



Sveučilište u Zagrebu

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Ivona Krošl Knežević

**FLUORESCENTNI MOLEKULARNI SENZORI
TEMELJENI NA PEPTIDU WHW,
TRIARILBORANIMA I KALIKSARENIMA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.



Sveučilište u Zagrebu

FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGY

Ivona Krošl Knežević

**FLUORESCENT MOLECULAR SENSORS BASED
ON PEPTIDE WHW, TRIARYLBORANES AND
CALIXARENES**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2024.



Sveučilište u Zagrebu

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

IVONA KROŠL KNEŽEVIĆ

**FLUORESCENTNI MOLEKULARNI SENZORI
TEMELJENI NA PEPTIDU WHW,
TRIARILBORANIMA I KALIKSARENIMA**

DOKTORSKI RAD

Mentori:
akademik Ivo Piantanida
prof. dr. sc. Tatjana Gazivoda Kraljević

Zagreb, 2024.



University of Zagreb
FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGY

Ivona Krošl Knežević

**FLUORESCENT MOLECULAR SENSORS BASED
ON PEPTIDE WHW, TRIARYLBORANES AND
CALIXARENES**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:
academician Ivo Piantanida
prof. dr. sc. Tatjana Gazivoda Kraljević

Zagreb, 2024.

Bibliografska stranica

- ❖ Bibliografski podaci: (ovi podaci navode se na donjoj polovici stranice jedan ispod drugoga)
 - ❖ UDK: (univerzalna decimalna klasifikacija – saznaje se u BIC-u)
 - ❖ Znanstveno područje: Prirodne znanosti
 - ❖ Znanstveno polje: Kemija
 - ❖ Znanstvena grana: Organska kemija
 - ❖ Institucija: Institut Ruđer Bošković, Zavod za organsku kemiju i biokemiju, Laboratorij za biomolekularne interakcije i spektroskopiju
 - ❖ Voditelj rada: akademik Ivo Piantanida i prof. dr. sc. Tatjana Gazivoda Kraljević
 - ❖ Broj stranica:
 - ❖ Broj slika:
 - ❖ Broj tablica:
 - ❖ Broj priloga:
 - ❖ Broj literaturnih referenci:
-
- ❖ Datum obrane:
 - ❖ Sastav povjerenstva za obranu:
 - Prof. dr. sc. Silvana Raić-Malić
 - Prof. dr. sc. Irena Škorić
 - Dr. sc. Nikola Basarić
-
- ❖ Rad je pohranjen u:
 - Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb;
 - Knjižnici Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Marulićev trg 20.

Tema rada prihvaćena je na sjednici Fakultetskog vijeća Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, održanoj dana 10. srpnja 2023., te odobrena na sjednici Senata Sveučilišta u Zagrebu 23. siječnja 2024.

Informacije o mentorima

Akademik Ivo Piantanida

Prof. dr. sc. Tatjana Gazivoda Kraljević



Ova doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za bimolekularne interakcije i spektroskopiju, Zavoda za organsku kemiju i biokemiju, Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom akad. Ive Piantanide u sklopu Poslijediplomskog studija kemije na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Višekromoforne probe za prepoznavanje pojedinih struktura DNA, RNA i proteina (BioMultiChromoProbes) (HRZZ-IP-2018-01-5475)



Rad je sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom HRZZ-IP-2018-01-5475 "Višekromoforne probe za prepoznavanje pojedinih struktura DNA, RNA i proteina (BioMultiChromoProbes)" voditelja akad. Ive Piantanide

Zahvale

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. PEPTIDI	3
2.1.1. Kratki i ultrakratki peptidi	3
2.1.2. Sinteza peptida	3
2.1.3. Primjer bolesnih stanja uzrokovanih agregiranjem peptida/proteina: Amiloid-beta ($A\beta$) protein i Alzheimerova bolest	8
2.1.4. Triptofan-histidin-triptofan (WHW) peptid i kompleksiranje bakra	10
2.1.5. Nekovalentne interakcije s DNA/RNA i aminokiseline (triptofan).....	11
2.2. Triarilborani.....	14
2.2.1. Općenito	14
2.2.3. Triarilborani kao fluorescentne probe	15
2.3. Kaliksareni	22
2.3.1. Supramolekulska kemija i makrociklički ligandi	22
2.3.2. Kaliks[n]areni općenito	23
2.3.3. Kaliksareni kao receptori.....	25
2.3.4. Kaliksareni i DNA.....	27
3. EKSPERIMENTALNI DIO	29
3.1. SINTEZA DERIVATA PEPTIDA WHW	29
3.2. Ispitivani analozi bis-triarilborana.....	38
3.3. Ispitivani derivati kaliksarena.....	39
3.4. Spektroskopska karakterizacija i ispitivanje interakcija analoga peptida WHW, analoga bis-triarilborana i kaliksarena.....	41
3.4.1. Priprema otopina	41
3.4.2. Spektrofotometrijska karakterizacija.....	41
3.4.3. Ispitivanje interakcija analoga peptida WHW s Cu^{2+} kationom.....	42
3.4.4. Ispitivanje interakcija s DNA/RNA.....	42
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	46
4.1. Analozi peptida WHW	46
4.1.1. Sinteza analoga peptida WHW.....	46
4.1.2. Spektrofotometrijska karakterizacija analoga peptida WHW	52
4.1.3. Vežanje Cu^{2+} kationa na analoge peptida WHW	59
4.1.4. Interakcije analoga peptida WHW s ds-DNA i ds-RNA u prisutnosti/odsutnosti Cu^{2+} kationa	62
4.1.5. Biološka i biokemijska ispitivanja.....	69
4.2. Analozi bis-triarilborana.....	73

4.2.1. Spektrofotometrijska karakterizacija derivata bis-triarilborana	73
4.2.2. Interakcije bis-triarilborana s ds-DNA i ds-RNA	77
4.3. Analizi kaliksarena	84
4.3.1. Spektrofotometrijska karakterizacija analoga kaliksarena	84
4.3.2. Interakcije kaliksarena s ds-DNA i ds-RNA	89
4.3.3. Interakcije kaliksarena s nukleotidima	95
5. ZAKLJUČAK	100
6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA	103
7. LITERATURNI IZVORI	107

SAŽETAK

FLUORESCENTNI MOLEKULARNI SENZORI TEMELJENI NA PEPTIDU WHW, TRIARILBORANIMA I KALIKSARENIMA

Ivona Krošl Knežević

Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, Zagreb, Hrvatska

Mnoge male organske molekule su nekovalentni fluorescentni senzori za prepoznavanje DNA, RNA ili proteina, od izuzetnog značaja za biomedicinsku dijagnostiku i istraživanja molekularne biologije. U ovom radu istraživali smo interakcije tri različite grupe nekovalentnih fluorescentnih obilježivača pomoću spektroskopije UV/Vis, fluorescencije i cirkularnog dikroizma te temperature denaturacije s DNA, RNA i BSA. Prva grupa su analozi peptida triptofan—histidin—triptofan (WHW), karakterizirani zamjenom histidina s traizolo-alaninom, te su u dva uvedeni razni pireni umjesto jednog triptofana. Ti analozi zadržali su visok afinitet WHW prema Cu^{2+} kationu, ali i značajno viši afinitet prema DNA i RNA te BSA. Pirenski analozi pod UV svjetlom cijepaju DNA, zbog nastanka singletnog kisika. U suradnji s dr. Majhen s Instituta Ruđer Bošković analozi peptida WHW pokazali su slabu toksičnost *in vitro* na stanice zloćudnih tumora i normalne fibroblaste čovjeka, no bitno pojačanu pod UV svjetlom za pirenske analoge.

Druga grupa se bazira na bis-triarilboranima pripremljenim od partnera, za koje smo pokazali da su u stanju i s visokom osjetljivošću u 10 nM koncentracijama detektirati i razlikovati DNA, RNA i BSA, simultano, pomoću fluorescencije i Raman (SERS) metode. Za treću grupu, polikationske kaliksarene i neutralne analoge pripremljene od partnera, dokazali smo da pokazuju fluorescenciju u vodenom mediju; do sad neobjavljeno svojstvo kaliksarena. Dodatno, svi spojevi vežu nukleotide visokim afinitetom, ali s DNA i RNA u interakciju stupaju samo kationski analozi, ukazujući na značaj elektrostatskih interakcija s polianionskom okosnicom DNA/RNA.

Ključne riječi: CD spektroskopija DNA; fluorescentni senzori; kaliksareni; peptid WHW; RNA; triarilborani.

ABSTRACT

FLUORESCENT MOLECULAR SENSORS BASED ON PEPTIDE WHW, TRIARYLBORANE AND CALIXARENE

Ivona Krošl Knežević

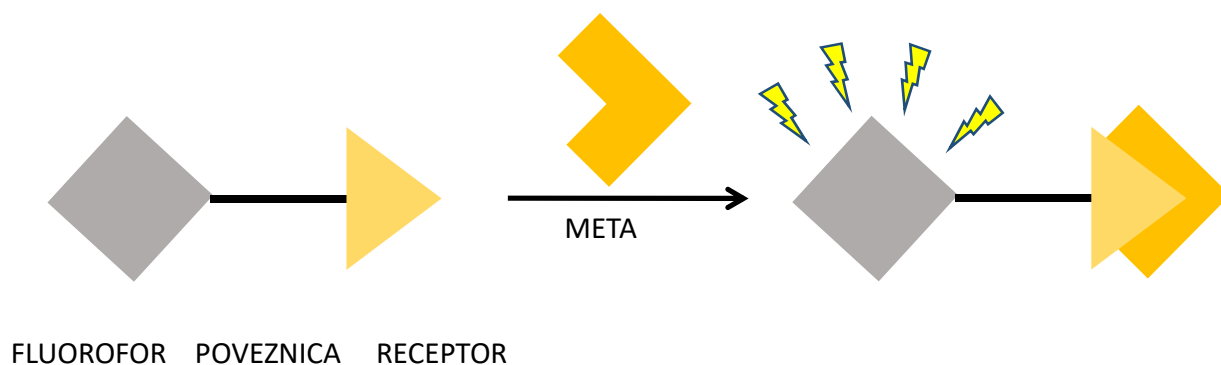
Ruđer Bošković Institute, Bijenička cesta 54, Zagreb, Hrvatska

Many small organic molecules, non-covalent fluorescent sensors for the recognition of DNA, RNA or proteins, are of great importance for biomedical diagnostics and molecular biology research. In this work, we investigated the interactions of three different groups of non-covalent fluorescent markers using UV/Vis spectroscopy, fluorescence and circular dichroism and temperature denaturation with DNA, RNA and BSA. The first group are analogues of the tryptophan-histidine-tryptophan (WHW) peptide, characterized by the replacement of histidine with triazole-alanine, and in two of them, various pyrenes were introduced instead of one tryptophan. These analogues retained a high affinity of WHW towards the Cu^{2+} cation, but also a significantly higher affinity towards DNA, RNA and BSA. Pyrene analogues cleave DNA under UV light, due to the formation of singlet oxygen. In collaboration with Dr. Majhen from the Ruđer Bošković Institute, WHW peptide analogs showed weak toxicity *in vitro* on malignant tumor cells and normal human fibroblasts, which significantly increased for pyrene analogs under UV light. The second group is based on bis-triarylboranes prepared by partners, which we have shown to detect with high sensitivity (10 nM) and differentiate between DNA, RNA and BSA simultaneously, using fluorescence and Raman (SERS) methods. For the third group, polycationic calixarenes and neutral analogs prepared by partners, we showed that they exhibit fluorescence in aqueous media; so far unknown property of calixarene. Additionally, all compounds bind nucleotides with high affinity, but only cationic analogs interact with DNA and RNA, stressing the importance of electrostatic interactions with the polyanionic DNA backbone.

Keywords: calixarene; CD spectroscopy; DNA; fluorescent sensors; peptide WHW; RNA, triarylboranes.

1. UVOD

Kemosenzori su molekularni receptori koji mogu osjetiti i precizno komunicirati s analitom i generirati odgovor kao signal koji se može detektirati.¹ Prvi fluorescentni kemosenzor spominje se još davne 1867. godine, kada je F. Goppelsröder smislio metodu za određivanje aluminijevih iona (Al^{3+}) pri nastajanju fluorescentnog morinskog kelata.² Od 1980-ih kreće ogroman rast razvoja i proizvodnje kemosenzora, zahvaljujući pionirima modernih kemosenzora, de Silvi i Czarniku.³ Od tada njihov razvoj i primjena samo raste. Današnja važnost senzora je upravo u njihovoj upotrebi u nizu različitih područja, u prirodnim, biomedicinskim i tehničkim znanostima.² Zbog svojih svojstava kao što su odlična osjetljivost, niska cijena, mogućnost modulacije i brzog odgovora, najpopularniji su upravo fluorescentni molekularni senzori. Struktura fluorescentnog kemosenzora sastoji se od fluorofora (signalna podjedinica), receptora i poveznice.⁴ Sama poveznica nije nužna. Ti sintetizirani sustavi dizajniraju se tako da se vežu za metu (analit), a signal se očituje u promjeni emisijskog profila fluorofora.⁵



Slika 1. Prikaz strukture fluorescentnog molekularnog senzora

S obzirom na brzi napredak tehnologije DNA proba, razvijaju se razni fluorescentni biosenzori koji ciljaju nukleinske kiseline ili proteine.⁶ DNA probe su uglavnom sintetske DNA ili RNA molekule koje sadrže signalnu skupinu koja je fluorofor. Zbog svoje široke primjene koja uključuje i prepoznavanje i vizualizaciju DNA i RNA u genomskim analizama, te detekciju analita nenukleinske kiseline (metali, proteini, male molekule), u posljednjih nekoliko godina područje se brzo razvija. Za prepoznavanje se upotrebljavaju vrlo različite molekularne strukture za prepoznavanje meta, a uvođenjem fluorescentnih grupa osigurava se dojavni signal.⁷ Mnogi

lijekovi i antibiotici duguju svoju biološku aktivnost nekovalentnim interakcijama s DNA.⁸ Njihova aktivnost iskazuje se prema raznim vrstama tumora, bakterijskih infekcija, te virusnih i parazitskih bolesti, kao npr. malarije. Male molekule koje sudjeluju u reakcijama s DNA mogu sudjelovati u kovalentnim i nekovalentnim interakcijama.

Kratki peptidi sadrže manje od dvadeset aminokiselina, a u zadnje vrijeme privlače pažnju kao novi i vrlo uspješni terapijski agensi, sa smanjenim nuspojavama.⁹ Jedan od zanimljivijih motiva je i WHW-tripeptid, koji je pronađen kao dio amiloid-beta ($A\beta$) peptida, koji se povezuje i s Alzheimerovom bolesti,¹⁰ koji tvori stabilne komplekse s prijelaznim metalima poput bakra.¹¹ S obzirom da je poznato da bakar ima sposobnost oksidativnog cijepanja DNA/RNA zbog svojeg oksidacijsko-redukcijskog potencijala, otvara se i novo područje interesa za novim probama koje kompleksiraju bakar (II) i potom uzrokuju oksidativno cijepanje DNA/RNA.¹²

Cilj ovog rada je bio razviti nove molekularne sustave za detekciju i prepoznavanje različitih DNA, RNA i/ili proteina (serum albumina, BSA), uglavnom se oslanjajući na fluorescenciju kao metodu detekcije, ali i neke novije metode, poput Raman(SERS) spektrofotometrije ili CD spektrofotometrije.

Prema tom cilju išli smo kroz tri smjera:

a) razvojem novih analoga WHW peptida u kojima se histidinski heteroaromat zamjenjuje triazolom, uvedenim ortogonalnom klik reakcijom. Novi analozi bi pritom trebali zadržati sposobnost kompleksiranja bakra. Također, jedan od fluorofora (triptofan) u WHW peptidu smo zamijenili s različitim pirenima. Piren je izabran zbog osjetljivosti fluorescencijske emisije na mikrokruženje¹³, a također je poznat kao proba za DNA/RNA i proteine^{14,15} te kao teranostički agens¹⁶.

b) studijem *bis*-triarilboranskih polikationskih sustava (sintetiziranih u grupi prof. T. B. Mardera s Kemijskog i farmaceutskog fakulteta Sveučilišta u Würzburgu), karakteriziranih kromoforima izuzetno jake fluorescencije, ali i vrlo jakog Raman (SERS) signala, koji su novorazvijeni analozi sustava za koje smo ranije pokazali izuzetno svojstvo razlikovanja DNA i proteina (BSA).¹⁷

c) Kationskih derivata kaliksarena i njihovih neutralnih analoga (sintetiziranih u grupi prof. O. Reinaud s Universite de Paris), koji su monomerni analozi sustava za koje smo ranije pokazali

izuzetno svojstvo vezanja na ds-DNA¹⁸, no sada sa sustavnijom studijom utjecaja kationskog naboja, vezanja bakrovih kationa i interakcija i sa nukleotidima, a ne samo s ds-DNA i ds-RNA.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. PEPTIDI

2.1.1. Kratki i ultrakratki peptidi

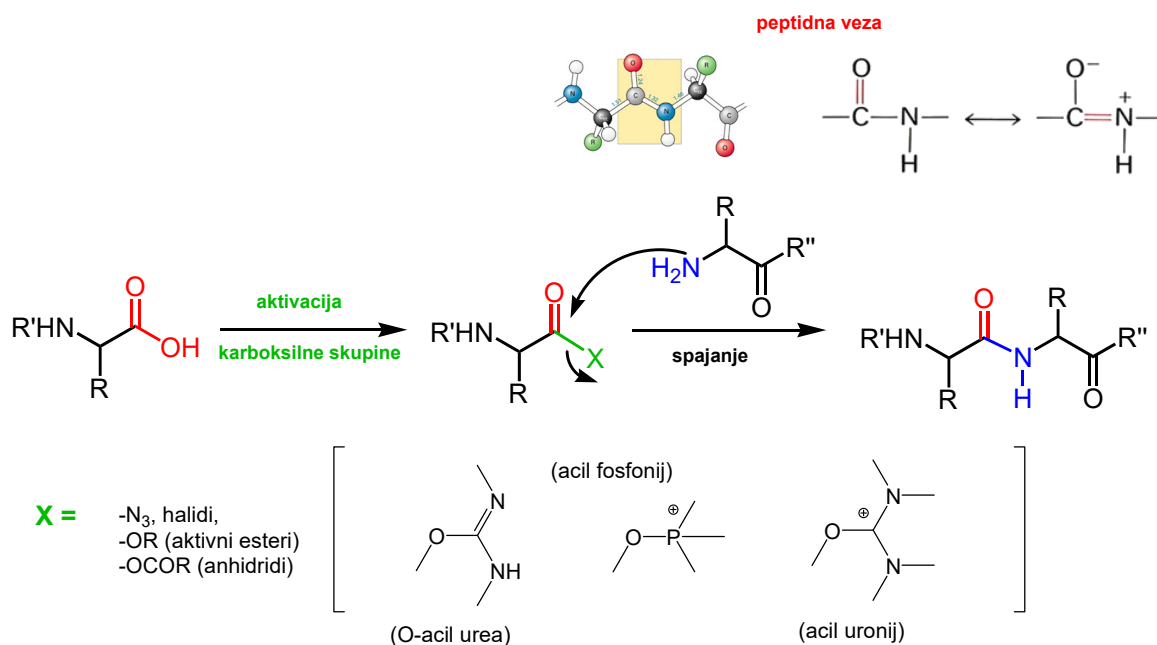
U posljednje vrijeme kratki peptidi zbog svojih različitih svojstava pojavljuju se sve više u raznim područjima; od kemije, biologije i medicine.¹⁹ Razlog je to što su postali novi i vrlo uspješni terapijski agensi, sa smanjenim nuspojavama, a uz to su i ekonomični te ih je lako proizvesti i okarakterizirati.²⁰ Mnogi kratki peptidi uključeni su u razne biološki važne procese, a zbog specifičnih interakcija s metama pokazuju i visoku selektivnost. Unatoč raznim prednostima, imaju i nedostataka, a neki od njih su nestabilnost *in vivo*, niska oralna bioraspoloživost, kratko vrijeme poluživota, itd. Lijekovi temeljeni na peptidima koriste se za liječenje tumora, metaboličkih poremećaja (pretilost, dijabetes i osteoporoza) te drugih medicinskih stanja (kardiovaskularne bolesti, alergije, imunološki poremećaji).²¹

Značenje kratkih peptida teže je odrediti, ali kratki peptidi imaju karakteristike oligomera, a ne polimera (< 20 aminokiselina).¹⁹ Po IUPAC-ovoj definiciji oligomeri sadrže od 10–20 aminokiselina, a polipeptidi više od 20. Ultrakratki peptidi sadrže 2–7 aminokiselina. Zanimljivo je i da ultrakratki peptidi imaju mogućnost samo-organizacije (engl. *self-assembly*), gdje formiraju agregate na bazi nekovalentnih interakcija.²⁰ Sam proces korišten je u razvoju novih biomaterijala, a odvija se kod različitih biomolekula; lipida, proteina i aminokiselina u živim organizmima te u raznim biološkim procesima kao što je i stvaranje amiloidnog β plaka. Ultrakratki peptidi nemaju nedostatke vezane uz veličinu molekule, a koje njihovi duži analozi imaju. Njihova sinteza je povoljnija, biokompatibilni su *in vitro* i *in vivo*, bolje biorazgradivosti, poboljšane oralne bioraspoloživosti, itd.^{19,22}

2.1.2. Sinteza peptida

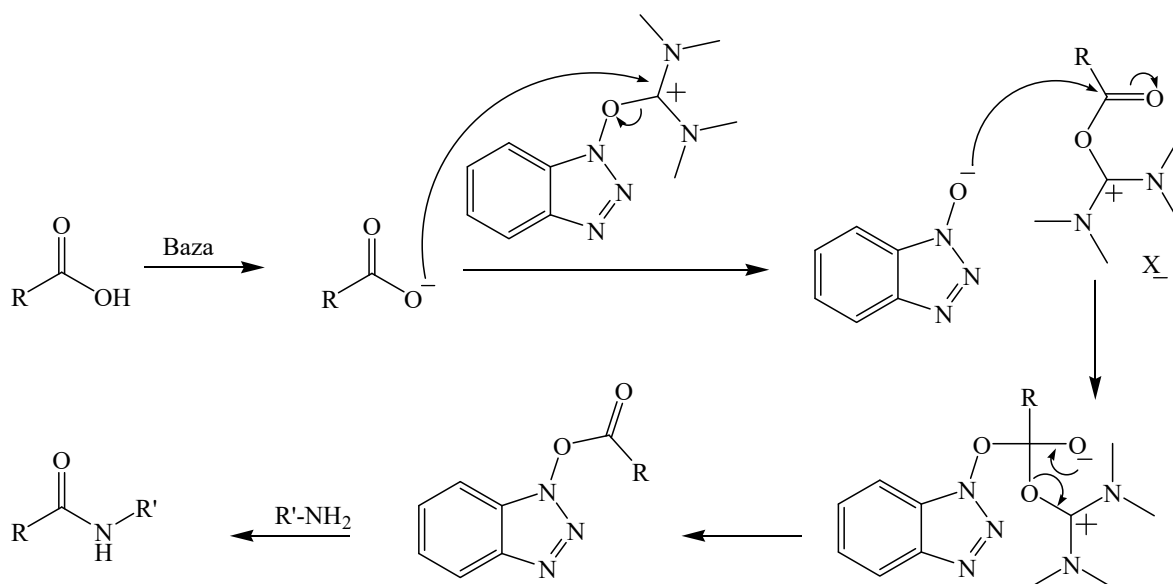
Prva sinteza peptida provedena je još davne 1901. godine od strane Fischera i Fournéaua.²³ 1953. godine de Vigneaud je uspješno proveo sintezu oksitocina (peptidnog hormona) i za svoj rad dobio je i Nobelovu nagradu.²⁴ Od tada je započela i upotreba peptida kao farmaceutika, a oksitocin se i danas koristi za induciranje trudova tijekom trudnoće. Klasična sinteza peptida uključuje

reakciju kondenzacije karboksilne skupine jedne aminokiseline s amino skupinom druge aminokiseline (shema 1.). Aminokiselina koja ulazi u reakciju sa svojom karboksilnom skupinom mora imati zaštićenu amino skupinu, dok druga ima slobodnu amino skupinu, a zaštićenu karboksilnu skupinu. U protivnom nastale bi smjese četiri produkta. Isto tako zaštićuju se i polarne skupine u bočnim lancima. Najčešće korištena dva načina za provođenje sinteze su sinteza u otopini ili sinteza u čvrstom stanju (engl. *solid-phase synthesis*, SPPS).²³ Svaka sinteza peptida uključuje formiranje peptidne veze i/ili deprotekciju zaštitne skupine, ali i mogućnost modifikacije glavnog i bočnog lanca.¹⁹ Danas se sinteza u otopini provodi samo za kraće peptide (4–5 aminokiseline). Sinteza u čvrstom stanju počela se provoditi od 1963. godine kada ju uvodi Merrifield.²⁴ Kod sinteze u čvrstom stanju postoji dodatan korak, odnosno kovalentno povezivanje peptida i netopljivog polimernog nosača.²³ Reakcije se dovode do kraja korištenjem topljivih reagensa u suvišku, koji se nakon završetka reakcije jednostavno uklanjaju ispiranjem ili filtracijom. Merrifield je predložio da korišteni nosač bude temeljen na polistirenu. Neke od prednosti SPPS u odnosu na sintezu u otopini su minimalno nastajanje nusprodukata, automatizirana elongacijska reakcija te neovisnost o netopljivosti. Kod sinteze u otopini prednost je što se može jednostavno izolirati konačni produkt.



Shema 1. Sinteza peptida uz korištenje zaštitnih skupina na terminalnoj amino skupini jedne aminokiseline i karboksilnoj skupini druge aminokiseline

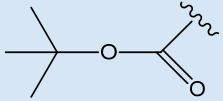
Prije reakcije spajanja bitno je aktivirati karboksilnu skupinu.²⁵ Problem koji može nastati je potencijalan gubitak kiralne čistoće (racemizacija) aminokiseline zbog ionizacije α -vodika i stvaranja intermedijera oksazolona.²⁶ Kako bi se spriječila racemizacija koriste se odgovarajuće *N*-zaštitne skupine i reagensi za spajanje. Najčešće korišteni reagensi za spajanje su karbodiimidi i soli 1-hidroksibenzotriazola – HOBt i njegovi derivati.¹⁹ Dodavanje triazola (HOBt) i njegovih derivata (1-hidroksi-7-aza-benzotriazol – HOAt) može spriječiti racemizaciju prilikom aktivacije karbodiimida. Među češće korištenim reagensima spadaju i HBTU, TBTU, PyBOP te 6-ClHOBt (HCTU).²⁷ Oni smanjuju proces racemizacije i djeluju kao reagensi za spajanje zahvaljujući svojim iminskim, fosfonijevim ili uronijevim solima ne-nukleofilnog aniona (tetrafluoroborat ili heksafluorofosfat).¹⁹ Prije početka aktivacije karboksilne skupine, bitno je –OH skupinu kiseline pretvoriti u dobro odlazeću skupinu uz pomoć baze.²⁸ Mehanizam aktivacije karboksilne skupine s HBTU reagensom (shema 2) počinje stvaranjem HOBt estera, gdje karboksilna skupina kiseline napada imidni karbonilni ugljik HBTU-a. Nakon toga, anionski benzotriazol N-oksid napada karboksilnu kiselinu, stvarajući nusprodukt tetrametil ureu i aktivirani ester. Aminoliza pomakne benzotriazol N-oksid kako bi se formirao željeni amid.

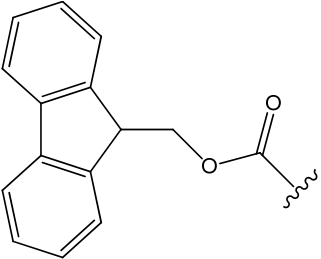
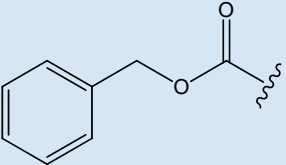


Shema 2. Primjer aktivacije karboksilne skupine aminokiseline s HBTU reagensom i stvaranje peptidne veze.

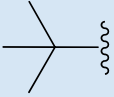
Zaštitne skupine koje štite amino skupinu razvijene su kako bi pojednostavile sintezu peptida i spriječile racemizaciju. U sintezi peptida bitno je trajno zaštititi bočni lanac aminokiselina, ali bitne su i 'privremene' zaštite α -amino skupine, kako ne bi došlo do polimerizacije aminokiseline kada je aktivirana. S obzirom da se postupak uklanjanja zaštitnih skupina ponavlja više puta tijekom sinteze peptida, uvjeti reakcije trebaju biti umjereni, kako ne bi utjecali na ostale zaštitne skupine.²⁹ Zaštitne skupine trebale bi biti topljive u najčešće korištenim otapalima, spriječiti epimerizaciju (prelazak jednog epimera u drugi) te bi njihovo uklanjanje trebalo biti jednostavno i brzo, s lako uklonjivim nusproduktima. Najčešće α -amino zaštitne skupine za sintezu u čvrstom stanju su 9-fluorenilmetoksikarbonil (Fmoc) i *tert*-butiloksikarbonil (Boc) skupine (tablica 1). Kod sinteze u otopini koriste se osim navedenih zaštitnih skupina i benziloksikarbonil (Z), 2-nitrofenil-sulfenil (Nps) te [2-(4-(bifenil)izopropoksikarbonil)] (Bpoc) u kombinaciji sa zaštitom bočnog lanca s *t*Bu- ili Bn- skupinama. Boc zaštitna skupina uklanja se u kiselim uvjetima, najčešće uz 25-50 % TFA u diklormetanu, ali može se ukloniti i s 1 M trimetilsiliklorid (TMS-Cl) fenolom u diklormetanu, 4 M HCl u dioksanu i 2 M MeSO₃ u dioksanu. Fmoc zaštitna skupina uklanja se u bazičnim uvjetima (uglavnom sekundarni amini), najčešće koristeći 20 % piperidin u DMF-u, 1-5 % DBU u DMF-u, morfolin – DMF (1:1), itd. Najčešće korištene zaštitne skupine za α -karboksilnu skupinu su *tert*-butil (*t*Bu), benzil (Bz), 9-fluorenilmetil (Fm), metiloksikarbonil (COOMe) te etiloksikarbonil (COOEt) (tablica 2). Zaštitna skupina *tert*-butil (*t*Bu) uklanja se uz pomoć 90 % TFA u diklormetanu i za sintezu na čvrstom nosaču i za sintezu u otopini, dok se zaštitna skupina 9-fluorenilmetil (Fm) može ukloniti uz 20 % piperidin i DMF-u.

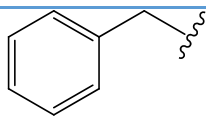
Tablica 1. Primjeri najčešće korištenih zaštitnih skupina za α -amino skupinu

Naziv i struktura	Mjesto zaštite	Način uvođenja	Mogući uvjeti uklanjanja
<i>tert</i>-Butiloksikarbonil (Boc) 	α -amino skupina	Boc ₂ O, Na- HCO ₃ , dioksan, H ₂ O	1) 25–50 % TFA- DCM 2) 4 M HCl u dioksanu 3) 2 M MeSO ₃ H u dioksanu

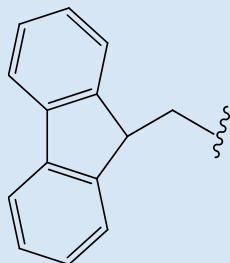
<p>9-Fluorenilmetoksikarbonil (Fmoc)</p> 	<p>α-amino skupina</p>	<p>Fmoc-Cl, NaHCO₃, dioksan, H₂O</p>	<p>1) NH₃ (l) (10 h) - otopina 2) Morfolin ili piperidin u organskim otapalima (nekoliko minuta) – čvrsti nosač 3) 10 % DEA, DMA (2 h)</p>
<p>Benziloksikarbonil (Z)</p> 	<p>α-amino skupina</p>	<p>Cbz-Cl, NaHCO₃, dioksan, H₂O</p>	<p>1) H₂ cat 2) Jake kiseline (HBr u AcOH, TFA pri visokim temperaturama, TFA-tioanizol, tekući HF) 3) BBr₃</p>

Tablica 2. Primjeri najčešće korištenih zaštitnih skupina za α -karboksilnu skupinu

Naziv i struktura	Mjesto zaštite	Način uvođenja	Mogući uvjeti uklanjanja
<p>tert-Butil (tBu)</p> 	<p>α-karboksilna skupina</p>	<p>t-BuOH, EDC • HCl, DMAP, DCM</p>	<p>1) 90 % TFA /DCM – čvrsti nosač i otopina 2) 4 M HCl / dioksan – otopina</p>
<p>Benzil (Bn)</p>	<p>α-karboksilna skupina</p>	<p>O-benzil-N,N'-dizopropilizourea, THF</p>	<p>1) Pd-C / H₂ 2) HF</p>



9-Fluorenilmetil (Fm)



α -karboksilna skupina

FmOH, EDC • HCl, DMAP, DCM

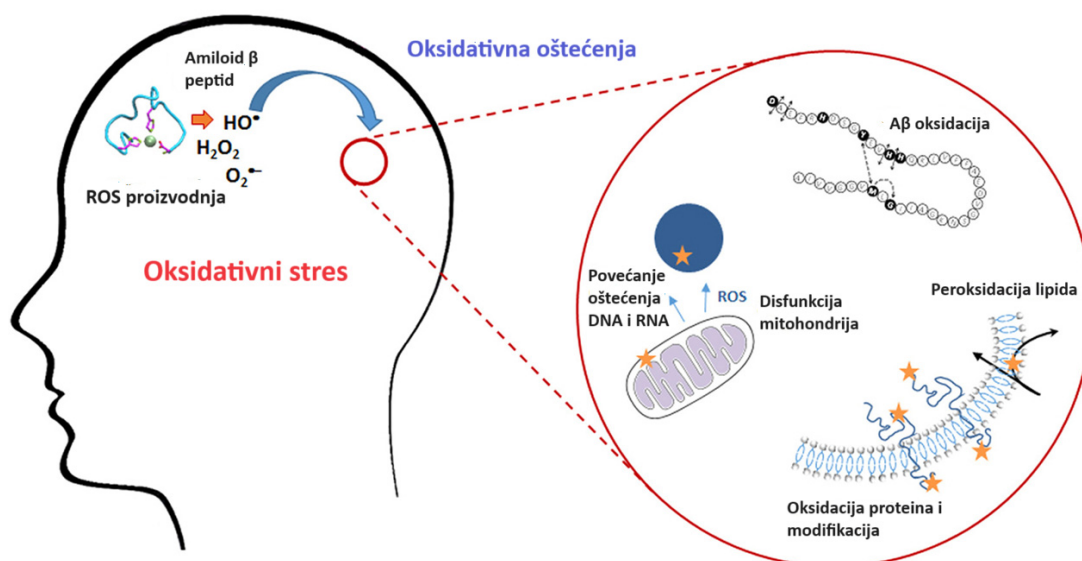
- 1) 20 % piperidin /DMF
- 2) Pd-C / H₂ - otopina

2.1.3. Primjer bolesnih stanja uzrokovanih agregiranjem peptida/proteina: Amiloid-beta (A β) protein i Alzheimerova bolest

Alzheimerova bolest je progresivni neurodegenerativni poremećaj i jedan od najčešćih uzroka demencije kod starijih, a njezina etiologija može se povezati s oksidativnim stresom.^{30,31} Bolest karakterizira amnezija, promjene u ponašanju te smanjene izvršne funkcije kod starijih ljudi. Iako se rizik za oboljenje povećava s godinama, ostali rizični faktori uključuju dijabetes, genetičku predispoziciju, hipertenziju, ozljede glave, hiperlipidemiju te konzumaciju alkohola. Alzheimerovu bolest karakterizira abnormalno nakupljanje amiloidnog β peptidnog plaka u mozgu i intraneuronsko nakupljanje neurofibrilarnih čvorova (engl. *neurofibrillary tangles*, NFTs) hiperfosforiliranog τ proteina, što također pridosnosi disfunkciji sinapsi i degeneraciji aksona. A β peptid i τ protein i dalje su glavne mete za razvoj lijekova za liječenje bolesti. Nakupljanje amiloidnog β -peptida pokreću reaktivne kisikove čestice (engl. *reactive oxygen species*, ROS), na način da povećana proizvodnja ROS-a pokreće obradu toksičnog amiloidnog β prekursorskog proteina (engl. *amyloid β precursor protein*, APP) koji potom pokreće stvaranje A β proteina (slika 2).³²

Reaktivne kisikove čestice imaju važne uloge u raznim staničnim i signalnim putevima pri fiziološkim koncentracijama (npr. regulacija staničnog ciklusa), ali ako dođe do disbalansa redoks stanja, može doći do njihovog prevelikog nakupljanja, koji potom uzrokuju oksidativni stres.³³ Tijekom normalnog metabolizma dolazi do proizvodnje superoksidnog kisikovog radikala (O₂⁻) i neradikalnog oksidansa vodikovog peroksida (H₂O₂) i hipoklorne kiseline. Problem je kada dođe

do prevelikog stvaranja $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 koji onda mogu uzrokovati oštećenje tkiva i nastanak vrlo reaktivnog hidroksi radikala (OH^{\cdot}) i drugih oksidansa. Pogotovo je ovdje važna uloga prisutnosti katalitičkih količina bakrovih i željezovih iona, čija neravnoteža u metabolizmu može imati značajne negativne posljedice u agregiranju peptida/proteina. S druge strane ti isti ioni su prisutni u katalitičkom centru antioksidativnih enzima, kao bakar u SOD1 (superoksid dismutaza) ili željezo u katalazi, gdje uništavaju superoksidni anion ili vodikov peroksid.³⁴ Iz tog razloga je važna koordinacijska kemija, jer ovisno o koordinaciji željezo i bakar mogu biti pro-oksidansi ili antioksidansi.



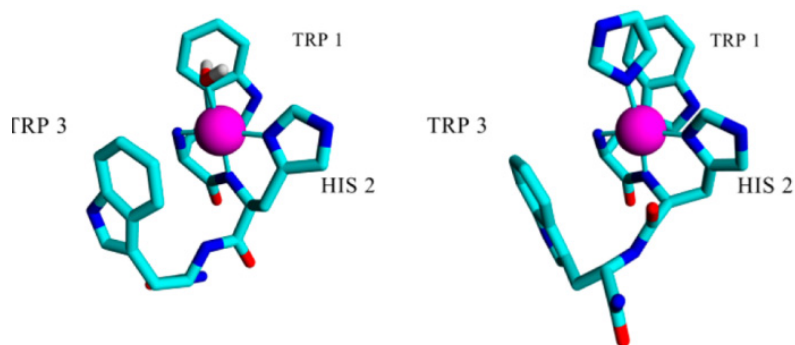
Slika 2. Povezanost oksidativnog stresa i A β proteina u Alzheimerovoj bolesti (slika preuzeta i modificirana).³⁴

Metabolit A β -proteina odgovoran za agregiranje čine 38 do 43 aminokiselinska ostatka slijeda DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT. Nastaje nakon enzimskog cijepanja β - i γ -sekretaze APPa, koji prolazi puteve proteolitičkog cijepanja i daju A β ₁₋₄₀ i A β ₁₋₄₂ peptide.³⁵ A β ₄₋₄₂ je najzastupljeniji od ovih peptida, a A β ₅₋₄₂ je otkriven upravo u A β peptidnom plaku osoba oboljelih od Alzheimerove bolesti.³⁶ Podrijetlo A β _{5-x} vrsti ($x = 38, 40, 42$) nije poznato, a zanimljivi su sa strane koordinacijske kemije zbog prisutnosti Arg-His sekvence koja veže metale na svom N-kraju i ima sposobnost stvaranja trikoordiniranog kelatnog sustava s tri dušika (3N). A β _{5-x} peptidi sadrže histidin na položaju dva (His^2) i zbog takvog rasporeda stvara

se specifično vezno mjesto za bakrov kation (Cu^{2+}), koje se razlikuje od dinamičkog sustava mikrokelatnih $\text{A}\beta_{1-x}$ peptida i krutih kelatnih sustava $\text{A}\beta_{4-x}$ peptida.

2.1.4. Triptofan-histidin-triptofan (WHW) peptid i kompleksiranje bakra

Iz gore navedenog primjera nas je u sklopu ovog doktorata zaintrigirala uloga bakrovog kationa (Cu^{2+}) u kompleksiranju peptida i kontroli njihovih bioloških (i patoloških) funkcija. Posebno je privukla pažnju uloga histidina: ukoliko je na srednjoj poziciji (His^2) u recimo tripeptidnim sekvencama, takav peptid je vrlo često vrlo efikasan kelator u biorelevantnim uvjetima za metalne ione kao što su bakar (II), nikal (II) ili cink (II).³⁷ Poznato je za His^2 peptide da su tri koordinativna vezna mjesta bakra (II) zauzeta imidazolom (Im), aminom i amidnim atomima dušika peptidne molekule (3N koordinacija), a četvrto koordinativno vezno mjesto slobodno je za vanjske ligande, što im omogućuje formiranje ternarnih kompleksa (slika 3). Najpoznatiji predstavnik His^2 peptida je Gly-His-Lys (GHK), ljudski faktor zacijeljenja koji veže bakar (II) i važan je u njegovoj biološkoj aktivnosti. Osim GHK, slijed Trp-His-Trp ($\text{W}^1\text{H}^2\text{W}^3$) također veže bakar (II) s K_d vrijednošću od 0,18 pM pri $\text{pH} = 7,4$. Slijed $\text{W}^1\text{H}^2\text{W}^3$ može se pronaći u α -faktor-1 (WHWLQLKPGQPMY), peptidnom feromonu kvasca *Saccharomyces cerevisiae* i može se pretpostaviti da su α -faktor-1 i ostali peptidi $\text{X}^1\text{H}^2\text{X}^3$ tipa nositelji bakra (II) u biološkim sustavima. Razlog snažnog afiniteta $\text{W}^1\text{H}^2\text{W}^3$ ($\text{X}^1\text{H}^2\text{X}^3$) slijeda prema bakru (II) je relativno niska $\text{p}K_a$ vrijednost imidazolnog dušika (N_{im}) histidinskog bočnog lanca ($\text{p}K_a \sim 6,0$).³⁸ Kada su prisutni Trp, Phe i/ili Tyr treba uzeti u obzir utjecaj bočnih lanaca na stabilnost kompleksa, zbog prisutnosti aromatskih prstenova te može doći do elektronskih interakcija (kation- π interakcije) ili do aromatskog slaganja. Sam proces kompleksiranja Cu (II) je i pH ovisan, odnosno povećanjem pH povećava se i afinitet vezanja.³⁹ Kako bi došlo do kompleksiranja, metalni ion mora zamijeniti vodikove ione peptida.

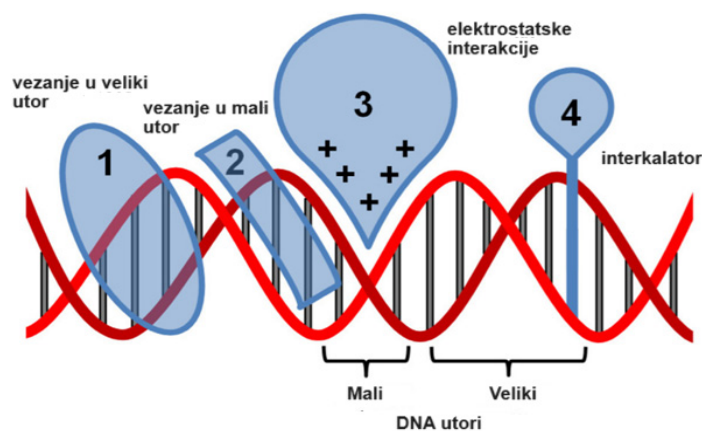


Slika 3. Strukture Cu (II) kompleksa dobivenih molekulskim modeliranjem. (Lijevo) Binarni kompleks s vodom koja zauzima četvrto koordinacijsko mjesto. (Desno) Ternarni kompleks s Im. Cu (II) je prikazan pomoću ružičaste kugle, a atomi dušika i kisika su prikazani u tamnoplavoj i crvenoj boji, redom (slika preuzeta i modificirana).³⁷

Metali su prisutni u više od trećine proteina koji se pojavljuju u prirodi i imaju važnu biološku ulogu.⁴⁰ Važnost kompleksiranja metala očituje se u strukturalnoj i funkcijskoj ulozi metala. Strukturna uloga može se objasniti obzirom na stvaranje veza s proteinima, kojima održavaju terciarnu strukturu proteina i stvaranjem kvaterne strukture oligomera, vežući se s više polipeptidnih lanaca. Metalni kationi najčešće dolaze u interakciju s donorskim atomima funkcionalnih skupina bočnih lanaca aminokiselina, sumporom cisteina (Cys), dušikom imidazola na histidinu (His), kisikom treonina ili serina (Thr ili Ser) te karboksilatnim kisikom asparaginske ili glutaminske kiseline. Kompleksiranje peptida s Cu (II) uzrokuje i poboljšava α -heliksnu konformaciju.⁴¹ Bakar (II) zbog svog oksidacijsko-redukcijskog potencijala ima ulogu prijenosnika elektrona u plastocijaninima,⁴² superoksidnoj dismutazi,⁴³ mitohondrijskoj citokrom c oksidazi⁴⁴ i drugim bakrenim enzimima⁴⁵.

