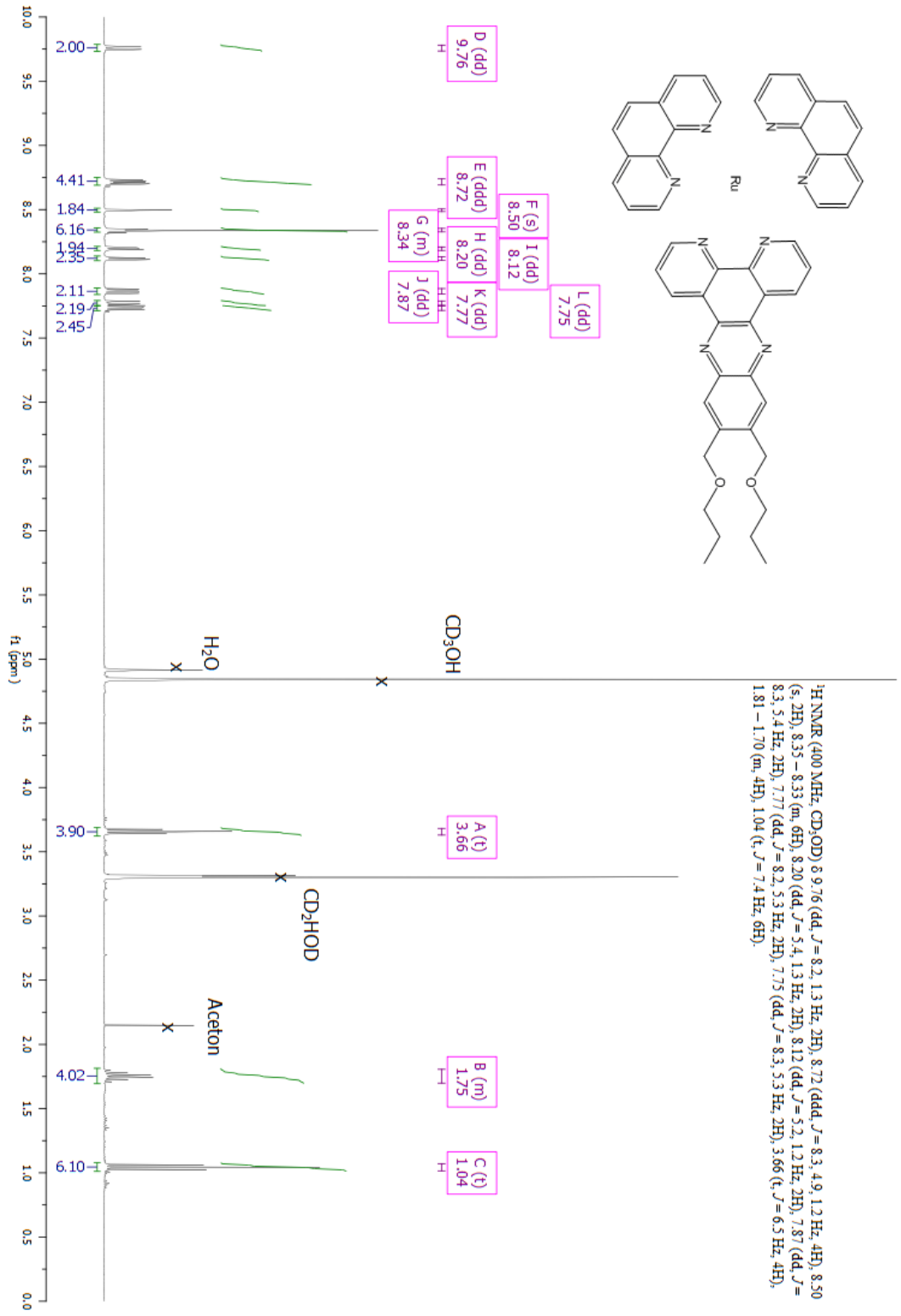


Figur 15: Reaktionsschema för syntesen av D3.

