

Fluorescentni molekularni senzori temeljeni na peptidu WHW, triarilboranima i kaliksarenima

Krošl Knežević, Ivona

Doctoral thesis / Doktorski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:429777>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)





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 WHW PEPTIDE, 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 WHW PEPTIDE, TRIARYLBORANES AND
CALIXARENES**

DOCTORAL THESIS

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

Zagreb, 2024.

Bibliografska stranica

- ❖ UDK: 577.336:577.112(043.3)
 - ❖ 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: 116
 - ❖ Broj slika: 63
 - ❖ Broj tablica: 15
 - ❖ Broj priloga: 0
 - ❖ Broj literaturnih referenci: 139
-
- ❖ Datum obrane: 23. svibnja 2024.
 - ❖ 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 Sveučilišta u Zagrebu Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, održanoj dana 10. srpnja 2023., te odobrena na sjednici Senata Sveučilišta u Zagrebu 23. siječnja 2024.



Ovaj doktorski rad izrađen 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 Kemijsko inženjerstvo i primijenjena kemija na Sveučilištu u Zagrebu Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije.



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

Hvala mentoru, dr. sc. Ivi Piantanidi, na pruženoj prilici, stručnom vodstvu i dijeljenju znanja te na savjetima i strpljenju prilikom izrade doktorskog rada.

Hvala mentorici, dr. sc. Tatjani Gazivodi Kraljević, na stručnom vodstvu te savjetima i strpljenju prilikom izrade doktorskog rada.

Hvala dr. sc. Biserki Žinić na velikom trudu i posvećenom vremenu tijekom sinteze koja je dio ovog rada, a i nakon te na savjetima prilikom same izrade doktorskog rada.

Hvala dr. sc. Dragomiri Majhen i dr. sc. Kseniji Božinović na biološkim eksperimentima.

Hvala cijelom Laboratoriju za biomolekularne interakcije i spektroskopiju na ugodnoj radnoj atmosferi.

Hvala i društvu iz Laboratorija za biomolekularne interakcije i spektroskopiju i onima koji više nisu njegov dio, a bili su. Hvala Ivi Z., Marti, Željki, Ivoni Č. i Bojanu na mnogim druženjima uz kavu, ručak i beskrajnim zanimljivim razgovorima o poslu, a i o svemu ostalome.

Hvala i prijateljicama i prijateljima izvan labosa, a i izvan posla koji su mi bili podrška kroz ovo cijelo razdoblje. Posebna hvala Gabi, Emeriku, Luciji, Ivani, Eni i Mariji na druženjima koja traju od studentskih dana pa do danas.

Najveća hvala mom Dini, mami i baki na bezuvjetnoj podršci i razumijevanju, ljubavi, guranju naprijed i na vjeri u mene, vama i posvećujem ovaj rad.

SADRŽAJ

SAŽETAK	XIX
ABSTRACT	XXI
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: amiloidni β -protein ($A\beta$) i Alzheimerova bolest.....	8
2.1.4. Peptid triptofan-histidin-triptofan (WHW) i kompleksiranje bakra	10
2.1.5. Nekovalentne interakcije s DNA/RNA i aminokiseline (triptofan).....	11
2.2. Triarilborani.....	14
2.2.1. Općenito o triarilboranima	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.....	24
2.3.4. Kaliksareni i DNA.....	27
3. EKSPERIMENTALNI DIO	29
3.1. SINTEZA DERIVATA PEPTIDA WHW	29
3.2. Analozi bis-triarilborana.....	39
3.3. Analozi kaliksarena	40
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
4.1.3. 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

SAŽETAK

4.2. Analizi 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	85
4.3.1. Spektrofotometrijska karakterizacija analoga kaliksarena	85
4.3.2. Interakcije kaliksarena s ds-DNA i ds-RNA	90
4.3.3. Interakcije kaliksarena s nukleotidima	96
5. ZAKLJUČAK	102
6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA	105
7. LITERATURNI IZVORI	109
8. PRILOZI.....	XXIII
9. ŽIVOTOPIS	XLIX