2.1.5. Nekovalentne interakcije s DNA/RNA i aminokiseline (triptofan)

Interakcije malih organskih molekula s nukleinskim kiselinama mogu biti a) nepovratne, na primjer stvaranje kovalentnih veza male molekule i polinukleotida ili cijepanja polinukleotidnih lanaca i b) ravnotežne, bazirane na nekovalentnim interakcijama.⁴⁶ Primjena DNA nekovalentnih proba je vrlo široka, te njihova optimizacija zahtjeva dobro poznavanje mehanizama načina vezanja.⁹



Slika 4. Različiti načini nekovalentnih interakcija malih organskih molekula s DNA (slika preuzeta i prilagođena)⁹

Postoji nekoliko načina nekovalentnog vezanja malih molekula na ds-DNA (slika 4). Kod interkalacije (slika 4-4) dolazi do umetanja malih organskih molekula – interkalatora između parova baza. Tipični interkalatori su planarni i aromatski, te svojim umetanjem stabiliziraju dvostruku uzvojniju DNA, zbog značajnih π - π aromatskih interakcija slaganja između parova baza. Da bi došlo do umetanja DNA uzvojnica se treba odmotati do 50 % što rezultira deformacijom sekundarne strukture native ds-DNA. Poznati predstavnici interkalatora su proflavin, etidij bromid, daunorubicin, itd.⁸ Kod vezanja u utore, male organske molekule imaju tendenciju vezanja u mali utor ds-DNA (slika 4-2), odnosno veliki utor RNA, što je definirano dimenzijama samog utora i male molekule.¹² Mali utor DNA je uzak i dubok i time olakšava vezanje hidrofobnih molekula, za razliku od velikog utora DNA koji je prilično širok, te stoga većinom veliki proteini favoriziraju vezanje u veliki utor DNA. Nadalje, male organske molekule favoriziraju vezanje u veliki utor ds-RNA, jer je uzak i dubok, za razliku od širokog i plitkog velikog utora RNA. Molekule koje se vežu u mali utor DNA uglavnom imaju afinitet prema području bogatom AT parovima baza te ne uzrokuju značajne deformacije DNA dvostruke uzvojnice.^{8,47} Ostale karakteristike malih molekula koje se vežu u utore su pozitivan naboj, struktura molekule u obliku polumjeseca i fleksibilno povezani aromatski prsteni. Neki tipični predstavnici su Hoechst 33258, DAPI, pentamidin, netropsin, itd. Male molekule s više pozitivnih naboja zahvaljujući negativno nabijenoj fosfatnoj okosnici DNA se mogu vezati i elektrostatski (slika 4-3).⁴⁸ Primjer spoja koji se veže na DNA dominantno uz pomoć elektrostatskih sila je spermin. Ostale bitne sile koje također utječu na načine vezanja su Van der Waalsove sile⁸ te hidrofobne sile,⁴⁹ kod kojih dolazi do energijskog doprinosa pri napuštanju vodenog medija od strane male organske molekule u manje polarni utor biomakromolekule, i Londonova disperzijska međudjelovanja.

U istraživanjima interakcija malih molekula s DAN i RNA često se koristi nekoliko uobičajenih, komercijalno dostupnih polinukleotida s tipičnim strukturnim karakteristikama prikazanim u tablici 3.

Tablica 3. Dimenzije malog i velikog utora [Å] za odabrane nukleinske kiseline^{50,51}.

Struktura	Širina utora [Å]		Dubina utora [Å]	
	veliki	mali	veliki	mali
^[a] poli rA – poli rU (AU-RNA)	3.8	10.9	13.5	2.8
^[b] ct-DNA (48% GC-parova)	11.4	3.3	7.5	7.9
^[b] poli dAdT – poli dAdT(AT-DNA)	11.2	6.3	8.5	7.5
^[c] poli dGdC – poli dGdC	13.5	9.5	10.0	7.2

^[a] A - heliks

^[b] B - heliks

^[c] B - heliks s malim utomom koji ima amino skupine gvanina kao steričku smetnju

Niz proteina i peptida bazira svoje biološke uloge na nekovalentnim interakcijama s ds-DNA ili ds-RNA. Neke od aminokiselina su posebno odgovorne za vezne interakcije: na primjer kationski lizin ili arginin za elektrostatske interakcije s polianionskom okosnicom DNA/RNA. Jedna od aminokiselina s fluoroforom, triptofan (trp, $\phi_F = 0,03 - 0,06$), tvori nekovalentne interakcije s DNA bazirane na aromatskim interakcijama slaganja i hidrofobnim interakcijama.⁵² Aromatske kiseline, kao što su triptofan, tirozin (tyr) i fenilalanin (phe) su zaslužne za intrizičnu fluorescenciju proteina.¹³ No, kao dominantan izvor UV apsorpcije u području > 270 nm i emisije u proteinima ističu se indolne skupine triptofanskih ostataka. Trp se često koristi kao signalna skupina (engl. *reporter*) kod konformacijskih promjena proteina zbog visoke osjetljivosti njegove emisije na okruženje. Spektralni pomaci emisije proteina mogu biti rezultat protein-protein asocijacija, vezanja liganada ili odmotavanja proteina.⁵³ U interakcijama s DNA, Trp preferira vezanje za gvanin i citozin.⁵⁴ Veća je vjerojatnost da će se vezati na RNA veznim mjestima što može značiti da je njegova uloga u informiranju proteina o prepoznavanju između nukleinskih kiselina. Poznato je da aromatske aminokiseline, kao što je triptofan, mogu stvarati perokside u prisutnosti singletnog kisika.⁵⁵ Kada je tiazol narančasto (engl. *thiazole orange*, TO), poznata visoko fluorescirajuća boja i senzibilizator singletnog kisika, povezan s peptidom koji sadrži triptofan dolazi do direktnog cijepanja uzvojnice, koje je posljedica formiranja peroksida na aminokiselini. Slijed Trp-Trp od biološke je važnosti kao dipeptid ili kao fragment nekih peptida.⁵⁶ S obzirom da je važno za antitumorske lijekove da prepoznaju DNA te su često alkilirajući agensi,

interkalatori ili se umeću u utore, istraživana je i skupina novih DNA interkalatora. Neki od njih su i β -karbolin-3-karboksiltriptofan benzilni ester i N-triptofanil- β -karbolin-3-karboksilna kiselina benzilnog estera koji sličnom modifikacijom otvaranja prstena tvore Trp-Trp-Obzl te je on njihov farmakofor.

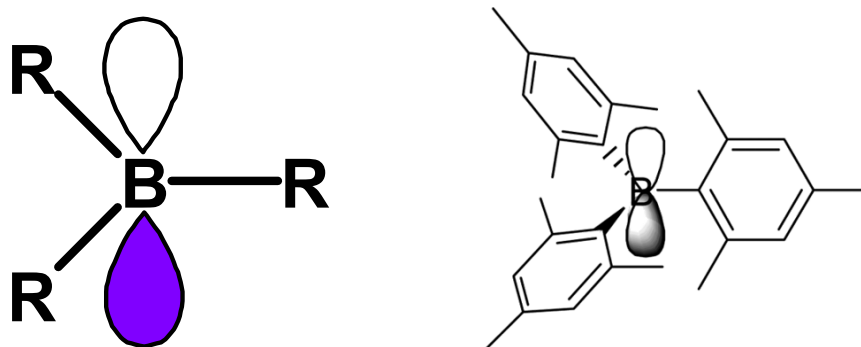
Iz navedenog pod 2.14. i 2.1.5 se posebno razabire interes studije bis-triptofanskog niza sa histidinom u sredini (WHW), koji objedinjuje DNA-aktivne komponente na krajevima i Cu^{2+} vežuću komponentu u sredini, kojom bi bakrov kation po vezanju WHW-Cu kompleksa na ds-DNA/RNA bio u idealnoj poziciji elektrostatske interakcije s DNA/RNA. Takvi binarni (WHW-DNA/RNA) ili ternarni (WHW-Cu-DNA/RNA) sustavi bi mogli biti osjetljivi fluorescentni senzori finih razlika u različitim sljedovima DNA/RNA, uz dodatnu mogućnost bakrom-promoviranog oksidativnog cijepanja DNA/RNA i posljedičnih bioloških utjecaja.

2.2. Triarilborani

2.2.1. Općenito

Triarilborani privukli su veliki interes zbog svojih zanimljivih elektronskih i fotofizičkih svojstava, a posljedično im je i primjena velika, od linearne i nelinearne optike, kao slojevi za emisiju i elektronsku vodljivost, u OLED uređajima i kao luminiscentne probe za anione.⁵⁷ Trikoordinirane organoboronske spojeve karakterizira trigonska planarna geometrija, prazna p_z -orbitala centralnog atoma bora, koji se ponaša kao snažan π elektron akceptor u konjugiranim organskim π sustavima i daje značajan doprinos LUMO materijala.⁵⁸ Problem kod ovih spojeva je što je centralni atom bora zbog svoje trigonalne planarne geometrije i Lewisove kiselosti podložan nukleofilnim napadima, npr. vode, koji kao posljedica imaju cijepanje veze ili nastanak četiri-koordiniranih borovih vrsta.⁵⁹ Takva nestabilnost u vodi je riješena uz pomoć velikih supstituenata koji sterički onemogućavaju nukleofilni napad otapala (vode) na centralni atom bora, a zaštitne grupe koje se često koriste su mesitil (Mes) i 2,4,6-(CF_3) $_3$ C $_6$ H $_2$ (FMes) (slika 5). Ipak, mali anioni kao što su fluoridi i cijanidi mogu se vezati za centralni borov atom. Uvođenje elektron donora kod triarilborana povećava elektronske dipole molekule, što posljedično uzrokuje povećanje intramolekulskog prijenosa naboja apsorpcije i emisije.⁶⁰ Zahvaljujući praznoj p_π -orbitali atoma bora u središtu, trikoordinirani atomi bora mogu stvarati komplekse s Lewisovim bazama, što dovodi do prekida p_π - π konjugacije i vodi do promjena u fotofizičkim svojstvima,

odnosno do promjena u luminiscenciji. Upravo iz tih razloga mogu biti korišteni i kao senzori za detekciju aniona.

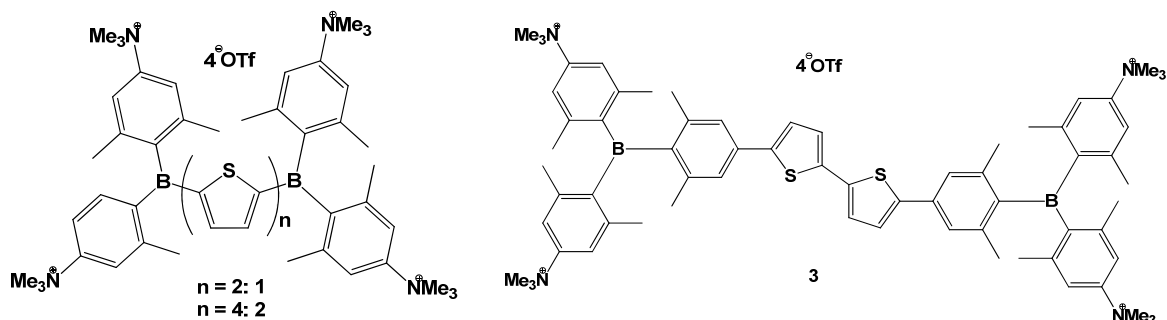


Slika 5. Trikoordinirani bor sa supstituentima R (često Mes ili FMes) LIJEVO; Trimesitilboran DESNO⁶¹

Zbog velike promjene dipolnog momenta pri ekscitaciji triarilborana, kao elektron akceptora, dolazi do hiperpolarizacije prvog i drugog reda što upućuje da su i odlični kromofori, pogodni za dvofotonsku apsorpciju (engl. *two-photon absorption*, TPA), odnosno pogodni za dvofotonsku pobuđenu fluorescenciju (engl. *two-photon excited fluorescence*, TPEF) mikroskopiju živih stanica i tkiva.⁵⁹ Dodatni problem predstavlja njihova topljivost u vodenom mediju, zbog primjene u *in vivo* i *in vitro* pokusima. To su prvi uspjeli riješiti Gabbaï i suradnici, na način da su zamijenili *para*-metilne skupine trimesitilborana s kationskim amonijevim supstituentima.⁶² Na taj način dolazi do povećanja Lewisove kiselosti centralnog bora.

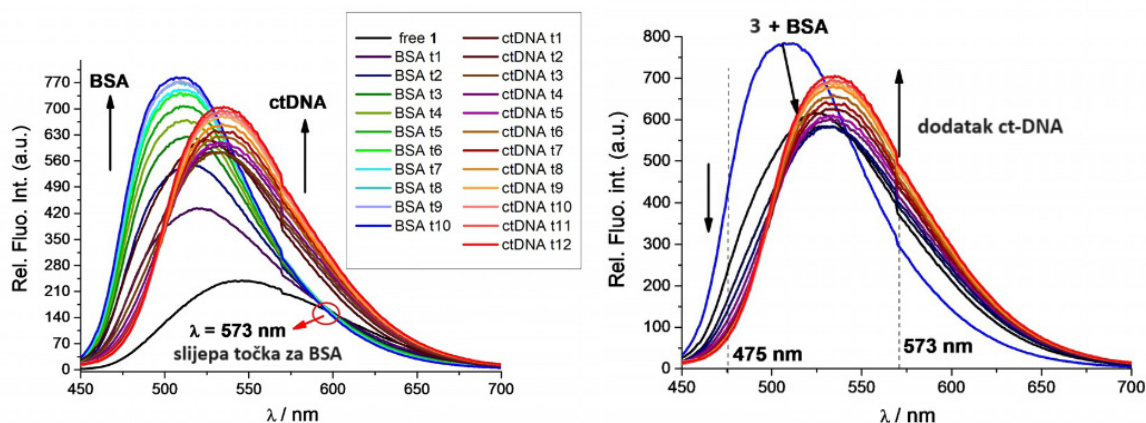
2.2.3. Triarilborani kao fluorescentne probe

Kako bi se triarilborani mogli koristiti kao probe, bitno je da su stabilni i topljivi u vodi. Stabilnost se, kao što je već spomenuto, može postići uz voluminozne zaštitne skupine oko centralnog bora, a topljivost u vodi uvođenjem pozitivnih naboja. Tako se modifikacijom π mosta s obzirom na broj tiofenskih poveznica i prirodom arilnog supstituenta vezanog na centralni atom bora utjecalo na fotofizička svojstva u primjeru sintetiziranih kvadrupolarnih triarilborana (slika 6).⁵⁹ Spoj **3** kod kojeg je borov atom okružen s tri mesitilne skupine je sintetiziran je upravo zbog poboljšanja stabilnosti kromofora u vodi za biooslikavanje, za razliku od spojeva **1** i **2**, koji zbog manjeg volumena tiofena povezanog uz borov atom nisu stabilni u vodi.



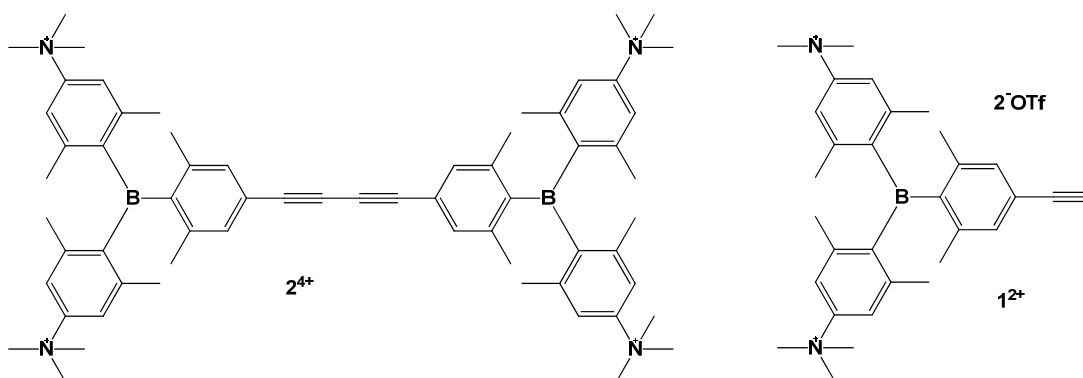
Slika 6. Kvadrupolarni triarilborani s tiofenskim mostovima

S obzirom da se kationski bis-triarilboran **3** pokazao kao novi fluorofor pogodan za jedno- i dvofotonsko pobuđeno fluorescencijsko oslikavanje, a i stabilan je i topljiv u vodi, istraživane su i njegove biološke mete (npr. DNA, protein).¹⁷ Zbog hidrofobnosti same molekule provedena su ispitivanja interakcija sa serumskim albuminom (BSA), koji je poznati fiziološki transporter raznih heterocikličkih molekula i prirodno najzastupljeniji protein. Proučavane su i interakcije s DNA/RNA, a rezultati su pokazali snažne nekovalentne interakcije s ds-DNA, ds-RNA i ss-RNA, te s BSA. Ditiofenski analog **3** pokazao je selektivan fluorescencijski odgovor pri vezanju na DNA/RNA (pri $\lambda = 573$ nm) u odnosu na vezanje s BSA (pri $\lambda = 475$ nm) što omogućuje istovremeno ratiometrijsko određivanje DNA/RNA i BSA u otopini (slika 7). Ditiofenski triarilboran veže se u utore, ali i stvara snažne interakcije sa ss-RNA gdje se ponaša kao vreteno oko kojeg se ss-RNA omota, a uzrok tih interakcija su kombinacija H-veza, elektrostatskih i hidrofobnih interakcija. Ovakvo vezanje malih molekula sa ss-RNA je neuobičajeno, s obzirom da se male molekule uglavnom vežu za ss-RNA kao interkalatori.



Slika 7. Kompeticijski BSA/DNA eksperiment: a) fluorimetrijska titracija spoja **3** ($c = 5 \times 10^{-7}$ mol dm⁻³, $\lambda_{exc} = 425$ nm s BSA; preklopljena titracija s *ct*-DNA (*ct*DNA t1-t12) napravljena je odvojeno radi usporedbe. Pri $\lambda = 573$ nm možemo primijetiti izosbestičnu točku u titraciji s BSA, pri kojoj na fluorescenciju spoja ne utječe dodana količina BSA ('slijepa točka'), ali se snažno mijenja pri dodatku DNA/RNA; b) prije pripremljeni kompleks **3**/BSA titriran je s *ct*-DNA (slika preuzeta i prilagođena)¹⁷

Fluorimetrijske titracije s DNA/RNA/BSA pokazale su važnost poveznice koja povezuje dva triarilborana. Htjela se vidjeti važnost kromoforne poveznice (bitiofena) na dobivene spektroskopske odgovore i afinitet.⁶³ Uz bitiofen, pozornost je privukao i 1,3-butadiin, koji je rigidan, štapićastog oblika i inertan u smislu da ne utječe na kovalentne i nekovalentne interakcije prema DNA/RNA i proteinima, a ima značajan signal u Ramanovom spektru na oko 1600 cm⁻¹. Prema tome je sintetiziran je spoj tetrakationski **2**⁴⁺, gdje su dvije triarilboranske podjedinice povezane 1,3-butadiiinskom poveznicom, a služio bi kao kombinirana fluorofofor – Raman proba za nekovalentno prepoznavanje DNA/RNA i proteina. Radi usporedbe sintetiziran je i dikationski monomer **1**²⁺ (slika 8).



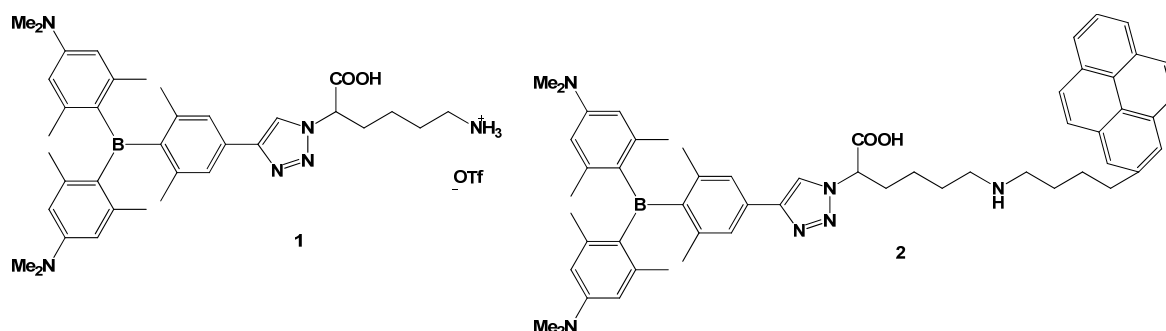
Slika 8. Bis-triarilboran 1,3-butadiin (**2**⁴⁺) i etinil-triarilboran (**1**²⁺)

Dodatak bilo kojeg DNA/RNA ili proteina spojevima **2**⁴⁺ ili **1**²⁺, uzrokovao je gašenje fluorescencije spojeva, za razliku od bitiofenskog analoga **3**, gdje je dodatak bilo kojeg polinukleotida ili proteina uzrokovao snažan porast fluorescencije, što je pokazalo važnost poveznice na fluorescencijsku emisiju triarilborana. Monomer **1**²⁺ nije pokazao značajne interakcije s proteinom BSA, pokazujući nužnost hidrofobne poveznice kod dimera (**2**⁴⁺ i **3**) radi uspješnog vezanja u hidrofobni džep BSA. Na afinitet vezanja na BSA, koji je za **2**⁴⁺ iznosio log*K*_s

= 8,2, naspram spoju **3** čiji je $\log K_s = 5,9$, utjecala je i struktura poveznice. To upućuje da je alifatska, linearna poveznica, niskog volumena (**2⁴⁺** diin) preferirana za vezanje za umetanje u vezno mjesto BSA. Visok afinitet vezanja ($\log K_s = 6-7,5$) za razne DNA/RNA pokazala su oba kationska triarilborana (**1²⁺** i **2⁴⁺**) te je kationski monomer pokazao samo red veličine niži afinitet vezanja za polinukleotide, nego tetrakationski **2⁴⁺**. To upućuje na mali utjecaj elektrostatskih interakcija s negativno nabijenom fosfatnom okosnicom DNA/RNA te vezanje u ds-DNA/RNA utore. Analog **2⁴⁺** pokazao je i snažni afinitet prema ss-RNA, a CD rezultati potvrdili su omatanje ss-RNA oko analoga **2⁴⁺**. Značajno je da **2⁴⁺** pokazuje vrlo jaki signal diinske poveznice u SERS (*Surface Enhanced Raman Spectroscopy*) spektru, kojim se također može pratiti interakcije s DNA i BSA paralelno i neovisno o fluorescenciji.

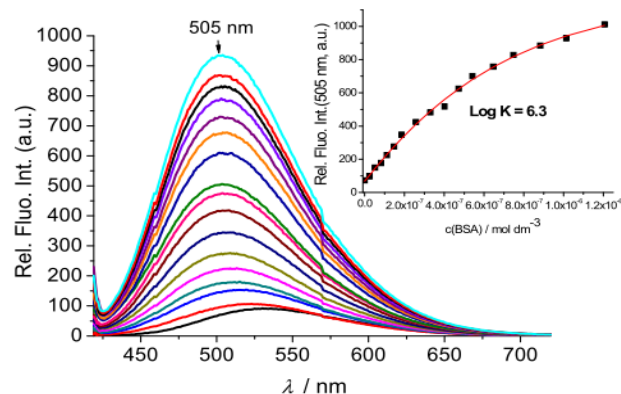
Neutralni triarilborani i bis-triarilborani se vežu s visokim (50–10 nM) afinitetom isključivo na proteine, ali ne i na DNA/RNA, ističući tako važnost elektrostatskih interakcija s polianionskim okosnicama DNA/RNA.⁶⁴ Neutralni konjugirani sustavi koji sadrže donor NMe₂ i 3-koordinirani bor akceptor dovode do prijelaza prijenosa naboja i posljedično dovode do snažnog batokromnog pomaka UV/Vis i fluorescencijskog emisijskog spektra u odnosu na kationske analoge. To se može primijeniti u fluorescencijskom biooslikavanju te je stoga bilo zanimljivo ispitati interakcije takvih sustava s proteinima. Enzim koji je odabran kao meta je dipeptidil peptidaza III (DPP III), zbog svoje široke rasprostranjenosti u tkivima sisavaca, široke specifičnosti supstrata te hidrofobnog veznog mjesta. DPP III je citosolni enzim, jedini je predstavnik M49 metalopeptidaza i cink-ovisna je aminopeptidaza.⁶⁵ Sudjeluje u sekvencionalnoj hidrolizi dipeptida s N kraja oligopeptida u rasponu od tri do deset aminokiselinskih ostataka. DPP III se osim u tkivima sisavaca može pronaći i kod nižih eukariota te se smatra da pridonosi normalnom intracelularnom katabolizmu proteina, iako njegova točna uloga još nije poznata. Promijenjena ekspresija se povezuje s upalama, regulacijom krvnog tlaka, modulacijom boli, a povećana aktivnost DPP III se povezuje s histološkom agresivnošću tumora jajnika. Zbog svih ovih razloga, fluorescentni inhibitor DPP III enzima bio bi vrlo koristan u daljnjem istraživanju fiziološke uloge ovog enzima. Kako bi dobili što veću strukturalnu prilagodljivost probe, sintetiziran je konjugat triarilborana i aminokiseline sa slobodnim N- i C-krajevima, što bi trebalo omogućiti jednostavno umetanje sintetiziranog peptidoida u inhibitorsko mjesto DPP III enzima.⁶⁴ Sintetiziran je triarilboran-aminokiselinski-pirenski konjugat, gdje je piren uveden zbog ranije objavljenih dobrih rezultata DPP III inhibitora temeljenih na pirenima, a sama prisutnost pirena daje mogućnost Försterovog rezonancijskog

prijenosa energije (FRET) između pirena ($\lambda_{exc} = 342 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 400 - 450 \text{ nm}$) i triarilborana ($\lambda_{exc} = 400 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 540 \text{ nm}$) (slika 9). Dodatno, piren može pokazati i razne fluorescencijske promjene, npr. uzrokovane stvaranjem ekscimera, gdje dolazi do interakcije između dva pirena ili ekscipleksa s drugim fluoroforom. Sinteza novih konjugata **1** i **2** (slika 9) provedena je uz pomoć 'klik' CuAAC reakcije, odnosno azid-alkin cikloadicijom kataliziranu Cu (I). 'Klik' reakcija je izabrana kako bi se kasnije moglo ortogonalno pristupiti novim peptidima, uvodeći triarilboranske probe u željenom trenutku. Također 1,2,3-triazoli su jaki akceptori vodikove veze i lako stupaju u interakciju s raznim biološkim metama, preko H-veza, dipolnih i π - π interakcija, a i sami triazoli imaju biološki relevantna djelovanja.



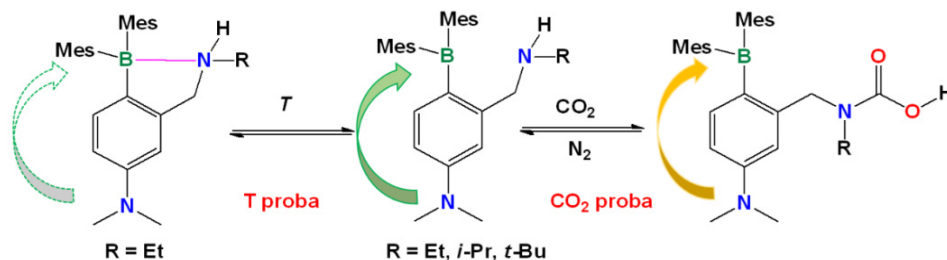
Slika 9. 1,4-disupstituirani-1,2,3-triazol triarilboran – aminokiselinski konjugati **1** i **2**

Novi neutralni triarilborani vežu se samo za protein, a ne za DNA/RNA kao kod prethodnih kationskih triarilborana. Triarilboranska aminokiselina **1** i triarilboran-piren konjugat **2** vežu se za BSA i DPP III enzim s visokim afinitetom te pokazuju snažno povećanje fluorescencije triarilborana (do 100 puta) (slika 10). Pirenski konjugat **2** daje i FRET signal pri vezanju za protein. Bitno je naglasiti da sintetizirane triarilboranske boje nisu smanjile enzimsku aktivnost DPP III enzima i da su prve nekovalentne probe za DPP III enzim koje se mogu koristiti i tijekom enzimskih reakcija.



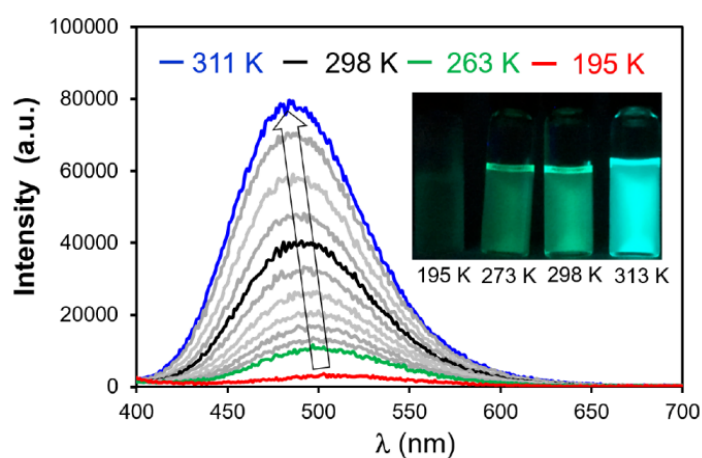
Slika 10. Fluorimetrijska titracija spoja **1** ($c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$; $\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$) s BSA (goveđi serumski albumin), DESNO: ovisnost fluorescencije pri $\lambda_{\text{max}} = 505 \text{ nm}$ o $c(\text{BSA})$, stehiometrija 1:1 = 1 / BSA, pri pH 7 u natrijevom kakodilatnom puferu, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$.

Zanimljiva je upotreba triarilborana kao fluorescentne senzore za CO_2 , s obzirom da su CO_2 i njegovo skladištenje i transformacija jedna od bitnijih tema sadašnjice.⁶⁶ Zbog svog negativnog učinka na okoliš i zdravlje čovjeka ulaže se mnogo vremena u razvoj meta za praćenje i detekciju CO_2 . Metode koje se koriste temelje se na elektrokemiji ili infracrvenoj spektroskopiji (IR) koje nisu jednostavne za korištenje. Fluorescentni senzori su odlična opcija za detekciju CO_2 upravo zbog svoje osjetljivosti i mogućnosti prijenosa, a nedostatak im je što rijetko koji ima nizak limit detekcije i ne mogu se koristiti više puta. Dobra metoda za hvatanje CO_2 je korištenjem primarnih ili sekundarnih amina, koji formiraju karbamatne soli. Metoda se temelji na činjenici da D- π -A boranski sustav pokazuje fluorescenciju osjetljivu na geometriju donor-akceptor i polarnost otapala. Učinkoviti sensor mogao bi se razviti kombinirajući amino skupinu koja hvata CO_2 i D- π -A boranski sustav, što je i provedeno. Razvijen je alkilamino-funkcionalizirani donor- π -akceptor triarilborana, odnosno sensor za hvatanje CO_2 , stvarajući derivat karbaminske kiseline. Kako je aaminski supstituent jako blizu atomu bora, pri vezanju CO_2 dolazi do intramolekularnog prijenosa naboja, što dovodi do reverzibilne emisijske promjene/promjene u boji (shema 3.). Prednost ovog senzora je vrijeme odgovora i detekcijski limit koji je nizak, 100 ppm u metanolu. Osim za hvatanje CO_2 ovaj sustav je učinkovit i kao 'turn on' fluorescencijski temperaturni sensor, upravo zbog dinamičke disocijacije/asocijacije B \leftarrow N veze. Odnosno reverzibilno mijenjanje između otvorene i zatvorene forme ovih molekula dovodi do korištenja kao 'turn on' senzora (shema 3.).



Shema 3. D- π -A triarilboran kao fluorescentna proba za CO₂ i temperaturu (shema preuzeta i prilagođena)

Iz grafa fluorescencije (slika 11) može se vidjeti i pojačanje emisije fluorescencije porastom temperature. Protična otapala kao MeOH, mogu stupiti u interakcije s N (1) atomom preko vodikove veze, što dovodi do slabljenja B-N veze u sintetiziranom spoju. Sva tri sintetizirana spoja pokazala su sličnu ovisnost o polarosti otapala i fluorescencije s kvantnim iskorištenjem fluorescencije većim od 65 % i valnom duljinom emisije na 450-510 nm i velikim Stokesovim pomakom (oko 140 nm), koji je pripisan izvrnutom pomaku naboja (TICT) otvorene forme.

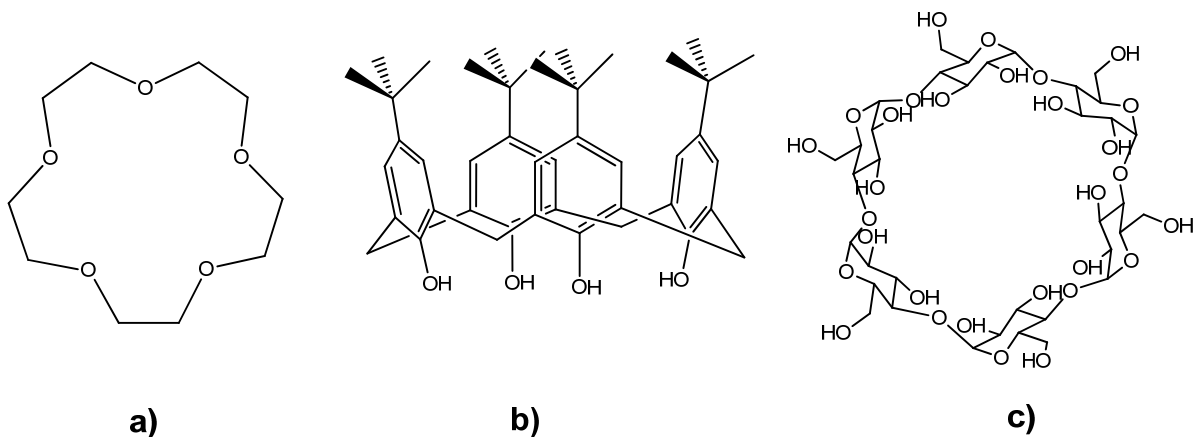


Slika 11. Promjena fluorescencijskog spektra sintetiziranog spoja uzrokovana povećanjem temperature u CH₂Cl₂ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³, $\lambda_{\text{exc}} = 370$ nm); DESNO: umetnuta fotografija koja pokazuje promjene boje pri četiri različite temperature. (slika preuzeta)

2.3. Kaliksareni

2.3.1. Supramolekulska kemija i makrociklički ligandi

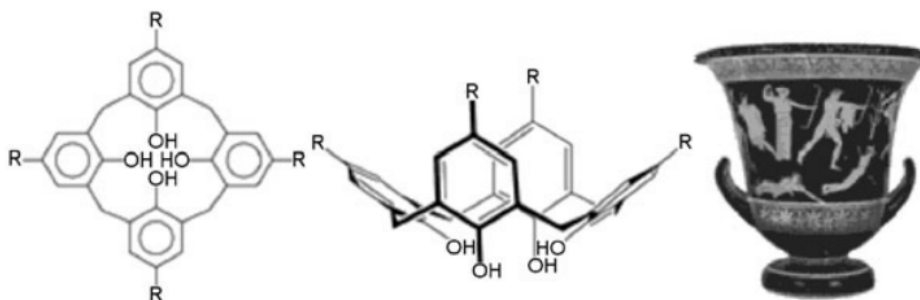
Još jedna zanimljiva skupina spojeva, za koje se dosad nije ni znalo da su fluorescentni u vodenim otopinama su kaliksareni. Kaliksareni zajedno s ciklodekstrinima, krunskim eterima, kurbit[n]urilima te ciklofanima spadaju u makrocikličke supramolekulske sustave (slika 12).⁶⁷ Razvoj supramolekulske kemije počeo je još 1987. godine kada su Lehn, Pedersen i Cram dobili Nobelovu nagradu zbog otkrića sustava domaćin–gost (engl. host–guest system). Supramolekulske sustave čine gradivne jedinice koje su međusobno povezane nekovalentnim interakcijama.⁶⁸ Te interakcije uključuju H-veze, van der Waalsove interakcije te hidrofobne/hidrofilne interakcije, π - π interakcije slaganja, interakcije prijenosa naboja, itd.⁶⁹ Prednosti tih interakcija su jednostavan i lak pristup za izgradnju supramolekularnih struktura, čime se izbjegava višestupnjevita sinteza i komplicirano pročišćavanje spojeva.⁶⁷ Također takve metode su i financijski isplativije i ekološki prihvatljivije. Supramolekulski sustavi imaju sposobnost intrizične samoorganizacije, a zbog relativno slabih nekovalentnih interakcija su i reverzibilni, što im omogućuje disocijaciju i rekonstrukciju. Osim nekovalentnih interakcija, jako bitna je i definicija sustava domaćin–gost, gdje u tom inkluzijskom kompleksu, molekula domaćina inkapsulira molekulu gosta unutar svoje šupljine, uz nekovalentne interakcije. Supramolekulski domaćini su upravo makrociklički ligandi, jer sadrže šupljine u koje mogu smjestiti molekulu gosta. Primjena ovakvih sustava je moguća u biomedicini, od dostave lijekova, dostave gena, fotodinamske terapije (PDT), biooslikavanja, itd.



Slika 12. Primjeri makrocikličkih liganda: a) krunasti eter, b) kaliks[4]aren, c) ciklodekstrin

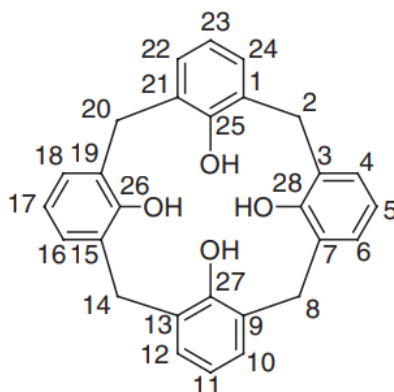
2.3.2. Kaliks[n]areni općenito

Naziv kaliks[n]arena predložio je C. D. Gutsche 1970. godine, zbog svoje sličnosti s peharom/kaležom (grč. *calix*), a nastavak -aren sugerira prisutnost aromatskih prstenova u makrocikličkoj okosnici (slika 13.).⁷⁰ Broj u uglatim zagrada označava broj fenolnih podjedinica u prstenu.⁷¹ Prefiks nazivu je ime fenolnog derivata korištenog kao ishodna tvar u sintezi, npr. *p-tert*-butilkaliks[4]aren.



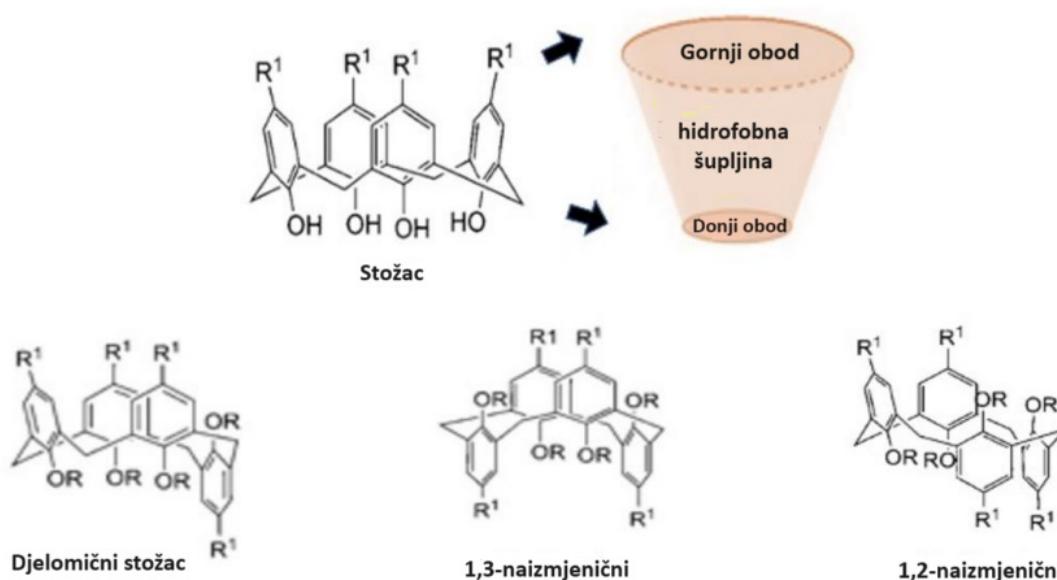
Slika 13. Molekulska struktura kaliks[4]arena i grčke krater vaze (slika preuzeta)⁷²

Ti hidrofobni aromatski makrocikli sastoje se od fenolnih podjedinica međusobno povezanih metilenskim mostovima.⁷³ Broj tih podjedinica može biti od 4 do 20, ali oni koji su najčešće proučavani su tetrameri, heksameri i oktameri.⁷⁴ Gornji i donji obod služi za uvođenje različitih veznih mjesta, dozvoljavajući pristup raznih receptorskih molekula s amfilnim karakterom (slika 14.). Jedan od začetnika sinteze kaliksarena bio je A. Zinke, koji je 1942. godine iz reakcije kondenzacije *p*-supstituiranog fenola i formaldehida u bazičnim uvjetima, dobio kristalinični produkt empirijske formule C₁₁H₁₄O.⁷⁴ Zbog korištenja *p*-supstituiranog fenola, koji može reagirati samo u dva *orto*-položaja, smanjena je mogućnost unakrsnog povezivanja (engl. *cross-linking*). Način numeriranja kaliksarena prikazan je na slici 14.



Slika 14. Struktura i numeriranje kaliks[4]arena; kaliks[4]aren-25,26,2,28-tetrol (slika preuzeta)⁷⁴

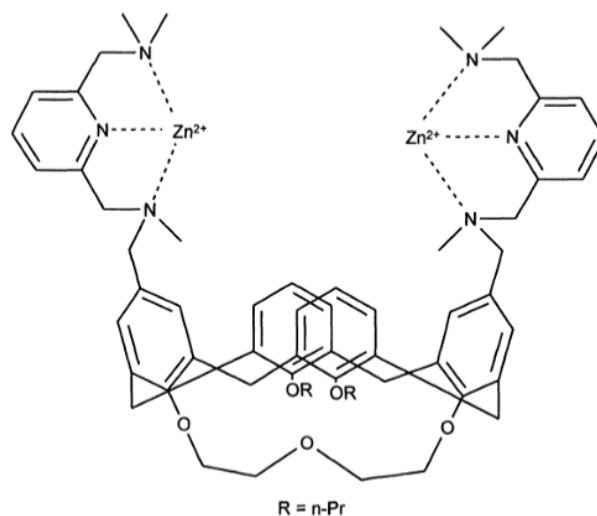
Mogu biti prisutni u različitim konformacijama, te su veliki kaliksareni ($n > 5$) prilično fleksibilni i bez specifične orijentacije supstituenata na rubovima.⁷⁵ Prvi je to primijetio Cornforth, u slučaju kaliks[4]arena i predložio postojanje četiri konformacije.⁷⁶ Te četiri konformacije su: stožac, djelomični stožac, 1,3-naizmjenični i 1,2-naizmjenični stožac (slika 15).⁷⁷ Najpovoljnija konformacija je konformacija stošca, zbog prisutnosti četiri OH skupine, koje stabiliziraju ovu konformaciju preko intramolekularne vodikove veze. S porastom broja arila, raste i broj konformacija, tako kaliks[6]areni imaju osam konformera, a kaliks[8]areni šesnaest.⁷⁴ Andreotti, Ungaro i Pochini objavili su prvu kristalnu strukturu inkluzijskog kompleksa, adukta između *p-tert*-butilkaliks[4]arena, uz pomoć X-zraka.⁷⁸ Najčešće se primjenjuju za kompleksiranje metalnih kationa unutar šupljine, ali njihova uloga je puno šira. Koriste se u područjima kao što su senzori, kataliza, mikroelektronika, vodikova energija, farmaceutici, nanomedicina, itd.⁷² Stupaju u nekovalentne interakcije s dvostrukom uzvojnicom nukleinskih kiselina, preferirajući umetanje u veliki utor DNA ili stvaranje elektrostatskih interakcija.¹⁸



Slika 15. Konformacije kaliks[4]arena: Stožac, djelomični stožac, 1,3-naizmjenični i 1,2-naizmjenični stožac (slika preuzeta i prilagođena).⁷⁹

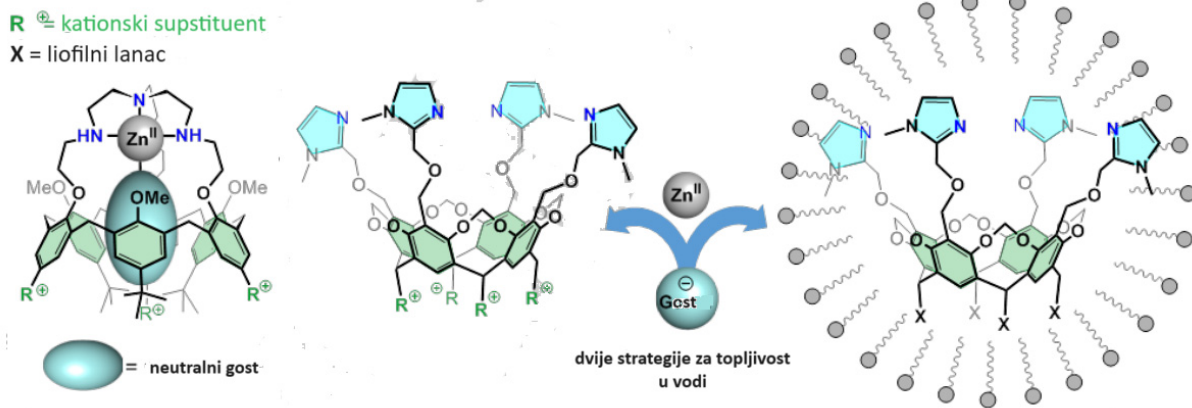
2.3.3. Kaliksareni kao receptori

Molekularno prepoznavanje je proces koji uključuje vezanje i odabir supstrata od strane molekule receptora, kao i mnoge specifične funkcije, a potaknuo je i veliki razvoj umjetnih receptora.⁸⁰ Velika upotreba kaliksarena posljedica je jednostavnosti višegramske sinteze iz lako dostupnih početnih materijala i mogućnosti selektivne funkcionalizacije na različitim pozicijama.⁸¹ Njihova primjena proizlazi iz njihove sposobnosti kao receptori. Ovisno o supstituciji, kaliksareni mogu uspješno reverzibilno kompleksirati razne katione, anione ili neutralne spojeve, ali za razliku od drugih makrocikla (npr. ciklodekstrini) nisu kiralni. Postoji mogućnost pretvaranja kaliksarena u kiralne sustave, gdje se na neplanarne molekule uvodi supstituent koji dovodi do kiralnosti, bez uvođenja stereogenih centara. Jedan još uvijek popularan način je onaj kojeg je proveo još 1979. Gutsche, a uključuje uvođenje kiralnog supstituenta (kamforosulfonilne skupine) na *p*-*t*Bu-kaliks[8]aren.⁸² Kako bi dobili važne informacije i bolje razumjeli molekularni mehanizam, istražuje se dizajn biomimetičkih kompleksa u svrhu modeliranja metalo-enzimskih aktivnih mjesta.⁸³ Klasični način na koji se to provodi je sinteza metalnih kompleksa s polidentatnim ligandima koji oponašaju koordinacijsko okruženje iz prirode. Dvije su moguće konformacijske sfere. Kod prve sfere imamo korištenje porfirina u modeliranju hem enzima, a kod druge imamo usmjeravanje reaktivnosti metalnog iona. Kod prve koordinacijske sfere problem je reproducirati specifične karakteristike enzima koje se trebaju oponašati nekovalentnim vezama. Karakteristika enzima je prisutnost džepa koji okružuje reaktivno mjesto metalnog iona koji dopušta vezanje supstrata, preorganizaciju i otpuštanje produkta. Kod enzima taj džep je posljedica uvijanja proteina te je s malom molekulom teško postići takav džep. Moguća strategija je sinteza kompleksa sa šupljinom, kao što je kaliksaren. Mnogi derivati kaliksarena proučavani su kao modeli enzima npr. Zn(II) i Cu(II) hidrolitičkih metaloenzima, aciltransferaze, ribonukleaze, ATPaze, aldolaze, i dr.⁸⁰ Zanimljiv primjer je i Zn²⁺ dinuklearni kaliksarenski model (slika 16.) koji vrlo efikasno katalizira ciklizaciju i hidrolizu *p*-nitrofenola u 2-hidroksipropil-*p*-nitrofenil fosfatu (HPNP) koji oponaša fosfodieterske veze kod RNA.