Bilaga B: NMR

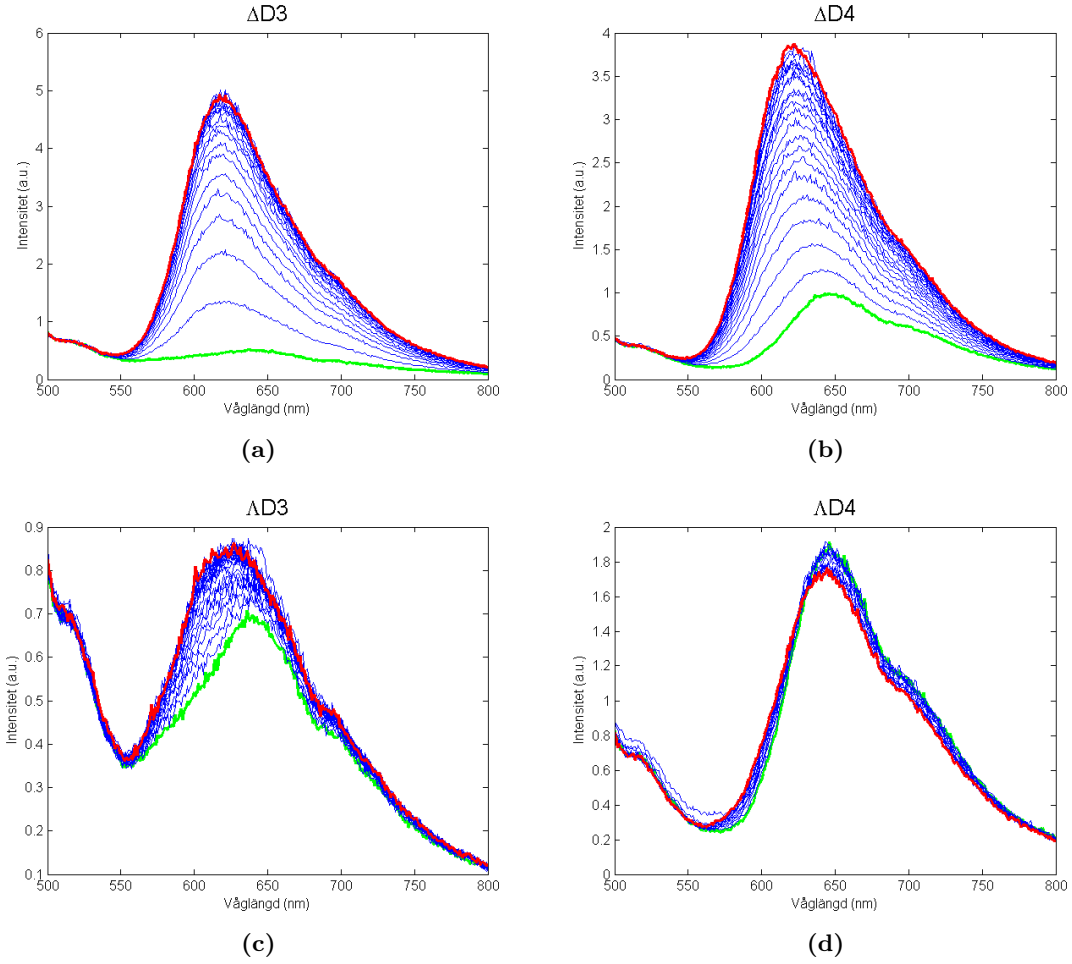


Figur 16: NMR-spektrum för $[Ru(II)(phen)_2dppz]^{2+}$. Topparna vid 3,3 och 4,8 ppm motsvarar lösningsmedlet.