SAŽETAK

Mnoge male organske molekule su nekovalentni fluorescentni senzori za prepoznavanje DNA, RNA ili proteina te su od izuzetnog značaja za biomedicinsku dijagnostiku i istraživanja molekularne biologije. U ovom radu istraživane su interakcije tri različite grupe nekovalentnih fluorescentnih obilježivača pomoću spektroskopije UV/Vis, fluorescencije i cirkularnog dikroizma te temperaturne denaturacije s DNA, RNA i BSA. Prva grupa su analozi peptida triptofan-histidin-triptofan (WHW), karakterizirani zamjenom histidina s triazolilalaninom, te je kod dva nova analoga jedan triptofan zamijenjen pirenima. Ti analozi zadržali su visok afinitet peptida 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. Ispitana je citotoksičnost sintetiziranih spojeva 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 nekovalentnih fluorescentnih obilježivača se bazira na bis-triarilboranima, za koje je pokazano da s visokom osjetljivošću u 10 nM koncentracijama mogu detektirati i razlikovati DNA, RNA i BSA, simultano pomoću fluorescencije i površinski pojačane Ramanove spektroskopije (engl. *surface-enhanced Raman spectroscopy*, SERS). Ispitani tetrakationski bis-triarilborani s dugom bis(feniletinil)arilnom poveznicom pokazali su snažnu stabilizaciju ds-DNA i ds-RNA u eksperimentu temperaturne denaturacije, a kratki antracenski analog slabiju stabilizaciju, što je pokazalo važnost duljine i fleksibilnosti aromatske poveznice. Rezultati istraživanja dobivena uz pomoć cirkularnog dikroizma (CD) pokazala su da spoj čija je arilna poveznica 9,10-antracen uzrokuje odmotavanje uzvojite strukture polinukleotida pri vezanju i vrlo uniformiranu orijentaciju u odnosu na helikalnu os polinukleotida. Za treću grupu polikationskih kaliksarena i neutralnih analoga, dokazano je da pokazuju fluorescenciju u vodenom mediju, do sada nepoznato svojstvo kaliksarena. Dodatno, dokazano je da svi spojevi vežu mononukleotide (NMP) visokim afinitetom, stvarajući kompleks u obliku 'pincete'. Dobiveni odgovor je selektivan prema pirimidinskim bazama (uracil-monofosfatu i citozin-monofosfatu). S DNA i RNA u interakciju stupaju samo kationski analozi, ukazujući na značaj elektrostatskih interakcija s polianionskom okosnicom DNA/RNA. Eksperiment istiskivanja

SAŽETAK

DAPI-ja iz DNA utora provedeno uz pomoć cirkularnog dikroizma (CD) pokazalo je također bolje istiskivanje uz pomoć kationskih kaliksarena. Dodatni eksperimenti cirkularnog dikroizma pokazali su kako umetanje kaliksarena ne utječe bitno na samu dvostruku uzvojniju.

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

ABSTRACT

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 have investigated the interactions of three different groups of non-covalent fluorescent markers using UV/Vis spectroscopy, fluorescence and circular dichroism as well as 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 triazolyl-alanine, and in the two new analogs one tryptophan is replaced by pyrenes. These analogues retained a high affinity of WHW peptide 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. The cytotoxicity of the synthesized compounds was tested in collaboration with Dr. Majhen from the Ruđer Bošković Institute. It was found that WHW peptide analogues showed weak toxicity *in vitro* on malignant tumor cells and normal human fibroblasts, which was significantly increased for pyrene analogs under UV light. The second group of non-covalent fluorescent labels is based on bis-triarylboranes, which have been shown to detect and differentiate DNA, RNA, and BSA at high sensitivity in 10 nM concentrations simultaneously using fluorescence and surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS). Investigated tetracationic bis-triarylboranes with a long bis(phenylethynyl)aryl linker exhibited strong stabilization of ds-DNA and ds-RNA in the temperature denaturation experiment, while the short anthracene analog showed weaker stabilization, highlighting the importance of the length and flexibility of the aromatic linker. Circular dichroism (CD) results showed that the compound with a 9,10-anthracene aryl linker caused unwinding of the helical structure of polynucleotides upon binding and very uniform orientation relative to the helical axis of the polynucleotide. For the third group of polycationic calixarenes and neutral analogs, it was demonstrated that they exhibit fluorescence in an aqueous medium, an unknown property of calixarenes until now. Additionally, it was shown that all compounds bind mononucleotides (NMP) with high affinity, forming a 'tweezer-like' complex. The obtained response is selective towards pyrimidine bases (uracil monophosphate and cytosine monophosphate). Only cationic analogs interact with DNA and RNA, indicating the significance of electrostatic interactions with the polyanionic backbone of DNA/RNA. The displacement experiment of DAPI from DNA grooves conducted using circular dichroism (CD) also showed better displacement with cationic