Slika 16. Dinuklearni kaliks[4]arenski Zn(II) model (slika preuzeta)

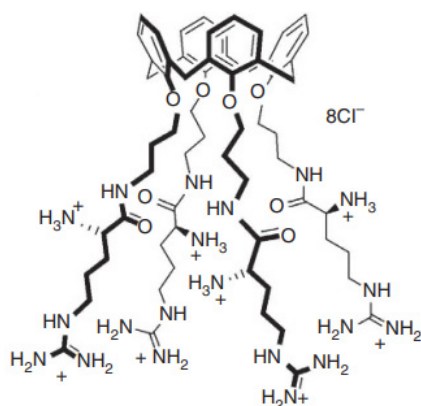
Molekularno prepoznavanje polarnih organskih molekula od biološkog interesa, kao što su ugljikohidrati i aminokiseline od velike je važnosti, a idealno je ako može biti provedeno u vodi, što je izrazito zahtjevno zbog same prirode medija.⁸⁴ Dvije su strategije za sintezu biomimetičkih metalo-receptora topljivih u vodi, temeljene na poli(imidazol) rezorcinaren jezgri (slika 17.). Prva strategija temelji se na novom sintetskom putu za uvođenje hidrofilnih supstituenata na receptoru, na približnoj udaljenosti od koordinacijskog mjesta. Druga strategija temelji se na ugradnji organotopivog metaloreceptora u micelle dodecilfosfokolina (DPC) koje oponašaju proteinsko okruženje aktivnog mjesta metaloenzima. Ligand rezorcinarena putem obje strategije u vodi uspješno veže Zn(II) u širokom pH rasponu. Poznat je i kaliks[6]aren topljiv u vodi, a koji je poznati biomimetik za kompleksiranje Cu(I).⁸⁵ Kaliksareni koji su topljivi u vodi sintetiziraju se i uvođenjem sulfonata, karboksilnih kiselina, fosfonata, amina, peptida, saharida, gvanidinskih skupina direktno ili preko poveznica na gornji ili donji obod.⁸⁶ Sve to primjenjuje se većinom za kaliks[4]arene. Kaliks[6]areni su veće i fleksibilnije molekule, a njihovi sulfonatni derivati koji su topljivi u vodi su podosta proučavani. Uvođenjem šest naboja na veći obod vodi do alternativnih konformacija zbog odbijanja naboja i sprječava zauzimanje konformacije lijevka, koja je najpogodnija za vezanje gosta unutar šupljine, ali je zanimljiva zbog raznih bioloških primjena; od kompleksiranja proteina, kompleksiranja malih bioaktivnih molekula, dostave lijekova, inhibicije enzima



Slika 17. Lijevo: Kompleks lijevka topiv u vodi. Desno: Dviije strategije receptor $Zn(II)$ temeljen na rezorcinarenu za topljivost u vodi (slika preuzeta i prilagođena)⁸⁴

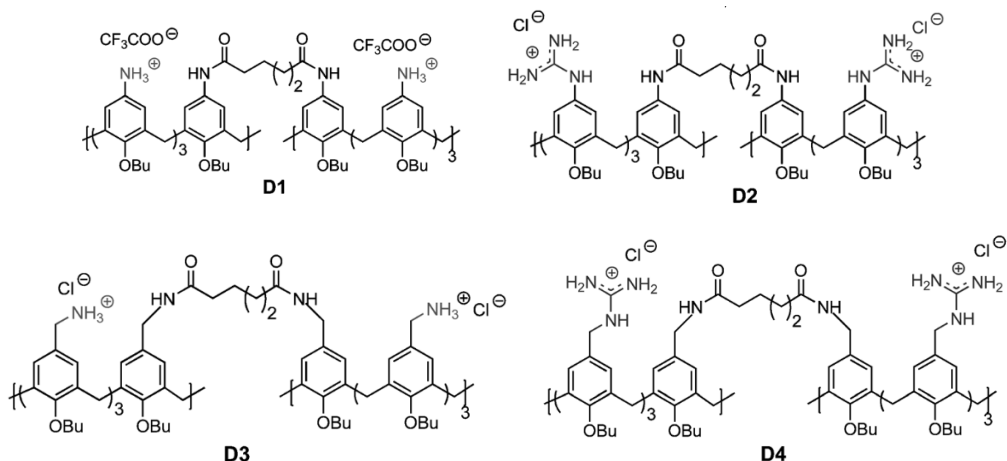
2.3.4. Kaliksareni i DNA

Osim upotrebe kaliksarena kao receptora za razne kationske, anionske ili neutralne specije, kaliksareni se mogu upotrebljavati i kao transfekcijski agensi.^{87,88} Transfekcija je proces uz pomoć kojeg strana nukleinska kiselina može prodrijeti unutar eukariotske stanice i modificirati gene stanice domaćina, a primjena je vrlo široka zbog mogućnosti proučavanja staničnih procesa i molekularnih mehanizama bolesti.⁸⁹ Moguće je iskoristiti peptide koji ulaze u stanice (engl. *cell-penetrating peptides*, CPP) te ih kovalentno povezati s makrociklom, kao što je kaliks[4]aren.⁸⁷ CPP koriste se kao molekularni prijenosnici za unošenje proteina ili nukleinskih kiselina unutar stanica. Četiri pojedinačne argininske podjedinice korištene su umjesto dugih peptida te su kovalentno povezane na donji ili gornji obod kaliks[4]arena (slika 18). Peptidi bogati argininom mogu omogućiti prodiranje nukleinskih kiselina kroz otvor stanične membrane, što je primjenjivo u isporuci gena i preduvjet za gensku terapiju.



Slika 18. Struktura peptidokaliks[4]arena

Prepoznavanje nukleinskih kiselina vrlo je bitan biološki proces. Preduvjet je i za ekspresiju gena, a svi transkripcijski čimbenici i regulatorni proteini vežu se na određeni segment DNA i potiču ili inhibiraju transkripciju odgovarajućeg gena. Postoje mnogi prirodni i sintetski spojevi koji služe za DNA prepoznavanje.¹⁸ Više o nekovalentnim načinima vezanja za DNA rečeno je u poglavlju 2.1.5. Već dulje vrijeme je poznato da kationski kaliks[4]areni pokazuju velik afinitet prema DNA. Ungaro⁹⁰, Schneider⁹¹ i ostali sintetizirali su trialkilamonijeve i gvanidijeve vrste te su pomoću elektroforeze pokazali kompleksnu formaciju. Prepostavilo se da bi kaliksareni prepoznali negativno nabijenu fosfatnu okosnicu DNA te bi elektrostatske interakcije dovele do uvijanja DNA uzvojnice, što je i dokazano pomoću AFM-a (engl. *atomic force microscopy*). Dimerni anilino-kaliks[4]areni s jednostavnim alkilnim poveznicama razvijeni su kao novi agensi za vezanje na DNA (slika 19).¹⁸ Provedena su mjerenja na fluorimetru, UV/vis-u i uz pomoć cirkularnog dikroizma. Pokazala su vezanje u veliki utor DNA s vodikovim vezama između kationskih ostataka na gornjem obodu kaliksarena i nukleinskih baza, kao i fosfatnih skupina oligonukleotida. Takvi kaliksareni mogli bi se koristiti u ekspresiji gena, na način da bi blokirali određene promotorske sekvence, ali modificirani analozi mogli bi se koristiti u dijagnozi i kao citotoksični agensi u tumorskoj terapiji.



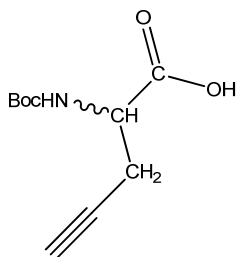
Slika 19. Strukture dimernih anilino-kaliks[4]arena koji se vežu u veliki utor DNA (slika preuzeta)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. SINTEZA DERIVATA PEPTIDA WHW

Opće metode i materijali: Pripravljene derivati peptida WHW okarakterizirani su pomoću NMR i HRMS analiza. ^1H NMR i ^{13}C NMR spektri snimljeni su na aparatima BRUCKER AV300 i BRUCKER AV600 (Brucker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Njemačka), koristeći 150,92 ili 75,47 MHz za ^{13}C jezgre i 600,13 ili 300,13 MHz za ^1H jezgre. Kao unutarnji standard korišten je DMSO- d_6 , a od otapala su korišteni: kloroform- d , metanol- d_4 i dimetilsulfoksid- d_6 (oznake u spektrima: Trp = triptofanski prsten; Py = prsten pirena). Kemijski pomaci (δ) izraženi su u ppm, dok su konstante sprege (J) izražene u Hz. Signali su označeni kao s-singlet, d-dublet, dd-dublet dubleta, t-triplet, dt-dublet tripleta, q-kvartet, m-multiplet, brs-široki singlet (engl. *broad*). Spektri masa snimljeni su na Agilent 6410 Triple quad spektrometru masa (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA). Spektri masa visoke rezolucije (HRMS) snimljeni su Q-Tof2 hybrid quadrupole time-of-flight spektrometru masa (Micromass, Cary, NC, USA) u pozitivnom modu. Tijek reakcija pratio se tankoslojnom kromatografijom, na pločicama Kieselgel 60 F 245 (Merck, KGaA, Darmstadt, Njemačka), a supstancije su detektirane pomoću UV svjetla pri 254 i 365 nm. Za čišćenje produkta koristila se preparativna tankoslojna (2 mm) kromatografija, na Merck 60 F254 pločama (Merck, KGaA, Darmstadt, Njemačka). Temperature tališta pripremljenih spojeva određene su na Koflerovom mikroskopu i nisu korigirane. WHW je nabavljen iz GenScripta, Treubstraat 1, 1.kat, 2288EG, Rijswijk, Nizozemska, kao 95 % čista bijela krutina (TFA sol).

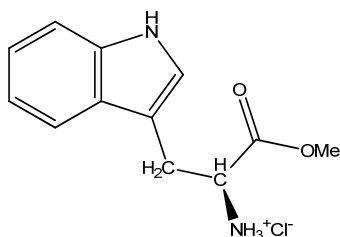
2-((*tert*-Butoksikarbonil)amino)pent-4-inoična kiselina (1)



Spoj **1** je pripremljen prema poznatoj proceduri.⁹²

D,L-propargilglicin (PG) (1 g, 8,84 mmol) otopljen je u smjesi 1,4-dioksan/H₂O (*v:v* = 2:1; 18 mL), ohlađen na 0 °C, te je potom prvo dodana otopina 2 M NaOH (4,42 mL, 8,84 mmol) kap po kap, a onda i di-*tert*-butil dikarbonat (2,14 g, 9,81 mmol). Reakcija se miješala 15 min, pri 0 °C, a onda još 2 h pri sobnoj temperaturi. Otapalo je upareno, a dobiveni ostatak je ispran etil acetatom (20 mL). Vodena otopina je zakiseljena na pH 2–3 sa zasićenom otopinom KHSO₄ (7 mL), te je provedena ekstrakcija s etil acetatom (3 × 40 mL). Dobiveni organski sloj ispran je s vodom i (25 mL) i sušen na Na₂SO₄. Otapalo je upareno i dobiven je Boc zaštićeni PG **1**, kao žuto ulje, koje sušenjem prelazi u krutinu (1,838 g, 97 %): *R_f* = 0,22 (CH₂Cl₂/MeOH = 9:1); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ /ppm: 12,76 (brs, 1H, COOH), 7,05 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H, NH), 4,05 (td, *J* = 8,4, 5,3 Hz, 1H, CH), 2,85 (s, 1H, HC≡C-), 2,70–2,33 (m, 2H, CH₂ prekriveno DMSO-om), 1,39 (s, 9H, Me₃C-O-); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ /ppm: 172,2 (HO-C=O), 155,2 (Me₃C-O-C=O), 80,7 (C_q, Me₃C-O-), 78,3 (HC≡C-), 72,8 (HC≡C-), 52,4 (CH), 28,1 (Me₃C-O-), 21,1(CH₂); slika D.8.1.

(*S*)-3-(1*H*-Indol-3-il)-1-metoksi-1-oksopropan-2-aminijum klorid (2)

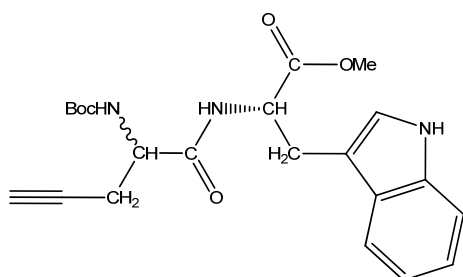


Spoj **2** je pripremljen prema poznatoj proceduri.⁹³

Svježe destilirani klorotrimetilsilan (2,588 mL, 20,4 mmol) polako je dodan u tikvicu gdje se nalazi L-triptofan (2,081 g, 10,2 mmol). Potom je dodan metanol (10 mL), te je suspenzija miješana 48 h, pri sobnoj temperaturi. Otapalo je upareno i dobiven je produkt **2** (2,34 g, 90 %), kao bijela

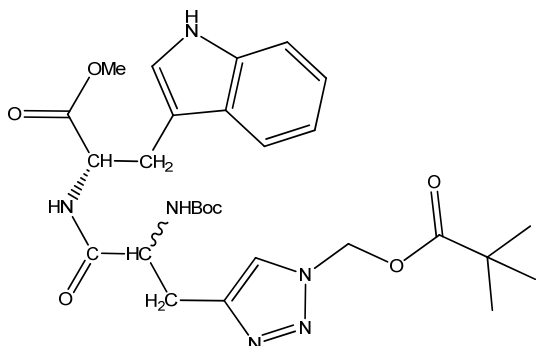
krutina: $R_f = 0,65$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 9:1$); $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ/ppm : 11,15 (s, 1H, NH-Trp), 8,70 (s, 3H, NH_3^+), 7,52 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H, Trp), 7,37 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, Trp), 7,26 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H, Trp), 7,08 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H, Trp), 7,00 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H, Trp), 4,19 (t, $J = 6,0$ Hz, 1H, CH), 3,63 (s, 3H, OCH_3), 3,42–3,27 (m, 2H, CH_2); $^{13}\text{C NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ/ppm : 169,7 (MeO-C=O), 136,2 (Cq, Trp), 126,9 (Cq, Trp), 125,0 (CH, Trp), 121,1 (CH, Trp), 118,6 (CH, Trp), 118,0 (CH, Trp), 111,5 (CH, Trp), 106,3 (Cq, Trp), 52,6 (CH ili OCH_3), 52,57 (CH ili OCH_3), 26,1 (CH_2); slika D.8.2.

Metil(2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)pent-4-inoil)-L-triptofanat (3)



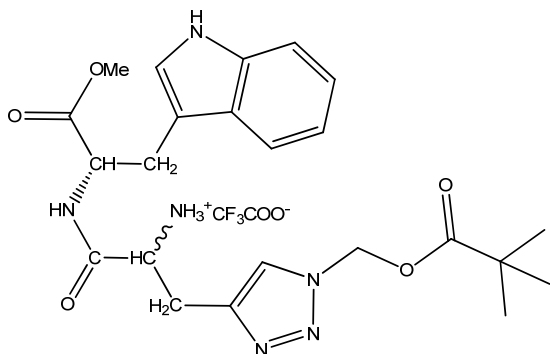
Boc zaštićeni PG **1** (83 mg, 0,39 mmol) i metilni ester triptofana **2** (100 mg, 0,39 mmol) su otopljeni u suhom CH_3CN (7 mL) pri suhim uvjetima, te su dodani HOBt (97 %, 54 mg, 0,39 mmol), HBTU (98 %, 151 mg, 0,39 mmol) i suhi Et_3N (0,22 mL, 1,56 mmol). Reakcijska smjesa miješala se 16 h pri sobnoj temperaturi. Produkt Trp-A(alkin) dipeptid **3** (114 mg, 71 %) izoliran je preparativnom kromatografijom ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 9:1) kao žuto ulje: $R_f = 0,86$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ 9:1); $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ/ppm : 10,87 (s, 1H, NH-Trp), 8,32 i 8,25 (2xd, $J = 7,7, 7,4$ Hz, 1H, NH-C=O), 7,47 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, Trp), 7,33 (dd, $J = 8,1, 2,6$ Hz, 1H, Trp), 7,18–7,11 (m, 1H, Trp), 7,06 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H, Trp), 7,01–6,96 (m, 1H, Trp), 6,92 i 6,86 (2xd, $J = 8,6, 8,7$ Hz, 1H, NH), 4,55–4,49 (m, 1H, CH), 4,20–4,01 (m, 1H, CH), 3,58 i 3,55 (2xs, 3H, OCH_3), 3,20–3,01 (m, 2H, CH_2), 1,38 (s, 9H, $\text{Me}_3\text{C-O-}$); $^{13}\text{C NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) δ/ppm : 172,0 i 171,9 (MeO-C=O), 170,4 i 170,2 (NH-C=O), 155,1 i 155,0 ($\text{Me}_3\text{C-O-C=O}$), 136,1 (Cq, Trp), 127,0 (Cq, Trp), 123,7 (CH, Trp), 120,9 (CH, Trp), 118,4 i 118,37 (CH, Trp), 117,9 (CH, Trp), 111,4 i 111,37 (CH, Trp), 109,1 i 109,0 (Cq, Trp), 80,8 i 80,7 (Cq, $\text{Me}_3\text{C-O-}$), 78,3 i 78,27 ($\text{HC}\equiv\text{C-}$), 72,6 i 72,58 ($\text{HC}\equiv\text{C-}$), 53,1 i 53,0 (CH ili OCH_3), 52,9 i 52,7 (CH ili OCH_3), 51,8 i 51,78 (CH), 28,1 ($\text{Me}_3\text{C-O-}$), 27,1 i 26,9 (CH_2), 21,9 (CH_2); slika D.8.3a. ESI/MS: m/z : izrač. za $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{NaO}_5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 436,18, nađeno 436,4.

(4-(3-(((*S*)-3-(1*H*-Indol-3-il)-1-metoksi-1-oksopropan-2-il)amino)-2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-3-oksopropil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)metil pivalat (4)



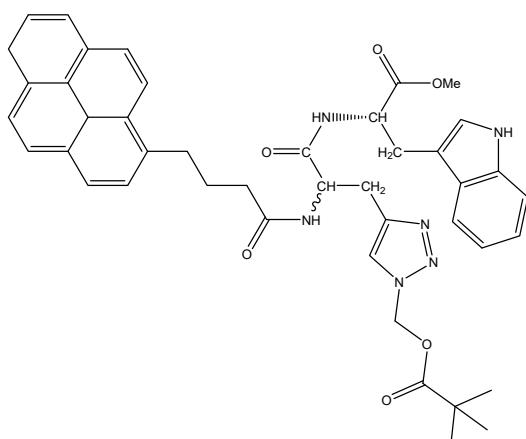
U miješanu otopinu klorometil pivalata (0,104 mL, 0,7 mmol, 97 %) u EtOH/H₂O (7:3, 1,8 mL), dodani su NaN₃ (45 mg, 0,7 mmol), CuI (13 mg, 0,07 mmol), natrijev askorbat (7 mg, 0,035 mmol, 99 %) i *N,N'*-dimetiletilendiamin (DMEDA) (12 μL, 0,105 mmol, 95 %). Nakon dodatka DMEDA-a, otopina postaje plava, potom zelena i na kraju žuta. Nakon 30 min miješanja, čisto žuta otopina mijenja boju u zelenu. Otopina je zagrijana na 100 °C u trajanju od 1 h, potom se dodaju alkin **3** (114 mg, 0,28 mmol), natrijev askorbat (7 mg, 0,035 mmol, 99 %), CuI (13 mg, 0,07 mmol) i DMEDA (12 μL, 0,105 mmol, 95 %). Reakcija je zagrijana na 100 °C u trajanju od 30 min, a nakon hlađenja sirovi produkt profiltriran je kroz kratku SiO₂ kolonu i uparen. Prekristalizacija iz metanola dala je produkt **4** (139 mg, 87 %) kao žutu krutinu: *R*_f = 0,72 (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 10,95 (brs, 1H, NH-Trp), 8,49–8,23 (m, 1H, NH-C=O), 7,85 i 7,73 (2xs, 1H, H-5 triazol), 7,48 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H, Trp), 7,33 (dd, *J* = 8,0, 0,9 Hz, 1H, Trp), 7,15 (dd, *J* = 13,8, 2,0 Hz, 1H, Trp), 7,11–7,01 (m, 1H, Trp), 7,0–6,85 (m, 2H, Trp i NH), 6,26 i 6,22 (2xs, 2H, CH₂), 4,51 (dd, *J* = 12,9, 6,6 Hz, 1H, CH), 4,36–4,10 (m, 1H, CH), 3,58 i 3,55 (2xs, 3H, OCH₃), 3,18–2,73 (m, 4H, 2 × CH₂), 1,32 (brs, 9H, Me₃C-O-), 1,11 i 1,10 (2xs, 9H, Me₃C=O); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 176,4 i 176,39 (C=O, Piv), 172,1 i 172,05 (MeO-C=O), 171,3 i 171,0 (NH-C=O), 155,1 (Me₃C-O-C=O), 143,7 i 143,67 (C₄, triazol), 136,0 i 136,05 (C_q, Trp), 127,0 i 126,98 (C_q, Trp), 123,9 i 123,8 (C₅, triazol), 123,75 i 123,72 (CH, Trp), 120,9 (CH, Trp), 118,4 (CH, Trp), 117,9 i 117,89 (CH, Trp), 111,4 (CH, Trp), 109,1 i 109,06 (C_q, Trp), 78,2 (C_q, Me₃C-O-), 69,8 i 69,79 (N-CH₂-O), 53,8 i 53,6 (CH), 53,1 i 53,0 (CH), 51,82 i 51,80 (OCH₃), 38,2 i 38,1 (Me₃C-C=O), 28,1 (Me₃C-O-), 28,0 (CH₂), 27,4 (CH₂), 26,4 (Me₃C-C=O); slika D.8.4. ESI/MS: *m/z*: izračunato za C₂₈H₃₉N₆O₇ [M+H]⁺ 571,3, nađeno 571,5.

1-(((S)-3-(1H-Indol-3-il)-1-metoksi-1-oksopropan-2-il)amino)-1-okso-3-(1-((pivaloiloksi)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)propan-2-aminijum 2,2,2-trifluoroacetat (5)



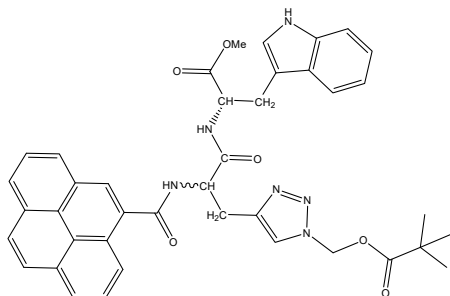
Spoj 4 (139 mg, 0,24 mmol) otopljen je u 1:1 otopini TFA/CH₂Cl₂ (6 mL) i miješan 20 h na sobnoj temperaturi. Nakon uklanjanja zaostalog TFA uparavanjem, dobiven je W-A(triazol) dipeptid 5 (140 mg, 100 %), kao tamnoplava krutina: *R_f* = 0,45 (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 10,92 (s, 1H, NH-Trp), 9,11–8,87 (m, 1H, NH-C=O), 8,17 (brs, 3H, NH₃⁺), 8,02 i 7,71 (2xs, 1H, H-5 triazol), 7,52–7,48 (m, 1H, Trp), 7,35 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, Trp), 7,16 (dd, *J* = 11,2, 2,2 Hz, 1H, Trp), 7,10–7,04 (m, 1H, Trp), 7,02–6,97 (m, 1H, Trp), 6,28 i 6,19 (2xs, 2H, CH₂), 4,71–4,35 (m, 1H, CH), 4,13 (brs, 1H, CH), 3,61 i 3,60 (2xs, 3H, OCH₃), 3,23–3,01 (m, 4H, 2x CH₂), 1,13 i 1,11 (2xs, 9H, Me₃C=O); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 176,5 i 176,4 (C=O, Piv), 171,7 i 171,67 (Me-O-C=O), 167,9 i 167,6 (NH-C=O), 158,7, 158,4, 158,1 i 157,7 (CF₃-C=O), 141,0 i 140,9 (C4, triazol), 136,2 i 136,1 (Cq, Trp), 125,0 i 124,7 (C5, triazol), 124,0 (CH, Trp), 121,1 (CH, Trp), 118,52 i 118,5 (CH, Trp), 118,0 i 117,9 (CH, Trp), 111,5 (CH, Trp), 108,84 i 108,81 (Cq, Trp), 69,9 (N-CH₂-O), 53,3 i 53,1 (CH), 52,1 i 52,0 (CH), 51,7 i 51,6 (OCH₃), 38,3 i 38,2 (Me₃C-C=O), 27,5 i 27,3 (CH₂), 27,2 i 27,0 (CH₂), 26,5 (Me₃C-C=O); slika D.8.5. ESI/MS: *m/z*: izračunato za C₂₃H₃₁N₆O₅⁺ [M⁺] 471,24, pronađeno 471,4.

(4-(3-(((S)-3-(1H-Indol-3-il)-1-metoksi-1-oksopropan-2-il)amino)-3-okso-2-(4-(piren-1-il)butanamido)propil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)metil pivalat (6)



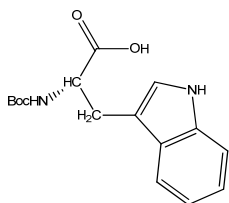
Spoj **5** (236 mg, 0,4 mmol) i 1-pirenbutanska kiselina (119 mg, 0,4 mmol, 97 %) otopljene su u suhom CH₃CN (10 mL) pod argonom, te su dodani HOBt (56 mg, 0,4 mmol, 97 %), HBTU (155 mg, 0,4 mmol, 98 %) i suhi Et₃N (222 μ L, 1,6 mmol). Reakcija se miješala 16 h, pri sobnoj temperaturi. W-A(triazol)-Pyr **6** (194 mg, 66 %) izoliran je preparativnom kromatografijom (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1) kao žuta pjena: $R_f = 0,82$ (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ /ppm: 10,88 (s, 1H, NH-Trp), 8,43 (dd, $J = 7,5, 1,6$ Hz, 1H, NH-C=O), 8,34 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H, Pyr), 8,27–7,77 (m, 10 H, 8H-Pyr, H-5 triazol, NH-C=O), 7,48 i 7,47 (2xd, $J = 8,0$ Hz, 1H, Trp), 7,32 i 7,31 (2xd, $J = 4,8$ Hz, 1H, Trp), 7,18 i 7,13 (2xd, $J = 2,3$ Hz, 1H, Trp), 7,06–7,02 (m, 1H, Trp), 6,97–6,94 (m, 1H, Trp), 6,20 i 6,16 (d, $J = 1,6$ Hz, i brs, 2H, CH₂), 4,70–4,66 (m, 1H, CH), 4,61–4,46 (m, 1H, CH), 3,55 i 3,54 (2xs, 3H, OCH₃), 3,29–3,20 (m, 2H, CH₂), 3,18–3,08 (m, 2H, CH₂), 3,07–2,76 (m, 2H, CH₂), 2,29–2,14 (m, 2H, CH₂), 1,97–1,87 (m, 2H, CH₂), 0,99 i 0,98 (2xs, 9H, Me₃C=O); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ /ppm: 176,4 i 176,3 (C=O, Piv), 172,1 (NH-C=O, Pyr), 172,0 i 171,9 (MeO-C=O), 171,1 i 170,8 (NH-C=O), 143,7 i 143,68 (C4, triazol), 136,5 (Cq, Pyr), 136,1 i 136,0 (Cq, Trp), 130,9 (Cq, Pyr), 130,4 (Cq, Pyr), 129,3 (Cq, Pyr), 128,1 (Cq, Pyr), 127,5 (CH, Pyr), 127,4 (CH, Pyr), 127,2 (CH, Pyr), 127,0 (Cq, Trp), 126,5 (CH, Pyr), 126,1 (CH, Pyr), 124,89 i 124,87 (C5, triazol), 124,7 (Cq, Pyr), 124,2 (CH, Pyr), 124,1 (CH, Pyr), 123,8 (Cq, Pyr), 123,8 i 123,77 (CH, Trp), 123,7 (CH, Pyr), 123,5 (CH, Pyr), 121,0 (CH, Trp), 118,4 (CH, Trp), 118,0 i 117,9 (CH, Trp), 111,4 (CH, Trp), 109,2 i 109,1 (Cq, Trp), 69,9 (N-CH₂-O), 53,3 i 53,1 (CH), 51,9 (CH), 51,8 (OCH₃), 38,2 i 38,1 (Me₃C-C=O), 34,8 (CH₂), 32,1 (CH₂), 28,1 i 28,0 (CH₂), 27,4 (CH₂), 27,1 i 26,9 (CH₂), 26,3 (Me₃C-C=O); slika D.8.6. HRMS (MALDI-TOF/TOF): m/z : izračunato za C₄₃H₄₄N₆O₆ [M+Na]⁺: 763,3220, nađeno 763,3229.

(4-(3-(((S)-3-(1H-Indol-3-yl)-1-metoksi-1-oksopropan-2-il)amino)-3-okso-2-(piren-4-karboksamido)propil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)metil pivalat (7)



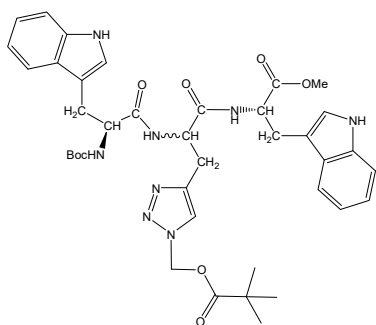
Dipeptid **5** (108 mg, 0,185 mmol) i 1-pirenkarboksilna kiselina (47 mg, 0,185 mmol) otopljeni su u suhom DMF-u (5 mL) pod argonom, te su dodani HOBt (26 mg, 0,185 mmol), HBTU (72 mg, 0,185 mmol) i suhi Et₃N (103 μL, 0,74 mmol). Reakcija je miješana 16 h pri sobnoj temperaturi. W-A(triazol)-Pyr **7** (82 mg, 64 %) izoliran je preparativnom kromatografijom (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1) kao žuta pjena. *R_f* = 0,80 (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 10,92 (s, 1H, NH-Trp), 8,87 i 8,83 (2xbrd, 1H, NH-C=O), 8,65 i 8,61 (2xbrd, 1H, -NH-C=O), 8,14 (m, 10H, 9H-Pyr+H-5 triazol), 7,54 (d, *J* = 7,9 Hz, 1H, Trp), 7,35 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, Trp), 7,28 i 7,22 (2xd, *J* = 2,2 Hz, 1H, Trp), 7,09–7,06 (m, 1H, Trp), 7,02–6,98 (m, 1H, Trp), 6,35–6,26 (m, 2H, CH₂), 5,04–4,99 (m, 1H, CH), 4,68–4,64 (m, 1H, CH), 3,65 i 3,62 (2xs, 3H, OCH₃), 3,24–2,99 (m, 4H, 2x CH₂), 1,04 i 1,03 (2xs, 9H, Me₃C=O); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 176,5 i 176,47 (C=O, Piv), 172,3 i 172,2 (MeO-C=O), 171,1 i 170,8 (NH-C=O), 168,8 i 168,79 (NH-C=O, Pyr), 143,95 i 143,93 (C4, triazol), 136,14 i 136,11 (Cq, Trp), 131,7 i 131,6 (Cq, Pyr), 131,3 i 131,26 (Cq, Pyr), 130,6 (Cq, Pyr), 130,2 (Cq, Pyr), 128,3 (Cq, Pyr), 128,02 i 128,0 (CH, Pyr), 127,9 (CH, Pyr), 127,2 (CH, Pyr), 127,1 i 127,08 (Cq, Trp), 126,6 (CH, Pyr), 125,8 (CH, Pyr), 125,6 (CH, Pyr), 125,3 i 125,26 (C5, triazol), 124,7 (Cq, Pyr), 124,2 (CH, Pyr), 124,1 i 124,0 (CH, Pyr), 123,9 i 123,8 (CH, Pyr), 123,7 (Cq, Pyr), 123,6 i 123,56 (CH, Trp), 121,0 (CH, Trp), 118,5 (CH, Trp), 118,0 i 117,99 (CH, Trp), 111,5 (CH, Trp), 109,3 (Cq, Trp), 69,91 i 69,90 (N-CH₂-O), 53,4 i 53,1 (CH), 53,1 i 52,9 (CH), 52,0 i 51,9 (OCH₃), 38,14 i 38,13 (Me₃C-C=O), 27,8 i 27,7 (CH₂), 27,2 i 26,97 (CH₂), 26,4 i 26,38 (Me₃C-C=O); slika D.8.7. HRMS (MALDI-TOF/TOF): *m/z*: izračunato za C₄₀H₃₈N₆O₆Na⁺ [M+Na]⁺: 721,2751; nađeno 721,2763.

(tert-Butoksikarbonil)-L-triptofan (8)



Spoj **8** je pripravljen prema poznatoj proceduri.⁹⁴ L-triptofan (1 g, 4,8 mmol, 98 %) otopljen je u 1 M NaOH (4,8 mL), te razrijeđen s 3,6 mL *tert*-butil alkohola, te je tijekom 20 min pomalo dodavan di-*tert*-butil dikarbonat (1,237 g, 5,28 mmol). Reakcija se miješala 15 h pri sobnoj temperaturi. Otapalo je upareno, a dobiveno ulje otopljeno je u vodi. Vodena otopina zakiseljena je na pH 1–2 sa zasićenom otopinom KHSO₄ i provedena je ekstrakcija s etil acetatom (3 × 15 mL). Dobiveni organski sloj ispran je s vodom i sušen na Na₂SO₄. Otapalo je upareno, a produkt Boc-zaštićeni triptofan **8**, dobiven je kao bijela krutina (1,184 g, 81 %). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 12,52 (s, 1H, COOH), 10,82 (s, 1H, NH, Trp), 7,53 (d, *J* = 7,9 Hz, 1 H, Trp), 7,34 (d, *J* = 8,1 Hz, 1H, Trp), 7,15 (d, *J* = 1,3 Hz, 1H, Trp), 7,07 (t, *J* = 7,5 Hz, 1H, Trp), 6,99 (t, *J* = 7,4 Hz, 1H, Trp), 6,94 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H, NH), 4,16 (td, *J* = 8,8; 4,8 Hz, 1H, CH), 3,14 (dd, *J* = 14,6; 4,6 Hz, 1H, Ha-CH₂), 2,99 (dd, *J* = 14,6; 9,4 Hz, 1H, Hb-CH₂), 1,33 (s, 9H, Me₃C-O-); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 173,9 (HO-C=O), 155,4 (Me₃C-O-C=O), 136,1 (Cq, Trp), 127,2 (Cq, Trp), 123,6 (CH, Trp), 120,9 (CH, Trp), 118,3 (CH, Trp), 118,1 (CH, Trp), 111,4 (CH, Trp), 110,2 (Cq, Trp), 78,0 (Me₃C-O-), 54,5 (CH), 28,2 (Me₃C-O-), 26,8 (CH₂); slika D.8.8.

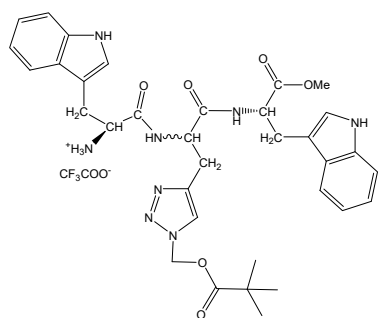
Metil (6*S*, 12*S*)-6,12-bis((1*H*-indol-3-il)metil)-2,2-dimetil-4,7,10-triokso-9-((1-((pivaloiloksi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil)-3-oksa-5,8,11-triazatridekan-13-oat (9)



Spoj **5** (231 mg, 0,395 mmol) i Boc-zaštićeni triptofan **8** (120 mg, 0,395 mmol) otopljeni su u suhom CH₃CN (15 mL) u suhim uvjetima, te su dodani HOBt (97 %, 54 mg, 0,395 mmol), HBTU (98 %, 153 mg, 0,395 mmol) i suhi Et₃N (0,224 mL, 1,58 mmol). Reakcija se miješala 16 h pri

sobnoj temperaturi. Zaštićeni W-A(triazol)-W tripeptid **9** (189 mg, 63 %) izoliran je preparativnom kromatografijom (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1) kao svijetložuti prah: *R_f* = 0,76 (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 10,86 (s, 1H, NH-Trp), 10,76 (s, 1H, NH-Trp), 8,93–8,61 (m, 1H, NH-C=O), 8,52–8,13 (m, 1H, NH-C=O), 7,96 i 7,71 (2xs, 1H, H-5 triazol), 7,61–7,41 (m, 2H, Trp), 7,35–7,27 (m, 2H, Trp), 7,16–6,74 (m, 7H, NH i Trp), 6,24 i 6,14 (2xs, 2H, CH₂), 4,63 (brs, 1H, CH), 4,58–4,46 (m, 1H, CH), 4,26–4,07 (m, 1H, CH), 3,56 i 3,55 (2xs, 3H, OCH₃), 3,23–2,83 (m, 6H, 3× CH₂), 1,28 (brs, 9H, Me₃C-O-), 1,09 i 1,03 (2xs, 9H, Me₃C=O); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 176,4 i 176,3 (C=O, Piv), 171,9 (MeO-C=O), 170,7 i 170,3 (NH-C=O), 164,6 (NH-C=O), 155,3 (Me₃C-O-C=O), 143,3 (C4, triazol), 136,0 (Cq, Trp), 135,99 (Cq, Trp), 127,31 i 127,30 (Cq, Trp), 127,0 i 126,97 (Cq, Trp), 124,0 i 123,9 (C5, triazol), 123,8 (CH, Trp), 123,7 i 123,6 (CH, Trp), 120,9 (CH, Trp), 120,7 (CH, Trp), 111,1 (CH, Trp), 110,1 (Cq, Trp), 109,1 (Cq, Trp), 78,1 (Cq, Me₃C-O-), 69,8 (N-CH₂-O), 55,3 i 55,0 (CH), 53,1 (CH), 51,9 (CH), 51,79 i 51,77 (OCH₃), 38,2 (Me₃C-C=O), 31,3 (CH₂), 28,1 (Me₃C-O-), 27,5 i 27,4 (CH₂), 27,2 i 26,9 (CH₂), 26,4 i 26,37 (Me₃C-C=O); slika D.8.9. ESI/MS: *m/z*: izračunato za C₃₉H₄₈N₈NaO₈ [M+Na]⁺ 779,35, nađeno 779,7.

(2S)-1-((1-(((S)-3-(1H-Indol-3-il)-1-metoksi-1-oksopropan-2-il)amino)-1-okso-3-(1-((pivaloiloksi)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)propan-2-il)amino)-3-(1H-indol-3-il)-1-oksopropan-2-aminijum 2,2,2-trifluoroacetat (10**)**

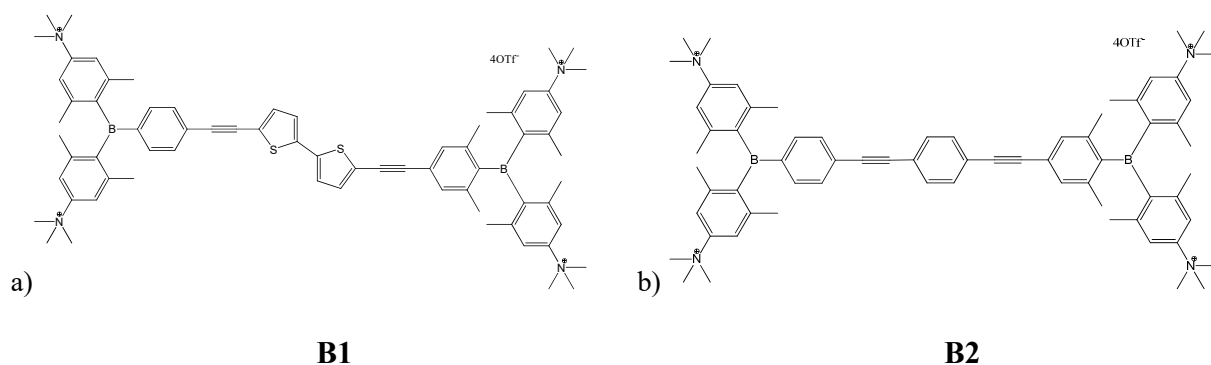


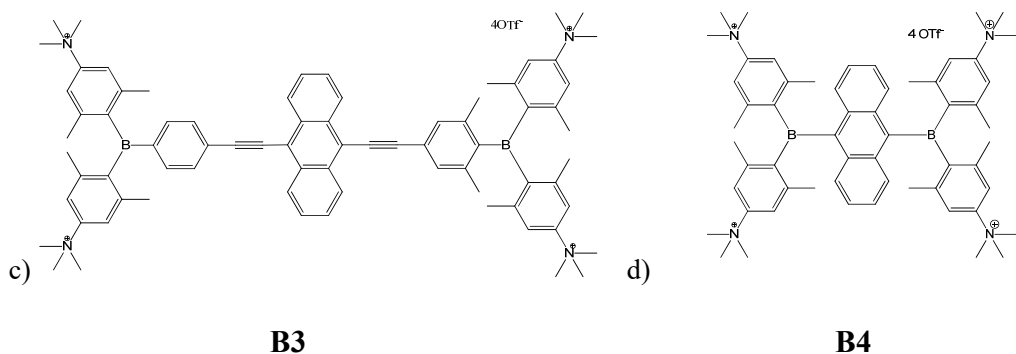
Spoj **9** (42 mg, 0,24 mmol) otopljen je u 1:1 smjesi TFA/CH₂Cl₂ (1,2 mL) i reakcija se miješala 20 h na sobnoj temperaturi. Nakon uklanjanja zaostalog TFA uparavanjem, W-A(triazol)-W tripeptid **10** (41 mg, 95 %) izoliran je kao tamnoplava krutina: *R_f* = 0,62 (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 10,97 (brs, 1H, NH-Trp), 10,89 (brs, 1H, NH-Trp), 8,95–8,67 (m, 2H, 2× NH-C=O), 8,02–7,88 (m, 4H, NH₃⁺ i H-5 triazol), 7,73–7,66 (m, 2H, Trp), 7,51 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, Trp), 7,36–7,32 (m, 2H, Trp), 7,21–7,13 (m, 1H, Trp), 7,11–6,94 (m, 4H, Trp), 6,26 i 6,14 (2xs, 2H,

CH₂), 4,80–4,37 (m, 2H, 2× CH), 4,12–3,89 (m, 1H, CH), 3,58 i 3,56 (2xs, 3H, OCH₃), 3,29–2,88 (m, 6H, 3× CH₂), 1,11 i 1,01 (2xs, 9H, Me₃C=O); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 176,5 i 176,4 (C=O, Piv), 172,2 i 172,0 (MeO-C=O), 170,3 i 170,1 (NH-C=O), 168,5 i 168,4 (NH-C=O), 159,5, 158,4 i 157,9 (CF₃-C=O), 143,0 i 142,9 (C4, triazol), 136,3 (Cq, Trp), 136,1 (Cq, Trp), 127,03 i 127,0 (Cq, Trp), 125,1 i 125,0 (Cq, Trp), 124,3 (C5, triazol), 124,2 (C5, triazol), 124,0 (CH, Trp), 123,9 (CH, Trp), 121,1 (CH, Trp), 121,0 (CH, Trp), 118,4 (CH, Trp), 118,3 (CH, Trp), 118,2 (CH, Trp), 118,0 (CH, Trp), 111,5 (CH, Trp), 111,4 (CH, Trp), 109,2 (Cq, Trp), 106,8 (Cq, Trp), 69,9 (N-CH₂-O), 69,8 (N-CH₂-O), 52,4 (CH), 52,3 (CH), 52,0 (CH), 51,9 i 51,8 (OCH₃), 38,2 (Me₃C-C=O), 38,1 (Me₃C-C=O), 31,9 i 31,7 (CH₂), 30,7 (CH₂), 29,7 (CH₂), 26,5 i 26,4 (Me₃C-C=O); slika D.8.10. HRMS (MALDI-TOF/TOF): *m/z*: izračunato za C₃₄H₄₁N₈O₆⁺ [M⁺] 657.3149, nađeno 657.3124.

3.2. Ispitivani analozi bis-triarilborana

U izradi doktorskog rada ispitana je i skupina derivata bis-triarilborana, koji su dobiveni u suradnji s prof. dr. sc. Todd B. Marderom, Sveučilište u Würzburgu, Würzburg, Njemačka. Ova skupina obuhvaća četiri analoga s različitim aromatskim poveznicama. Kratki antracenski analog **B4** je poznat od prije ⁹⁵, a korišten je radi prikaza važnosti duljine i rigidnosti poveznice između dvije arilboranske podjedinice, a u usporedbi s antracenskim analogom **B3**. Ispitivane strukture spojeva **B1**, **B2**, **B3** i **B4** prikazane su na slici ispod.