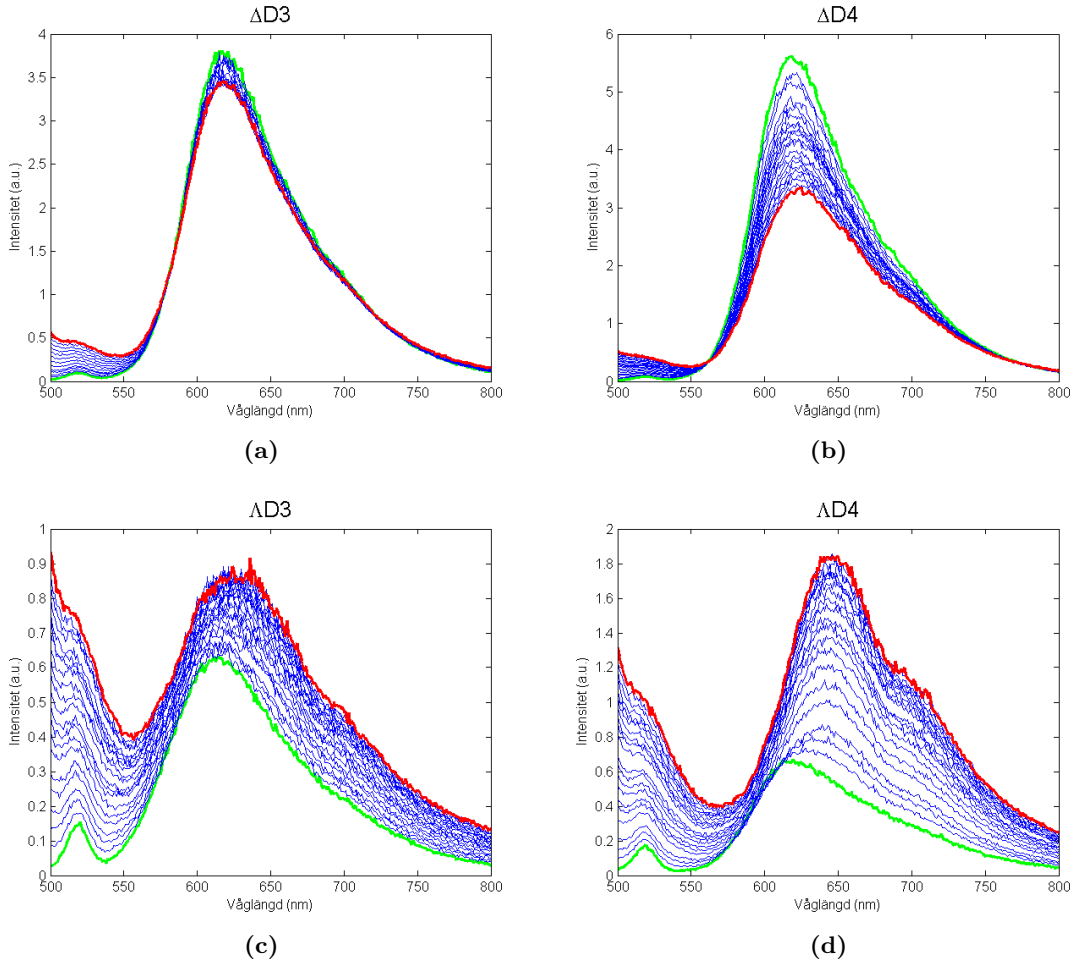


Figur 17: NMR-spektrum för D3. Vid jämförelse med Figur 16 ses fem ytterligare toppar, tre av dessa motsvarar alkyletergrupper (1,0 ppm, 1,8 ppm och 3,6 ppm). Topparna vid 4,9 ppm och 2,3 ppm motsvarar vatten och aceton.