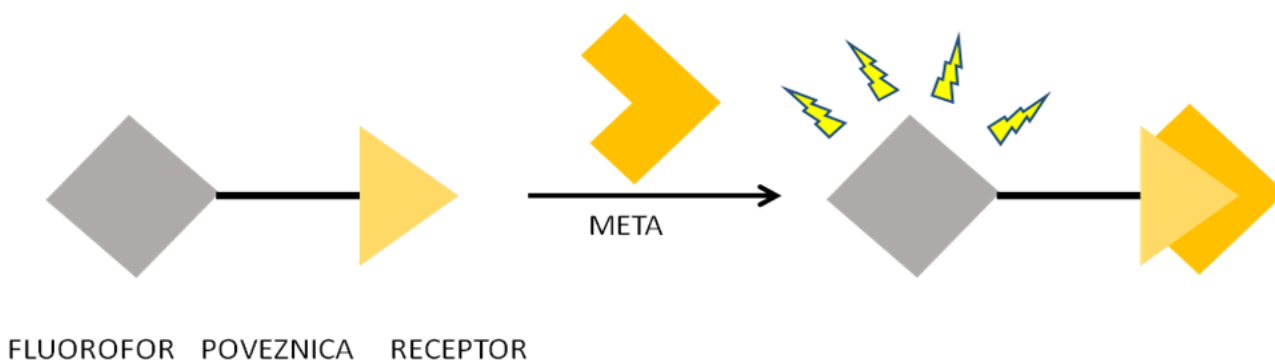
ABSTRACT

calixarenes. Additional circular dichroism experiments showed that the insertion of calixarenes does not significantly affect the double helix structure.

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 osmislio metodu za određivanje aluminijevih iona (Al^{3+}) pri nastajanju fluorescentnog morinskog kelata.² Od 1980-ih započinje razvoj i primjena kemosenzora, zahvaljujući pionirima modernih kemosenzora, de Silvi i Czarniku.³ Današnja važnost senzora je upravo u njihovoj upotrebi u različitim područjima prirodnih, biomedicinskih i tehničkih znanosti.² Zbog svojstava kao što su odlična osjetljivost, niska cijena, brzog odgovora, najpopularniji su upravo fluorescentni molekularni senzori. Struktura fluorescentnog kemosenzora sastoji se od fluorofora (signalna podjedinica), receptora i poveznice,⁴ pri čemu prisutnost poveznice nije nužna (slika 1). Takvi 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 kojima su mete nukleinske kiseline ili proteini.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 metala, proteina i malih organskih molekula, u posljednjih nekoliko godina fluorescentni biosenzori brzo se razvijaju. Za prepoznavanje meta se upotrebljavaju vrlo različite molekularne strukture, a uvođenjem fluorescentnih grupa osigurava se dojavni signal.⁷ Biološka aktivnost mnogih lijekova i antibiotika proizlazi iz nekovalentnih interakcija s DNA.⁸ Njihova aktivnost

1. UVOD

iskazuje se prema raznim vrstama tumora, bakterijskih infekcija, te virusnih i parazitskih oboljenja poput primjerice malarije. Male molekule koje sudjeluju u reakcijama s DNA mogu se kovalentno i nekovalentno vezati na DNA.