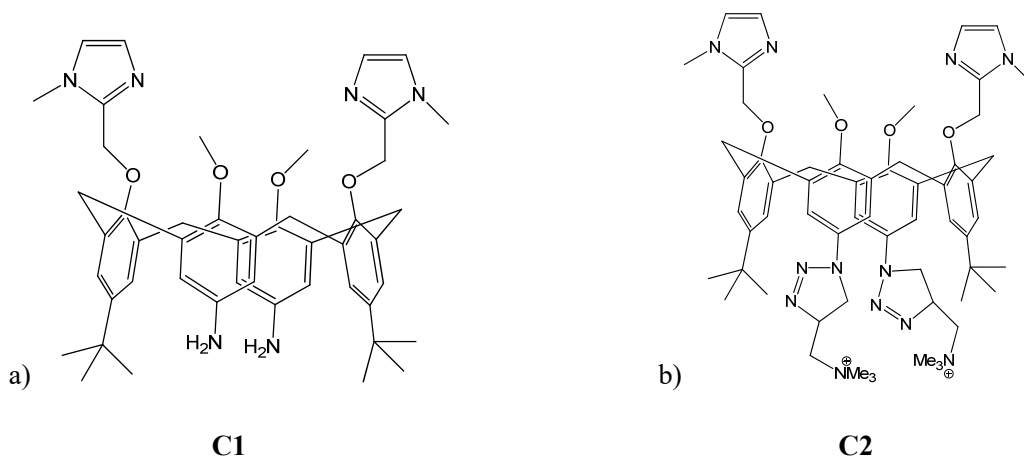


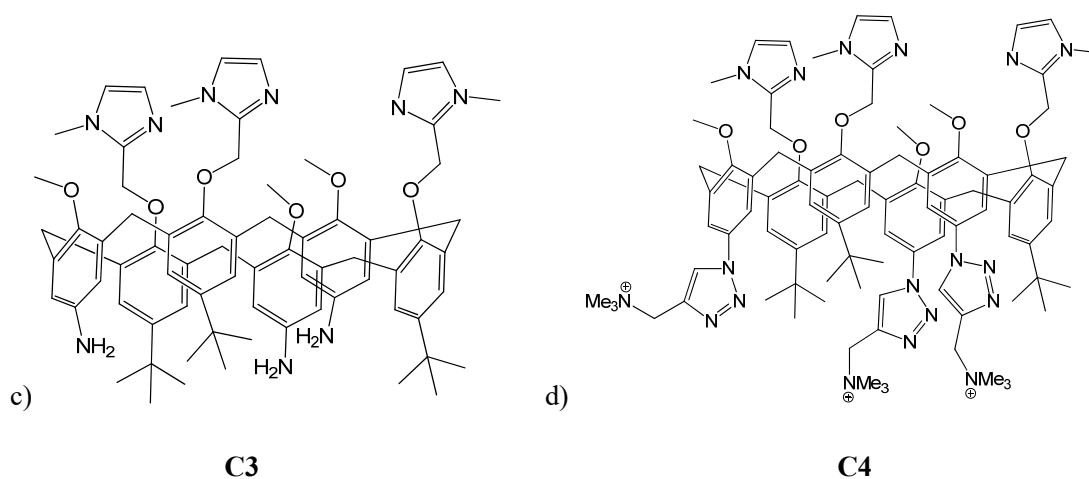


Slika 20. Ispitivani bis-triarilborani: a) 5,5'-Bis[4-(bis(4-(*N,N,N*-trimetilamonij)-2,6-dimetilfenil)boril)-3,5-dimetilfeniletinil]-2,2'-bitiofen tetratriflat (**B1**); b) 1,4-Bis[4-(bis(4-(*N,N,N*-trimetilamonij)-2,6-dimetilfenil)boril)-3,5-dimetilfeniletinil]-benzen tetratriflat (**B2**); 9,10-Bis[4-(bis(4-(*N,N,N*-trimetilamonij)-2,6-dimetilfenil)boril)-3,5-dimetilfeniletinil]-antracen tetratriflat (**B3**); d) 1,4-Bis[bis[4-(*N,N*-dimetilamino)-2,6-ksilil]boril]-antracen (**B4**)

3.3. Ispitivani derivati kaliksarena

U izradi doktorskog rada ispitana je i skupina derivata kaliksarena, koji su dobiveni u suradnji s dr. sc. Oliviom Reinaud, Sveučilište Pariz, Pariz, Francuska. Ispitivani su kaliksareni s pozitivnim nabojem – **C2** (u obliku kloridne soli) i **C4** (u obliku nitratne soli), te njihovi neutralni analozi – **C1** i **C3**.





Slika 21. Ispitivani kaliksareni: a) 5,17-diamino-11,23-di-*tert*-butil-26,28-dimetoksi-25,27-di-[(1-metilimidazol-2-il)metoksi]kaliks[4]aren (**C1**), b) 11,23-di-*tert*-butil-26,28-dimetoksi-25,27-di-[(1-metilimidazol-2-il)metoksi]-5,17-di-[4-(*N,N,N*-trimetilaminometil)-1,2,3-triazol-1-il]kaliks[4]aren (**C2**), c) 5,17,28-triamino-11,23,34-tri-*tert*-butil-37,39,41-trimetoksi-36,38,40-tri-[(1-metilimidazol-2-il)metoksi]kaliks[6]aren (**C3**) i d) 11,23,34-tri-*tert*-butil-37,39,41-trimetoksi-36,38,40-di-[(1-metilimidazol-2-il)metoksi]-5,17,28-tri-[4-(*N,N,N*-trimetilaminometil)-1,2,3-triazol-1-il]kaliks[6]aren (**C4**)

3.4. Spektroskopska karakterizacija i ispitivanje interakcija analoga peptida

WHW, analoga bis-triarilborana i kaliksarena

3.4.1. Priprema otopina

Polazne otopine analoga peptida WHW pripremljene su, zbog slabe topljivosti u vodi, otapanjem u DMSO-u ($c = 5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$). Početne otopine triarilboranskih derivata pripremljene su otapanjem u vodi ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$). Polazne otopine analoga kaliksarena pripremljene su, zbog slabe topljivosti u vodi, otapanjem u DMSO-u ($c = 5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$).

3.4.2. Spektrofotometrijska karakterizacija

UV/Vis spektri su snimljeni na Varian Cary 100 Bio spektrofotometru, a fluorescentni spektri na Varian Cary Eclipse fluorimetru, spektri cirkularnog dikrozma (CD) snimljeni su na Jasco J-815 spektropolarimetru, i brzinom skeniranja od 200 nm/min, kao prosjek od tri uzastopno snimljena spektra, sve metode provedene su pri 25 °C.

Sva spektroskopska mjerenja provedena su u puferu natrijevog kakodilata (pH = 7.0, $I = 0.05 \text{ mol dm}^{-3}$), te su korištene kvarcne kivete duljine optičkog puta 1 cm. Otopine svih spojeva ispitivane su pri koncentracijama kod kojih je njihov UV/Vis ili fluorescentni odgovor proporcionalan koncentraciji spoja. Vremena života fluorescencijske emisije određena su metodom vremenski-razlučenog brojanja pojedinačnih fotona (TC-SPC) na Edinburgh FS5 spektrometru, uz prethodno propuhivanje argonom vodene otopine uzorka u trajanju 30 min. Apsolutni kvantni prinosi fluorescencije (Φ_f) određeni su pri sobnoj temperaturi (25 °C) u natrijevom kakodilatnom puferu, uz pomoć integrirane sfere SC-30 na Edinburgh FS5 spektrometaru. Relativni kvantni prinosi za kaliksarene određeni su uz pomoć NATA (*N*-acetil-L-triptofanamid, $\phi_R = 0,14$) standarda te su mjereni pri sobnoj temperaturi (25 °C) u natrijevom kakodilatnom puferu. Kako bi se uklonio kisik iz otopine, jer je gasitelj fluorescencije, otopine u kivetama propuhane su argonom u trajanju od 30 min. Koncentracije su prilagođene apsorbancijama nižim od 0,1 pri valnim duljinama pobude od 270, 280 i 290 nm. Fluorescentni kvantni prinos računat je prema sljedećoj formuli:

$$\Phi_f = \Phi_{Ref} \left(\frac{n}{n_R} \right)^2 \frac{I}{IR} \frac{1-10^{-A_R}}{1-10^{-A}} \quad (1)$$

Φ_f i Φ_{Ref} – fluorescentni kvantni prinos spoja i referentnog spoja;

n i n_R – indeks refrakcije otapala u kojem je spoj ili referentni spoj otopljen;

A i A_R – apsorbancija spoja i referentnog spoja pri valnoj duljini pobude;

I i I_R – područje ispod krivulje emisije spoja i referentnog spoja

3.4.3. Ispitivanje interakcija analoga peptida WHW s Cu^{2+} kationom

U ispitivanju interakcija analoga peptida WHW korišten je CuCl_2 . Spektrofotometrijske titracije provedene su u puferu natrijevog kakodilata ($\text{pH} = 7,0$; $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$) dodavanjem alikvota otopine CuCl_2 u otopinu ispitivanog spoja. Zatim je izmjerena apsorbancija, odnosno intenzitet fluorescencije, iz čega su izračunate konstante stabilnosti ($\log K_s$) nelinearnom regresijom pomoću programa Specfit.^{96,97} Korišteni podaci dobiveni su spektrofotometrijskim titracijama u kojima je koncentracija spojeva (**6**, **7** i **10**) bila konstantna, a koncentracija Cu^{2+} postupno povećavana. Potom se postavlja model vezanja koji se može objasniti faktorskom analizom eigenvektora skupa podataka koju izvodi SpecFit, što se uspoređuje s prirodom proučavanog sustava i logički mogućim stehiometrijama receptor/metal. Specfit koristi NewtonRaphsonovu metodu za rješavanje specijskih ravnoteža za kompleksometrijske ravnoteže prema zadanim modelima različitih stehiometrija receptor/metal te se kao rezultat dobiva niz statističkih parametara prema kojima se ocjenjuje koji set stehiometrija i povezanih ukupnih konstanti stabilnosti (β_{xy}) najbolje odgovara eksperimentalnim podacima.

U ispitivanju interakcija kompleksa analoga peptida WHW/ Cu^{2+} s DNA ili RNA, prvo su pripremljeni kompleksi spojeva **6** i **7** s CuCl_2 , dodavajući pet puta više Cu^{2+} peptidu ($c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) u 1 mL natrijevog kakodilatnog pufera ($\text{pH} = 7,0$; $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$), kako bi $> 90\%$ peptida bilo u obliku kompleksa s Cu^{2+} kationom. Nakon 1 min inkubacije, dodan je alikvot ishodišne otopine DNA ili RNA za omjer Cu^{2+} -peptid/DNA ili RNA = 0,3 te su provedeni eksperimenti temperaturnog mekšanja. U referentnim eksperimentima DNA ili RNA otopini dodane su odgovarajuće količine DMSO ili Cu^{2+} prema onim koje su korištene i u dodavanju Cu^{2+} -peptida, te su takve referentne krivulje mekšanja za DNA ili RNA korištene za izračunavanje ΔT_m vrijednosti uzrokovane kompleksima Cu^{2+} -peptid.

3.4.4. Ispitivanje interakcija s DNA/RNA

U ispitivanju interakcija analoga peptida WHW korišteni su polinukleotidi: poli dGdC – poli dGdC, poli dAdT – poli dAdT, calf thymus DNA (*ct*-DNA) i poli rA – poli rU (rArU) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, SAD), koji su prema uputama proizvođača otopljeni u puferu (natrijev kakodilatni pufer,

pH = 7,0; $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$). U ispitivanju interakcija derivata triarilborana korišteni su različiti polinukleotidi: poli rA, poli dA, poli rU, poli dT, poli rG, poli rG, poli dGdC – poli dGdC, poli dAdT – poli dAdT, poli rA – poli rU (rArU), ct-DNA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, SAD). U ispitivanju interakcija derivata kaliksarena korišteni su polinukleotidi ct-DNA, poli rA – poli rU, poli dA – poli dT, poli dGdC – poli dGdC, poli dAdT – poli dAdT. Dodatno, ct-DNA je sonicirana i filtrirana kroz 0,45 mm filter.⁹⁸ Koncentracija polinukleotida određena je spektrofotometrijskim mjerenjem apsorbancije i izračunom pomoću molarnog ekstincijskog koeficijenta definiranog od proizvođača, te je izražena kao koncentracija nukleinskih baza.⁹⁹

Spektrofotometrijske titracije provedene su u puferu natrijevog kakodilata (pH = 7,0, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$) dodavanjem alikvota otopine DNA ili RNA polinukleotida u otopinu ispitivanog spoja. Vrijeme inkubacije nakon svakog dodatka DNA ili RNA bilo je 60 sekundi, te je zatim izmjerena apsorbancija, odnosno intenzitet fluorescencije. CD eksperimenti provedeni su dodavanjem alikvota ishodne otopine ispitivanog spoja u otopinu polinukleotida ($c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$).

U fluorimetrijskim titracijama korištena je valna duljina pobude fluoroforma iznad 300 nm, kako bi se izbjegla apsorpcija ulaznog svjetla od strane DNA ili RNA. Podaci fluorimetrijskih titracija ispitivanih spojeva s polinukleotidima obrađeni su nelinearnom regresijom po Scatchardovoj jednadžbi^{100, 101} pomoću programa za obradu podataka Origin 7.0 te su dobivene konstante stabilnosti ($\log K_s$) kompleksa spoj/DNA, RNA i omjer n [vezani spoj]/[polinukleotid] = 0,1 - 0,3. Zbog lakše usporedbe, sve $\log K_s$ vrijednosti ponovno su izračunate za fiksni $n = 0,2$ te su imale zadovoljavajuće koeficijente korelacije ($> 0,99$). Podaci fluorimetrijskih titracija ispitivanih bis-triarilborana s polinukleotidima obrađeni su nelinearnom regresijom po Scatchardovoj jednadžbi^{100,101} i dobivene su konstante stabilnosti ($\log K_s$) dobivenih kompleksa spoj/DNA, RNA i omjer n [vezani spoj]/[polinukleotid] = 0,1 – 0,5. Zbog lakše usporedbe, sve $\log K_s$ vrijednosti ponovno su izračunate za fiksni $n = 0,25$ (ds-polinukleotidi) te za fiksni $n = 0,5$ (ssRNA/RNA). Svi koeficijenti korelacije bili su zadovoljavajući ($> 0,99$).

Scatchardova izoterma vezanja u slučaju spektroskopski aktivnog kompleksa može se prikazati izrazom:

$$(1) \quad I = I_0 + ((I_{lim} - I_0) / (2 \times c)) \times (c + n \times c_s + 1 / K_s - ((c + n \times c_s + 1 / K_s)^2 - 4$$

$$\times c \times n \times c_s)^{1/2})$$

dok se Scatchardova izoterma vezanja u slučaju spektroskopski neaktivnog kompleksa može prikazati izrazom:

$$(2) \quad I = I_0 - (I_0 / (2 \times c)) \times (c + n \times c_s + 1 / K_s - ((c + n \times c_s + 1 / K_s)^2 - 4 \times c \times n \times c_s)^{1/2})$$

gdje je c koncentracija ispitivanog spoja u otopini, c_s koncentracija polinukleotida, n omjer koncentracije vezanog spoja i polinukleotida ($n_{[\text{vezani spoj}] / [\text{poli XY}]}$) I_0 spektroskopski odgovor čistog spoja, I spektroskopski odgovor nakon dodatka određene količine supstrata, I_{lim} spektroskopski odgovor kompleksa kad više nema slobodnog spoja u otopini i $\log K_s$ konstanta stabilnosti kompleksa.

U ispitivanjima interakcija kaliksarena koristili su se i nukleotidi: AMP, GMP, UMP i CMP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, SAD) ($c = 1 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$). Fluorimetrijske titracije rađene su tako da se dodavao alikvot ishodne otopine nukleobaze u otopinu kaliksarena ($c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$), s valnom duljinom pobude na 300 nm te se pratila promjena emisije cijelog spektra, iz čega su izračunate konstante stabilnosti ($\log K_s$) u stehiometrijskom omjeru 1:1 nelinearnom regresijom pomoću eksponencijalne jednadžbe 1. reda, u programu Origin7.0.

U ispitivanjima interakcija kaliksarena koristila se i fluorescentni analog nukleobaze D8-111TFA. [40] Fluorimetrijske titracije rađene su tako da se dodavao alikvot ishodne otopine nukleotida u otopinu kaliksarena ($c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$), s valnom duljinom pobude na 350 nm te se pratila promjena emisije cijelog spektra nukleobaze, iz čega su izračunate konstante stabilnosti ($\log K_s$) u stehiometrijskom omjeru 1:1 nelinearnom regresijom pomoću eksponencijalne jednadžbe 1. reda, u programu Origin7.0.

Metoda kompetitivnog istiskivanja referentne boje (DAPI) za mali utor AT-DNA provedena je za analoge peptida WHW i kaliksarene, na Jasco J-815 spektropolarimetru, u 1,5 mL natrijevog

kakodilatnog pufera ($\text{pH} = 7,0$; $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$), u raspon 230 – 500 nm, i brzinom skeniranja od 200 nm/min, kao prosjek od tri uzastopno snimljena spektra. Prvo je snimljen CD spektar otopine AT-DNA ($c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$), potom je dodan DAPI ($r[\text{DAPI}]/[\text{DNA}] = 0,6$) pri čemu dolazi do pojave pozitivne ICD vrpce na 375 nm. Potom je ispitivani spoj dodavan u omjeru ($r = [\text{spoj}]/[\text{DNA}]$) 0,2 – 3,2 i praćeno je smanjivanje intenziteta ICD vrpce na 375 nm kao funkcija istiskivanja DAPI. Određena je vrijednost IDA50%, (engl. *Indicator Displacement Assay*)¹³⁰ koja predstavlja omjer $r = [\text{DAPI}]/[\text{spoj}]$ pri kojem se intenzitet ICD 375 nm vrpce smanjio za 50 % u odnosu na početni DAPI/AT-DNA kompleks.

Metoda istiskivanja etidij bromida iz ds-DNA provedena je za kaliksarenske analoge. Snimana je na Agilent Eclipse fluorimetru u 1,5 mL natrijevog kakodilatnog pufera ($\text{pH} = 7,0$; $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$), pri valnoj duljini ekscitacije od 505 nm i valnoj duljini emisije od 600 nm. Prvo je snimljen fluorescencijski spektar otopine etidij bromida ($c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3} : \text{Int}(\text{EB})$), potom je dodan polinukleotid ($c = 5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) te je snimljena emisija EB/polinukleotid ($\text{Int}(\text{EB}/\text{DNA})$). Slijedilo je dodavanje alikvota kaliksarena u rasponu omjera etidij bromida i kaliksarena ($r = [\text{EB}]/[\text{kaliksaren}]$) 1 – 0,1 i praćeno je smanjivanje intenziteta emisije na 600 nm kao funkcija istiskivanja EB. Određena je vrijednost IDA50%, (engl. *Indicator Displacement Assay*)¹³⁰ koja predstavlja omjer $r = [\text{EB}]/[\text{spoj}]$ pri kojem se emisije na 600 nm smanjio za 50 % u odnosu na početni EB/DNA kompleks.

Eksperimenti temperature mekšanja za ds-DNA, ds-RNA i njihove komplekse s ispitivanim spojevima (u omjerima spoj/DNA ili RNA = 0,1 – 0,3) određeni su prateći promjenu apsorpcije DNA/RNA pri 260 nm kao funkciju temperature.¹⁰² Krivulje su korigirane za apsorbanciju liganda, a skala apsorpcije je normalizirana. Temperaturne točke T_m su točke infleksije u pregibu krivulja, a vrijednosti su im određene iz maksimuma prvih derivacija i provjerene tangencijalnom metodom. Vrijednosti ΔT_m izračunate su oduzimajući T_m slobodne nukleinske kiseline od T_m kompleksa. Svaka prikazana vrijednost ΔT_m prosječna je vrijednost od dva uzastopna mjerenja. Pogreška instrumenta u ΔT_m vrijednostima iznosi $\pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$.

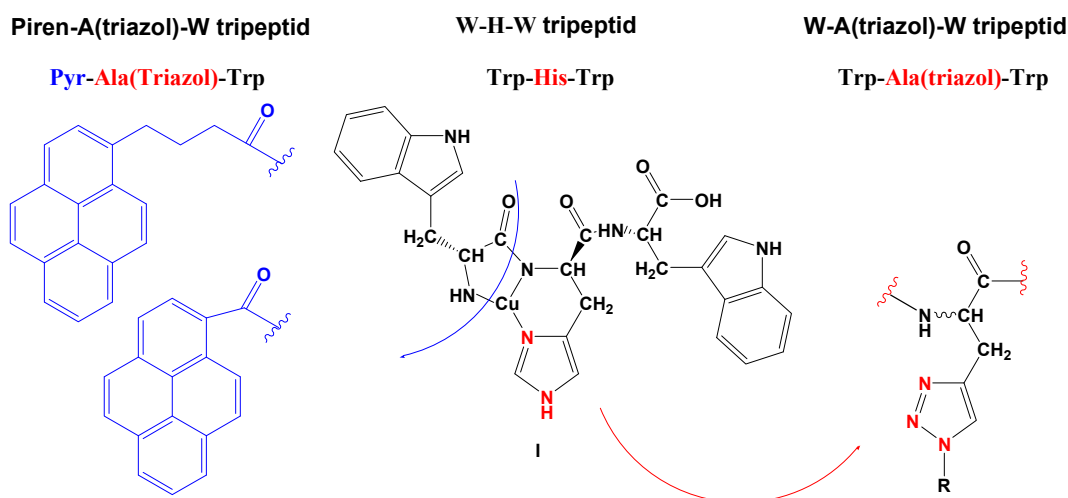
4. REZULTATI I RASPRAVA

Rezultati i rasprava bit će podijeljeni na tri glavna dijela. Prvi dio prikazat će pripravljene analoge peptida WHW, odnosno njihovu sintezu, spektroskopsku karakterizaciju, njihove interakcije s DNA i RNA te titracije s Cu^{2+} ionima. Zaključno će biti prikazana biološka ispitivanja. Drugi dio prikazat će spektroskopsku karakterizaciju triarilborana i njihove interakcije s DNA i RNA. Treći dio prikazat će spektroskopsku karakterizaciju kaliksarena i njihove interakcije s nukleotidima (AMP, GMP, CMP, UMP) te polinukleotidima (DNA, RNA).

4.1. Analози peptida WHW

4.1.1. Sinteza analoga peptida WHW

Usporedbom u prirodi prisutnog peptidnog slijeda WHW i u ovom radu opisanih analoga s triazol-substituentom, zamjetna je strukturna i metal-koordinacijska sličnost između histidinskog heterocikla i triazola (shema 4). Naime, 1,2,3-triazol posjeduje dva atoma dušika sposobna koordinirati metale i predstavlja dobar ligand za komplekse prijelaznih metala [103,104]. Često se koriste u peptidima za oponašanje trans-amidne veze [105-107]. i kao atraktivna premošćujuća skupina za povezivanje dvaju farmakofora [108,109]. Još važnije, uvođenje 1,2,3-triazola bakrom(I) kataliziranom 'klik' kemijom (CuAAC) često se koristi za uvođenje raznih molekularnih alata, poput fluorofora ili slično. Stoga bi zamjena središnjeg histidina u WHW analogu s amino kiselinom koja ima za bočni lanac propargilnu skupinu (prekursor 1,2,3-triazola) bila prikladan put za kasnu ortogonalnu modifikaciju peptida „klik“ reakcijom i uvođenjem 1,2,3-triazola (Shema 6, spoj **10**: W-A(triazol)-W). Pretpostavku da će 1,2,3-triazol zadržati svojstvo koordinacije bakrovih iona slično histidinu nedavno smo poduprli sličnom zamjenom kod FRH peptida [110].



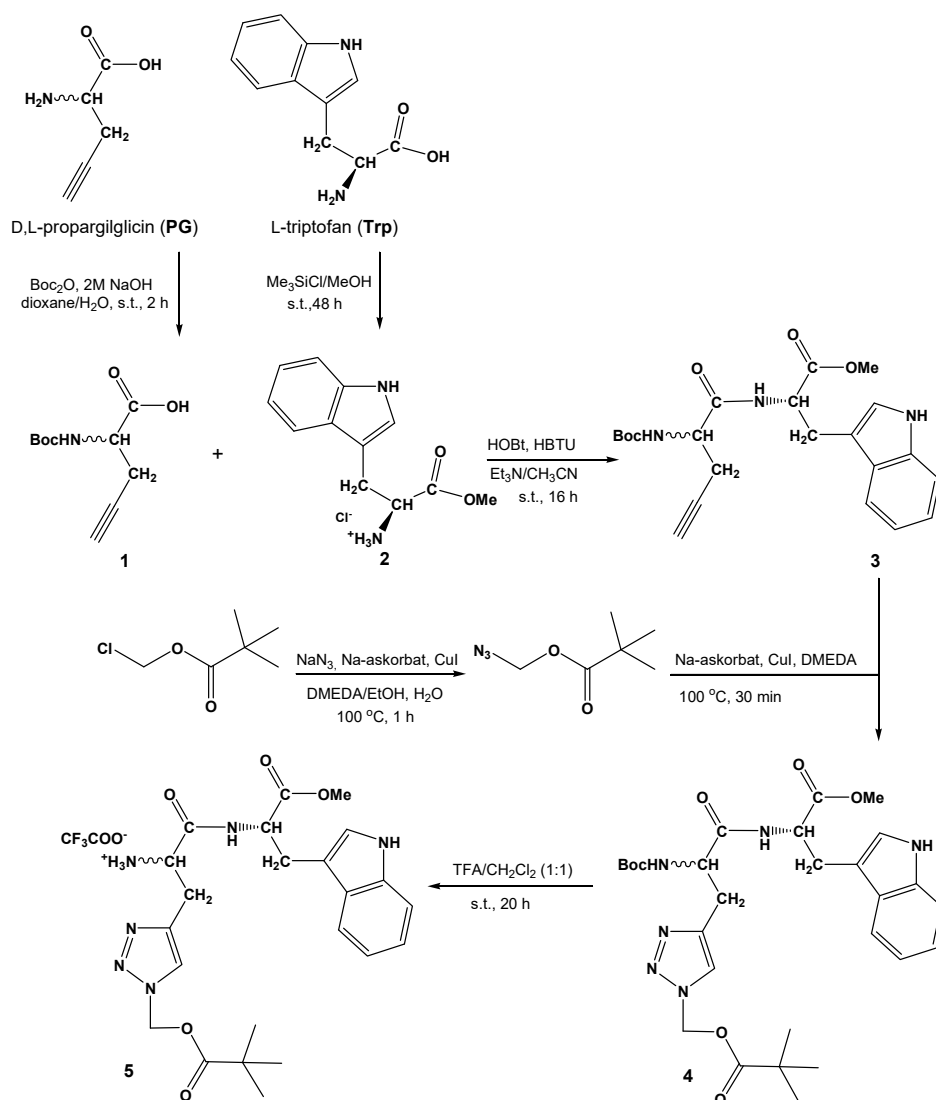
Shema 4. Plan sinteze WHW analoga

Nadalje, pripremljena su dva analogna peptida, u kojima je jedan triptofanski (W) fluorofor zamijenjen pirenima, dajući W-A(triazol)-Pyr motiv (Shema 6, **6** i **7**). Analog s pirenom koji je vezan fleksibilnom i dužom poveznicom (Shema 6, **6**) odgovara po broju atoma poveznice W-A(triazol)-W peptidu **10**; za razliku od kratke, krute poveznice (**7**), gdje je piren znatno bliži Cu(II) koordinacijskom mjestu. Odabir fluorofora temeljio se na osjetljivosti emisije pirena na mikrokruženje [13], a piren se intenzivno koristi za razna sondiranja DNA/RNA/proteina [14,15], kao i u teranostičkim agensima [16]. Također, piren-peptidni konjugati nedavno su učinkovito primijenjeni za fino detektiranje različitih sekvenci nukleinskih kiselina [111-113]. Posebno intrigantno svojstvo pirena za ovo istraživanje je sposobnost proizvodnje singletnog kisika nakon zračenja svjetlom [13], što bi, ukoliko se spojevi **6**, **7** vežu na DNA/RNA, moglo dovesti do foto-induciranog cijepanja DNA/RNA i posljedično do bioaktivnosti [114,115]. Mana pirena je pobuda svjetlom u UV dijelu spektra (oko 350 nm), što je nepoželjno u terapiji zbog štetnosti UV svijetla i slaboj prolaznosti kroz tkivo. No, uzimajući u obzir nedavni napredak u tehnikama dvofotonske apsorpcije (TPA) koje se primjenjuju za fotodinamičku terapiju (PDT) [116,117], pireni se sada mogu pobuditi i svjetlom na oko 700 nm, te tako primijeniti kao vrlo učinkoviti fotosenzibilizatori [115,116,117,118].

Sinteza W-A(triazol) dipeptida **5** izvedena je u pet koraka iz komercijalno dostupnih početnih materijala, D,L-propargilglicina (PG) i L-triptofana (Shema 5). Amino skupina D,L-propargilglicina zaštićena je poznatom metodom⁹² s di-*tert*-butil dikarbonatom uz NaOH i Boc-

zaštićeni PG **1** izoliran je u 97 %-tnom iskorištenju. Esterifikacija triptofana provedena je primjenom efikasne metode⁹³ s metanolom pomoću trimetilklorosilana i triptofan metil ester hidroklorid **2** izoliran je u 90 %-tnom iskorištenju. Boc-propargilglicin **1** i metilni ester triptofana **2** povezani su peptidnom vezom koristeći HBTU/HOBt reagens uz suvišak baze trietilamina u acetonitrilu. HBTU se koristi kako bi se aktivirala karboksilna kiselina, a HOBt reagens smanjuje vjerojatnost racemizacije i nastanak nusprodukata. Trp-A(alkin) dipeptid **3** izoliran je u iskorištenju od 71 %. Protonski NMR spektar dijastereomerne smjese **3** (D,L +L,L) pokazuje duplicirane signale u dijastereomernom omjeru 1:1 (vidi dodatne informacije Slika D.8.3b.: dva dublet signala za protone NH skupine na δ 8,31 i 8,25 ppm s ukupnim integralom 1H za oba signala; dva singlet signala za protone OCH₃ skupine na δ 3,58 i 3,55 ppm s ukupnim integralom 3H za oba signala).

U sljedećem koraku sintetiziran je 1,2,3-triazolni prsten cikloadicijskom reakcijom (CuAAC) iz alkina **3** s *in situ* pripremljenim azidom. U prvom stupnju reakcije azidacijom pivaloiloksimetil klorida (POM-Cl) uz natrijev azid i katalizatore CuI, natrijev askorbat i bazu *N,N'*-dimetiletildiamin (DMEDA) u smjesi EtOH/H₂O generiran je POM-N₃. Dobivenom azidu dodan je Trp-A(alkin) dipeptid **3** i dodatne količine katalizatora CuI, Na-askorbata i baze DMEDA. Zaštićeni dipeptid **4** izoliran je s visokim iskorištenjem od 87 %, a nakon uklanjanja zaštitne Boc skupine s TFA/CH₂Cl₂, W-A(triazol) **5** dobiven je u kvantitativnom iskorištenju.

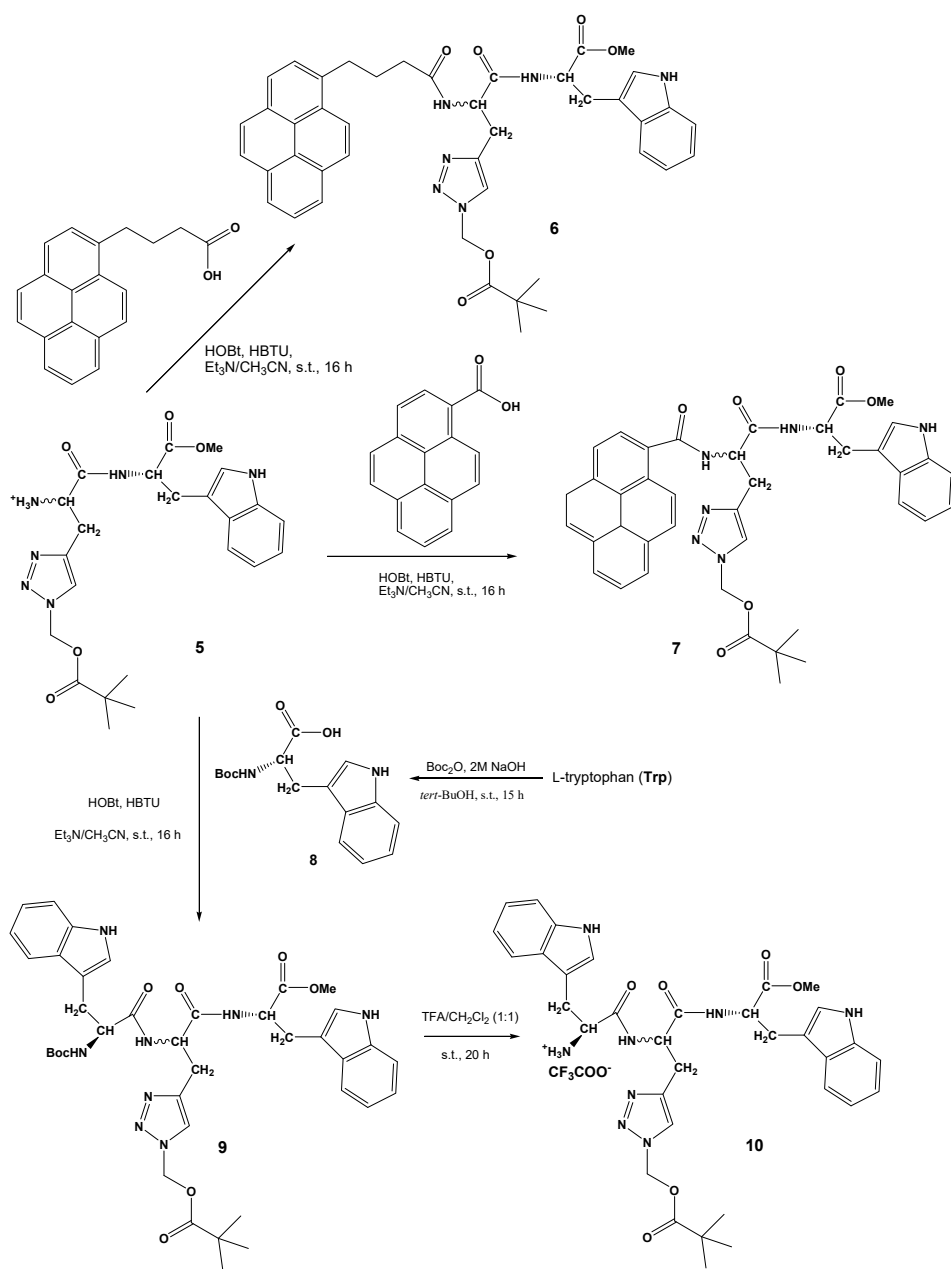


Shema 5. Sinteza dipeptida W-A(triazol) 5

Dipeptid W-A(triazol) 5 je pogodan međuprodukt za vezivanje drugih molekula, aminokiselina, aromata ili heteroaromata, a u našem slučaju za naknadnu nadogradnju s pirenima i triptofanom.

Počevši od spoja 5 sinteza se grana u tri smjera tvorbom peptidne veze (shema 6). Pireni su vezani na slobodnu amino skupinu dipeptida 5 s dužim, fleksibilnijim amidnim mostom i vrlo kratkim karboksamidnim mostom. Reakcija spajanja između W-(A)triazol dipeptida 5 i 1-pirenemaslačne ili 1-pirenekarboksilne kiseline u prisutnosti HBTU/HOBt reagensa i trietilamina u acetonitrilu dala je fleksibilni analog W-A(triazol)-Pyr 6 (66 %) i rigidni W-A(triazol)-Pyr 7 (64 %) u dobrim iskorištenjima.

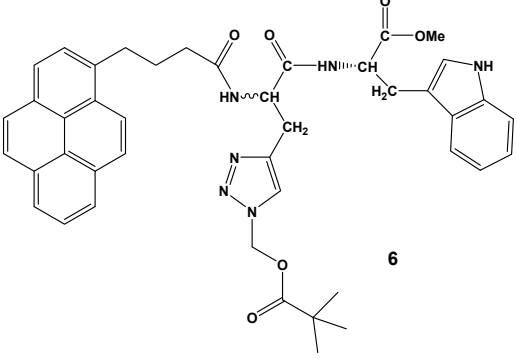
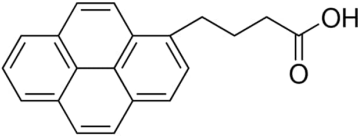
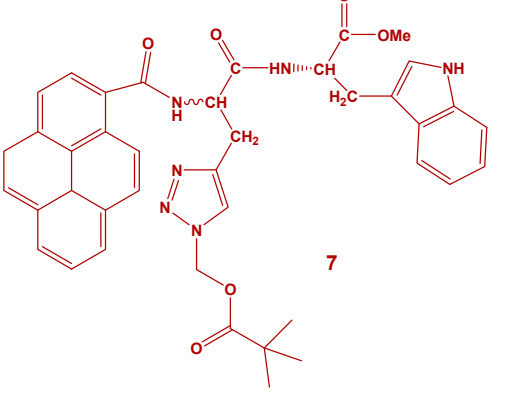
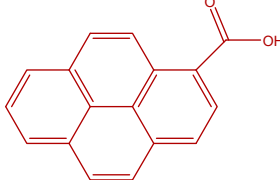
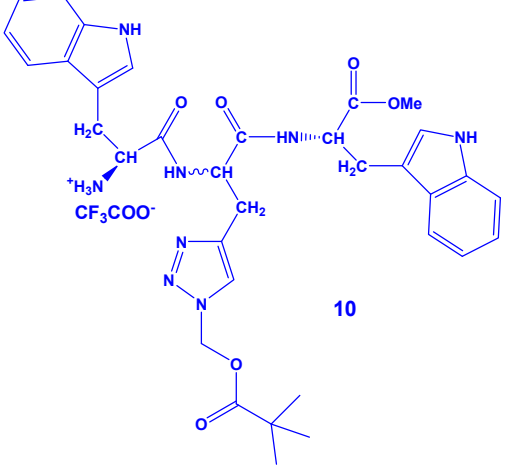
Za sintezu W-A(triazol)-W tripeptida **10** pripremljen je Boc-zaštićeni triptofan **8** (81 %), poznatom metodom iz L-triptofana i di-*tert*-butil dikarbonata uz vodenu otopinu NaOH u *tert*-butil alkoholu.⁹⁴ Tvorbom peptidne veze u reakciji Boc- L-Trp (**8**) i dipeptida **5** uz HBTU/HOBt reagensne i trietilamin u acetonitrilu izoliran je zaštićeni tripeptid **9** u dobrom iskorištenju od 63 %. Nakon uklanjanja zaštitne skupine s TFA/CH₂Cl₂ dobiven je željeni W-A(triazol)-W tripeptid **10** u odličnom iskorištenju (95 %).



Shema 6. Sinteza tripeptida 6, 7 i 10

4.1.2. Spektrofotometrijska karakterizacija analoga peptida WHW

Tablica 4. Strukture finalnih produktata **6,7 i 10** i njihovi referentni spojevi **A, B i Trp**

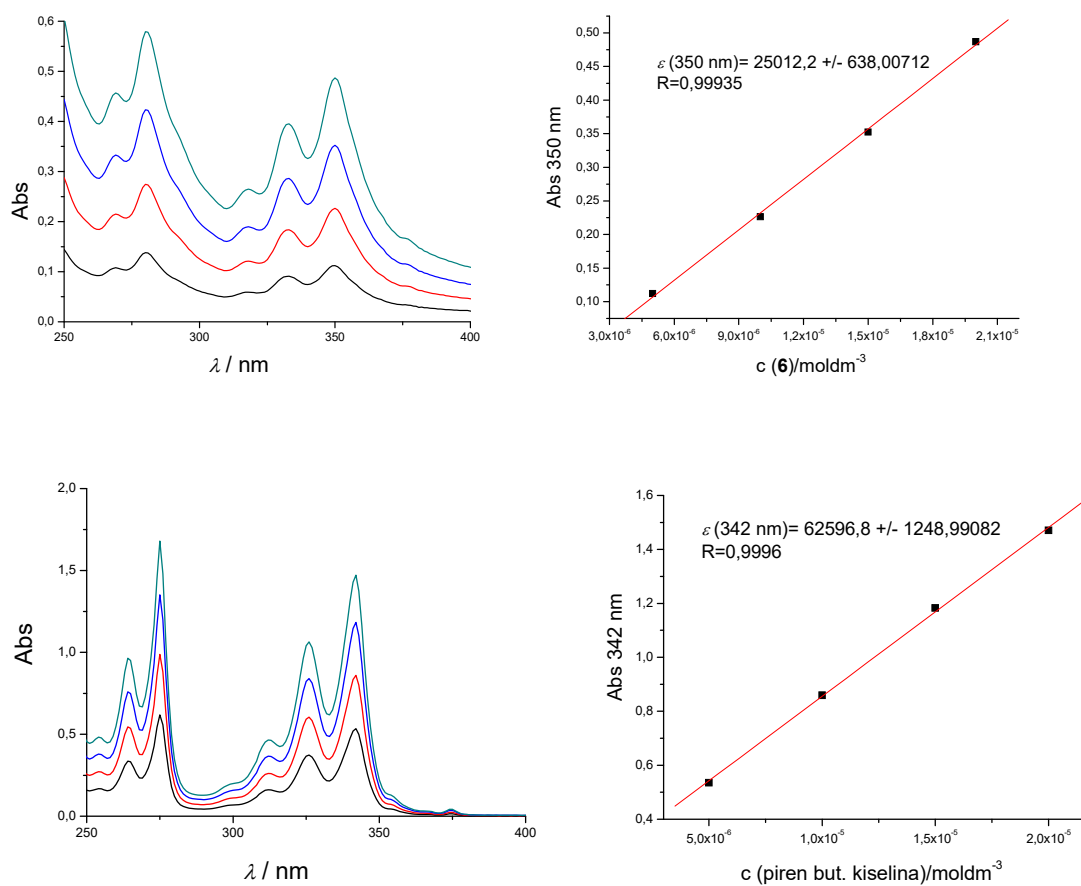
Finalni produkti	Referentni spojevi
 <p>Chemical structure of final product 6, featuring a tryptophan residue linked to a peptide backbone, which is further connected to a tryptophan residue and a tryptophan derivative. The structure includes a tryptophan side chain, a peptide backbone, and a tryptophan derivative.</p>	 <p>Chemical structure of reference compound A, which is 4-(5-hydroxytryptophan)butanoic acid.</p>
 <p>Chemical structure of final product 7, featuring a tryptophan residue linked to a peptide backbone, which is further connected to a tryptophan residue and a tryptophan derivative. The structure includes a tryptophan side chain, a peptide backbone, and a tryptophan derivative.</p>	 <p>Chemical structure of reference compound B, which is 5-hydroxytryptophan.</p>
 <p>Chemical structure of final product 10, featuring a tryptophan residue linked to a peptide backbone, which is further connected to a tryptophan residue and a tryptophan derivative. The structure includes a tryptophan side chain, a peptide backbone, and a tryptophan derivative.</p>	<p>Trp</p>

Ovisnost UV/vis ili fluorescencijskog spektra o koncentraciji spoja je jedna od najpouzdanijih indikacija postoje li intermolekulske interakcije između molekula ispitivanog uzorka.^{119, 120, 121} Ako graf ovisnosti nije linearan, to ukazuje da je došlo intermolekulskih interakcija, kao posljedice nastanka agregata. S druge strane, spoj koji ima više kromofora može dati koncentracijski linearan spektroskopski odgovor, no UV i/ili fluorimetrijske spektre bitno različite od referentnih kromofora (vidi tablicu 5) – što se može pripisati intramolekulskim interakcijama unutar iste molekule.

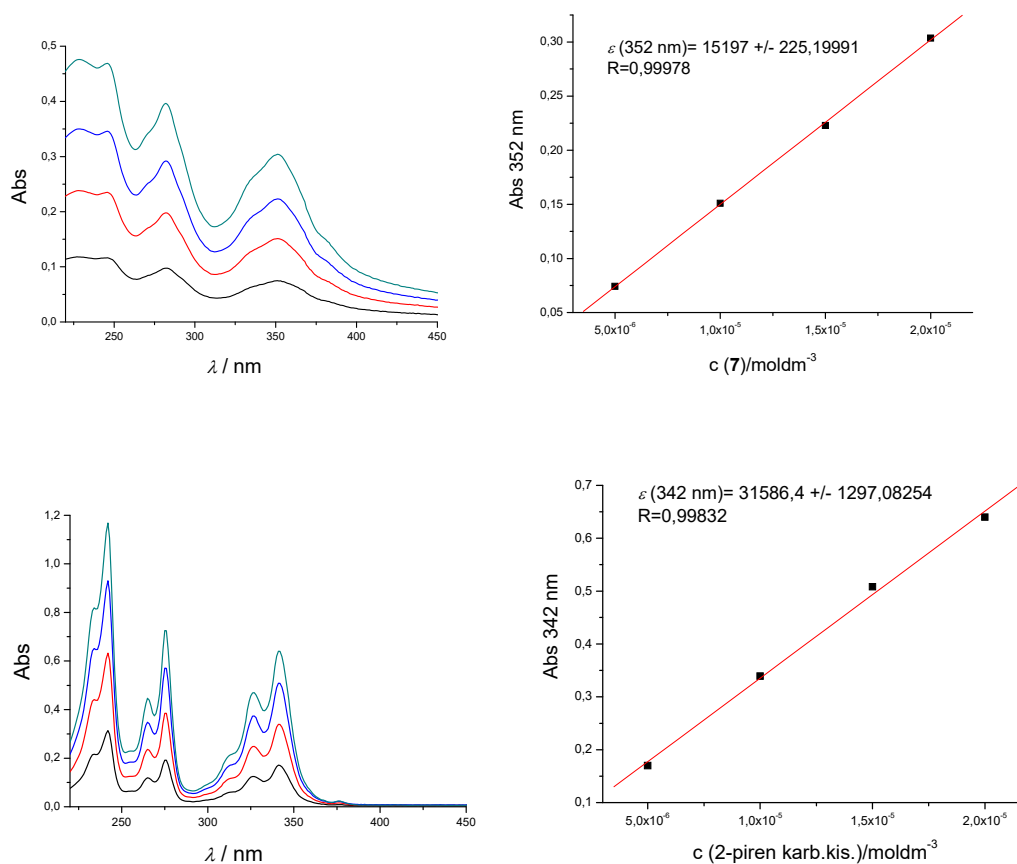
Apsorpcijski spektri kromofora u interakciji unutar agregata mogu biti bitno različiti u odnosu na spektre monomera. Ukoliko su uzrokovani aromatskim slaganjem kromofora, dolazi do batokromnog ili hipsokromnog pomaka apsorpcijske vrpce. Kod batokromnog pomaka govorimo o J-vrpce, odnosno J-agregatima, a kod hipsokromnog pomaka o H-vrpce, odnosno o H-agregatima (paralelno slaganje monomera). Batokromni pomak označava pomak vrpce prema većim valnim duljinama u apsorpcijskom i emisijskom spektru, naziva ga se i crvenim pomakom (engl. *red-shift*). Hipsokromni pomak je upravo suprotno, pomak vrpce prema manjim valnim duljinama u apsorpcijskom i emisijskom spektru, a naziva ga se i plavim pomakom (engl. *blue-shift*). Mnogi J-agregati pokazuju fluorescenciju i ona zna biti jača nego fluorescencija monomera, za razliku od H-agregata čija se fluorescencija uglavnom gasi. U apsorpcijskom spektru možemo primijetiti i hipokromni i hiperkromni pomak, odnosno smanjene apsorbancije i porast apsorbancije. Može biti više uzroka pojave ovih pomaka, a jedan od njih su i aromatske π - π interakcije.^{13, 122} π -interakcije slaganja između dva monomera pirena od koji je jedan piren u pobuđenom stanju mogu uzrokovati nastanak ekscimera, odnosno dimera u pobuđenom stanju (engl. *excimer*). Drugi slučaj je nastanak kompleksa u pobuđenom stanju – ekscipleks (engl. *exciplex*), gdje se npr. slaže jedan monomer pirena u pobuđenom stanju s nekim drugim aromatom. Valna duljina emisije ekscimera ili ekscipleksa pirena onda je pomaknuta prema značajno višim valnim duljinama, za oko 100 nm, znači s oko 400 nm (piren monomer) na oko 500 nm. Tako nastali ekscimer ili ekscipleks pirena je karakteriziran u vremenski razlučivom fluorescentnom eksperimentu bitno kraćim vremenima relaksacije.¹³

Ovdje ispitivani spojevi imaju UV i fluorescencijske spektre proporcionalne njihovim koncentracijama (Slike 22, 23, D8.12., D8.13., D.8.14.), što ne podržava intermolekularne interakcije. No UV i fluorescencijski spektri **6**, **7**, **10** se bitno razlikuju od spektara referentnih spojeva, što ukazuje na intramolekulske interakcije kromofora unutar iste molekule: konkretno

interakcije dvaju triptofana u spoju **10**, odnosno pirena i triptofana u spojevima **6** i **7**. Dodatno, izrazit pomak emisije spojeva **6** i **7** može se pripisati stvaranjem ekscipleksa intramolekulskim preklapanjem triptofana i pirena (pobuđenom stanju).¹²³



Slika 22. Ovisnost koncentracije ($5 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) spoja **6** (GORE) i njegovog referentnog spoja **piren butanske kiseline** (DOLJE) u natrijevom kakodilatnom puferu ($\text{pH} = 7$, $I = 0.05 \text{ mol dm}^{-3}$)



Slika 23. Ovisnost koncentracije ($5 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) spoja **7** i njegovog referentnog spoja **piren karboksilne kiseline** u natrijevom kakodilatnom puferu ($\text{pH} = 7,0$; $I = 0.05 \text{ mol dm}^{-3}$)

Apsorpcijski maksimumi i odgovarajući molarni apsorpcijski koeficijenti (ϵ), kao i valne duljine maksimuma fluorescencije, kvantna iskorištenja i podaci vremenski razlučive fluorescencije proučavanih spojeva prikazani su u tablici 5.