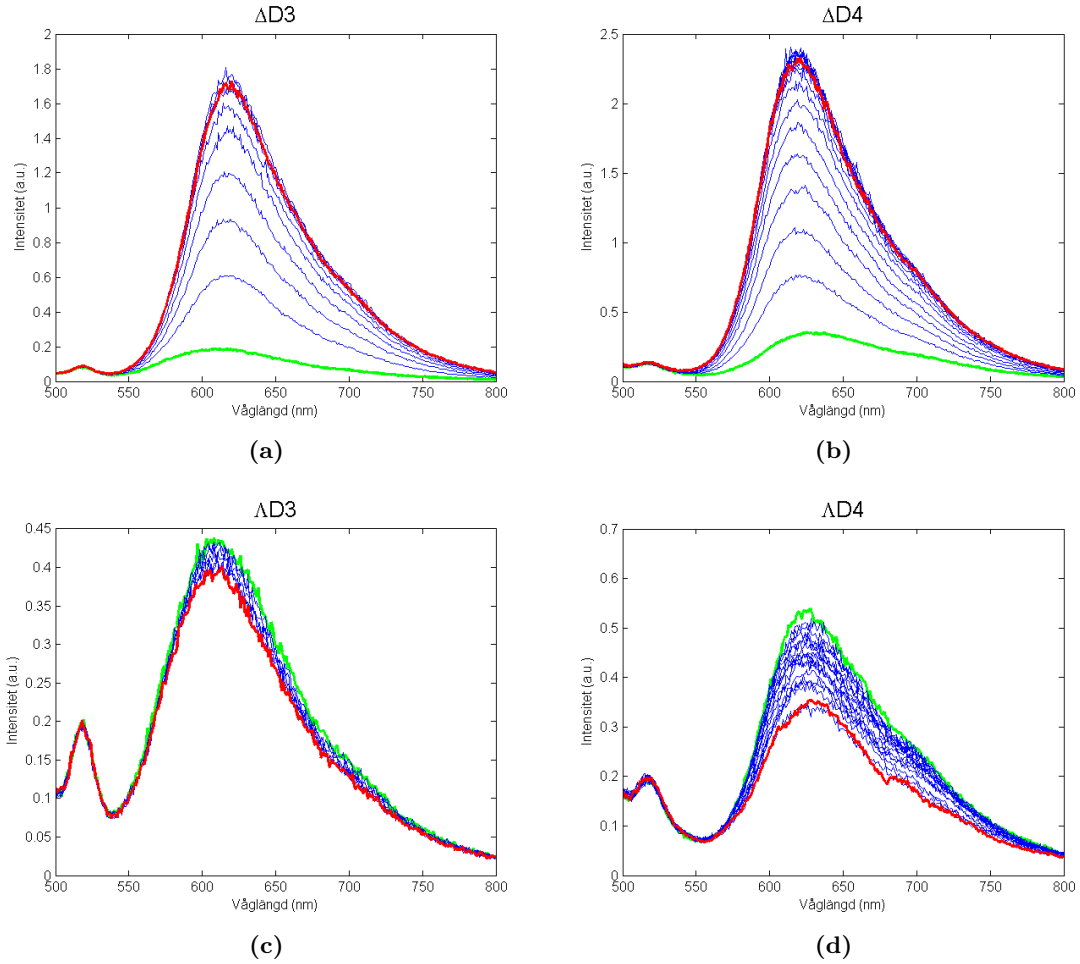
Bilaga C: Titreringsförsök med emissionsspektroskopi