Kratki peptidi sadrže manje od dvadeset aminokiselina, a u zadnje vrijeme privlače pažnju kao novi i vrlo uspješni terapijski agensi, sa smanjenim nuspojavama.⁹ Jedna od zanimljivijih struktura je i Trp-His-Trp-tripeptid (WHW-tripeptid), koji je pronađen kao sastavni dio amiloidnog β -peptida ($A\beta$), koji se povezuje i s Alzheimerovom bolesti.¹⁰ WHW-tripeptid također 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 s bakrom(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 (goveđi serum albumin, BSA), uglavnom se oslanjajući na fluorescenciju kao metodu detekcije, ali i neke novije metode, poput površinski pojačane Ramanove spektroskopije (engl. *surface-enhanced Raman spectroscopy*, SERS) ili CD spektrofotometrije.

U ostvarenju tog cilja proveli smo sljedeća istraživanja:

a) razvoj 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 derivatima pirena. Piren je izabran kao fluorfor zbog osjetljivosti fluorescencijske emisije na mikrokruženje,¹³ a također je poznat kao proba za DNA/RNA i proteine^{14,15} te kao teranostički agens.¹⁶

b) *bis*-triarilboranskih polikationskih sustava (sintetiziranih u grupi prof. T. B. Mardera s Kemijskog i farmaceutskog fakulteta Sveučilišta u Würzburgu), kromofora karakteriziranih izuzetno jakom fluorescencijom, 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 sa Sveučilišta u Parizu), koji su monomerni analozi sustava za koje smo ranije pokazali izuzetno svojstvo vezanja na ds-DNA,¹⁸ a istraživanjem utjecaja kationskog naboja pokazali smo njihovo vezivanje s bakrovim kationom i interakciju s nukleotidima (monofosfatima).

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 poput kemije, biologije i medicine.¹⁹ Razlog tome je njihova primjena kao uspješni terapijski agensi, sa smanjenim nuspojavama, a uz to im je proizvodnja ekonomična i jednostavna.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

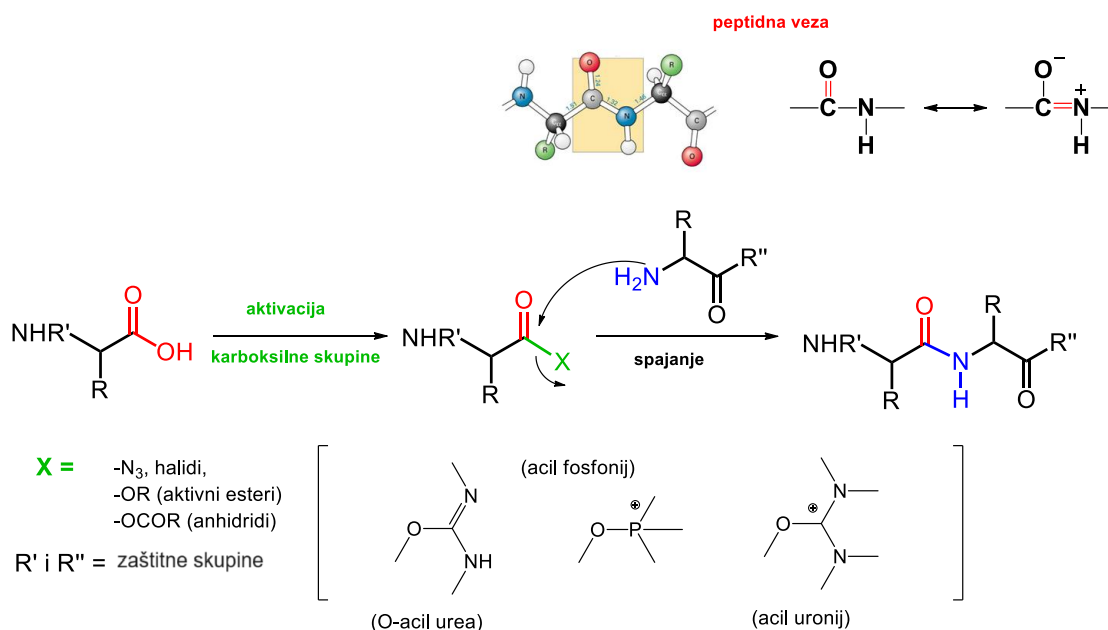
Po IUPAC-ovoj definiciji oligomeri sadrže od 10–20 aminokiselina, a polipeptidi više od 20. Ultrakratki peptidi sadrže 2–7 aminokiselina. Zanimljivo je i da ultrakratki peptidi imaju mogućnost samo-organizacije (engl. *self-assembly*), gdje formiraju agregate na bazi nekovalentnih interakcija te se koriste u razvoju novih biomaterijala, pri čemu se mogućnost samoorganizacije odvija kod različitih biomolekula; lipida, proteina i aminokiselina u živim organizmima te u raznim biološkim procesima kao što je i stvaranje amiloidnog β -plaka.²⁰ Za razliku od dužih analoga, ultrakratki peptidi nemaju nedostatke vezane uz veličinu molekule, njihova sinteza je povoljnija, biokompatibilni su *in vitro* i *in vivo*, te posjeduju bolju biorazgradivost, poboljšanu oralnu bioraspoloživost, i sl.^{19,22}