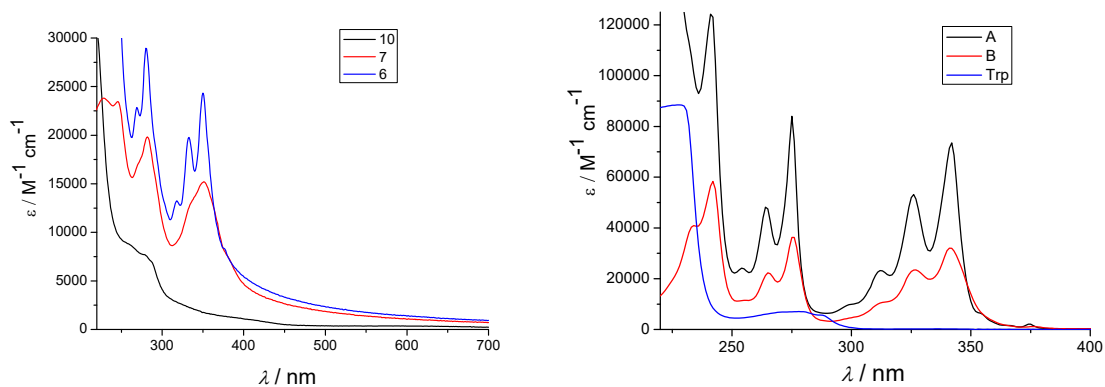
Tablica 5. Prikaz emisijskih i apsorpcijskih maksimuma, pripadajućih molarnih apsorpcijskih koeficijenata te vremena života (τ/ns) i kvantnog iskorištenja (ϕ_f) spojeva **10** i njegovog referentnog **aTrp** ¹³, **6** i referentne piren butanske kiseline **A** ¹³ te **7** i referentne piren karboksilne kiseline **B**. ¹³

Spoj	$\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	$\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	ϕ_f	$\lambda_{\text{exc}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$	τ/ns^b	χ^2
c							

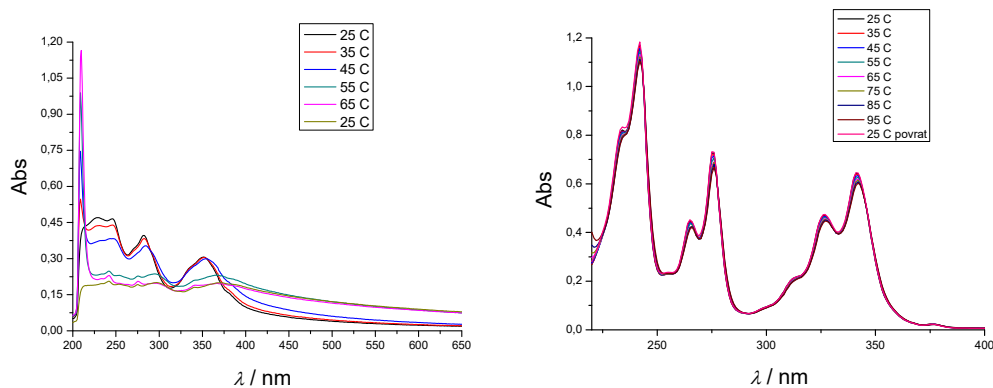
A (13)	342	62596±1248	0,15±0,02 _a	340	398	2,5 (1%) 100.3 (99,2%)	1,060
B (13)	341	31586±1297	0,16±0,03 _a	340	401	38,3 (-) 566,2 (-B)	1,207
6	350	25012±638	0,02±0,005 _d	340	472	11,6 (62 %) 36,4 (37%)	1,223
7	352	15197±225	0,08±0,001 _d	340	481	32,2 (100%)	1,286
Trp	295	5600	0,14±0,02 _a	280	366	_a 0,53 _a 3,1	-
10	295	8322±0,5	0,017±0,002 _d	280	360	0,96 (29%) 4,1 (71%)	1,091

^a Vidi referencu [13]; ^b vodene otopine propuhane su argonom; ^c Uzorci su pobuđeni pulsirajućim diodama pri 340 nm i pri 280 nm. Mjerenja su provedena tri puta i uzete su prosječne vrijednosti. Pogreške odgovaraju maksimalnom apsolutnom odstupanju; ^d Apsolutno kvantno iskorištenje fluorescencije određeno je uz pomoć integrirane sfere SC-30, Edinburgh Inst., za otopine propuhane argonom, za $\lambda_{exc} = 353$ nm.

Već pri pogledu na UV/vis spektre (slika 24) mogu se vidjeti značajne razlike između sintetiziranih spojeva **6**, **7** i **10** i njihovih referentnih spojeva (piren karboksilnih kiselina **A** i **B** te aminokiseline **Trp**) koje sugeriraju interakcije intramolekulskog aromatskog slaganja (engl. *stacking*) u peptidima, kao što je već spomenuto na početku poglavlja. Kod peptida **6** (duga i fleksibilna poveznica) se kao i kod ostalih može primijetiti hipokromni efekt, odnosno smanjenje apsorbancije, uzrokovano upravo aromatskim slaganjem, ali za razliku od peptida **7**, UV/vis spektar **6** je zadržao vibronsku strukturu pirena u rasponu od 300 – 360 nm. Temperaturne promjene kod referentnih spojeva nisu uzrokovale nikakve promjene u UV/vis spektrima, za razliku od spojeva **6,7** i **10** (slika D.8.11.), gdje dolazi do vidljivih promjena, opet upućujući na intramolekulsko aromatsko slaganje.



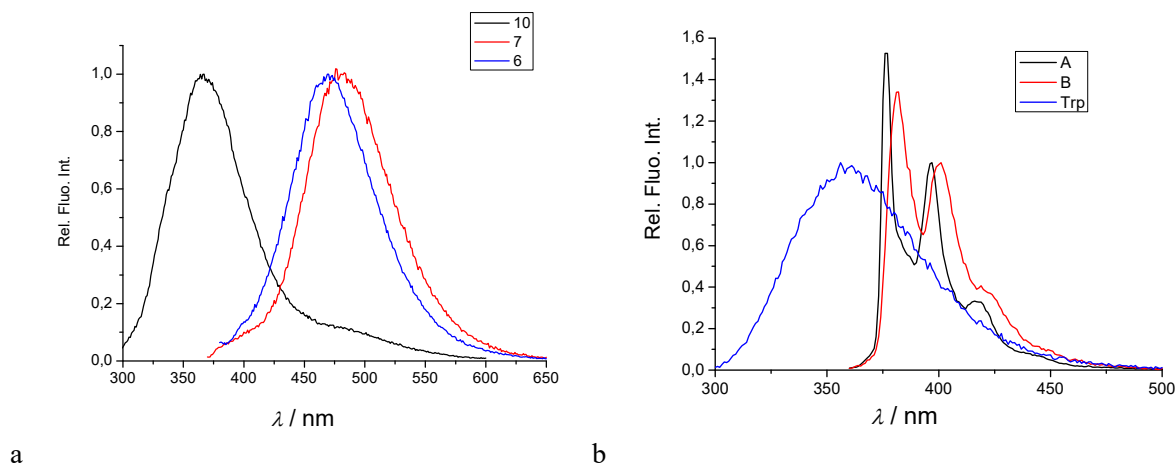
Slika 24. UV/vis spektar ispitivanih peptida i njihovih referentnih spojeva



Slika 25. Temperaturna ovisnost UV/vis spektar peptida **7** i referentne piren karboksilne kiseline **B** ($c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u natrijevom kakodilatnom puferu ($I = 0,05 \text{ M}$, $\text{pH} = 7$).

Ekscitacijski spektri odgovaraju UV spektrima, što ukazuje kako je isti kromofor odgovoran i za emisiju i apsorpciju svjetlosti. Spektri fluorescencije peptida **6**, **7** i **10** znatno se razlikuju od spektara odgovarajućih referentnih spojeva (slika 26) što i dalje sugerira aromatsko slaganje. Najvjerojatnije je došlo do interakcije triptofana i pirena kod spojeva **6** i **7**, odnosno između dva triptofana kod spoja **10**. Iz emisijskih spektara može se vidjeti hipsokromni pomak kod peptida **10** i pojava proširenog signala na $\lambda > 450 \text{ nm}$ (slika 26), što se može pripisati slaganju ekscimera triptofana, odnosno intramolekulska aromatska interakcija dva triptofana od kojih je jedan od njih u pobuđenom stanju. Emisijski spektri **6** i **7** su batokromno pomaknuti za $\Delta\lambda \sim 100 \text{ nm}$ naspram emisije referentnih pirena **A** i **B**, a i fino vibronsko cijepanje, koje se može primijetiti kod **A** i **B**, je nestalo. Snažna emisija **6** i **7** na oko 480 – 500 nm mogla se prepisati ili nastanku ekscimera, [13,111](#)

intermolekulskim preklapanjem dva pirena ili nastankom ekscipleksa,¹²⁴ intramolekulskim preklapanjem pirena i triptofana, jer je emisija samog pirena između 375-405 nm.¹²⁵ Kako je njihova emisija bila proporcionalna njihovoj koncentraciji, može se zaključiti da je došlo do formiranja ekscipleksa. (Slika D.8.12., D.8.13., D.8.14.)



Slika 26. a) Normalizirani spektri fluorescencije spojeva **6** ($\lambda_{exc} = 352$ nm), **7** ($\lambda_{exc} = 350$ nm) i **10** ($\lambda_{exc} = 295$ nm) u vodi (0,01 % DMSO); b) Normalizirani spektri fluorescencije referentnih spojeva 1-pirenbutanske kiseline **A** ($\lambda_{exc} = 342$ nm) i pirenkarboksilne kiseline **B** ($\lambda_{exc} = 341$ nm) i aminokiseline **Trp** ($\lambda_{exc} = 295$ nm) u vodi. Normalizacija je provedena dijeljenjem cijelog spektra s maksimalnim intenzitetom emisije.

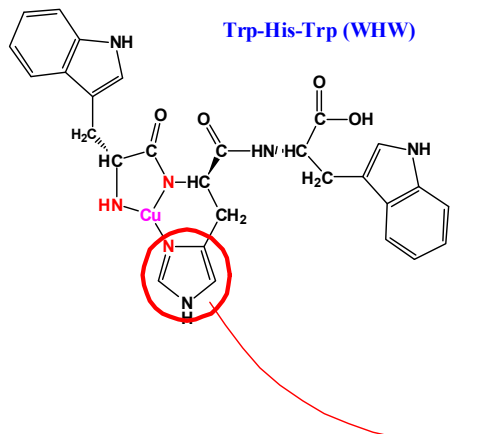
Određena kvantna iskorištenja (ϕ_f) pri sobnoj temperaturi (25 °C) uz pomoć integrirane sfere SC-30 Edinburgh FS5 spektrometra bila su za peptidoide **6** i **7** bitno niža od referentnih pirena **A** i **B** (tablica 5), što se može pripisati intramolekulskim interakcijama fluorofora, koje olakšavaju neradijativnu relaksaciju.

Određena vremena života metodom vremenski koreliranog pojedinačnog brojanja fotona (engl. *time-correlated single photon counting*, TCSPC) uz prisustvo kisika i bez prisustva kisika u vodenim otopinama. Otopine bez prisustva kisika pripremljene su neposredno prije mjerenja, na način da je kiveta s vodenom otopinom propuhana argonom u trajanju od pola sata. Iz vremena života (τ) dobivenih za bis-Trp **10**, nakon uklanjanja kisika u otopini i uz prisutnost kisika, može se vidjeti sličan dvo-eksponencijalni emisijski profil, koji pokazuje da prisutnost kisika ne utječe značajno na vrijeme života fluorofora kod **10**. Referentni Trp također karakterizira dvo-

eksponencijalno vrijeme života, gdje druga, dulje živaća vrsta ($\tau = 3$ ns) je kraća nego ona kod bis-Trp **10** ($\tau = 4$ ns). Kod vremena života pirenskih analoga, veći utjecaj imala je pirenska emisija nad triptofanom, zbog veće apsorpcije pirena. Vremena života pirenskih analoga **A**, **B**, **6** i **7** nije bilo osjetljivo na kisik (Slike D.8.18.-D.8.21.), dajući dvoeksponencijalni profil vremena života. Jedini s mono-eksponencijalnim profilom vremena života primijećeni su kod **7** u odsutnosti kisika i kod **A** u prisutnosti kisika, a razlog je vjerojatno niski udjel druge emisijske vrste. Vrijeme života fluorescencije **6** i **7** se prilično razlikuje od njihovih referentnih spojeva **A** i **B**, upravo zbog već spomenutog stvaranja ekscipleksa pirena kod **6** i **7**. S obzirom da piren ima dugačko vrijeme poluživota (~ 400 ns)¹³, što se i može vidjeti u tablici 1. za referentne spojeve **A** i **B**, zbog formiranja ekscipleksa kod **6** i **7**, njihovo vrijeme života je smanjeno.

4.1.3. Vežanje Cu^{2+} kationa na analoge peptida WHW

Sukladno diskusiji u poglavlju 4.1.1. i shematskom prikazu slike 27, novosintetizirani spojevi **6**, **7** i **10** tvore komplekse s $\text{Cu}(\text{II})$ kationom u vodenom mediju s biorelevantnim konstantama stabilnosti. Emisija pirena novosintetiziranih peptida **6**, **7**, isto kao i bis-triptofanskog analoga **10** je djelomično ugašena vežanjem Cu^{2+} , no spektri su zadržali svoj oblik i emisijski maksimum (Slika 28). U referentnom eksperimentu s WHW emisija triptofana je u potpunosti ugašena s Cu^{2+} , vjerojatno zbog relativno niske pK_a vrijednosti imidazolnog dušika (N_{im}) na histidinskom bočnom lancu ($\text{pK}_a \sim 6,0$)³⁸ drugačije koordinira Cu^{2+} i intereagira s fluoroforima u usporedbi s triazolom u **10**.



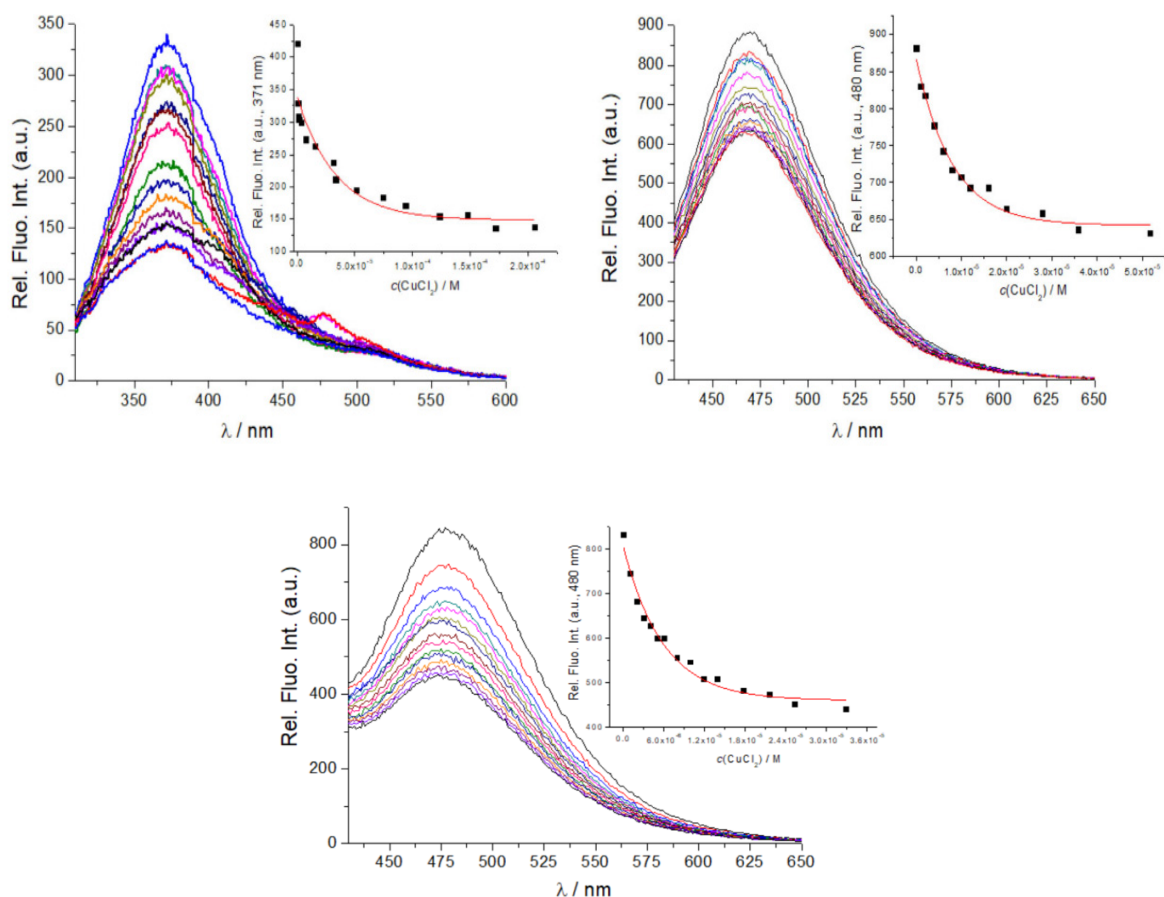
Slika 27. Usporedba peptida WHW sa novოსintetiziranim Trp-Ala(triazol-R)-Trp **10**, njegov bliski analog **6** (duljina pirenskog linkera odgovara linkeru spoja **10** za Trp) i kratki i rigidni pirenski analog **7**.

Obrada podataka titracija (promjene u cijelom spektru) metodom multikomponentne nelinearne regresije (SpecFit)^{96,97,126} dala je najbolje s eksperimentalnim podacima za stehiometriju spoj:Cu²⁺ = 1:1, dajući snažne konstante vezanja ($\log K_s$). Zanimljivo, dobivena stehiometrija 1:1 se razlikuje od srodnog FRH tripeptida¹¹⁰ gdje nastaju peptid:Cu²⁺ stehiometrije 2:1 i 1:1 i 1:2.

Afinitet vezanja analoga **10** ($\log K_s = 5,2 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$) je za red veličine niži nego afinitet pirenskih analoga **6** ($\log K_s = 6,9 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$) i **7** ($\log K_s = 6,8 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$).

Vrijeme života fluorescencije za pirenske analoge **6** i **7** nije se značajno promijenilo nakon dodatka Cu²⁺ kationa, npr. za spoj **6** τ_1 iznosi 2,68 ns, a τ_1 iznosi 2,24 ns, a za spoj **7** τ_1 iznosi 2,54 ns, a nakon dodatka Cu²⁺ kationa τ_1 iznosi 2,77 ns, što upućuje na statički mehanizam gašenja fluorescencije (Tablica D.1.). Kod statičkog mehanizma gašenja fluorescencije dolazi do nastanka

nefluorescirajućeg kompleksa u osnovnom stanju između fluorofora i gasitelja (engl. *quencher*), a kompleks se pri apsorpciji svjetlosti vraća u osnovno stanje bez emisije fotona. ¹³ Fluorofori koji su dio kompleksa ne fluoresciraju, a promatrana fluorescencija dolazi od fluorofora koji nisu dio kompleksa, te vrijedi $\tau_0/\tau = 1$.



Slika 28. Fluorimetrijska titracija spoja **10** ($c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$; $\lambda_{\text{exc}} = 295 \text{ nm}$) s CuCl_2 . Umetnuto: Ovisnost fluorescencije pri $\lambda_{\text{max}} = 371 \text{ nm}$ o $c(\text{CuCl}_2)$ (LIJEVO); Fluorimetrijska titracija spoja **6** ($c = 1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$; $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$) s CuCl_2 . Umetnuto: Ovisnost fluorescencije pri $\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ nm}$ o $c(\text{CuCl}_2)$. Fluorimetrijska titracija spoja **7** ($c = 1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$; $\lambda_{\text{exc}} = 352 \text{ nm}$) s CuCl_2 . Umetnuto: Ovisnost fluorescencije pri $\lambda_{\text{max}} = 480 \text{ nm}$ o $c(\text{CuCl}_2)$. (DOLJE); Provedeno pri $\text{pH} = 7,0$ u natrijevom kakodilatnom puferu, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$.

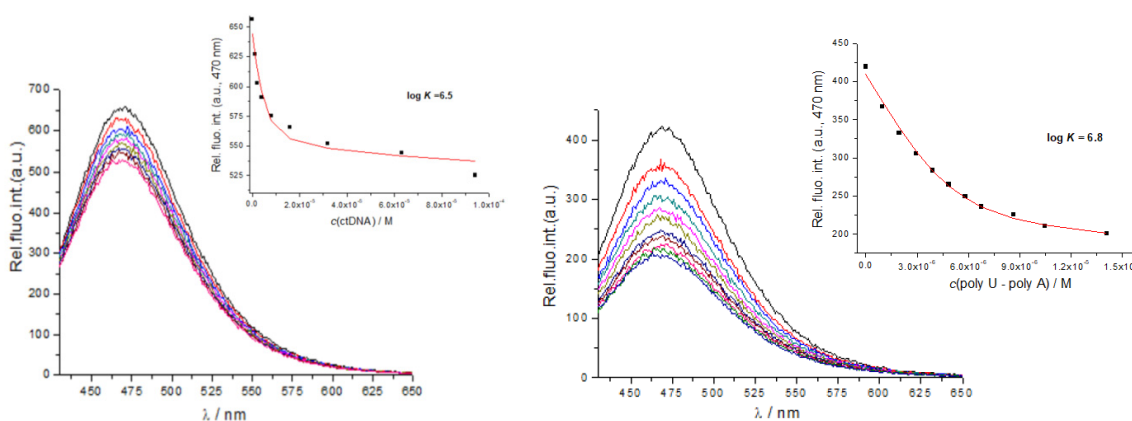
4.1.4. Interakcije analoga peptida WHW s ds-DNA i ds-RNA u prisutnosti/odsutnosti Cu^{2+} kationa

Interakcije analoga peptida WHW ispitane su s *ct*-DNA, tipičnog predstavnika B-uzvojnice⁵¹ koja se sastoji od podjednakog udjela AT i GC parova baza (58 % GC parova baza) i sintetske poli rA – poli rU (RNA) tipičnog predstavnika A-uzvojnice. Ispitivanja su provedena metodama fluorescencijske spektroskopije, cirkularnog dikroizma, temperaturnog mekšanja, kompeticijskim eksperimentima s poznatim DNA-vežućim malim molekulama.

4.1.4.1. Fluorimetrijske titracije

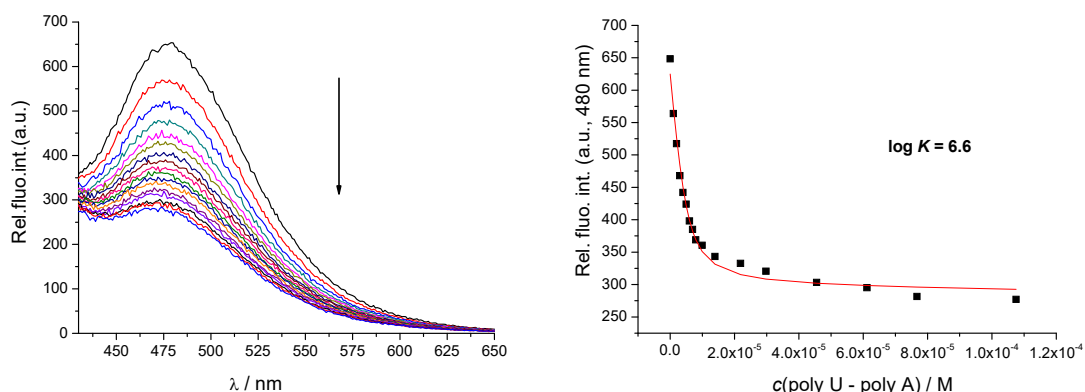
Svi ovdje ispitivani analozi WHW, kao i nativni WHW, su fluorescentni, što je omogućilo provedbu fluorimetrijskih titracija na način da su peptidu dodavani mali alikvoti ishodnih otopina DNA ili RNA, te su mjerene promjene emisije fluorofora.

Dodatak ds-DNA/RNA bilo kojem od sintetiziranih peptida rezultirao je gašenjem fluorescencije. Za spojeve **6** i **7** s dodavanjem *ct*-DNA primijećeno je slabije gašenje fluorescencije (22 % i 12 %) nego što je slučaj s dodavanjem poli rA poli rU gdje je gašenje prilično veliko (52 % i 61 %) (Slike 29 i 30). Razlog može biti samo vezno mjesto RNA (veliki utor RNA uzak je i bitno dublji u usporedbi s malim utorim DNA) (tablica 3)^{50,51}, što više odgovara ispitivanim spojevima. Kod titracije s poli rA-poli rU može se primijetiti i mali hipsokromni pomak emisije (slika 29 desno), iz čega možemo pretpostaviti stvaranje H-agregata.



Slika 29. Fluorimetrijska titracija spoja **6** ($c = 1 \times 10^{-6}$ mol dm^{-3} ; $\lambda_{\text{exc}} = 350$ nm) s *ct*-DNA (lijevo) i poli A – poli U (desno). Umetnuto: Ovisnost intenziteta emisije pri $\lambda_{\text{max}} = 470$ nm o

$c(\text{polinukleotid})$, izračunato prema Scatchardovoj jednadžbi ^{100,101} (pH = 7,0 u natrijevom kakodilatnom puferu, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$).



Slika 30. Fluorimetrijska titracija spoja **7** ($c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$; $\lambda_{\text{exc}} = 352 \text{ nm}$) s poli rA – poli rU (lijevo); Ovisnost intenziteta emisije pri $\lambda_{\text{max}} = 480 \text{ nm}$ o $c(\text{polinukleotid})$, izračunato prema Scatchardovoj jednadžbi ^{100,101} (pH = 7,0 u natrijevom kakodilatnom puferu, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$).

Podaci titracija su obrađeni uz pomoć nelinearne regresije na Scatchardovu jednadžbu, dajući konstante stabilnosti nastalih kompleksa i Scatchardove omjere n [vezani ligand] / [polinukleotid] (tablica 6) Iz tablice se može vidjeti da je analog **10**, dao slične konstante vezanja kao i sam peptid WHW, što ukazuje da je triazol uspješno zamijenio histidin u peptidu WHW. Pirenski analozi **6** i **7** pokazali su skoro 2 reda veličine veći afinitet prema ds-polinukleotidima, nego bis-Trp analog **10**. To ukazuje na važnost pirena u vezanju na DNA/RNA i stvaranje novih veznih interakcija.

Tablica 6. Konstante vezanja ($\log K_s$)^a dobivene iz fluorimetrijskih titracija liganada **6**, **7** i **10** s *ct*-DNA i poli rA – poli rU, pri pH = 7,0 (natrijev kakodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$).

Spoj	<i>ct</i> -DNA	poli rA – poli rU
6	6,5	6,8
7	6,8	6,6
10	4,6	-
WHW	4,1	-

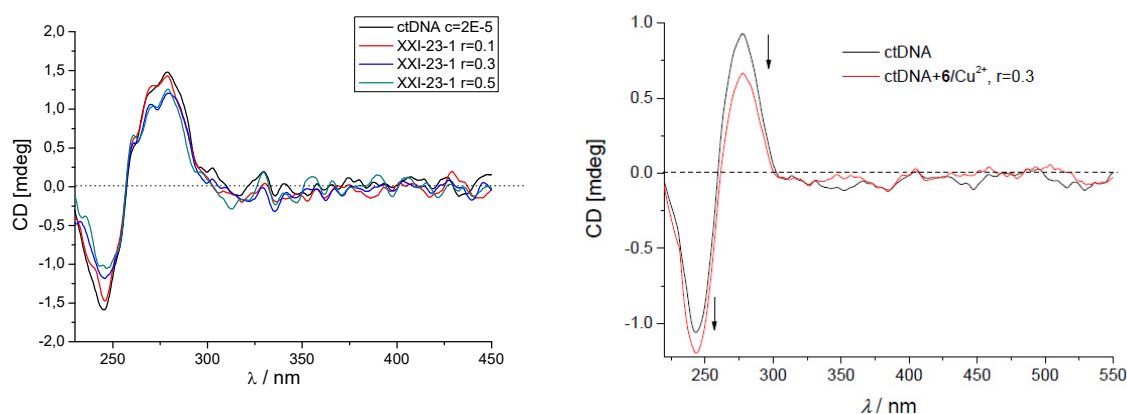
^a Podaci su obrađeni korištenjem Scatchardove jednadžbe ^{100,101} i dobiveni su omjeri n [vezani ligand] / [polinukleotid] = 0,1 i 0,3. Sve K_s vrijednosti su ponovno izračunate za fiksni $n = 0,2$. Korelacijski koeficijenti su $>0,99$ za sve izračunate vrijednosti $\log K_s$.

Kako navedeni peptidi tvore komplekse s Cu^{2+} (poglavlje 4.1.3.), pripremljeni su kompleksi spojeva **6** i **7** s četiri puta više Cu^{2+} kationa (kako bi prema utvrđenim $K_s > 90\%$ peptida bilo u formi bakrenog kompleksa). Tada je otopina takvog metalnog kompleksa titrirana s ds-DNA/RNA, no promjene emisije pirena nisu bile značajne, s razlogom što je već pri samom dodatku Cu^{2+} kationa fluorescencija bila djelomično ugašena. Dodatak RNA je uzorkovao nešto jače gašenje, ali i dalje nedovoljno za točno određivanje konstanti stabilnosti, dozvoljavajući samo procjenu afiniteta u području $\log K_s = 5 - 6 \text{ M}^{-1}$.

4.1.4.2. Cirkularni dikroizam

Sama metoda detaljnije je objašnjena u teorijskom uvodu,¹²⁷ a u ovim istraživanjima koristili smo ju kako bi saznali više o konformacijskim promjenama sekundarne strukture polinukleotida nakon vezanja liganda, te za procjenu načina vezanja liganda na polinukleotid. Na primjer, ovisno o tome je li spoj interkalator ili se veže u utore, mogao bi se pojaviti odgovarajući inducirani CD spektar (ICD) pirena iznad 300 nm.

Spojevi **6**, **7** i **10** su kiralni, ali u ispitivanim koncentracijama nisu dali vidljivi CD spektar u području između 240 i 400 nm (Slika D.8.16.) Razlog zašto nisu dali CD spektar je jer imaju racemičnu aminokiselinu, a piren kao jedini kromofor koji apsorbira $>300 \text{ nm}$, je udaljen od asimetričnog centra.



Slika 31. Lijevo: CD titracija *ct*-DNA sa spojem **6** pri molarnom omjeru $r = [\mathbf{6}] / [ct\text{-DNA}]$; Desno: CD titracija *ct*-DNA s kompleksom **6**/ Cu^{2+} pri molarnom omjeru $r = [\mathbf{6}] / [ct\text{-DNA}] = 0,3$ (pH = 7,0 u natrijevom kakodilatnom puferu, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$).

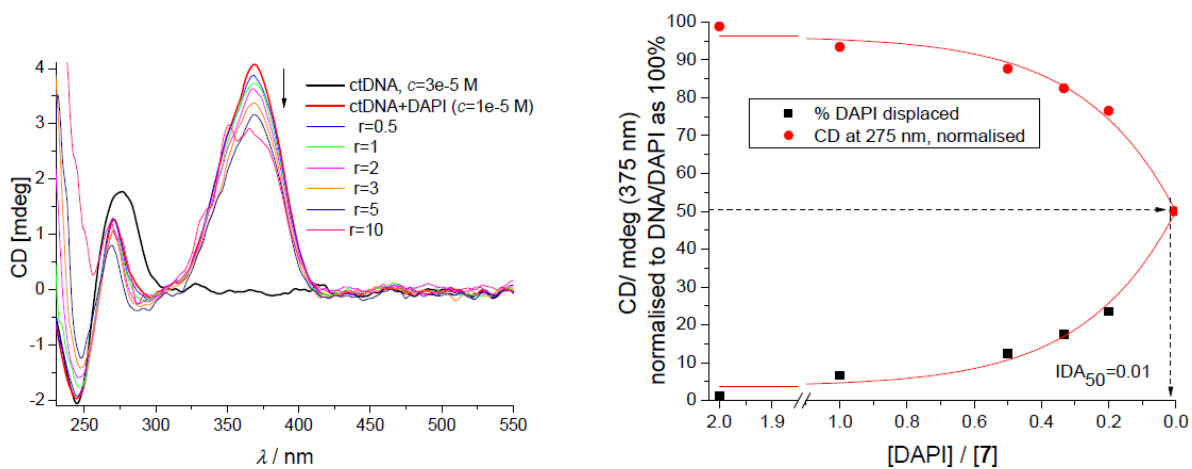
Dodatak spojeva **6**, **7** i **10** bilo kojem ds-DNA ili ds-RNA (slika 31, slika D.8.17.) nije uzrokovao značajnu promjenu CD spektra polinukleotida, što ukazuje da je sekundarna struktura DNA/RNA sačuvana te ne podupire klasično interkaliranje aromata (pirena) između parova baza. Naime, razmicanjem parova baza DNA/RNA po interkaliranju, dvostruka uzvojnica bi se trebala značajno odвити i produljiti,¹²⁸ što obično rezultira značajnim smanjenjem intenziteta CD spektra polinukleotida.

Dodatno, pri dodatku spojeva **6** ili **7** u otopine DNA/RNA nisu se pojavile inducirane CD vrpce iznad 300 nm, što upućuje na neujednačenu orijentaciju pirenskog kromofora prema kiralnoj osi polinukleotida.

Također su ispitane i interakcije s prethodno pripremljenim kompleksima **6**/Cu²⁺, **7**/Cu²⁺ i **10**/Cu²⁺ koji također nisu uzrokovali značajne promjene u ds-DNA/RNA CD spektru i bez ICD vrpce iznad 300 nm. Može se zaključiti da vezanje analoga peptida WHW ili njihovih kompleksa na polinukleotid ne uzorkuje značajne promjene u spiralnoj strukturi zbog vezanja u mali utor ds-DNA ili veliki utor ds-RNA.¹²⁷

Za potvrdu načina vezanja, proveden je i kompeticijski eksperiment istiskivanja DAPI-ja, mele molekule poznate po tome da se veže u mali utor AT-DNA i pri tome daje vrlo jaki inducirani CD signal u području $\lambda = 300 - 400$ nm.¹²⁹ Odabrana metoda eksperimenta je bio cirkularni dikroizam, kao metoda neovisna o fluorescenciji, jer je potonja nepogodna zbog preklapanja valnih duljina pobude sintetiziranih spojeva i DAPI-ja.

Prvotno pripremljeni kompleks DAPI/AT-DNA, karakteriziran jakim ICD signalom na 375 nm, je titriran sa spojevima **6** i **7**, što je uzrokovalo nestanak DAPI ICD vrpce (Slika 32, lijevo). Iz tog se može zaključiti kako **6** i **7** vrlo efikasno istiskuju DAPI iz manjeg utora AT-DNA, te je time potvrđeno mjesto vezanja novih peptida i po analogiji i WHW analoga. Obrada rezultata kompeticijskog eksperimenta izračunavanjem IDA50% vrijednosti,¹³⁰ (između 0,02 – 0,01), i uzimanjem u obzir poznate konstante vezanja DAPI, omogućuje procjenu afiniteta spojeva, koja je u skladu s vrijednostima prikazanim u tablici 6. IDA50% vrijednosti za spoj **10** su manje od **6** i **7**, što je i očekivano prema već izračunatim konstantama stabilnosti **10** (tablica 6).



Slika 32. Promjene u induciranom CD spektru DAPI-ja na 375 nm ($c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) od kompleksa s *ct*-DNA ($c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) pri dodatku **7** (pH = 7,0 u natrijevom kacidilatnom puferu, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$). Postotak istisnutog DAPI-ja spojem **7** je izračunat, a IDA50% vrijednosti predstavljaju omjer $r = [\text{DAPI}]/[\mathbf{7}]$ pri kojem je 50% ICD375 vrpce ugašeno u odnosu na slobodnu *ct*-DNA.

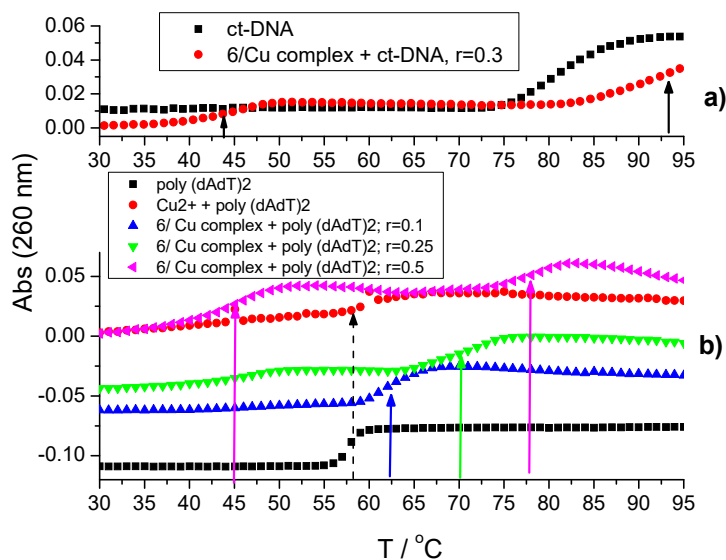
4.1.4.3. Temperaturno mekšanje dvolančanih DNA i RNA

Promjene vrijednosti temperaturnog mekšanja dvolančanih DNA i RNA u prisustvu ispitivanih spojeva mogu nam dati dodatne informacije o načinu vezanja sintetiziranih analoga peptida WHW.¹⁰² S obzirom da male molekule mogu stabilizirati dvostruku uzvojnici DNA, te tako povisiti njezinu temperaturu mekšanja, razlika tih dviju temperatura (ΔT_m) može otkriti je li naš spoj interkalator, veže li se u utore ili je u pitanju nespecifično vezanje.

Eksperimenti su pokazali kako spojevi **6**, **7** i **10** ne stabiliziraju dvostruku uzvojnici DNA, RNA (Slika D.8.22.), što upućuje na nespecifično vezanje u utore i isključuje interkalaciju kao način vezanja.

No, odgovarajući eksperimenti s prethodno pripravljenim kompleksima spojeva s Cu^{2+} pokazali su kako takvi kompleksi značajno utječu na temperaturnu stabilnost ds-DNA i ds-RNA (slika D.8.23.). Kontrolni pokus je ukazao kako dodatak iste količine samog Cu^{2+} u ds-DNA/RNA nije imao nikakav utjecaj na temperaturu mekšanja polinukleotida. Dodatak **7**/ Cu^{2+} kompleksa s kratkom poveznicom doveo je do male stabilizacije ds-DNA/RNA (slika D.8.23.), dok je kompleks **6**/ Cu^{2+} s fleksibilnijom poveznicom doveo do velikih promjena u temperaturi mekšanja (slika 33). S

obzirom da je *ct*-DNA stabilizirana preko mjernih sposobnosti metode ($T_m > 100\text{ }^\circ\text{C}$, tablica 6), proveden je i dodatan eksperiment s poli (dAdT)₂ i **6**/Cu²⁺ kompleksom kako bi se detaljnije proučila stabilizacija (slika 33). Rezultati ukazuju kako omjer $r = \mathbf{6}/\text{Cu}^{2+} : \text{AT-DNA}$ značajno utječe na iznos i tip stabilizacije dvolančanog polinukleotida. Naime, u suvišku AT-DNA ($r = 0 - 0.25$) stabilizacijski prijelaz je jednostupanjski i nelinearno se povećava sa zasićenjem na oko $r = 0,3$ (u skladu sa Scatchard omjerom n u tablici 7). To se može pripisati vezanju **6**/Cu²⁺ u mali utor AT-DNA pri čemu Cu²⁺ kation nije u potpunosti 'umetnut' u strukturu peptida te jednim koordinacijskim mjestom može stvarati dodatne interakcije s negativno nabijenom fosfatnom okosnicom ili nukleobazama, uzrokujući značajnu stabilizaciju dvostruke uzvojnice DNA/RNA. Suvišak **6**/Cu²⁺ ($r = 0,5$) doveo je do nastanka dvostupanjske krivulje, odnosno do snažne stabilizacije i destabilizacije, što ukazuje na dodatni način vezanja u tim uvjetima, koji destabilizira dvostruku uzvojnici DNA.



Slika 33. Krivulje temperature mekšanja od: a) *ct*-DNA ($c(\text{ct-DNA}) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $r_{[\mathbf{6}/\text{Cu}]/[\text{ctDNA}]} = 0,25$ i b) poli (dAdT)₂ ($c(\text{AT-DNA}) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $r_{[\mathbf{6}/\text{Cu}]/[\text{poli(dAdT)}_2]} = 0,1; 0,25; 0,5$ pri pH = 7,0 (natrijev kakodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$).

Dodatak kompleksa **6**/Cu²⁺ ds-RNA doveo je samo do stabilizacije (tablica 7), što znači da su dvostupanjske krivulje karakteristične samo za ds-DNA. Razlog tome može se objasniti strukturom polinukleotida. Male molekule se većinom nekovalentno vežu u mali utor DNA ili u veliki utor

RNA.¹³¹ Veliki utor RNA kao što je već spomenuto je uzak i dubok, dok je mali utor DNA bitno plići i širi (tablica 3). Nastali kompleks **6**/Cu²⁺ duboko se umetnuo u veliki utor RNA i nakon stabilizacije uzrokovane Cu²⁺ nije mogao imati utjecaja na destabilizaciju same uzvojnice pri povišenju temperature, jer je bio udaljen od negativno nabijene fosfatne okosnice. Kada se isti kompleks vezao u mali utor DNA, koji je nešto plići, kompleks je također stabilizirao uzvojnica, zahvaljujući Cu²⁺ još jače, jer je bakreni kation sada bio bliže negativno nabijenoj fosfatnoj okosnici i mogao je sudjelovati u elektrostatskim interakcijama. Kako je temperatura rasla, bakar je uzrokovao oksidativno cijepanje dvostruke uzvojnice DNA i nastalo je više fragmenata DNA s nižim temperaturama mekšanja, radi čega je i došlo do destabilizacije.

Tablica 7. Temperature mekšanja (^a $\Delta Tm/^\circ C$) *ctDNA* ($c(ctDNA) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $r_{[spoj]/[ctDNA]} = 0,25$) i poli A – poli U ($c(RNA) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $r_{[spoj]/[poli A - poli U]} = 0,25$) pri pH = 7,0 (natrijev kakodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$) pri dodatku **6**, **7** ili **10** ili dodatku prethodno pripremljenih kompleksa **6**, **7** ili **10** s pet puta više bakra.