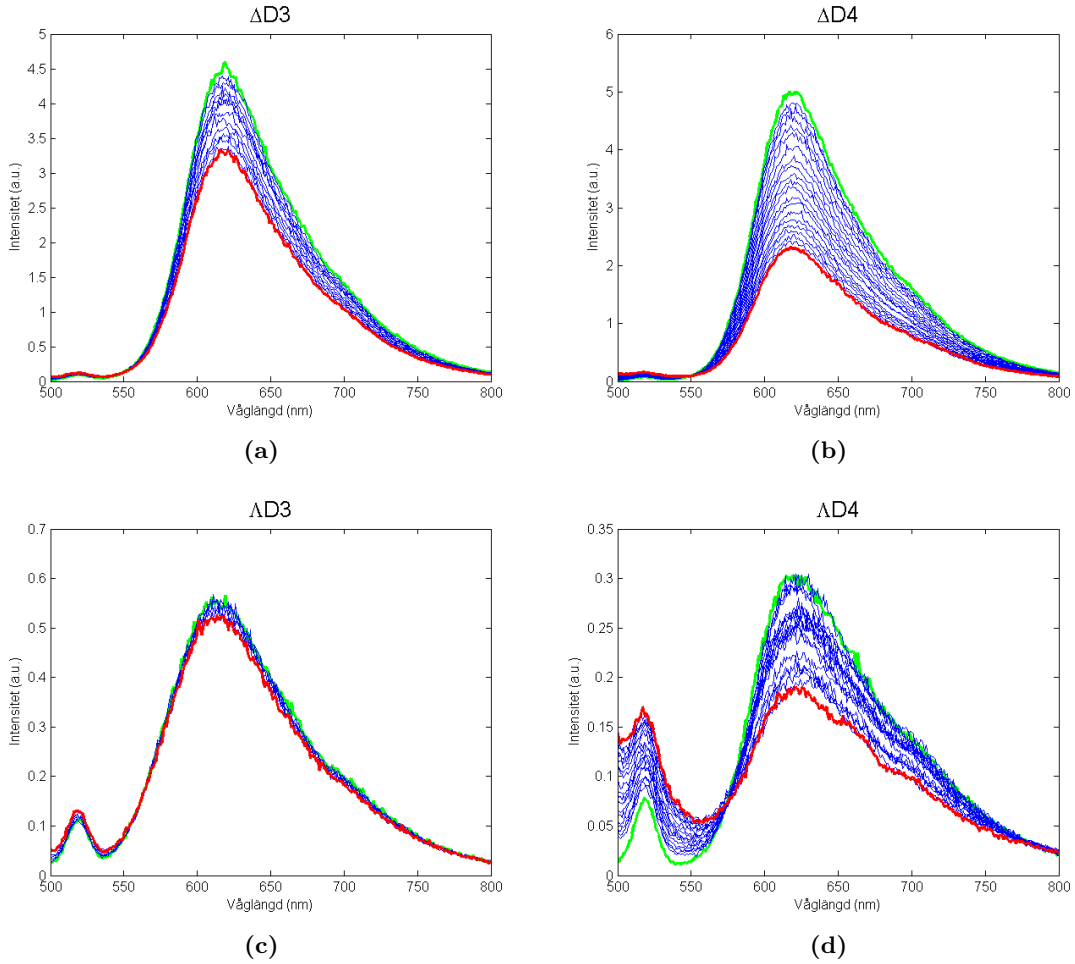
Figur 18: Emissionsspektran för de fyra olika försöken där en liposom-lösning med laddningskoncentrationen 40 μM titrerades med en DNA-lösning till en slutgiltig koncentration på 40 μM. De gröna linjerna visar emissionsprofilen vid startkoncentrationen och de röda linjerna visar emissionsprofilen efter att alla titreringar utförts.



Figur 19: Emissionsspektran för de fyra olika försöken där en DNA-lösning titrerades med en liposomlösning till en slutgiltig laddningskoncentration på 40 μM. De gröna linjerna visar emissionsprofilen vid startkoncentrationen och de röda linjerna visar emissionsprofilen efter att alla titreringar utförts. Den initiala DNA-koncentration var i **(a)** 35 μM, i **(b)** 38 μM, i **(c)** 34 μM och i **(d)** 33 μM.



Figur 20: Emissionsspektran för de fyra olika försöken där en RNA-lösning med koncentrationen 40 μM titrerades med DNA. De gröna linjerna visar emissionsprofilen vid startkoncentrationen och de röda linjerna visar emissionsprofilen efter att alla titreringar utförts. De slutliga DNA-koncentrationerna i **(a)**, **(b)** och **(c)** var 30 μM och i **(d)** 20 μM.



Figur 21: Emissionsspektran för de fyra olika försöken där en DNA-lösning med koncentrationen 40 μM titrerades med RNA. De gröna linjerna visar emissionsprofilen vid startkoncentrationen och de röda linjerna visar emissionsprofilen efter att alla titreringar utförts. De slutliga RNA-koncentrationen var i **(a)** 7,5 μM, i **(b)** 24 μM, i **(c)** 4 μM och i **(d)** 27 μM.