Spoj	<i>ctDNA</i>	poli A – poli U	poli (dAdT) ₂
6	0	0	0
^b 6 + 5 Cu ²⁺	^c -38; +>12	+32	^c -12; +>12
7	0	0	-
^b 7 + 5 Cu ²⁺	+2,5	+1,0	-
10	0	0	-
^b 10 + 5 Cu ²⁺	+9,8	0	-

^a Pogreška u ΔTm : $\pm 0,5 \text{ }^\circ C$; ^b Kompleks peptidoida **6**, **7** i **10** s ekvivalenta Cu²⁺ pripremljen je u kivetama i nakon 1 min, dodani su DNA ili RNA i inkubirani pri sobnoj temperaturi 2 min prije početka eksperimenta temperaturnog mekšanja. Kao kontrolni eksperiment, DNA/RNA otopine s jednakom količinom DMSO-a i Cu²⁺ su promatrane i korištene za izračun ΔTm vrijednosti. ^c Dvofazne krivulje mekšanja upućuju da su pri omjeru r prisutna dva različita tipa ds-DNA/spoj kompleksa: destabilizirana ds-DNA ($\Delta Tm = -38 \text{ }^\circ C$) i termalno stabilizirana ds-DNA ($\Delta Tm = +>12 \text{ }^\circ C$)

4.1.5. Biološka i biokemijska ispitivanja

4.1.5.1. Induciranje cijepanja plazmidne DNA UV izlaganjem spojeva **6** i **7** i njihovih kompleksa **6/Cu²⁺** i **7/Cu²⁺**

Ispitivanja su provedena od strane dr. sc. Dragomire Majhen i dr. sc. Ksenije Božinović (Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković), a događaj cijepanja plazmidne DNA praćen je uz pomoć gel elektroforeze. Kako su pokuse izveli suradnici, ovdje prikazan samo sažetak i konačni zaključci, a radi boljeg pregleda cjelokupnih istraživanja.

Piren, kada je fotoaktiviran, može uzrokovati nastanak singletnog kisika.^{114, 115}, koji može uzrokovati cijepanje ds-DNA. Oksidativno cijepanje DNA mogu uzrokovati i kompleksi peptida s bakrom, što rezultira promjenama plazmidne DNA.^{132, 133} S obzirom kako su već potvrđene interakcije s ds-DNA i ds-RNA s pirenskim derivatima **6** i **7** i kao samostalnim i kao kompleksima s Cu²⁺, istraženo je cijepanje plazmidne DNA u prisutnosti spojeva **6** i **7** uz UV svjetlo (30 s) i tretiranje plazmidne DNA s već pripremljenim kompleksima **6/Cu²⁺** ili **7/Cu²⁺** pri 37 °C ili 50 °C.

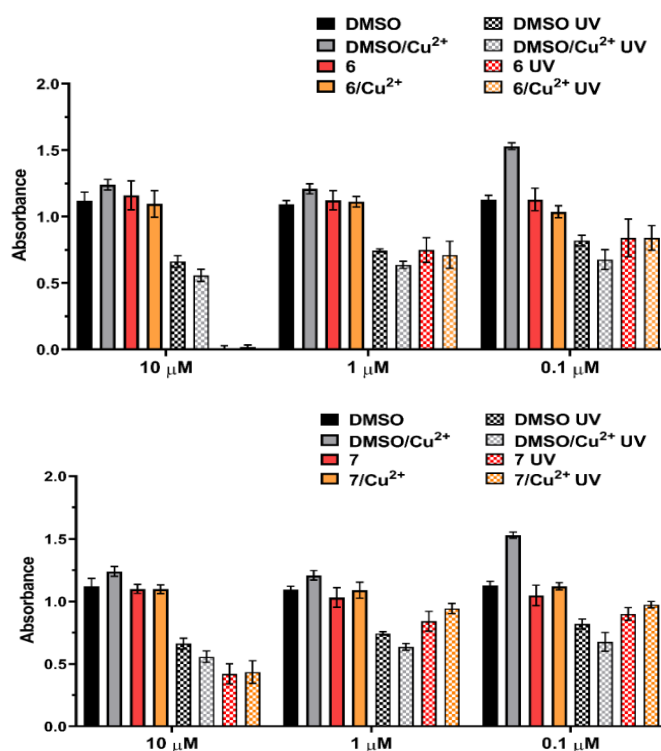
Na agaroznom gelu su vidljive tri forme plazmidne DNA: linearni oblik, opušteni kružni (engl. *nicked*) i „*supercoiled*“ kružni oblik. Sve tri forme su kvantitativno analizirane (Slika XY). iz koje se može vidjeti kako izlaganje UV zračenju nije utjecalo na samu plazmidnu DNA, ali porast „*nicked*“ oblika se može povezati s fotoaktiviranim **6** i **7**, vjerojatno zbog proizvodnje singletnog kisika od strane pirena. S obzirom na ranije poznate pirenske analoge^{13, 114, 115} i njihovu aktivnost, **6** i **7** su pokazali znatno slabije djelovanje, zbog vezanja u DNA mali utror i intramolekularnog slaganja (engl. *stacking*) pirena i triptofana, što je spriječilo potpuno cijepanje i DNA linearizaciju.

Ispitano je i termalno inducirano cijepanje DNA s prethodno pripremljenim **6/Cu²⁺** i **7/Cu²⁺** kompleksima. Uzorci plazmidne DNA s dodanim kompleksima su bili inkubirani pri sobnoj temperaturi, 37 °C i 50 °C tijekom 24 h. Kao negativne ili pozitivne kontrole služile su plazmidna DNA pUC19 bez dodanih kompleksa, plazmidna DNA s Cu²⁺ kationom i plazmidna DNA linearizirana s restriksijskim enzimom (RE). Rezultati su pokazali da **6/Cu²⁺** i **7/Cu²⁺** ne cijepaju plazmidnu DNA značajno bolje od Cu²⁺ kation samog po sebi. Razlog je vjerojatno kao i u gornjem slučaju, intramolekulsko slaganje kompleksa unutar malog utora DNA te ograničen dohvat Cu²⁺ kationa prema šećernim komponentama DNA okosnice, koje bi bile podložne kemijskom cijepanju.

Konfokalna mikroskopija i MTT test korišteni su za *in vitro* studiju kako bi istražili potencijalnu bioprimjenjivost sintetiziranih analoga. MTT test provele su dr. sc. Dragomira Majhen i dr. sc. Ksenija Božinović (Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković), dok je eksperimente na konfokalnom mikroskopu proveo akademik Ivo Piantanida (Zavod za organsku kemiju i biokemiju, Institut Ruđer Bošković).

4.1.5.2. MTT test

Ispitan je utjecaj sintetiziranih spojeva **6** i **7** i njihovih kompleksa s bakrom; **6**/ Cu^{2+} i **7**/ Cu^{2+} na vitalnost stanica, koristeći tumorske stanične linije karcinoma pluća (A549) i normalne stanične linije.



Slika 34. Vitalnost A549 stanica tretiranih s različitim koncentracijama **6**, **6**/ Cu^{2+} , **7** i **7**/ Cu^{2+} bez/s izlaganjem UV zračenju (350 nm) 30 min. Mjerena apsorbancija ($\lambda = 600 \text{ nm}$) direktno korelira s vitalnošću stanica. Podaci su predočeni kao srednja vrijednost \pm SD rađeno u tri replikata.

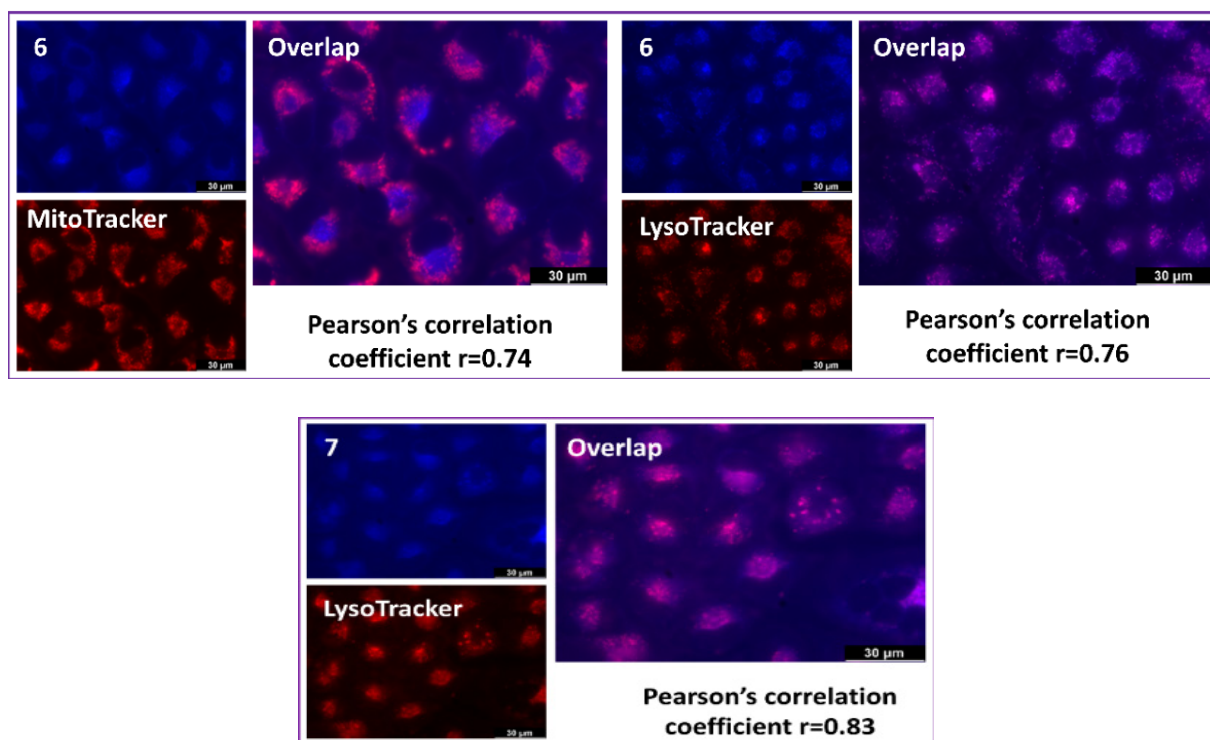
Kontrolni uzorci su stanice tretirane DMSO-om u istom razrjeđenju kao i ispitivani spojevi.

Stanice su tretirane s 10 μM , 1 μM i 0,1 μM spojeva **6** i **7** i njihovih kompleksa s bakrom. Spojevi **6** i **7** i njihovi kompleksi s bakrom nisu pokazali toksičnost prema stanicama ni u jednoj od ispitanih

koncentracija. Nakon UV zračenja stanica tretiranih spojevima **6** i **7** u trajanju od 30 min/dan, spoj **6** pokazao je snažan citotoksičan učinak pri najvećoj koncentraciji, a spoj **7** pokazao je umjereni citotoksični učinak, što se može povezati s pirenskom proizvodnjom singletnog kisika pri zračenju (slika 34), a u skladu je s rezultatima prikazanim u 4.1.5.1.

4.1.5.3. Konfokalna mikroskopija

Eksperimente konfokalne mikroskopije proveli smo kako bi utvrdili ulaze li sintetizirani analozi unutar stanice i koji je pritom njihov položaj. Unos spojeva je praćen u živim stanicama A549 ljudskog karcinoma pluća nakon 90 min inkubacije pri 37 °C. Radi jake stanične autofluorescencije pri valnim duljinama ekscitacije/emisije (295 nm/350 nm) korištenih za spoj **10** onemogućeno je mjerenje za taj spoj. Spojevi **6** i **7** ušli su u stanice A549 i mogla se vidjeti intenzivna plava boja u mitohondrijima i lizosomima, što je i potvrđeno kolokalizacijom s komercijalnim bojama MitoTracker Deep Red i LysoTracker Deep Red (slika 35).



Slika 35. Unutarstanična distribucija **6** i **7** (plave boje) u stanicama A549. Stanice su tretirane s 10 μM spoja 90 min, pri 37 °C i kolokalizacija s mitohondrijima (MitoTracker) ili lizosomima (LysoTracker), sve prikazano crveno, praćeno konfokalnim mikroskopom ($\lambda_{\text{exc}} = 348 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 430\text{-}550 \text{ nm}$). Za analizu je korišten ImageJ software i prikladan JACoP plugin.

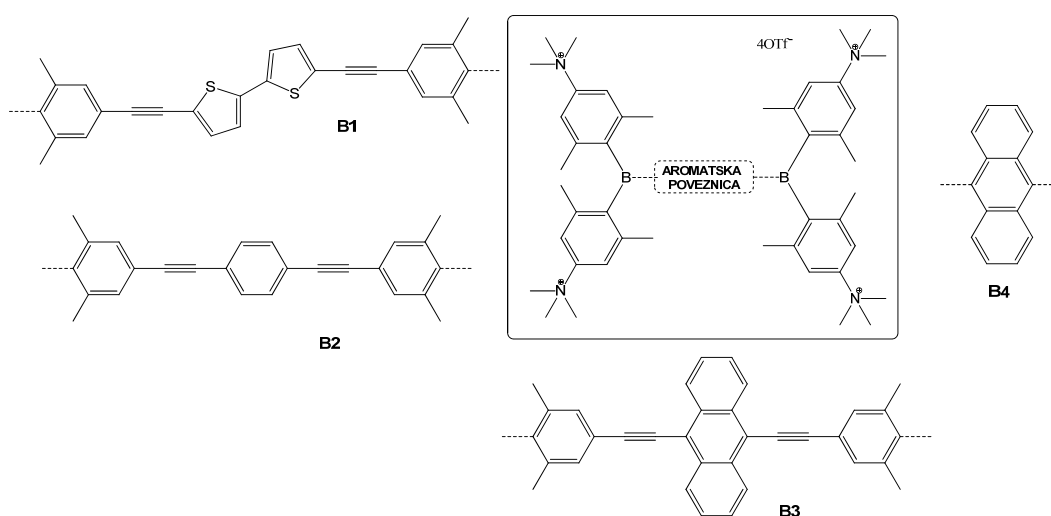
Kolokalizacija je kvantificirana uz pomoć Pearsonovog koeficijenta korelacije (PCC) (tablica 8). Spoj 6 pokazao je jednaku distribuciju u mitohondrijima i lizosomima, bez određene selektivnosti. Spoj 7 pokazao je snažnu kolokalizaciju s lizosomima, dok su rezultati kolokalizacije spoja 7 s mitohondrijima bili neodredivi.

Tablica 8. Korelacija kolokalizacije, PCC vrijednosti

Kombinacija	PCC
6 : MitoTracker	0,74
6 : LysoTracker	0,76
7 : MitoTracker	-
7 : LysoTracker	0,83

4.2. Analози bis-triarilborana

U ovom radu su okarakterizirano je četiri derivata bis-triarilborana. Spojevi **B5** i **B6** su poznati iz prethodno publiciranih radova^{17,63}, gdje su se pokazali kao jako dobre kombinirane fluorimetrijske i Ramanove probe za selektivno prepoznavanje DNA, RNA i proteina. Kratki antracenski analog **B4**, koji je također poznat od prije⁹⁵, korišten je radi prikaza važnosti duljine linkera. Strukture ispitanih spojeva **B1-B4** nalaze se na slici 36.



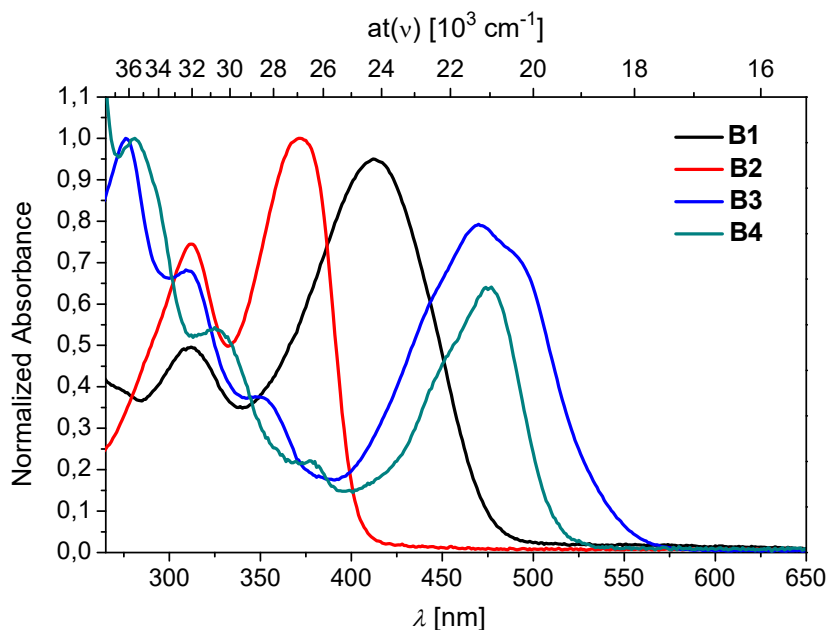
Slika 36. Ispitivani derivati bis-triarilborana **B1-B4**.

4.2.1. Spektrofotometrijska karakterizacija derivata bis-triarilborana

Spojevi pripremljeni u grupi prof. T. Mardera su prethodno detaljno okarakterizirani u organskim otapalima (tablica 9), no njihova svojstva u biorelevantnim uvjetima su bila nepoznata. Stoga je prije studija njihove interakcije s DNA/RNA trebalo detaljno ih spektrofotometrijski okarakterizirati u vodenom mediju.

UV/Vis spektri ispitivanih spojeva proporcionalni su njihovim koncentracijama u rasponu $c = 5-15 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, a njihovi apsorpcijski maksimumi i odgovarajući molarni apsorpcijski koeficijenti (ϵ) prikazani su u tablici 8. Može se primijetiti da spojevi **B3** i **B4** imaju jako sličan apsorpcijski spektar s maksimumima apsorpcije blizu jedan drugome, $\lambda_{\text{abs}}(\mathbf{B3}) = 485 \text{ nm}$, a λ_{abs}

(**B4**) = 476 nm, što upućuje na isti kromofor; antracen (slika 37). Triarilboranski kationi apsorbiraju iznad 300 nm, a ovisno o supstituentima (u ovom slučaju premosnicama) valna duljina se može pomaknuti i prema valnim duljinama iznad 400, kao što je slučaj kod spojeva **B1**, **B3** i **B4**.¹³⁴



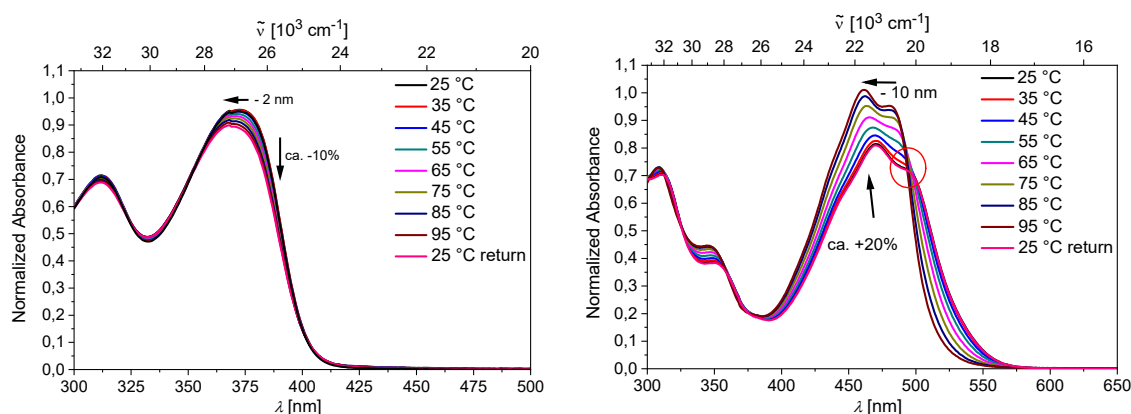
Slika 37. UV/Vis spektar spojeva **B1-B4** pri $c = 1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ pri pH = 7,0 (natrijev kakodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$)

Tablica 9. Prikaz emisijskih i apsorpcijskih maksimuma te pripadajućih molarnih apsorpcijskih koeficijenata derivata bis-triarilborana **B1-B3**.

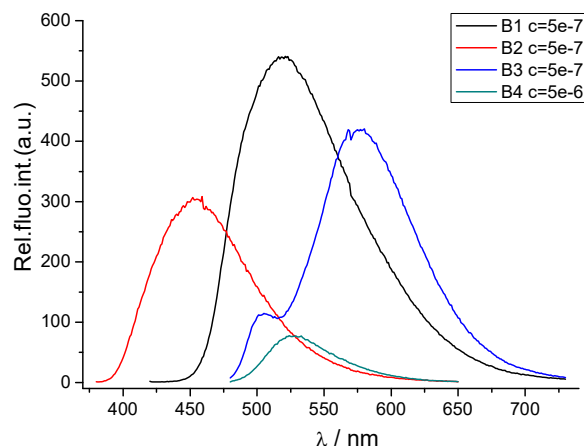
	Otapalo	$\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$	$\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$
B1	MeCN	413	65000	535
	H ₂ O	413	62000	558
B2	MeCN	373	60000	452
	H ₂ O	371	62000	452
B3	MeCN	483	52000	505
	^a H ₂ O	485	47000	501
B4	H ₂ O	476	8270	527

a Pri koncentracijama $> 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, spoj **B3** agregira. Rezultat je djelomičan pomak emisijskog maksimuma prema $\lambda_{em} = 578 \text{ nm}$.

Pri zagrijavanju otopina (slika 38), u spektrima spojeva **B2** i **B4** može se primijetiti malo smanjenje apsorbancije, dok spektri spojeva **B1** i **B3** pokazuju snažno povećanje apsorbancije i izraženi pomak maksimuma prema nižim valnim duljinama (hipsokromni pomak). Opažene promjene nisu posljedica kemijske degradacije spojeva, pošto su sve spektralne promjene bile u potpunosti reverzibilne nakon ponovnog hlađenja na $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Velike reverzibilne promjene UV/Vis spektara ukazuju na intermolekularno nekovalentno aromatsko slaganje, odnosno zagrijavanjem dolazi do procesa deagregacije. Sustavni pomak preklapanja spektara (Slika 38 desno, crveni krug) upućuje na više tipova agregata.

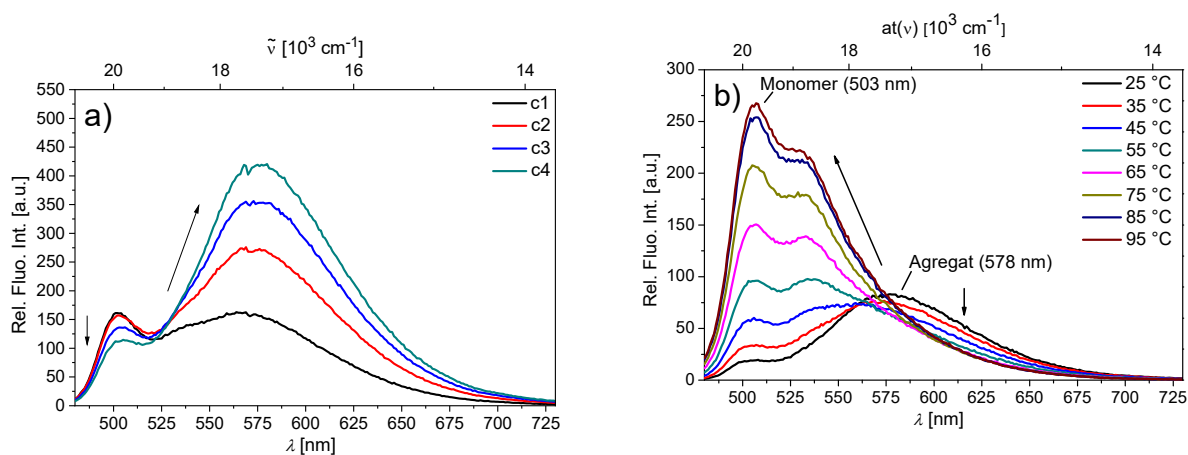


Slika 38. Temperaturna ovisnost pri $c = 1,3 - 1,7 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ pri $\text{pH} = 7,0$ (natrijev kakodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$). Lijevo: Hipokromni efekt u apsorpcijskom spektru spoja **B2** ($> 10\%$); desno: hiperkromni efekt ($+20\%$) u apsorpcijskom spektru spoja **B3**, upućuje na aromatsko slaganje spoja **B3**; crveni krug upućuje na sustavni pomak preklapanja spektara.



Slika 39. Fluorescencijski spektar spojeva **B1** ($\lambda_{exc} = 412$ nm), **B2** ($\lambda_{exc} = 372$ nm), **B3** ($\lambda_{exc} = 470$ nm) i **B4** ($\lambda_{exc} = 476$ nm) pri pH = 7,0 (natrijev kakodilatni pufer, $I = 0,05$ mol dm⁻³) pri c (**B1,B2,B3**) = 5×10^{-7} mol dm⁻³ i c (**B4**) = 5×10^{-6} mol dm⁻³.

Svi spojevi pokazuju vrlo jaku fluorescencijsku emisiju (slika 39). Kod spojeva **B2** i **B4** su emisijski intenziteti proporcionalni koncentraciji spoja do $c = 5 \times 10^{-7}$ mol dm⁻³ (**B2**) i $c = 8 \times 10^{-6}$ mol dm⁻³ (**B4**), a prilikom zagrijavanja do 95 °C pokazali su male promjene, što znači da nije došlo do intermolekulskih interakcija (Slika D.8.24.). Emisije spojeva **B1** i **B3** se značajno razlikuju (slika 39), intenzitet **B3** je izrazito neproporcionalan prema koncentraciji, čak pri $c < 1 \times 10^{-7}$ mol dm⁻³, a emisija oba spoja pri zagrijavanju do 95 °C i koncentraciji $c = 5 \times 10^{-7}$ mol dm⁻³ se značajno promijenila.



Slika 40. a) Fluorescencijski spektar spoja **B3** ($\lambda_{exc} = 470$ nm) pri pH = 7,0 (natrijev kakodilatni pufer, $I = 0,05$ mol dm⁻³) pri $c(\mathbf{B3}) = 5, 20, 35$ i 50×10^{-8} mol dm⁻³. b) Temperaturna ovisnost emisije $c(\mathbf{B3}) = 50 \times 10^{-8}$ mol dm⁻³ pri pH = 7,0 (natrijev kakodilatni pufer, $I = 0,05$ mol dm⁻³).

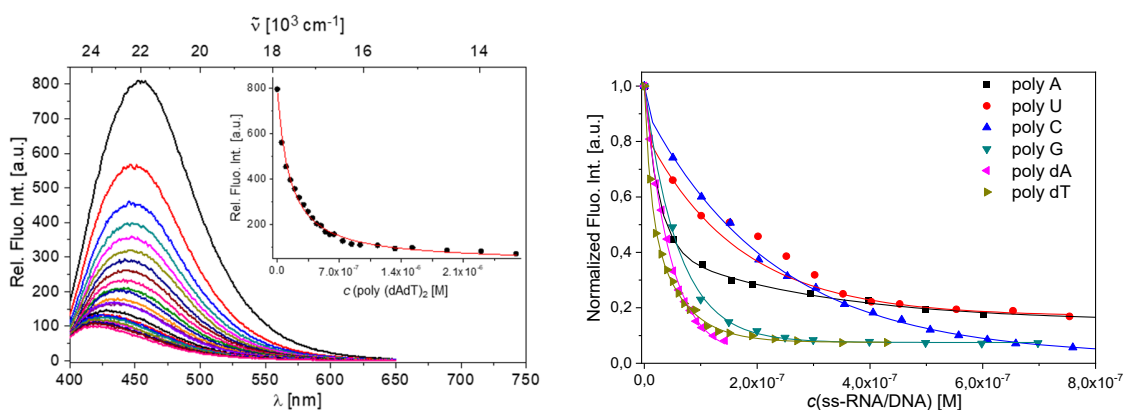
Temperaturna ovisnost fluorescencijskih i UV/Vis spektara spojeva **B1** i **B3** ukazuje na izrazite intermolekulske aromatske interakcije slaganja (engl. *stacking*) između kromofora. Analizom promjena emisijskog spektra spoja **B3** pri zagrijavanju, i usporedbom s literaturnim podacima¹³⁵ može se zaključiti kako maksimum emisije koji prevladava na povišenim temperaturama ($\lambda = 503$ nm) odgovara monomernom obliku antracena koji ne sudjeluje u aromatskom slaganju, a maksimum emisije na 578 nm odgovara emisiji **B3**-agregata antracena (slika 40). Agregacija u natrijevom kakodilatnom puferu primijećena je za spojeve **B1** i **B3**, dok su u čistoj vodi agregati primijećeni samo kod spoja **B3** pri koncentracijama višim od 1×10^{-5} mol dm⁻³ iz čega je vidljivo da je agregacija spojeva povezana s ionskom jakošću otopine. Spojevi **B1** i **B3** agregiraju zbog veće površine aromata u premosnici, koja stimulira aromatsko slaganje u vodenim otopinama, za razliku od spoja **B2** s manjom aromatskom površinom premosnice.⁶³ Posebno je zanimljivo odsustvo agregacije antracenskog **B4** (analog spoja **B3**), gdje sterička blokada voluminoznim triarilboranskim kationima ne dozvoljava intermolekularne interakcije slaganja vrlo kratke antracenske premosnice.

4.2.2. Interakcije bis-triarilborana s ds-DNA i ds-RNA

Interakcije bis-triarilborana **B1** – **B4** ispitane su s *ct*-DNA, tipičnog predstavnika B-uzvojnice koja se sastoji od podjednakog udjela AT i GC parova baza (58 % GC parova baza). Korišteni su i sintetički alternirajući DNA polinukleotidi poli(dGdC)₂ i poli(dAdT)₂, koji sadrže samo GC i AT parove baza, s obzirom da se male molekula imaju tendenciju vezati u AT bogata područja DNA, zbog steričkih smetnji amino skupine unutar malog utora poli(dGdC)₂. Kao predstavnik ds-RNA i A-uzvojnice korištena je dvolančana poli rA – poli rU (pozvat se na Tablicu sa svojstvima DNA i RNA). Korišteni su i jednolančani sintetički RNA polinukleotidi poli G, poli A, poli U i poli C zbog različitih svojstava. Poli G karakterizira područje bogato gvaninom u DNA i RNA, a poli A predstavlja 3'-kraj mRNA s 50 do 250 adeninskih nukleotida. Poli C i poli U predstavljaju manje organizirane sekundarne strukture i više su fleksibilni nego purini RNA. Korištene su i jednolančane DNA poli dA i poli dT. Mjerenja su provedena metodom fluorescencijske spektroskopije, cirkularnog dikroizma i temperaturnog mekšanja.

4.2.2.1. Fluorimetrijske titracije

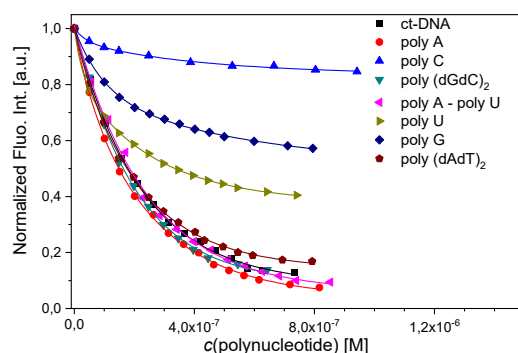
Fluorimetrijske titracije provedene su kako bi se ispitaio afinitet vezanja bis-triarilborana na ds-DNA i ds-RNA. Zbog agregiranja spojeva **B1** i **B3**, titracije su morale biti provedene na što je moguće nižim koncentracijama prema spoju **B1**, (5×10^{-9} mol dm⁻³ ili 5×10^{-8} mol dm⁻³), ali svejedno nije izbjegnuta agregacija kod nekih polinukleotida pri omjerima $r_{[B1]}/[\text{polinukleotid}] > 0,25$ (slika 44). Titracije spojeva **B2** i **B4** također su provedene pri istim koncentracijama radi lakše usporedbe. Podaci su za većinu titracija obrađeni uz pomoć nelinearne regresije na Scatchardovu jednadžbu^{100,101}, dajući konstante stabilnosti i Scatchardov omjer n [vezani ligand] / [polinukleotid] (tablica 10).



Slika 41. Lijevo: Fluorimetrijska titracija spoja **B2** ($c = 5 \times 10^{-9}$ mol dm⁻³; $\lambda_{\text{exc}} = 372$ nm) s poli(dAdT)₂ kao primjer svih dsDNA/RNA titracija; umetak: ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 448 nm o c (poli(dAdT)₂). Desno: Ovisnost normalizirane fluorescencije pri $\lambda_{\text{max}} = 448$ nm o c (ssDNA/RNA), izračunato prema Scatchardovoj jednadžbi^{100,101} (pH = 7,0 u natrijevom kakodilatnom puferu, $I = 0,05$ mol dm⁻³).

Dodatak ds-DNA/RNA spojevima **B2** i **B4** rezultirao je gašenjem fluorescencije, dok su spojevi **B1** i **B3** pokazali nešto kompleksnije ponašanje. Dodatak polinukleotida kod spoja **B2** dovelo je do snažnog gašenja (otprilike 90%) emisije, uz hipsokromni pomak emisijskog maksimuma za otprilike 30 nm (2000 cm⁻¹, slika 41). Kratki antracenski spoj **B4** pokazao je slično, neselektivno gašenje emisije za sve dsDNA/RNA, ali i visoku osjetljivost na ssRNA (slika 42) poli A (gašenje >95%), poli U (60%), poli G (40%) i poli C (10%). Ovakva emisijska selektivnost nije ujedno i afinitetna selektivnost s obzirom da su za sve ssRNA dobivene slične vrijednosti konstanti stabilnosti (tablica 10). Ovakav selektivan fluorimetrijski odgovor nije povezan s redoks

potencijalom nukleobaza i njihovim utjecajem na učinkovitost gašenja ¹³⁶, nego vjerojatno na selektivnost utječe pozicija rigidnog liganda **B4** unutar ssRNA, gdje kombinacija elektronskih svojstava, veličina nukleobaze i fleksibilnost utječe na interakcije fluorofora s polinukleotidima i emisiju formiranog kompleksa (ligand-polinukleotid).



Slika 42. Fluorimetrijske titracije spoja **B4** ($c = 5 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$; $\lambda_{\text{exc}} = 476 \text{ nm}$) s različitim dsDNA/RNA i ssRNA; ovisnost fluorescencije pri $\lambda_{\text{max}} = 527 \text{ nm}$ o $c(\text{polinukleotid})$, izračunato prema Scatchardovoj jednadžbi ^{100,101} (pH = 7,0 u natrijevom kakodilatnom puferu, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$) dajući konstante vezanja ($\log K_s$) prikazane u tablici 10.

Tablica 10. Konstante vezanja ($\log K_s$)^a dobivene iz fluorimetrijskih titracija liganada **B1**, **B2**, **B3** i **B4** s polinukleotidima, pri pH = 7,0 (natrijev kakodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$).

		B1	B2	B3	B4
ds	ctDNA	8.8	8.6	8.5	7.5
	poli (dAdT)₂	5.1 ^c	7.8	7.7	7.4
	poli (dGdC)₂	6.6 ^c	8.4	7.9	7.8
	poli A - poli U	6.0 ^c	8.6	> 9	7.9
ss	poli A	> 9 ^b	8.4	7.8	7.1
	poli dA	7.6	> 9 ^b	> 9 ^b	n.d.
	poli U	7.0	7.4	8.8	7.1
	poli dT	7.6	8.5	7.4	n.d.
	poli G	7.1	8.7	8.7	7.3
	poli C	7.4	7.1	> 9 ^b	7.2

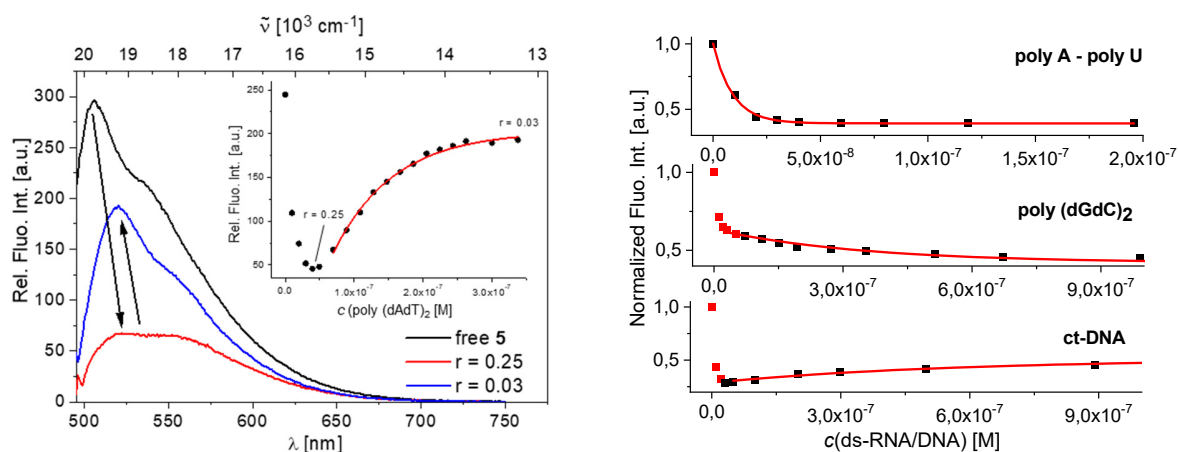
^a Podaci su obrađeni korištenjem Scatchardove jednadžbe ^{100,101} i dobiveni su omjeri n [vezani ligand] / [polinukleotid] = 0,2 - 0,5. Sve K_s vrijednosti su ponovno izračunate za fiksni $n = 0,25$ (ds-polinukleotidi) i $n = 0,5$

(ss-DNA, RNA). Korelacijski koeficijenti su $>0,99$ za sve izračunate vrijednosti $\log K_s$.^b Dodatak DNA/RNA čak i pri najnižoj $c(\text{liganda})$ uzrokovao je snažnu promjenu emisije i nije omogućio izračun točne konstante vezanja.^c

Zbog kompeticije između vezanja slobodne molekule i agregiranja, vezne konstante su niže.

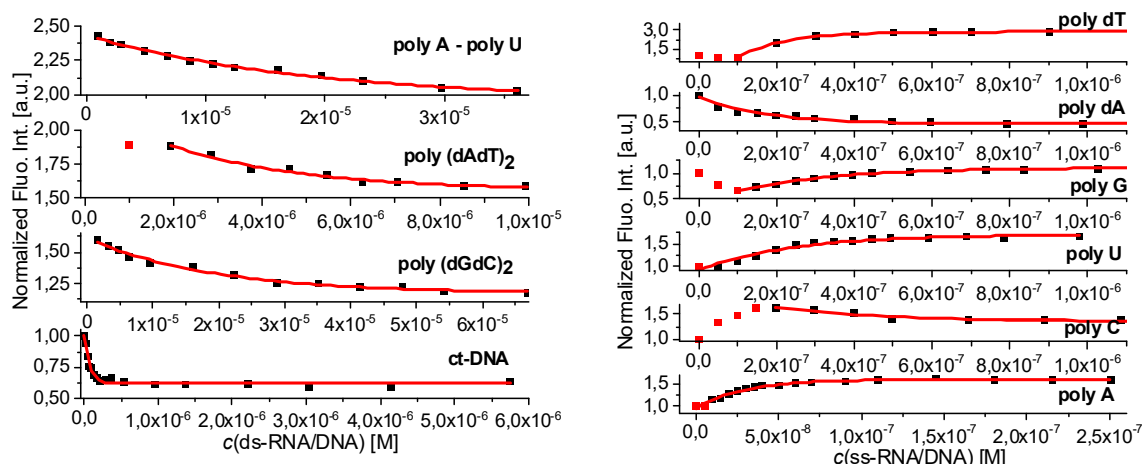
Iz tablice 9, u kojoj su prikazane konstante stabilnosti, može se vidjeti da se svi spojevi vežu s visokim afinitetom za DNA/RNA ($\log K_s > 7$), a u nekim slučajevima i s nanomolarnim afinitetima. Vrijednosti konstanti stabilnosti spojeva prema dsDNA/RNA i ssDNA/RNA su slične, što je neuobičajeno, s obzirom da se male molekule uglavnom vežu s većim afinitetom (2-3 reda veličine) za dvolančane DNA/RNA.¹³¹ Kratki antracenski analog **B4** pokazao je nešto slabije vezanje za DNA/RNA u usporedbi s analogima **B1-B3** što je i očekivano s obzirom vrlo kratku i krutu prenosnicu između dva triarilboranska sustava.

Spojevi **B1** i **B3** pokazali su nešto drugačije ponašanje pri fluorimetrijskim titracijama s DNA/RNA zbog svoje sklonosti agregaciji. Kod titracije spoja **B3** s poli(dAdT)₂ (slika 44) može se primijetiti proces agregacije-deagregacije što se vidi i po batokromnom pomaku emisijskog maksimuma prema 550 nm za omjere $r_{[\text{B3}]/[\text{poli(dAdT)}_2]} > 0,25$ i onda hipsokromnom pomaku emisijskog maksimuma natrag na 520 nm za omjere $r_{[\text{B3}]/[\text{poli(dAdT)}_2]} < 0,25$. Ovo upućuje na agregiranje duž polinukleotida pri visokim koncentracijama liganda (spoj **B3**) i deagregiranja i raspoređivanja liganda na odvojena vezna mjesta uzduž DNA pri povećanju koncentracije polinukleotida. Kod titracije s poli rA – poli rU proces agregacije-deagregacije nije primijećen, što se vidi po pomaku prema 550 nm. Može se zaključiti da zbog dubljeg velikog utora RNA spoj **B3** se može uspješno vezati kao agregat dimer, nego što je to slučaj kod plićeg malog utora poli(dAdT)₂.



Slika 43. Lijevo: Promjene u emisijskom spektru spoja **B3** pri titraciji s poli(dAdT)₂, umetak: ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 520 nm o $c(\text{poli(dAdT)}_2)$. Desno: Fluorimetrijske titracije spoja B3 ($c = 1 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$; $\lambda_{\text{exc}} = 470 \text{ nm}$) s dsDNA/RNA; ovisnost normalizirane fluorescencije pri $\lambda_{\text{max}} = 550 \text{ nm}$ o $c(\text{polinukleotid})$, izračunato prema Scatchardovoj jednadžbi ^{100,101} (pH = 7,0 u natrijevom kakodilatnom puferu, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$) dajući konstante vezanja ($\log K_s$) prikazane u tablici 10.

Slično se dogodilo i sa spojem **B1** koji je također sklon agregiranju. Titracije su se provodile na najnižoj mogućoj koncentraciji za spoj **B1**, ali svejedno nije izbjegnuta agregacija kod nekih polinukleotida pri omjerima $r_{[\text{B1}]/[\text{polinukleotid}]} > 0,25$ za poli rG, poli rC te sve dvolančane DNA/RNA osim ctDNA (slika 44).

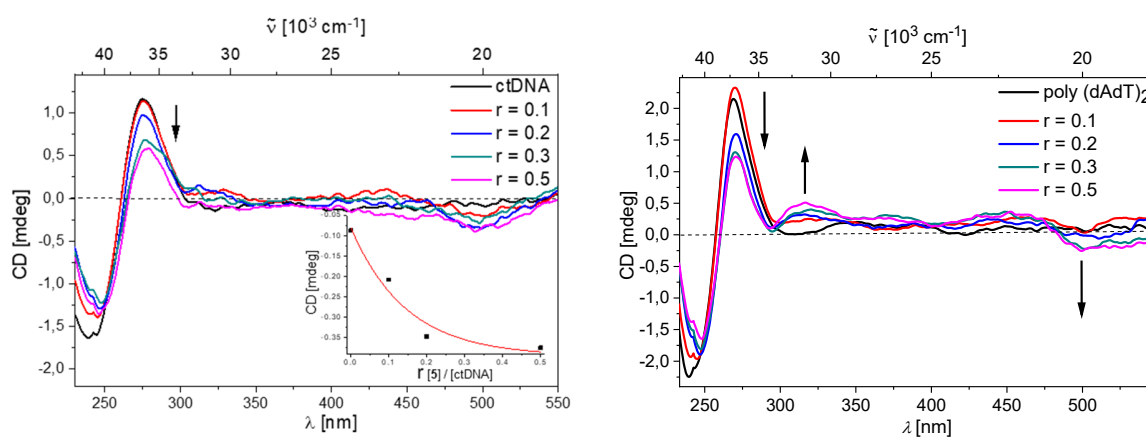


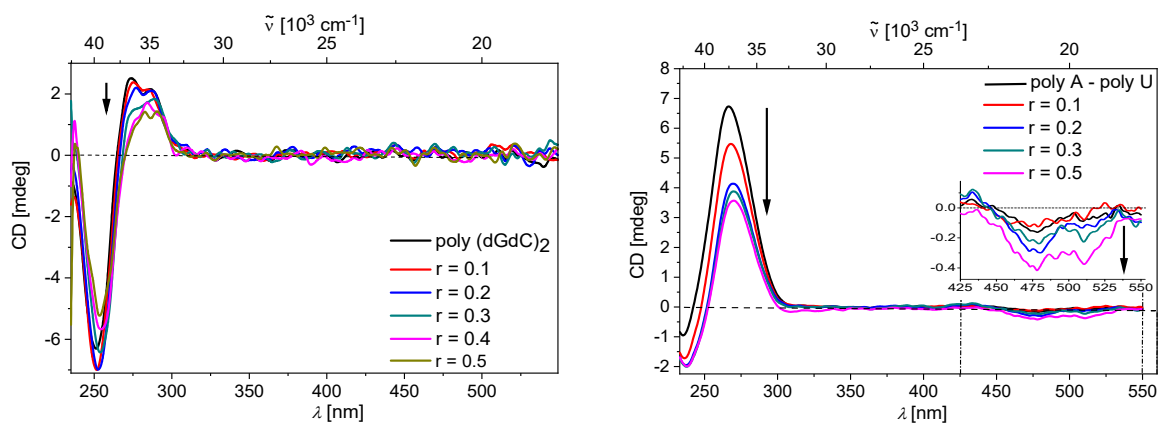
Slika 44. Fluorimetrijske titracije spoja **B1** ($c = 5 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$; $\lambda_{\text{exc}} = 412 \text{ nm}$) s DNA/RNA; ovisnost normalizirane fluorescencije pri $\lambda_{\text{max}} = 500 \text{ nm}$ o $c(\text{polinukleotid})$, izračunato prema Scatchardovoj jednadžbi ^{100,101} (pH = 7,0 u natrijevom kakodilatnom puferu, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$) dajući konstante vezanja ($\log K_s$) prikazane u tablici 10.

4.2.2.3. Cirkularni dikroizam

Kako bi saznali više o konformacijskim promjenama sekundarne strukture polinukleotida nakon vezanja liganda, korištena je metoda spektroskopije cirkularnog dikroizma (CD). ¹²⁷ Tako se pri interakciji akiralnih molekula kao što su **B1-B4** s polinukleotidima može pojaviti inducirani spektar (ICD) u području iznad 300 nm, gdje DNA ili RNA nema signal. Cirkularni dikroizam može dati informacije o načinima vezanja liganda na polinukleotid, ovisno je li spoj interkalator ili se veže u utore.

Dodatak spojeva **B1** i **B2** uzrokovao je malo smanjenje intenziteta u CD spektru dsDNA/RNA, bez mjerljivih ICD vrpca spojeva, što upućuje na male promjene u sekundarnoj strukturi polinukleotida (slike D.8.25 i D.8.26). Kratki antracenski analog **B4** nije imao nikakav mjerljiv utjecaj na CD spektar dsDNA/RNA i bez mjerljivih ICD vrpca, što upućuje da njegovo vezanje nije uzrokovalo promjene u sekundarnoj strukturi polinukleotida. Spoj **B4** se nije vezao uniformirano orijentiran prema kiralnoj osi dsDNA/RNA ili su njegovi prijelazni vektori orijentirani prema kiralnoj osi dsDNA/RNA pa nije došlo do pojave ICD vrpca. Spoj **B3** jedini je uzrokovao odmotavanje dvostruke uzvojnice dsDNA/RNA i djelomični gubitak kiralnosti, što se vidi u jakom smanjenju intenziteta CD spektra dsDNA/RNA (slika 45). Pri dodatku spoja **B3** u *ct*-DNA, poli rA – poli rU i p(dAdT)₂ došlo je do pojave ICD vrpca u području spoja ($\lambda = 450 - 550$ nm). To upućuje na ujednačenu orijentaciju prijelaznih vektora molekule u odnosu na kiralnu os DNA. Dodatak spoja **B3** u poli(dGdC)₂ nije uzrokovao nastanak ICD vrpca, a sam spektar GC-DNA se jako malo promijenio ($\lambda < 300$ nm). Razlog tome mogu biti steričke smetnje gvanina nad malim utorom. Sve ovo je dodatno potvrdilo da se bis-triarilboranski analozi **B1-B4** vežu u uture, odnosno u mali utor DNA i veliki utor RNA.





Slika 45. CD titracije ctDNA (umetak: ovisnost CD na 500 nm o $r_{[B3]/[ctDNA]}$), poli rA – poli rU, poli(dAdT)₂, poli(dGdC)₂ ($c(\text{polinukleotid}) = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) s **B3** pri molarnim omjerima $r = [B3] / [\text{polinukleotid}] = 0,1 - 0,5$ (pH = 7,0 u natrijevom kakodilatnom puferu, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$).

4.2.2.3. Temperaturno mekšanje

Eksperimenti su otkrili da spojevi **B1**, **B2** i **B3** stabiliziraju dvostruku uzvojnica DNA/RNA čak i pri niskim omjerima spoja prema polinukleotidu, a spoj **B3** pokazao je najsnažniju stabilizaciju (tablica 11). Takav stabilizacijski efekt dodatno potvrđuje vezanje triarilborana na DNA/RNA. Kratki antracenski analog **B4** pokazao je slab utjecaj na stabilizaciju DNA/RNA, što je u skladu s manjim afinitetima u usporedbi s ostalim analogima (tablica 10). Očigledno vrlo kruta i kratka poveznica **B4** bitno ograničava elektrostatske interakcije s DNA/RNA veznim mjestima, i posebno negativno nabijenom okosnicom.

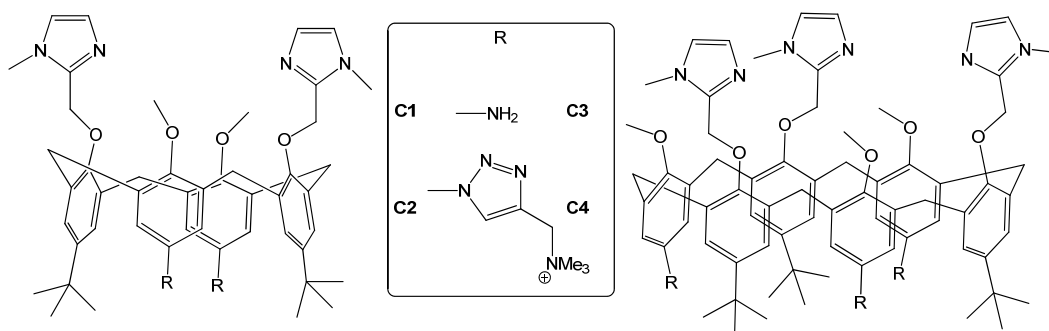
Tablica 11. Temperature mekšanja ($^{\Delta}Tm/^{\circ}C$) dsDNA/RNA pri dodatku **B1**, **B2**, **B3** ili **B4** pri pH = 7,0 (natrijev kakodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$) pri omjeru $r = r_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]}$.

	r^b	ctDNA	poli A - poli U	poli (dAdT) ₂
B1	0.1	4	7	3
B2	0.1	2	9	2
B3	0.1	10	8	6
B4	0.1	1	0	n.d.

^a Pogreška u ΔTm : $\pm 0,5 \text{ }^{\circ}C$;

4.3. Analози kaliksarena

U ovom radu okarakterizirana je skupina derivata kaliksarena pripremljenih u grupi prof. Reinaud (Sveučilište u Parizu) u svrhu vezanja metalnih kationa.^{86,137} Dio navedenih spojeva su oligokationi (slika 46., **C2**, **C4**) i za njih smo pretpostavili da bi mogli vezati polianionske DNA/RNA, ali i nukleotide. Radi usporedbe ispitani su i neutralni analozi (slika 46, **C1** i **C3**). Okarakterizirani su kaliksareni s pozitivnim nabojem – **C2** (dikation, u obliku kloridne soli) i **C4** (tetrakation, u obliku nitratne soli), te njihovi neutralni analozi – **C1** i **C3**.

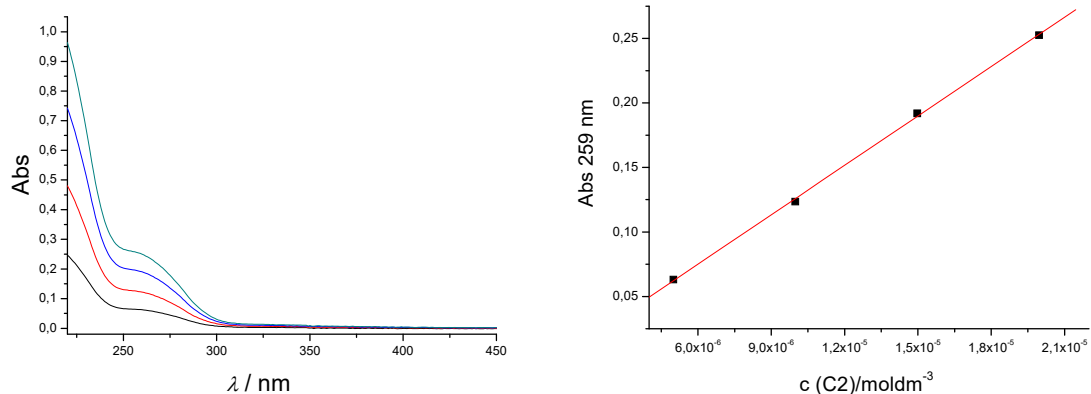


Slika 46. Ispitivani analozi kaliksarena **C1-C4**.

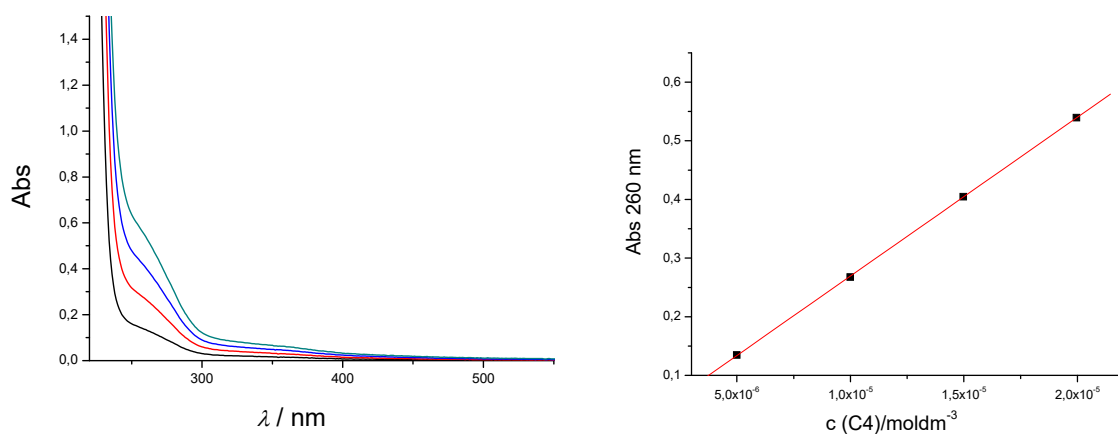
Svojstva ispitivanih spojeva u biorelevantnim uvjetima su bila nepoznata te je stoga je prije studija njihovih interakcija s DNA/RNA trebalo detaljno ih spektrofotometrijski okarakterizirati u vodenom mediju.

4.3.1. Spektrofotometrijska karakterizacija analoga kaliksarena

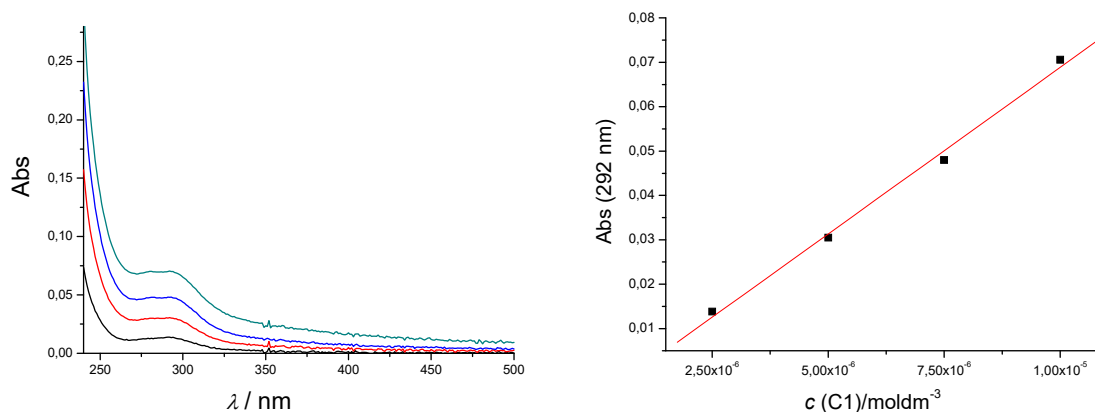
Apsorpcije ispitivanih spojeva proporcionalne su njihovim koncentracijama u rasponu $c = 1 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³ za spojeve **C1** i **C3** te za spojeve **C2** i **C4** u rasponu $c = 2 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³ (slike 47-50), a njihovi apsorpcijski maksimumi i odgovarajući molarni apsorpcijski koeficijenti (ϵ) prikazani su u tablici 11. Svi spojevi imaju maksimum apsorpcije ispod 300 nm, ali široki UV spektar tvori plato na $\lambda = 300$ nm, što je i korišteno kao valna duljina pobude u eksperimentima fluorescencije. Valna duljina pobude od 300 nm korištena je i kako ne bi došlo do preklapanja s apsorpcijom DNA pri nižim valnim duljinama.



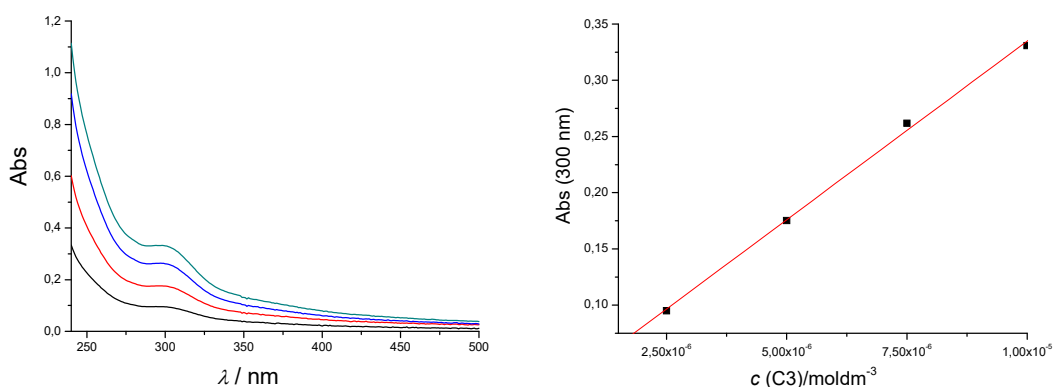
Slika 47. Ovisnost koncentracije ($5 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³) spoja C2 u natrijevom kakodilatnom puferu (pH = 7,0; $I = 0.05$ mol dm⁻³).



Slika 48. Ovisnost koncentracije ($5 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³) spoja C4 u natrijevom kakodilatnom puferu (pH = 7,0; $I = 0.05$ mol dm⁻³).

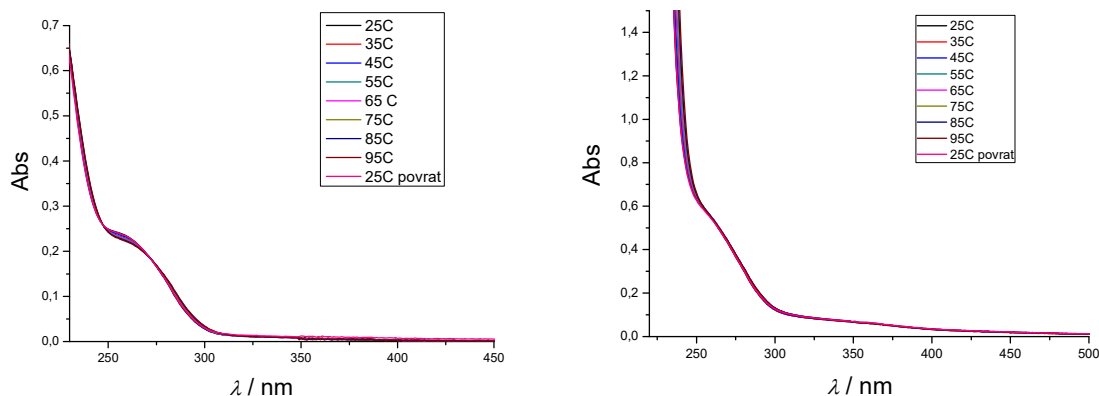


Slika 49. Ovisnost koncentracije ($2,5 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³) spoja **C1** u natrijevom kakodilatnom puferu (pH = 7,0; $I = 0.05$ mol dm⁻³).

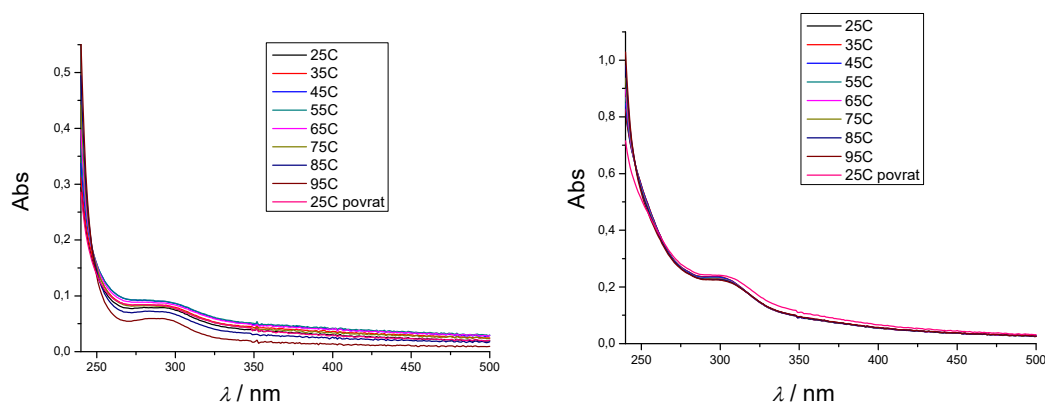


Slika 50. Ovisnost koncentracije ($2,5 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³) spoja **C3** u natrijevom kakodilatnom puferu (pH = 7,0; $I = 0.05$ mol dm⁻³).

Pri zagrijavanju spojeva, došlo je do značajne promjene jedino kod neutralnog kaliksarena **C1** ($c = 1 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³) gdje apsorbancija raste do temperature od 65 °C, a nakon toga na temperaturama do 95 °C, apsorbancija pada. Prisutan je i porast bazne linije, što upućuje na nastanak koloida.



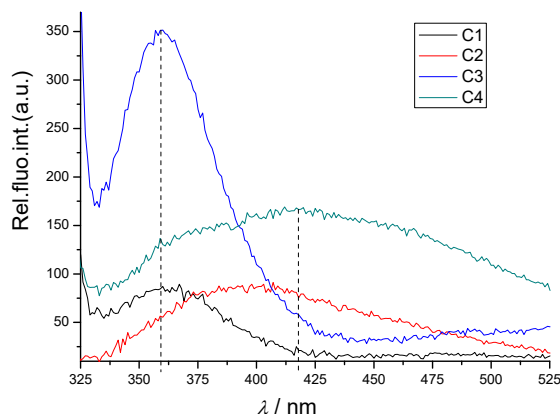
Slika 51. Temperaturni UV/vis spektar pozitivno nabijenih kaliksarena **C2** (lijevo) i **C4** (desno) pri koncentraciji spoja ($c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u natrijevom kakodilatnom puferu ($I = 0,05 \text{ M}$, $\text{pH} = 7,0$).



Slika 52. Temperaturni UV/vis spektar neutralnih kaliksarena **C1** (lijevo) i **C3** (desno) pri koncentraciji spoja ($c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u natrijevom kakodilatnom puferu ($I = 0,05 \text{ M}$, $\text{pH} = 7,0$).

Iako u literaturi nije opisano kako osnovni kostur kaliksarena fluorescira, ispitana je emisija spojeva **C1-C4**, te je pri pobudi na valnoj duljini od 300 nm, dobivena slaba, ali primjenjiva fluorescencija (tablica 12). Intenzitet fluorescencije proporcionalan je koncentraciji spoja do $5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. Spektri apsorbancije odgovaraju emisijskim spektrima (slike D.8.27–D.8.30.), što upućuje da je kromofor spektra apsorbancije i fluorofor. Usporedba emisijskih maksimuma

pokazala je da neutralni kaliksareni **C1** i **C3** emitiraju svjetlost pri valnim duljinama nižim za 30 – 40 nm u usporedbi s pozitivno nabijenim kaliksarenima **C2** i **C4** (slika 53).



Slika 53. Usporedba valnih duljina maksimuma emisija spojeva **C1**, **C2**, **C3** i **C4**. Koncentracije spojeva iznose $2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, osim koncentracije spoja **C3** ($c = 1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) zbog podizanja bazne linije spektra pri višim koncentracijama. Sva mjerenja su provedena u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0; $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$) pri valnoj duljini pobude 300 nm.

Relativni kvantni prinosi, izračunati prema usporedbi s NATA standardom (*N*-acetil-L-triptofanamid, $\phi_R = 0,14$; $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 300\text{--}360 \text{ nm}$) su jako niski, $\phi_f < 0,005$ (Tablica 12), a usporedba kvantnog prinosa sva četiri kaliksarena pokazala je da pozitivno nabijeni veći kaliksaren **C2** i neutralni manji kaliksaren **C3** imaju za red veličine veće kvantne prinose. Sama metoda izračuna relativnog kvantnog prinosa opisana je u eksperimentalnom dijelu.

Tablica 12. Prikaz emisijskih i apsorpcijskih maksimuma, pripadajućih molarnih apsorpcijskih koeficijenata spojeva **C1**, **C2**, **C3** i **C4** te relativni kvantni prinosi (ϕ_f) kaliksarena **C1**–**C4** određeni u usporedbi s NATA standardom (*N*-acetil-L-triptofanamid, $\phi_R = 0,14$; $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 300\text{--}360 \text{ nm}$)

Spoj	λ_{max}/nm	$\epsilon/M^{-1}cm^{-1}$	λ_{em}/nm	$^a\phi_f$
C1	292	$7509 \pm 0,393$	360	0,003
				0,003
				0,005
C2	259	$12759 \pm 0,223$	400	0,0008
				$0,0011 \pm 0,001$
				$0,0027 \pm 0,001$

C3	300	31782 ± 0,972	360	0,0029 ± 0,001 0,0031 ± 0,001 0,0047 ± 0,001
C4	260	27091 ± 0,126	400	^b 0,0003 ^b 0,0002 ^b 0,0008

^a Kvantni prinos određen je koristeći NATA standard. Valne duljine pobude su bile pri 270, 280 i 290 nm. Mjerenja su provedena tri puta i izračunat je prosjek. ^b Procijenjene vrijednosti zbog niskog intenziteta emisije mogu biti smatrane $\phi_t < 0,001$.

4.3.2. Interakcije kaliksarena s ds-DNA i ds-RNA

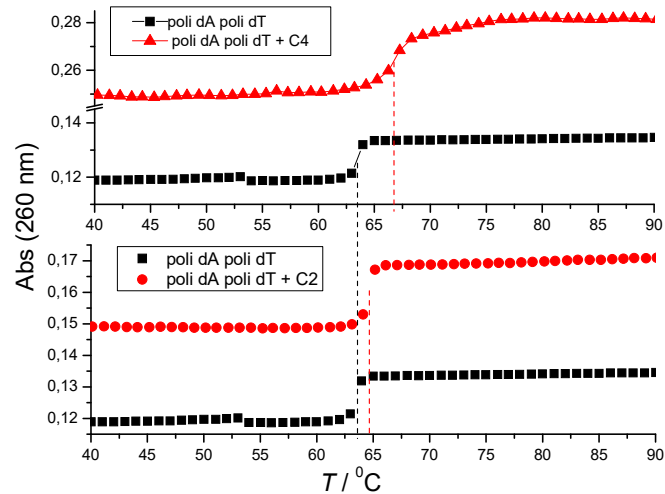
Interakcije kaliksarena ispitane su uz korištenje polinukleotida odabranih na temelju svojih strukturalnih karakteristika (tablica 3)^{50,51}: poli (dAdT)₂ karakterizira tipični B-heliks i mali utor idealan za vezanje malih molekula, mali utor poli (dGdC)₂ sterički je ometan s gvaninskim amino skupinama, poli rA poli rU predstavlja tipični RNA A-heliks s velikim utorom pogodnim za vezanje malih molekula.¹⁰² Za usporedbu je korištena i prirodno izolirana *ct*-DNA (58 % GC parova baza).

4.3.2.1. Temperaturno mekšanje

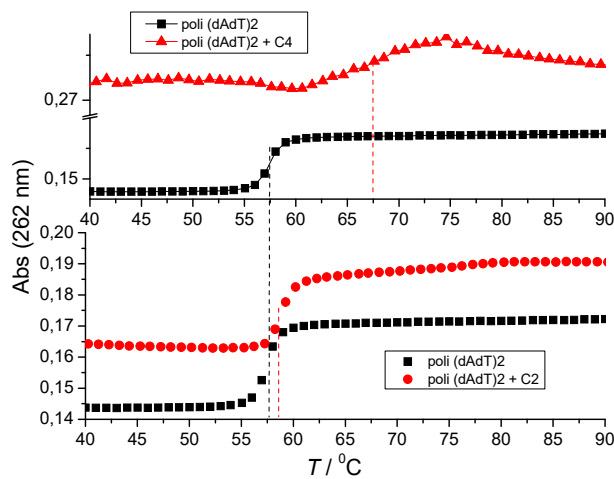
S obzirom da na samu stabilizaciju dvostruke uzvojnice DNA/RNA utječe nekoliko steričkih faktora kao što su širina i dubina utora, steričke smetnje prouzrokovane amino grupa na gvaninu te elektrostatske interakcije, dodatak spojeva **C1-C4** uzorkovao je selektivnu stabilizaciju dvostrukih uzvojnica DNA/RNA. Utjecaj neutralnih kaliksarena **C1** i **C3** bili su zanemarivi i nisu uzrokovali stabilizaciju uzvojnice, što je i očekivano zbog nedostatka elektrostatskih interakcija (slike D.8.31 i D.8.32).¹³⁴ Niti jedan spoj nije uzrokovao stabilizaciju *ct*-DNA, zbog steričkih smetnji amino grupa na gvaninu koji čine polovicu veznih mjesta same *ct*-DNA. To upućuje i da su utori dominantna vezna mjesta. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 13.

Kationski analozi **C2** i **C4** selektivno su stabilizirali AT(U) polinukleotide. Uzrokovali su stabilizaciju poli dA – poli dT za 1 °C, odnosno 3 °C, a alternirajući polinukleotid poli (dAdT)₂ za 1 °C, odnosno 10 °C (slika 54 i 55). Razlika u širini malog utora poli (dAdT)₂ koja je 3,3 Å i poli dA poli dT koja je 6,3 Å može se koristiti za ispitivanje idealne širine male molekule koja se umeće u mali utor. Iz temperatura mekšanja može se zaključiti da se veći kaliksaren (**C4**) bolje umeće u mali utor poli (dAdT)₂ jer efikasnije može istisnuti molekule vode, za razliku od manjeg kaliksarena (**C2**). Mali utor poli dA – poli dT nije dovoljno širok za spojeve pa je i stabilizacija

niža i potrebna je sterička promjena polinukleotida. Stabilizacija poli rA – poli rU usporediva je s onom poli dA – poli dT zbog slične širine malog utora između dva polinukleotida.



Slika 54. Krivulje temperature mekšanja polinukleotida poli dAdT – poli dAdT ($c(\text{poli dA poli dT}) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $r[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}] = 0,3$) snimljene u puferu natrijeva kakodilata ($\text{pH } 7,0$; $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$) nakon dodatka spojeva **C2** i **C4**. Greška u vrijednostima ΔT_m iznosi $\pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$.



Slika 55. Krivulje temperature mekšanja polinukleotida poli (dAdT)₂ ($c(\text{poli (dAdT)}_2) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $r[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}] = 0,3$) snimljene u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0; $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$) nakon dodatka spojeva **C2** i **C4**. Greška u vrijednostima ΔT_m iznosi $\pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tablica 13. Vrijednosti ΔT_m ($^\circ\text{C}$)^a polinukleotida ct-DNA, poli rA – poli rU, poli (dAdT)₂ i poli dA – poli dT nakon dodatka spojeva **C1**, **C2**, **C3** i **C4** ($r = 0,3$)^b pri pH 7,0 (u natrijevom kakodilatnom puferu, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$), $c(\text{polinukleotid}) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$.

Spoj	^b r	ctDNA	poli A – poli U	poli (dAdT) ₂	poli dA – poli dT
C1	0,3	0	0	0	0
C2	0,3	0	2	1	1
C3	0,3	0	0	0	0
C4	0,3	0	1	10	3

^a Pogreška u ΔT_m : $\pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$; ^b $r = [\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]$

4.3.2.2. Fluorimetrijske titracije

Emisija proučavanih spojeva **C1–C4** promijenila se vrlo malo pri dodatku bilo koje dsDNA/RNA, što se i slaže s pretpostavkom lokacije fluorofora unutar kaliksarenskog prstena (fenol-triazol ili fenol-amin jedinica). Takvi fluorofori bili bi osjetljivi pri vezanju kationa ili duboko umetnutih nukleobaza, ali struktura DNA/RNA veznih mjesta ne uključuje umetanje kaliksarena, nego obavijanje DNA oko kaliksarena.

Zbog niske emisije kaliksarena pri vezanju na dsDNA/RNA korištena je metoda istiskivanja etidijevog bromida. Kako je metoda provedena opisano je u poglavlju 3.4.4. Ispitane su interakcije spojeva **C1–C4** s dvolančanim polinukleotidima ctDNA, poli rA – poli rU, poli (dAdT)₂ i poli (dGdC)₂. Etidijev bromid pri interkaliranju između parova baza DNA emitira svjetlost pri valnoj duljini od 520 nm.^{138,139} Pri nekovalentnom vezanju drugih molekula na DNA, dolazi do istiskivanja etidijevog bromida iz DNA i posljedično gašenje fluorescencije.¹¹² Izračunate vrijednosti IDA50% (engl. *Indicator Displacement Assay*) predstavljaju omjer koncentracije etidijevog bromida i koncentracije ispitivanog spoja kada je 50 % etidijevog bromida istisnuto iz kompleksa s polinukleotidom.¹³⁰ Što je vrijednost parametra IDA50% veća, spoj je efikasnije istisnuo etidijev bromid.

Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 14. Opet se može primijetiti utjecaj elektrostatskih interakcija na vezanja za polinukleotid. Spoj **C4** koji posjeduje tri pozitivna naboja istisnuo je

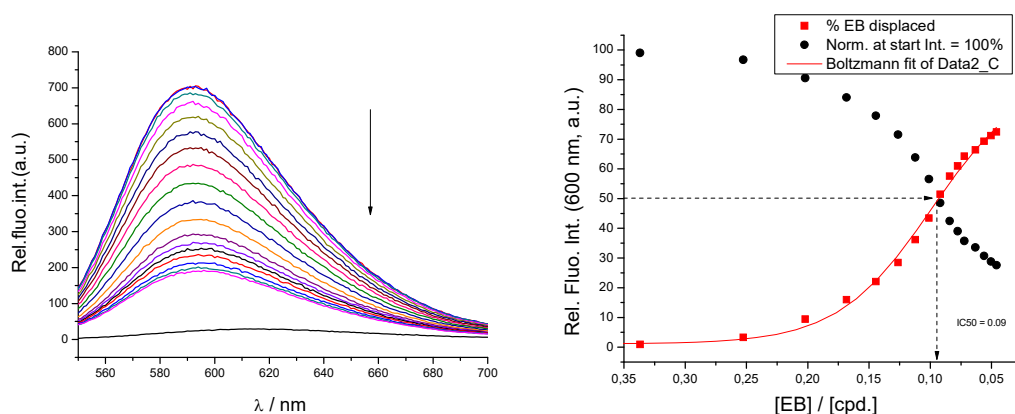
etidijev bromid 3–6 puta uspješnije nego spoj **C2** koji sadrži dva pozitivna naboja. Neutralni analozi **C1** i **C3** nisu istisnuli etidijev bromid iz bilo kojeg korištenog polinukleotida. Najveća razlika između kationskih spojeva **C2** i **C4** može se vidjeti pri istiskivanju etidijevog bromida iz RNA, gdje spoj **C4** uspješno može istisnuti 50 % etidijevog bromida iz polinukleotida, koristeći manju količinu spoja (slika 56 i 57). S obzirom da je etidijev bromid interkalator koji je istisnut s ispitivanim kaliksarenima, koji se vežu u utore, ne može se precizno govoriti o konstantama vezanja iz izračunatih IDA50% vrijednosti.

Tablica 14. Omjeri etidijevog bromida i spojeva **C1**, **C2**, **C3** i **C4** (${}^aIDA50 = [EtBr]/[kaliksaren]$) određeni istiskivanjem etidijevog bromida ($c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) iz kompleksa s ispitivanim polinukleotidom ($c = 5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$). Mjerenja su provedena u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0; $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$).

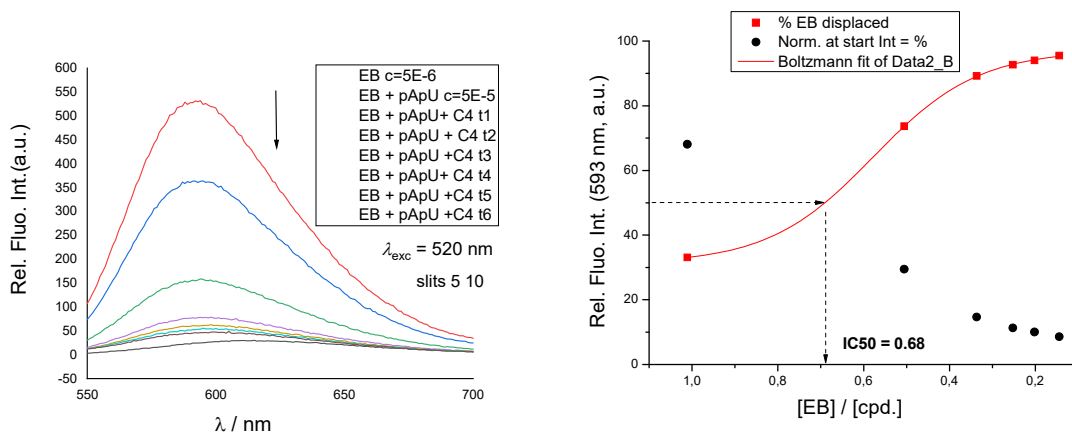
	ctDNA	poli (dAdT) ₂	poli (dGdC) ₂	poli rArU
C1	b	b	b	b
C2	0,15	0,10	0,11	0,09
C3	b	b	b	b
C4	0,34	0,47	0,68	0,68

^aIDA50% vrijednosti izračunate su iz omjera $[EtBr]/[kaliksaren] = (\text{Int}(EtBr\text{-DNA kompleks)} - \text{Int}(EtBr))/2$.

^bZanemariva promjena $\text{Int}(EtBr - \text{DNA kompleks})$ onemogućila je izračun IDA50% vrijednosti.



Slika 56. Lijevo: Emisijski spektri pri istiskivanju etidijevog bromida ($c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, $\lambda_{exc} = 520 \text{ nm}$) nakon vezanja s polinukleotidom poli rA – poli rU ($c = 5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$), sa spojem **C2** u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0; $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$); Desno: Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 600 nm o omjeru koncentracije EtBr i spoja **C2**.

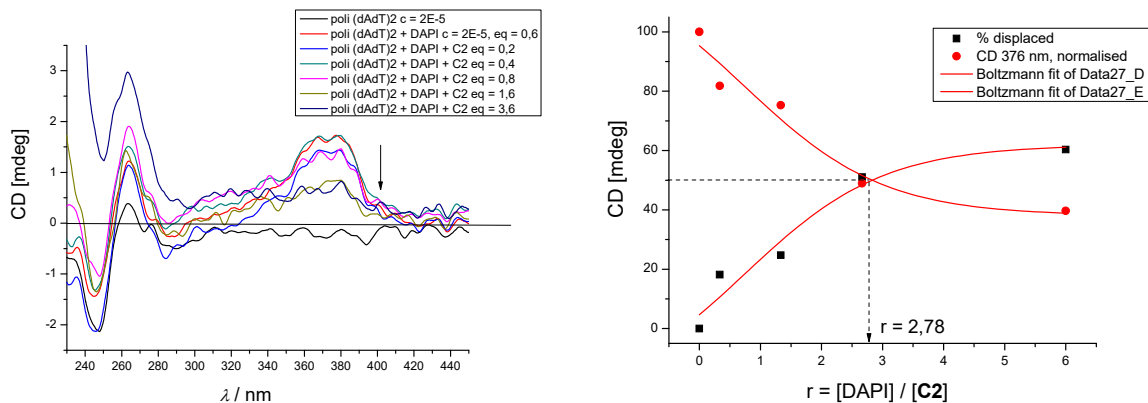


Slika 57. Lijevo: Emisijski spektri pri istiskivanju etidijevog bromida ($c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$; $\lambda_{\text{exc}} = 520 \text{ nm}$) nakon vezanja s polinukleotidom poli rA – poli rU ($c = 5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$), sa spojem **C4** u puferu natrijeva kakovilata ($\text{pH} = 7,0$; $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$); Desno: Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 600 nm o omjeru koncentracije EtBr i spoja **C4**.

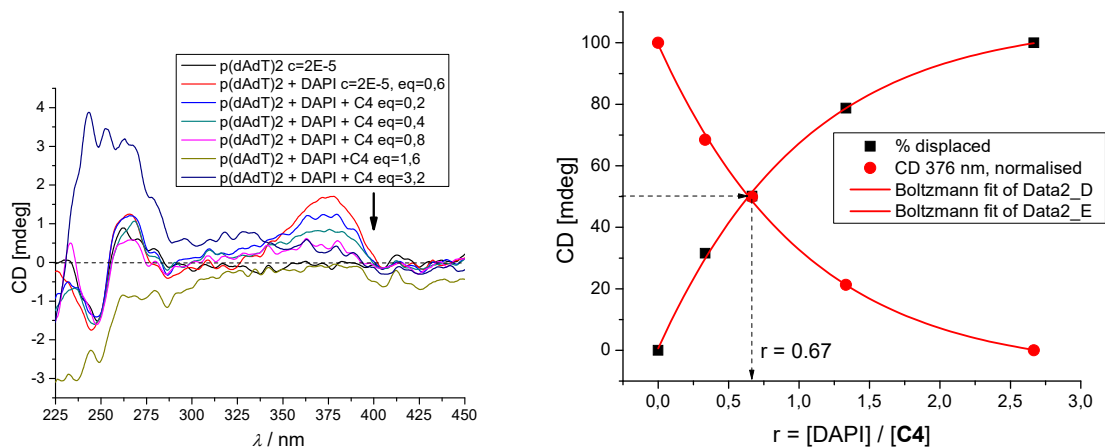
4.3.2.3. Cirkularni dikroizam

Kako bi se potvrdile IDA50% vrijednosti provedeni su i kompeticijski eksperiment istiskivanja DAPI-ja. DAPI je poznat kao spoj koji se veže u AT bogate male utore. Istiskivanje DAPI-ja provedeno je uz pomoć cirkularnog dikroizma kao metoda neovisna o fluorescenciji i zbog preklapanja valnih duljina pobude kaliksarena i DAPI-ja. Praćene su interakcije dvolančanih polinukleotida ctDNA, poli (dAdT)₂ i poli rA – poli rU sa spojevima **C2** i **C4** (slika D.8.33.). Metoda je provedena kao što je opisano u poglavlju 3.4.4. Mala molekula pri vezanju na polinukleotid može dati inducirani CD signal (ICD), pri valnoj duljini apsorpcije male molekule.

Dodatak spojeva **C2** i **C4** uspješno je istisnuo DAPI, što se može vidjeti po smanjivanju ICD signala (slike 58 i 59). IDA50% vrijednost poprilično se razlikuje, tako manji spoj **C2** čija je IDA50% vrijednost 2,8, uspješnije može istisnuti DAPI nego veći spoj **C4**, čija IDA50% vrijednost iznosi 0,7. Za snažno istiskivanje zaslužne su i hidrofobne interakcije, koje su osim elektrostatskih imale važnu ulogu u samom vezanju kaliksarena u mali utor DNA.



Slika 58. Lijevo: CD spektri pri istiskivanju DAPI-ja ($c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) spojem C2 nakon vezanja s polinukleotidom poli dAdT – poli dAdT ($c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0; $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$); Desno: Ovisnost ICD signala pri valnoj duljini 376 nm o omjeru koncentracija DAPI-ja i spoja C2.



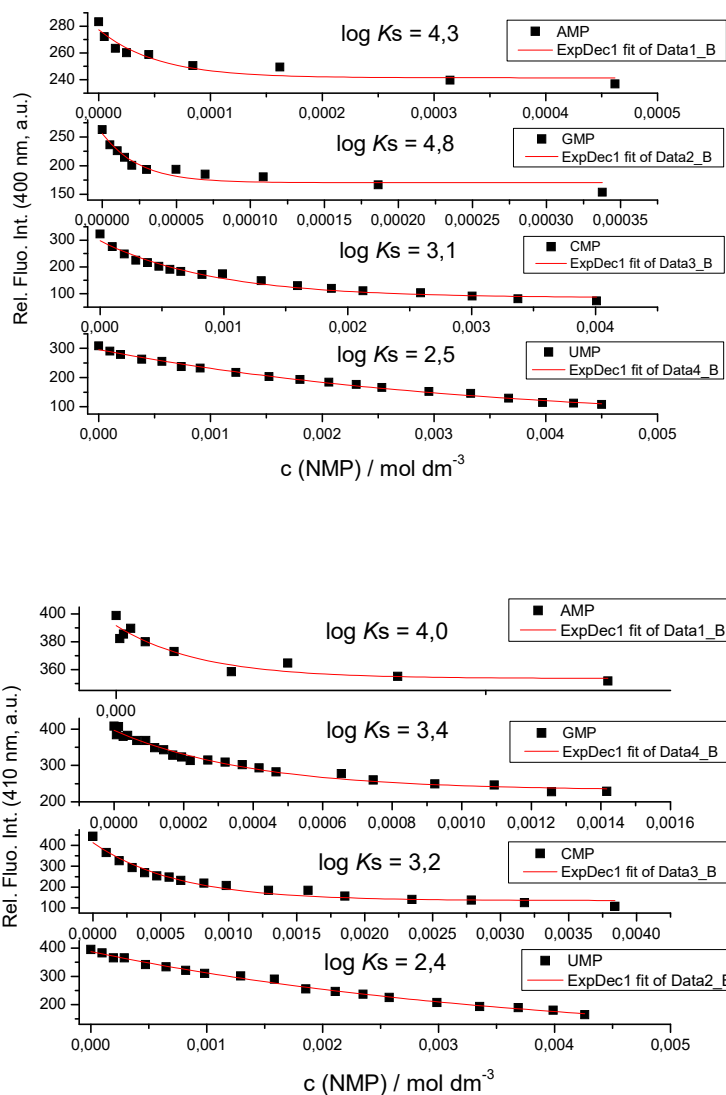
Slika 59. Lijevo: CD spektri pri istiskivanju DAPI-ja ($c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) spojem C4 nakon vezanja s polinukleotidom poli dAdT – poli dAdT ($c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0; $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$); Desno: Ovisnost ICD signala pri valnoj duljini 376 nm o omjeru koncentracija DAPI-ja i spoja C4.

4.3.3. Interakcije kaliksarena s nukleotidima

4.3.3.1. Interakcije kaliksarena s nukleozid-monofosfatima

Kako bi istražili dodatne interakcije kaliksarena s polinukleotidima, provedene su fluorimetrijske titracije s nukleozid-5'-monofosfatima AMP, CMP, GMP i UMP. S obzirom da nukleozid-5'-monofosfati sadrže negativno nabijenu fosfatnu okosnicu, moglo bi doći do interakcije s kationskim dijelom kaliksarena **C2** i **C4**. Interakcije kaliksarena **C1-C4** s navedenim nukleotidima provedene su uz pomoć fluorimetrijskih titracija, na način opisan u poglavlju 3.4.4. Rezultati fluorimetrijskih titracija pomoću nelinearne regresije primjenom eksponencijalne jednadžbe prvog reda za stehiometriju 1:1. Korištenje SpecFit programa^{96,97} za multivarijantnu analizu za druge stehiometrije (2:1 ili 1:2) nije dalo bolji fit ili logičniju raspodjelu. Dobivene konstante vezanja ($\log K_s$) nalaze se u tablici 15.

Dodatci nukleotida u svim slučajevima uzrokovali su gašenje fluorescencije (slika 60). Razlog su vjerojatno π - π interakcije između nukleobaza i fluorofora, do kojih dolazi prilikom umetanja dijela nukleotida unutar kaliksarena. Takve π - π interakcije mogu dovesti do neradijativne relaksacije fluorofora, s tim da uglavnom nisu 100 % učinkovite nego dovode do djelomičnog gašenja fluorescencije. Zbog slabe emisije kaliksarena, podatci titracija imaju varijaciju i vrijednosti konstanti vezanja dobivene uz pomoć nelinearne regresije točni su unutar reda veličine i prema tome se samo razlike veće od reda veličine mogu smatrati značajnima. Analiza veznih konstanti ($\log K_s$, tablica 15) pokazuje da neutralni kaliksareni (**C1** i **C3**) pokazuju sličan afinitet prema nukleotidima, u usporedbi s kationskim analogima (**C2** i **C4**), što znači da elektrostatske interakcije nisu igrale značajnu ulogu. Nadalje, samo neutralni kaliksareni **C1** i **C3** pokazali su sličan afinitet prema purinskim (A i G) i pirimidinskim (U i C) bazama, dok kationski **C2** i **C4** vežu purinske (A i G) za više od reda veličine snažnije nego pirimidinske (U i C) baze. Promjer kaliksarenske šupljine kod promatranih spojeva ne dopušta duboko umetanje nukleobaza u samu šupljinu, ali fleksibilnost i razmak aromatskih podjedinica na oba kraja kaliksarena dopušta umetanje aromatskih liganada, kao što su nukleobaze. Kaliksaren tvori kompleks koji podsjeća na pincetu unutar kojeg su nukleobaze.



Slika 60. Promjene fluorescencije spoja (GORE) **C2** ($\lambda_{exc} = 300 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 400 \text{ nm}$, $c = 1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) ili spoja (DOLJE) **C4** ($\lambda_{exc} = 300 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 410 \text{ nm}$, $c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) pri dodatku različitih nukleozid-5'-monofostata u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0; $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$). Konstante stabilnosti ($\log K_s$) određene su obradom podataka fluorimetrijske titracije metodom nelinearne regresije po modelu kompleksa stehiometrije spoj: NMP = 1 : 1.

Vrijednosti veznih konstanti ($\log K_s$) > 4 podržavaju teoriju stvaranja kompleksa u obliku pincete nukleobaza – kaliksaren, gdje je nukleobaza umetnuta između dva ili tri imidazolne ili triazolne podjedinice, temeljene na sendvič tipu aromatskih interakcija slaganja. Sličan tip kompleksa u

obliku pincete je već poznat i od prije.^{138,139} Kod neutralnih analoga **C1** i **C3** vezno mjesto nukleotida bi moglo biti imidazolnih podjedinica, dok kod kationskih analoga **C2** i **C4** postoji dodatna opcija vezanja između triazolno kationskih podjedinica, dopuštajući dodatne elektrostatske interakcije između negativno nabijene fosfatne okosnice nukleotida i kationskih dijelova **C2** i **C4**. Detaljnija analiza efikasnosti gašenja emisije fluorescencije (ΔInt , Tablica 15.) pokazuje selektivnost, gdje je pri dodatku pirimidinskih bazi (C i U) kationskim kaliksarenima (**C2** i **C4**) došlo do jačeg gašenja emisije (ΔInt) u usporedbi s dodatkom purinskih baza (A i G). Vjerojatno se manja pirimidinska baza dublje umetne u strukturu kaliksarena i posljedično više utječe na fluorescencijska svojstva.

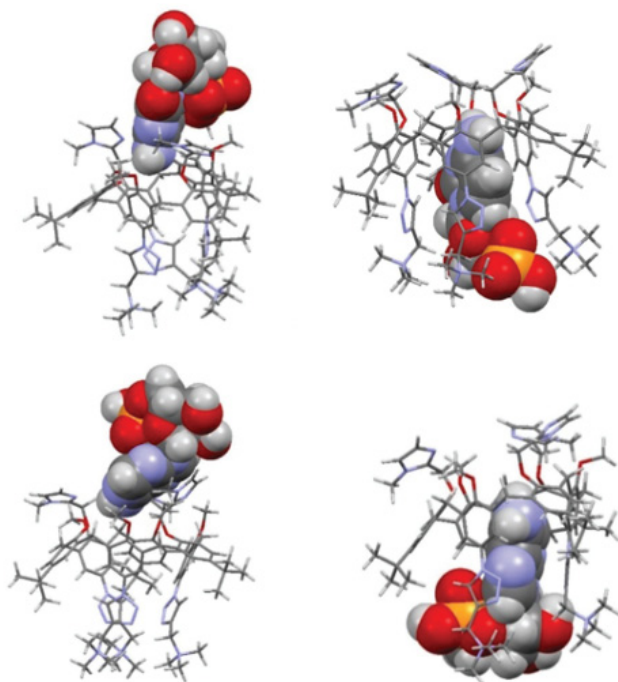
Tablica 15. Vrijednosti konstanti stabilnosti ^a($\log K_s$) kompleksa spojeva **C1**, **C2**, **C3** i **C4** s nukleozid-monofosfatima i promjene emisije spojeva u kompleksu ^b(ΔInt) u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0; $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$).

Spoj	$\log K_s$			
	AMP	GMP	UMP	CMP
C1	$4,3 \pm 0,1$ ($\Delta Int = 0,8$)	$4,8 \pm 0,2$ ($\Delta Int = 0,6$)	$2,5 \pm 0,3$ ($\Delta Int = 0,3$)	$3,1 \pm 0,3$ ($\Delta Int = 0,4$)
C2	^d $4,0$ ($\Delta Int = 0,9$)	$3,4 \pm 0,3$ ($\Delta Int = 0,6$)	$2,4 \pm 0,3$ ($\Delta Int = 0,4$)	$3,2 \pm 0,2$ ($\Delta Int = 0,2$)
C3	$5,0 \pm 0,1$ ($\Delta Int = 0,8$)	$4,7 \pm 0,1$ ($\Delta Int = 0,8$)	$4,1 \pm 0,2$ ($\Delta Int = 0,6$)	^c NP
C4	$4,7 \pm 0,1$ ($\Delta Int = 0,6$)	$5,0 \pm 0,1$ ($\Delta Int = 0,5$)	$5,0 \pm 0,1$ ($\Delta Int = 0,6$)	$4,7 \pm 0,2$ ($\Delta Int = 0,6$)

^a Dobiveni obradom podataka titracija uz korištenje nelinearne regresije primjenom eksponencijalne jednadžbe prvog reda (Origin 7,0) prema modelu spoj/NMP = 1:1 stehiometriji kompleksa; korelacijski koeficijent $R > 0,99$. ^b $\Delta Int = Int(100\% \text{ kompleks})/Int_0$. ^c NP = premale promjene intenziteta emisije za pouzdanu obradu podataka. ^d Zbog male promjene intenziteta emisije moguća je samo procjena $\log K_s$.

S obzirom na nisku topljivost kaliksarena, koja je ometala NMR studije, korištene su i računalne metode koje je provela dr. sc. Ivana Nikšić-Franjić (Zavod za fizičku kemiju, IRB) kako bi se utvrdila mogućnost inkluzije pirimidinske i purinske baze, specifično CMP i AMP unutar šupljine pozitivno nabijenog **C4**. Pripremljena su dva kompleksa kaliksarena **C4** sa svakim mononukleotidom, gdje je jedan mononukleotid orijentiran između imidazolnih skupina (slika 61;

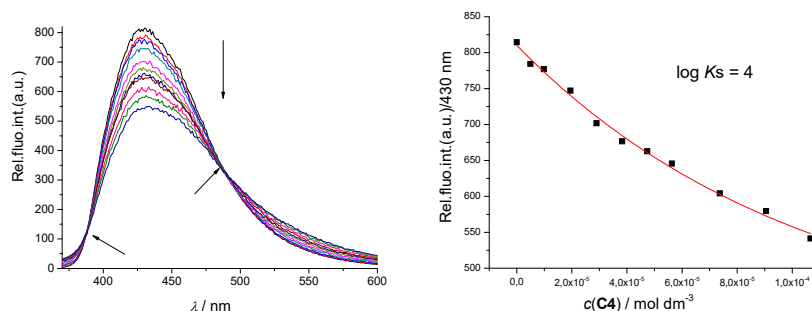
lijevo), a drugi između triazolnih podjedinica (slika 61; desno). Simulacije molekularne dinamike su provedene u trajanju 50 ps, s vremenskim korakom od 4 fs pri temperaturi od 298,15 K, koja je utvrđena dovoljnom za postizanje najstabilnijeg termodinamičkog stanja. Voda je modelirana generaliziranim Bornovim modelom s površinom (gbsa).



Slika 61. Optimizirani kompleksi kaliksarena **C4** (štapićasti model) s nukleotidima (kalotni model) umetnut između imidazola (lijevo) i triazola (desno): CMP (gore) i AMP (dolje). Određeno semiempirijskom GFN2-xTB metodom i simulacijama molekularne dinamike.

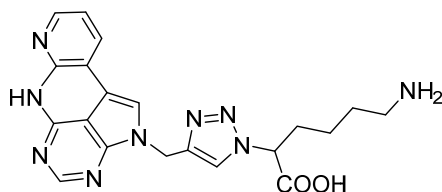
4.3.3.2. Interakcije kaliksarena s fluorescentnom nukleobazom

Zbog slabe emisije kaliksarena, praćenje njihovih interakcija s nukleotidima sklono je velikim pogreškama. Kako bi se potvrdili dobiveni rezultati korišten je obrnuti pristup, praćenjem emisijske promjene jako fluorescentnog derivata nukleobaze pri dodatku kaliksarena **C4**. Korištena je nukleobaza **D8-111TFA** ($\lambda_{exc} = 350 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 400\text{--}500 \text{ nm}$), ranije objavljena,¹¹² a različitih spektralnih karakteristika od kaliksarena (slika 63). Interakcije su ispitane fluorimetrijskim titracijama kako je opisano u poglavlju 3.4.4., dodavanjem kaliksarena u otopinu **D8-111TFA**. Rezultati fluorimetrijskih titracija su obrađeni pomoću nelinearne regresije primjenom eksponencijalne jednadžbe prvog reda kako bi se odredile vrijednosti konstante vezanja ($\log K_s$).



Slika 62. Lijevo: Emisijski spektri pri fluorimetrijskoj titraciji **D8-111TFA** ($c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$; $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$) spojem **C4** ($c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0; $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$). Desno: Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri valnoj duljini 430 nm o koncentraciji spoja **C4**.

Dodaci kaliksarena **C4** (najbolja topljivost od svih kaliksarena, mogući dodaci do 0,1 mM koncentracije) rezultirali su snažnim promjenama emisije pri 400–500 nm, gdje dvije izoemisije točke podupiru stvaranje jednog tipa kompleksa (slika 62). Obradom rezultata nelinearnom regresijom za stehiometriju kompleksa spoj **C4** : **D8-111TFA** = 1 : 1 određena je konstanta vezanja $\log K_s = 4,0 \text{ M}^{-1}$ koja je usporediva s vrijednosti kompleksa **C4/AMP** (Tablica 14). Na taj način je potvrđena izračunata vrijednost konstanti stabilnosti ($\log K_s$) za nukleotide (tablica 15).



Slika 63. Korištena fluorescentna nukleobaza povezana s lizinom ‘klik’ reakcijom **D8-111TFA** 112

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu pripravljena su tri nova analoga peptida WHW kod kojih je centralni histidin u triptofan-histidin-triptofan (WHW) peptidu zamijenjen s Ala-(triazol) motivom. Dok W-A(triazol)-W tripeptid **10** ima samo zamijenjen centralni histidin s već Ala-(triazol) motivom, analozi imaju zamijenjen i jedan triptofan s pirenima: W-A(triazol)-Pyr **6** (piren povezan s dužim amidnim mostom) i W-A(triazol)-Pyr **7** (piren povezan s kratkim, amidnim mostom). Novosintetizirani analog **10** uspješno kompleksira Cu^{2+} kation, sa sličnim afinitetom kao i nativni peptid WHW. U usporedbi s WHW i **10**, analozi sa piren-alkilnim supstituentima (**6** i **7**), bitno jače kompleksiraju Cu^{2+} kation, vjerojatno zbog stvaranja intramolekularnog ekscipleksa između triptofana i pirena, što je utjecalo na povoljnu konformaciju peptida za vezanje Cu^{2+} .

Pirenski analozi **6** i **7** pokazali su batokromni pomak apsorpcije (~ 400 nm) zbog nastanka ekscipleksa triptofana, te također batokromni pomak fluorescencije na 480–500 nm. Batokromni pomak fluorescencije omogućio je izvođenje konfokalne mikroskopije pri vidljivom svjetlu, s čime je izbjegnuta snažna stanična autofluorescencija.

Proučavani analozi pokazali su snažno vezanje na ds-DNA i ds-RNA, pogotovo pirenski analozi **6** i **7** i to s mikromolarnim afinitetom. Spojevi se vežu umetanjem u mali utor DNA i veliki utor RNA. Peptid/ Cu^{2+} kompleksi pokazali su drugačiji afinitet prema ds-DNA i ds-RNA, pogotovo kod stabilizacije ds-DNA u eksperimentu temperature mekšanja, gdje su svi osim **6**/ Cu^{2+} uzrokovali stabilizacije ds-DNA, a sami **6**/ Cu^{2+} uzrokovao je snažnu stabilizaciju, a potom i oksidativno cijepanje uzrokovano Cu^{2+} , što je dovelo do destabilizacije temperature mekšanja ds-DNA. Pirenski analozi **6** i **7** uspješno su ušli u stanice te nisu pokazali citotoksični efekt, a nakupili su se unutar organela citoplazme. Izlaganje svjetlu (350–400 nm) dovelo je do snažnog antiproliferativnog djelovanja na stanice tretirane mikromolarnom koncentracijom pirenskih analoga, vjerojatno uzrokovano proizvodnjom singletnog kisika inducirano pirenom. Sintetizirani pirenski analozi mogli bi se koristiti kao novi spojevi za razvoj fotoinduciranih teranostičkih agensa temeljenih na peptidima.

U radu su uspješno ispitani novi DNA i RNA senzori, tetrakationski bis-triarilborani (**B1–B4**). Spojevi **B1–B3** sadrže dugu bis(feniletinil)arilnu poveznicu između dva borilna ostatka (**B1**: aril = 5,5'-2,2'-bitiofen; **B2**: aril = 1,4-benzen; **B3**: aril = 9,10-antracen), dok kratki analog **B4** sadrži samo antracen kao poveznicu. UV/Vis i fluorescencijska mjerenja ovisna o koncentraciji i temperaturi

pokazala su da spojevi **B1** i **B3** imaju sklonost agregiranju, koja se povećava porastom ionske jakosti otopine. Eksperimenti temperaturnog mekšanja pokazali su snažnu stabilizaciju ds-DNA i ds-RNA od strane spojeva **B1–B3**, a slabija stabilizacija dvostrukih uzvojnica od strane kratkog antracenskog analoga **B4** pokazala je važnost duljine i fleksibilnosti aromatske poveznice za uspješnu temperaturnu stabilizaciju uzvojnice. Proučavani triarilborani pokazali su snažno vezanje na ds-DNA/RNA i ss-DNA/RNA. Afinitet vezanja je bio sličan prema ds-DNA/RNA i ss-DNA/RNA što je neuobičajeno, s obzirom da je afinitet vezanja prema ss-polinukleotidima 2-3 reda veličine niži nego prema ds-polinukleotidima. To nam sugerira da se ss-RNA omotava oko spojeva kao nit oko vretena, što je već poznato.^{17,63} Spoj **B4** pokazao je nešto slabiji afinitet vezanja za polinukleotide od ostalih ispitivanih spojeva, što je u skladu s prethodno provedenim eksperimentom temperaturnog mekšanja i potvrđuje važnost duljine poveznice. Tijekom provođenja fluorimetrijskih titracija s polinukleotidima, primijećen je proces agregacije – deagregacije kod spojeva **B1** i **B3**. Ovo upućuje na agregiranje duž polinukleotida pri visokim koncentracijama liganda i deagregiranja i raspoređivanja liganda na odvojena vezna mjesta uzduž DNA pri povećanju koncentracije polinukleotida ili vezanje u obliku dimera unutar utora. Prema svim rezultatima mjerenja, može se zaključiti da su utori dominantna vezna mjesta, odnosno mali utor kod ds-DNA i veliki utor kod ds-RNA za spojeve **B1**, **B2** i **B4**. CD mjerenja za spoj **B3** upućuju na odmotavanje uzvojnite strukture polinukleotida pri vezanju i vrlo uniformiranu orijentaciju u odnosu na helikalnu os za sve polinukleotide koji sadrže A, T i U parove baza.

Ispitani su i neutralni i kationski kaliksareni, koji su pokazali slabu, ali primjenjivu fluorescenciju. Kako to svojstvo kaliksarenskog kostura do sad nije poznato, pretpostavljamo da su dijelovi kaliksarena odgovorni za fluorescenciju vjerojatno fenol-amin i fenol-triazol podjedinice, no za potvrdu će trebati provesti opsežna dodatna istraživanja.

Ovisno o meti, ispitivani kaliksareni pokazali su dva tipa interakcija. Pri fluorimetrijskim titracijama s mononukleotidima (NMP) došlo je do stvaranja inkluzijskih kompleksa, gdje se mononukleotid djelomično umetnuo sa svojom nukleobazom u šupljinu kaliksarena. Interakcije su se temeljile na aromatskom slaganju i hidrofobnim interakcijama, uz moguć doprinos elektrostatskih interakcija u slučaju kationskih kaliksarena. Dobiven je selektivan odgovor prema pirimidinskim bazama (UMP, CMP), vjerojatno jer su nukleobaze bitno manje od purinskih AMP i GMP, a što utječe na umetanje u kaliksaren.

Fluorimetrijski eksperimenti su pokazali kako samo su kationski kaliksareni **C2** i **C4** efikasno istiskuju etidijev bromid iz dvolančanih DNA i RNA s vrijednostima IC_{50} od 0,1 do 0,8, što pokazuje važnost interakcije pozitivno nabijenih kaliksarena i negativno nabijene fosfatne okosnice polinukleotida. To je potvrđeno i s neovisnim eksperimentom CD spektrofotometrije istiskivanja DAPI-ja iz AT-DNA utora, s tim da uspješnije istiskivanje DAPI-ja manjim analogom **C2** u usporedbi s većim **C4** pokazuje sterički kontroliranu selektivnost. Dodatni eksperimenti cirkularnog dikroizma pokazali su kako umetanje kaliksarena u utore polinukleotida ne utječe bitno na samu dvostruku uzvojniju, Iz svega se zaključuje da je način vezanja ispitivanih kaliksarena umetanjem u mali utor DNA ili veliki utor RNA.

6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

A – adenin

AFM – mikroskopija atomske sile (engl. *atomic force microscopy*)

AMP – adenzin monofosfat

AT – adenin-timin bogato područje

A549 – stanice raka pluća

Boc – *tert*-butiloksikarbonilna zaštitna skupina

Boc-Trp – aminokiselina triptofan kojoj je NH kraj zaštićen *tert*-butiloksikarbonilnom zaštitnom skupinom

br-s – široki singlet u NMR spektroskopiji

C – citozin

CD – cirkularni dikroizam

CMP – citozin monofosfat

ct-DNA – engl. *calf thymus* DNA

d – dublet u NMR spektroskopiji

DAPI – 4',6'-diamidino-2-fenilindol

dd – dublet dubleta u NMR spektroskopiji

DMEDA – N,N'-dimetiletilendiamin

DMF – N,N-dimetilformamid

DMSO – dimetilsulfoksid

DNA – engl. *deoxyribonucleic acid* (deoksiribonukleinska kiselina)

ds – dvolančani polinukleotid

dt – dublet tripleta u NMR spektroskopiji

EtBr – etidijev bromid

Et₃N – trietilamin

EtOH – etanol

G – gvanin

GC – gvanin-citozin bogato područje

GMP – gvanozin monofosfat

HBTU – 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronijev heksafluorofosfat

HOBt – hidroksibenzotriazol

HRMS – engl. *high resolution mass spectrometry*

ICD – inducirani cirkularni dikroizam

IDA50% – engl. *Indicator Displacement Assay*

K_s – konstanta stabilnosti

m – multiplet u NMR spektroskopiji

MALDI-TOF/TOF – matricom potpomognuta ionizacija desorpcijom laserskog zračenja
analizator masa s vremenom leta

MS – spektrometrija masa

NATA – *N*-acetil-L-triptofanamid

NMR – engl. *nuclear magnetic resonance* (nuklearna magnetska rezonancija)

PCC – Pearsonov koeficijent korelacije

p(dAdT)₂ – alternirajući polinukleotid AT parova baza

p(dGdC)₂ – alternirajući polinukleotid GC parova baza

Ph – fenilna skupina

poli dA (dA) – jednolančana struktura adenina koja ima šećer deoksiriboza

poli dA-polu dT (dAdT) – dvolančani polinukleotid koji se sastoji od lanca adenina i timina

poli dT (dT) – jednolančana struktura timina koja ima šećer deoksiribozu

poli rA (rA) – jednolančana struktura adenina koja ima šećer ribozu

poli rA-polu rU (rArU) – dvolančana molekula koja sadrži uzvojnica adenina i uzvojnica uracila

poli rC (rC) – jednolančana struktura citozina koja ima šećer ribozu

poli rG (rG) – jednolančana struktura gvanidina koja ima šećer ribozu

poli rU (rU) – jednolančana struktura uracila koja ima šećer ribozu

pUC19 – vektor za kloniranje plazmida u E. Coli

Py – prsten pirena

q – kvartet u NMR spektroskopiji

Rf – engl. *retention factor* (faktor zadržavanja analita u kromatografiji)

RNA – engl. *ribonucleic acid* (ribonukleinska kiselina)

ROS – reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*)

s – singlet u NMR spektroskopiji

t – triplet u NMR spektroskopiji

T – timin

TC-SPC – engl. *time-correlated single-photon counting* (vremenski korelirano pojedinačno brojanje fotona)

TFA – engl. *trifluoroacetic acid* (trifluoroctena kiselina)

THF – tetrahidrofur

TLC – engl. *thin layer chromatography* (tankoslojna kromatografija)

T_m – temperatura mekšanja polinukleotida

Trp – triptofan

T.t. – temperatura tališta

U – uracil

UV – engl. *ultraviolet* (ultraljubičasto elektromagnetsko zračenje)

UV/Vis – engl. *ultraviolet/visible* (ultraljubičasto / vidljivo elektromagnetsko zračenje)

Q-TOF – engl. *Quadrupole Time-of-Flight*

δ – oznaka za kemijski pomak u NMR spektroskopiji

7. LITERATURNI IZVORI

- ¹ A.W.Czarnik, *Acc. Chem. Res.*, 1994, 27, 302–308.
- ² D. Wu, A. C. Sedgwick, T. Gunnlaugsson, E. U. Akkaya, J. Yoon, T. D. James, *Chem. Soc. Rev.* **46** (2017) 7105.
- ³ A.P.deSilva, H.Q.N.Gunaratne, T.Gunnlaugsson, A.J.M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher, T. E. Rice, *Chem.Rev.*,1997, 97, 1515–1566.
- ⁴ Y. Fang, W. Dehaen, Small-molecule-based fluorescent probes for f-block metal ions: A new frontier in chemosensors, *Coor. Chem.Rev.* 427 (2021) 213524.
- ⁵ C. Guo, A. C. Sedgwick, T. Hirao, J. L. Sessler, *Coor. Chem. Rev.* **427** (2021) 213560.
- ⁶ B. Juskowiak, *Anal. Bioanal. Chem.* **399** (2010) 3157-3176.
- ⁷ Y. Yang, F. Gao, Y. Wang, H. Li, J. Zhang, Z. Sun, Y. Jiang, *Molecules* **27** (2022) 8421.
- ⁸ S. Neidle, Principles of Nucleic Acid Structure, Vol. 1, Academic Press, Massachusetts, 2008, 132-203.
- ⁹ A. A. Almaqwashi, T. Paramanathan, I. Rouzina, M. C. Williams, *Nucleic Acids Research*, **44** (2016) 3971 – 3988.
- ¹⁰ Ma, C.; Hong, F.; Yang, S. Amyloidosis in Alzheimer’s Disease: Pathogeny, Etiology, and Related Therapeutic Directions. *Molecules* **2022**, 27, 1210.
- ¹¹ Abelein A, Ciofi-Baffoni S, Mörman C, Kumar R, Giachetti A, Piccioli M, Biverstål H. Molecular Structure of Cu(II)-Bound Amyloid-β Monomer Implicated in Inhibition of Peptide Self-Assembly in Alzheimer's Disease. *JACS Au*. 2022 Nov 11;2(11):2571-2584.
- ¹² M. Egli, W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer-Verlag, New York, 1983.
- ¹³ Lakowicz, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Springer: Boston, MA, USA, 2006.
- ¹⁴ Kostenko, E.; Dobrikov, M.; Pyshnyi, D.; Petyuk, V.; Komarova, N.; Vlassov, V.; Zenkova, M. 5'-bis-pyrenylated oligonucleotides displaying excimer fluorescence provide sensitive probes of RNA sequence and structure. *Nucleic Acids Res.* **2001**, 29, 3611–3620.
- ¹⁵ Østergaard, M.E.; Hrdlicka, P.J. Pyrene-functionalized oligonucleotides and locked nucleic acids (LNAs): Tools for fundamental research, diagnostics, and nanotechnology. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 5771–5788.

-
- ¹⁶ Mukherjee, S.; Das Sarma, J.; Shunmugam, R. pH-Sensitive Nanoaggregates for Site-Specific Drug-Delivery as Well as Cancer Cell Imaging. *Acs Omega* **2016**, *1*, 755–764.
- ¹⁷ Ž. Ban, S. Griesbeck, S. Tomić, J. Nitsch, T. B. Marder, I. Piantanida, *Chem. Eur. J.* **2020**, *26*, 2195–2203.
- ¹⁸ W. Hu, C. Blecking, M. Kralj, L. Šuman, I. Piantanida, T. Schrader, Dimeric calixarenes: A new family of major-groove binders, *Chem. Eur. J.* **18** (2012) 3589-3597.
- ¹⁹ V. Apostolopoulos, J. Bojarska, T.-T. Chai, S. Elnagdy, K. Kaczmarek, J. Matsoukas, R. New, K. Parang, O. P. Lopez, H. Parhiz, C.O. Perera, M. Pickholz, M. Remko, M. Saviano, M. Skwarczynski, Y. Tang, W. M. Wolf, T. Yoshiya, J. Zabrocki, P. Zielenkiewicz, M. AlKhazindar, V. Barriga, K. Kelaidonis, E. M. Sarasia, I. Toth, A global review on short peptides: Frontiers and perspectives, *Molecules* **26** (2021) 430.
- ²⁰ Rudradip Das, Bhavinkumar Gayakvad, Suchita Dattatray Shinde, Jyoti Rani, Alok Jain, Bichismita Sahu, *ACS Applied Bio Materials* **2020** *3* (9), 5474-5499.
- ²¹ Chandrudu, S.; Simerska, P.; Toth, I. Chemical methods for peptide and protein production. *Molecules* **2013**, *18*, 4373–4388.
- ²² N. Ming, Ultrashort peptides: minimum number in amino acid residues, maximum number in bioapplications, *Revista Bionatura* **2019**, *4*(1):1.
- ²³ M. Stawikowski, G. B. Fields, Introduction to peptide synthesis, *Curr. Protoc. Protein Sci.* **2012**, 18.1.1.-18.1.13.
- ²⁴ Verlander, M. Industrial Applications of Solid-Phase Peptide Synthesis – A Status Report. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2007**, *13*, 75.
- ²⁵ A. El-Faham, F. Albericio, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 11, 6557-6602.
- ²⁶ S. -Y. Han, Y.-A. Kim, Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis, *Tetrahedron*, **60**, 2004, 2447-2467.
- ²⁷ T. I. Al-Warhi, H. M. A. Al-Hazimi, A. El-Faham, Recent development in peptide coupling reagents, *Journal of Saudi Chemical society*, **2012**, *16*, 97-116.
- ²⁸ M. Bradley, E. Valeur, *Chemical society reviews*, **38**(2) (2008) 606-631.
- ²⁹ A. Isidro-Llobet, M. Alvarez, F. Albericio, Amino Acid-protecting groups, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2455-2504.

-
- ³⁰ S. Manoharan, G. J. Guillemin, R. S. Abiramasundari, M. M. Essa, M. Akbar, M. D. Akbar, The role of reactive oxygen species in the pathogenesis of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and Huntington's disease: a mini review, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 2016.
- ³¹ Bhatt S, Puli L, Patil CR. Role of reactive oxygen species in the progression of Alzheimer's disease. *Drug Discovery Today*. (2021) 3, 794-803.
- ³² C. Sharma, S. R. Kim, Linking oxidative stress and proteinopathy in Alzheimer's disease, *Antioxidants*, 2021, 10, 1231.
- ³³ Huang, W., Zhang, X., & Chen, W. (2016). Role of oxidative stress in Alzheimer's disease (Review). *Biomedical Reports*, 4, 519-522.
- ³⁴ C. Cheignon, M. Tomas, D. Bonnefont-Rousselot, P. Faller, C. Hureau and F. Collin, Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's Disease, *Redox Biology*, 2017.
- ³⁵ L. Rajendran, M. Honsho, T. R. Zahn, P. Keller, K. D. Geiger, P. Verkade, K. Simons, Alzheimer's disease β -amyloid peptides are released in association with exosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 2006, 103 (30), 11172-11177.
- ³⁶ Wezynfeld, N.E.; Tobolska, A.; Mital, M.; Wawrzyniak, U.E.; Wiloch, M.Z.; Plonka, D.; Bossak-Ahmad, K.; Wroblewski, W.; Bal, W. *Inorg. Chem.* **2020**, *59*, 14000–14011.
- ³⁷ Bossak, K.; Mital, M.; Poznański, J.; Bonna, A.; Drew, S.; Bal, W. Interactions of α -Factor-1, a Yeast Pheromone, and Its Analogue with Copper(II) Ions and Low-Molecular-Weight Ligands Yield Very Stable Complexes, *Inorg. Chem.* **2016**, *55*, 7829–7831.
- ³⁸ I. Ufnalska, U. E. Wawrzyniak, K. Bossak-Ahmad, W. Bal, W. Wroblewski, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 862 (2020) 114003.
- ³⁹ Gonzalez, P.; Bossak, K.; Stefaniak, E.; Hureau, C.; Raibaut, L.; Bal, W.; Faller, P. N-Terminal Cu-Binding Motifs (Xxx-Zzz-His, Xxx-His) and Their Derivatives: Chemistry, Biology and Medicinal Applications *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 8029–8041.
- ⁴⁰ Harding, M.M.; Nowicki, M.W.; Walkinshaw, M.D. Metals in protein structures: A review of their principal features. *Crystallogr. Rev.* **2010**, *16*, 247–302.
- ⁴¹ Zou, J.; Sugimoto, N. Complexation of peptide with Cu²⁺ responsible to inducing and enhancing the formation of α -helix conformation. *BioMetals* **2000**, *13*, 349–359.
- ⁴² Katoh, S. Early research on the role of plastocyanin in photosynthesis. *Photosynth. Res.* **2003**, *76*, 255–261.

-
- ⁴³ Robinett, N.G.; Peterson, R.L.; Culotta, V.C. Eukaryotic copper-only superoxide dismutases (SODs): A new class of SOD enzymes and SOD-like protein domains. *J. Biol. Chem.* **2017**, *293*, 4636–4643.
- ⁴⁴ Horn, D.; Barrientos, A. Mitochondrial copper metabolism and delivery to cytochrome c oxidase. *IUBMB Life* **2008**, *60*, 421–429.
- ⁴⁵ Solomon, E.I.; Heppner, D.E.; Johnston, E.M.; Ginsbach, J.W.; Cirera, J.; Qayyum, M.; Tian, L. Copper Active Sites in Biology. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 3659–3853.
- ⁴⁶ I. Piantanida, *Kem. Ind.*, **52** (2003) 545 – 552.
- ⁴⁷ A. Lauria, A. Montalbano, P. Barraja, G. Dattolo, A. M. Almerico, *Current Medicinal Chemistry*, **14** (2007) 2136 – 2160.
- ⁴⁸ J. Lipfert, S. Doniach, R. Das, D. Herschlag, *Annu. Rev. Biochem.* 2014, *83*, 813–841.
- ⁴⁹ S. K. Pal, A. H. Zewail, *Chem. Rev.* 2004, *104*, 2099–2124.
- ⁵⁰ Saenger, W. *Principles of Nucleic Acid Structure*; Springer-Verlag **1983**, New York
- ⁵¹ Cantor, C. R.; Schimmel, P. R. *Biophysical Chemistry*. *WH Freeman and Co.* **1980**, *3*, 1109-1181, San Francisco.
- ⁵² Erben, A.; Sviben, I.; Mihaljević, B.; Piantanida, I.; Basarić, N. Non-Covalent Binding of Tripeptides-Containing Tryptophan to Polynucleotides and Photochemical Deamination of Modified Tyrosine to Quinone Methide Leading to Covalent Attachment. *Molecules* 2021, *26*, 4315.
- ⁵³ A. V. Strizhak, V. Y. Postupalenko, V. V. Shvadchak, N. Morellet, E. Guittet, V. G. Pivovarenko, A. S. Klymchenko, Y. Mely, Two-color fluorescent L-amino acid mimic of tryptophan for probing, peptide-nucleic acid complexes, *Bioconjugate Chem.* 2012, *23*, 12, 2434–2443
- ⁵⁴ C. M. Baker, G. H. Grant, Role of aromatic amino acid in protein-nucleic acid recognition, *Biopolymers*, 2007, *85*, 456-470.
- ⁵⁵ K. P. Mahon Jr., M. D. Roy, J. R. Carreon, E. G. Prestwich, J. L. Rouge, S. Shin, S. O. Kelley, *ChemBioChem* 2006, *7*, 766 – 773
- ⁵⁶ X. Zhang, Y. Yang, M. Zhao, L. Liu, M. Zheng, Y. Wang, J. Wu, S. Peng, A class of Trp-Trp-AA-Obzl: Synthesis, in vitro anti-proliferation/ in vivo anti-tumor evaluation, intercalation mechanism investigation and 3D QSAR analysis, *Eur. J. Med. Chem.* *46* (8) 2011, 3410-3419.
- ⁵⁷ Parab, K. Venkatasubbaiah, F. Jakle, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (39) (2006) 12879 – 1288.
- ⁵⁸ Z. M. Hudson, S. Wang, *Dalton Trans.*, 2011,**40**, 7805-7816

-
- ⁵⁹ S. Griesbeck, Z. Zhang, M. Gutmann, T. Lühmann, R. M. Edkins, G. Clermont, A. N. Lazar, M. Haehnel, K. Edkins, A. Eichhorn, M. Blanchard-Desce, L. Meinel, T. B. Marder, *Chem. Eur. J.* **22** (2016) 14701-14706.
- ⁶⁰ J. Jia, P. Xue, Y. Zhang, Q. Xu, G. Zhang, T. Huang, H. Zhang, R. Lu, *Tetrahedron*, **70** (35) (2014) 5499-5504.
- ⁶¹ C. D. Entwistle, T. B. Marder, *Chem. Mater.* **16** (23) (2004) 4574 – 4585.
- ⁶² C.-W. Chiu, Y. Kim, F. P. Gabbaï, *J. Am. Chem. Soc.* **131** (2009) 60-61.
- ⁶³ H. Amini, Ž. Ban, M. Ferger, S. Lorenzen, F. Rauch, A. Friedrich, I. Crnolatac, A. Kendel, S. Miljanić, I. Piantanida, T. B. Marder, *Chem. Eur. J.* 2020, 26, 6017–6028.
- ⁶⁴ Ž. Ban, Z. Karačić, S. Tomić, H. Amini, T. B. Marder, I. Piantanida, *Molecules*, **26** (2021) 4816.
- ⁶⁵ C. Prajapati, S. S. Chauhan, *FEBS Journal*, **278** (2011) 3256-3276.
- ⁶⁶ H. -J. Li, S. K. Mellerup, X. Wang, S. Wang, *Org. Lett.* **21** (8) (2019) 2838–2842.
- ⁶⁷ X. Ma, Y. Zhao, *Chem. Rev.* 2015, 115, 15, 7794–7839
- ⁶⁸ F. Huang, E. V. Anslyn, *Chem. Rev.* 2015, 115, 6999–7000
- ⁶⁹ G. Yu, X. Chen, *Theranostics*, 2019, 9(11), 3041-3074.
- ⁷⁰ L. Baldini, A. Casnati and F. Sansone, *Eur. J. Org. Chem.*, 2020, 5056–5069.
- ⁷¹ C. D. Gutsche, B. Dhawan, K. H. No, R. Muthukrishnan, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 3782–3792.
- ⁷² Kalchenko, V.I. Functional Calixarene Nanostructures. *Theor Exp Chem* **54**, 74–84 (2018).
- ⁷³ R. Perrin, R. Lamartine, M. Perrin, *Pure & App. Chem.*, Vol. 65, No. 7, pp. 1549-1559, 1993.
- ⁷⁴ C. D. Gutsche, *Calixarenes: An introduction*, Royal Society of Chemistry, 2.izdanje, 2008.
- ⁷⁵ M. S. Peters, M. Li, T. Schrader, Interactions of calix[n]arenes with nucleic acids, *Nat. Prod. Commun.* 7 (2012) 409-417.
- ⁷⁶ J. W. Cornforth, P. D’Arcy Hart, G.A. Nicholls, R. J. W. Rees and J. A. Stock, *Br. J. Pharmacol.* 1955, 10, 73.
- ⁷⁷ M. M. Naseer, M. Ahmed, S. Hameed, Functionalized calix[4]arenes as potential therapeutic agents, *Chem. Biol. Drug Des.*, 89, 243–256 (2017).
- ⁷⁸ G. D. Andretti, R. Ungaro, A. Pochini, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1979, 1005–1007.

-
- ⁷⁹ Basilotta, R.; Mannino, D.; Filippone, A.; Casili, G.; Prestifilippo, A.; Colarossi, L.; Raciti, G.; Esposito, E.; Campolo, M. Role of Calixarene in Chemotherapy Delivery Strategies. *Molecules* **2021**, *26*, 3963.
- ⁸⁰ Y. K. Agrawal & H. Bhatt, *Bioinorg. Chem. Appl.* **2004**, *2*, 237–274.
- ⁸¹ Tlustý, M.; Eigner, V.; Dvořáková, H.; Lhoták, P. The Formation of Inherently Chiral Calix[4]quinolines by Doebner–Miller Reaction of Aldehydes and Aminocalixarenes. *Molecules* **2022**, *27*, 8545
- ⁸² P. Neri, J. L. Sessler, M.-X. Wang, *Calixarenes and beyond*, Springer, 2016.
- ⁸³ J.-N. Rebilly, B. Colasson, O. Bistri, D. Over and O. Reinaud, *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, *44*, 467–489.
- ⁸⁴ S. Collin, O. Parrot, L. Marcelis, E. Brunetti, I. Jabin, G. Bruylants, K. Bartik and O. Reinaud, *Chem. – Eur. J.*, **2018**, *24*, 17964–17974.
- ⁸⁵ Y. Rondalez, G. Bertho, O. Reinaud, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, *41*(6), 1044–1046.
- ⁸⁶ O. Bistri, B. Colasson and O. Reinaud, *Chem. Sci.*, **2012**, *3*, 811–818.
- ⁸⁷ V. Bagnacani, V. Franceschi, M. Bassi, M. Lomazzi, G. Donofrio, F. Sansone, A. Casnati, R. Ungaro, *Nat. Commun.*, **2013**, *4*, 1721.
- ⁸⁸ M. Lomazzi, V. Franceschi, V. Bagnacani, C. A. Vezzoni, G. Donofrio, A. Casnati and F. Sansone, *Eur. J. Org. Chem.*, **2021**, 1–13.
- ⁸⁹ Chong ZX, Yeap SK, Ho WY. Transfection types, methods and strategies: a technical review. *PeerJ*. **2021** Apr 21;9:e11165.
- ⁹⁰ M. Dudic, A. Colombo, F. Sansone, A. Casnati, G. Donofrio, R. Ungaro, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 11613–11 618.
- ⁹¹ Y. Shi, H.-J. Schneider, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1999**, 1797–1803
- ⁹² Stanley, N.J.; Sejer Pedersen, D.; Nielsen, B.; Kvist, T.; Mathiesen, J.M.; Bräuner-Osborne, H.; Taylor, D.K.; Abell, A.D. 1,2,3-Triazolyl amino acids as AMPA receptor ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 7512–7515.
- ⁹³ Li, J.; Sha, Y. A Convenient Synthesis of Amino Acid Methyl Esters. *Molecules* **2008**, *13*, 1111–1119.
- ⁹⁴ O. Keller, W. E. Keller, G. van Look, G. Wersin, *Org. Synth.* **1985**, *63*, 160.
- ⁹⁵ S. Griesbeck, M. Ferger, C. Czernetzi, C. Wang, R. Bertermann, A. Friedrich, M. Haehnel, D. Sieh, M. Taki, S. Yamaguchi, T. B. Marder, *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 7679–7688.

-
- ⁹⁶ H. Gampp, M. Maeder, C. J. Meyer and A. D. Zuberbuehler, *Talanta*, **1985**, *32*, 257–264.
- ⁹⁷ M. Maeder and A. D. Zuberbuehler, *Anal. Chem.*, **1990**, *62*, 2220–2224.
- ⁹⁸ J. B. Chaires, N. Dattagupta, D. M. Crothers *Biochemistry* **21** (1982) 3933–3940.
- ⁹⁹ G. Malojčić, I. Piantanida, M. Marinić, M. Žinić, M. Marjanović, M. Kralj, K. Pavelić, H. J. Schneider, *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, *3*, 4373.
- ¹⁰⁰ J. D. McGhee, P. H. von Hippel, *J. Mol. Biol.* **86** (1974) 469–489.
- ¹⁰¹ G. Scatchard, *Ann N Acad Sci.* **51** (1949) 660–672.
- ¹⁰² J.-L. Mergny, L. Lacroix, *Oligonucleotides*, **2003**, *13*, 515–537.
- ¹⁰³ Crowley, J. D.; McMorran, D. A. *Topics in Heterocyclic Chemistry*, **2012**, *28*, 31.
- ¹⁰⁴ Bedeche, S.; Daran, J.-C.; Ruiz, J.; Astruc, D. *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 4903–4908.
- ¹⁰⁵ Valverde, I. E.; Mindt, T. L. 1,2,3-Triazoles as Amide-bond Surrogates in Peptidomimetics. *CHIMIA* **2013**, *67*, 262–266. <https://doi.org/10.1002/anie.201303108>
- ¹⁰⁶ Hamdan, F.; Tahoori, F.; Balalaie, S. Synthesis of novel cyclopeptides containing heterocyclic skeletons. *RSC Adv.* **2018**, *8*, 33893–33926. <https://doi.org/10.1039/C8RA03899F>
- ¹⁰⁷ Bonnamour, J.; Legros, J.; Crousse, B.; Bonnet-Delpon, D. Synthesis of new trifluoromethyl peptidomimetics with a triazole moiety. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 8360–8362. doi: 10.1016/j.tetlet.2007.09.118
- ¹⁰⁸ Agalave, S. G.; Maujan, S. R.; Pore, V. S. Click Chemistry: 1,2,3-Triazoles as Pharmacophores. *Chem. Asian J.* **2011**, *6*, 2696–2718. doi: 10.1002/asia.201100432
- ¹⁰⁹ Kharb, R.; Sharma, P. C.; Yar, M. S. Pharmacological significance of triazole scaffold. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2010**, *26*, 1–21. doi:10.3109/14756360903524304
- ¹¹⁰ Koscak, M.; Kroszl, I.; Zinic, B.; Piantanida, I. Fluorescent Analogues of FRH Peptide: Cu(II) Binding and Interactions with ds-DNA/RNA, *Chemosensors* **2022**, *10*, 34. <https://doi.org/10.3390/chemosensors10010034>
- ¹¹¹ Ban, Ž.; Žinić, B.; Matković, M.; Tomašić Paić, A.; Crnolatac, I.; Piantanida, I. Pyrrolocytosine-pyrene conjugates as fluorescent and CD probes for a fine sensing of ds- polynucleotide secondary structure and specific recognition of poly G. *New J. Chem.* **2019**, *43*, 8204 - 8214. doi: 10.1039/C8NJ05286G

-
- ¹¹². Ban, Ž.; Matic, J.; Žinić, B.; Foller Fuchtbauer, A.; Wilhelmsson, L. M.; Piantanida, I. Flexibility and Preorganization of Fluorescent Nucleobase-Pyrene Conjugates Control DNA and RNA Recognition. *Molecules* **2020**, *25*, 2188. <https://doi.org/10.3390/molecules25092188>
- ¹¹³. Astakhova, I. V.; Korshun, V. A.; Wengel, J. Highly Fluorescent Conjugated Pyrenes in Nucleic Acid Probes: (Phenylethynyl)pyrenecarbonyl-Functionalized Locked Nucleic Acids. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 11010–11026.
- ¹¹⁴. Kanamori, T.; Matsuyama, A.; Naito, H.; Tsuga, Y.; Ozako, Y.; Ogura, S.; Okazaki, S.; Yuasa, H. Water-Soluble Glucosyl Pyrene Photosensitizers: An Intramolecularly Synthesized 2-C-Glucoside and an O-Glucoside, *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 13765-13775. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b02066>
- ¹¹⁵. Yang, Y.; Wang, L.; Cao, H. Q.; Li, Q.; Li, Y.; Han, M. J.; Wang, H.; Li, J. B. Photodynamic Therapy with Liposomes Encapsulating Photosensitizers with Aggregation-Induced Emission, *Nano. Lett.* **2019**, *19*, 1821-1826. doi: 10.1021/acs.nanolett.8b04875
- ¹¹⁶. Dobos, A.; Steiger, W.; Theiner, D.; Gruber, P.; Lunzer, M.; Van Hoorick, J.; Van Vlierberghe, S.; Ovsianikov, A. Screening of two-photon activated photodynamic therapy sensitizers using a 3D osteosarcoma model. *Analyst* **2019**, *144*, 3056-3063. <https://doi.org/10.1039/C9AN00068B>
- ¹¹⁷. Bolze, F.; Jenni, S.; Sour, A.; Heitz, V. Molecular photosensitisers for two-photon photodynamic therapy, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 12857-12877. <https://doi.org/10.1039/C7CC06133A>
- ¹¹⁸. Sun, B. B.; Wang, L.; Li, Q.; He, P. P.; Liu, H. L.; Wang, H.; Yang, Y.; Li, J. B. Bis(pyrene)-Doped Cationic Dipeptide Nanoparticles for Two-Photon-Activated Photodynamic Therapy. *Bio-macromolecules* **2017**, *18*, 3506-3513. doi: 10.1021/acs.biomac.7b00780
- ¹¹⁹ Klymchenko, A. S. 2013 *J. Nanosci. Lett.*, *3*, 21.
- ¹²⁰ U. Rosch, S. Yao, R. Wortmann, F. Wurthner, *Angew.Chem.Int.Ed.* 2006,*45*,7026–7030.
- ¹²¹ S. Ma, S. Du, G. Pan, S. Dai, B. Xu, W. Tian, *Aggregate*, 2021, *2*:e96.
- ¹²² R. Nandy, M. Subramoni, B. Varghese, S. Sankararaman, *J. Org. Chem.*, 2007, *72*, 938-944.
- ¹²³ W. T. Yip, D. H. Levy, *J. Phys. Chem.*, 1996, *100*, 11539-11545.
- ¹²⁴ Orehovec, I.; Glavac, D.; Dokli, I.; Gredicak, M.; Piantanida, I. *Croat. Chem. Acta* 2017, *90*, 603–611
- ¹²⁵ Bains GK, Kim SH, Sorin EJ, Narayanaswami V., *Biochemistry*. 2012, *51*(31), 6207-6219.
- ¹²⁶ J. Extebarria, A. Vidal-Ferran, P. Ballestar, *Chem. Commun.*, 2008, *45*, 5939-5941.
- ¹²⁷ T. Šmidlehner, I. Piantanida, G. Pescitelli, *Beilstein J Org Chem.* **14** (2017) 84-105.

-
- ¹²⁸ Eriksson M, Nordén B. Linear and Circular Dichroism of Drug-Nucleic Acid Complexes. In: Chaires J B, Waring M J, editors. *Methods in Enzymology*. Vol. 340. San Diego: Academic Press; 2001. pp. 68–98.
- ¹²⁹ List, N.H.; Knoops, J.; Rubio-Magnieto, J.; Ide, J.; Beljonne, D.; Norman, P.; Surin, M.; Linares, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 14947–14953.
- ¹³⁰ A.C.Sedgwick,J.T.Brewster,T.H.Wu,X.Feng,S.D.Bull, X.H. Qian, J. L. Sessler, T. D. James, E. V. Anslynand X.L.Sun,Chem.Soc.Rev.,2021,50,9–38.
- ¹³¹ Demeunynck, M.; Bailly, C.; Wilson, W.D., Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2004.
- ¹³² Ida, S.; Iwamaru, K.; Fujita, M.; Okamoto, Y.; Kudo, Y.; Kurosaki, H.; Otsuka, M. *Bioorg. Chem.* **2015**, *62*, 8–14.
- ¹³³ Le, X.Y.; Gu, Q.; Song, Z.J.; Zhuang, C.X.; Feng, X.L. *J. Coord. Chem.* **2007**, *60*, 1359–1371.
- ¹³⁴ Yang, Kai & Zhang, Guan & Song, Qiuling. (2018). Four-coordinate Triarylborane Synthesis via Cascade B-Cl/C-B Cross-Metathesis and C-H Bond Borylation. *Chemical Science*. 9. 10.1039/C8SC02281J.
- ¹³⁵ M. Lebtow, I. Helmers, V. Stepanenko, R. Q. Albuquerque, T. B. Marder, G. Fernandez, *Chem. Eur. J.* 2017, *23*, 6198-6205.
- ¹³⁶ P. Krishnamoorthy, P. Sathyadevi, A. H. Cowley, R. R. Butorac, N. Dharmaraj, *Eur. J. Med. Chem.*, 2011, **46** (8), 3376-3387.
- ¹³⁷ A.Maurin, S. Varatharajan, B.ColassonandO.Reinaud, *Org.Lett.*,2014,16,5426–5429.
- ¹³⁸ I. Piantanida, B. S. Palm, P. Cudic, M. Zinic and H. J.Schneider, *Tetrahedron*,2004,60,6225–6231.
- ¹³⁹ I. Piantanida, B. S. Palm, P. Cudic, M. Zinic and H. J.Schneider, *TetrahedronLett.* ,2001, 42, 6779–6783.