2.1.2. Sintaza peptida

Fischer i Fourneau proveli su prvu sintezu peptida 1901. godine.²³ 1953. godine de Vigneaud je uspješno proveo sintezu oksitocina (peptidnog hormona) i za svoj rad dobio Nobelovu nagradu.²⁴ Od tada je započela i upotreba peptida kao farmaceutika, a oksitocin se i

2. LITERATURNI PREGLED

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. U protivnom nastale bi smjese četiri produkta. Isto tako zaštićuju se i polarne skupine u bočnim lancima. Najčešće korištena dva načina za pripremu peptida su sinteza u otopini ili sinteza na čvrstom nosaču (engl. *solid-phase synthesis*, SPPS).²³ Svaka sinteza peptida uključuje formiranje peptidne veze i/ili uklanjanje 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 završavaju korištenjem topljivih reagensa u suvišku, koji se nakon završetka reakcije jednostavno uklanjaju ispiranjem ili filtriranjem. 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.

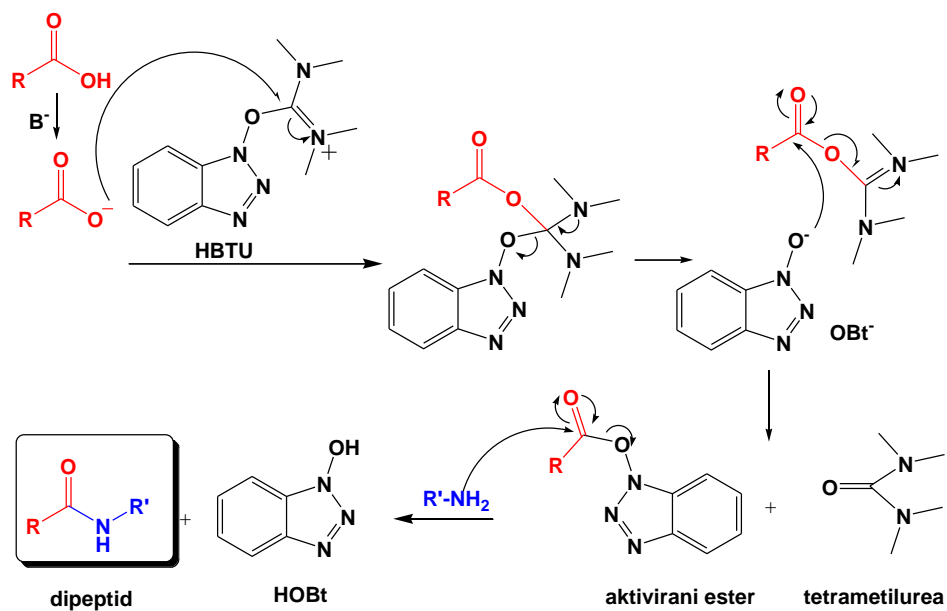


Shema 1. Sinteza peptida uz aktivaciju karboksilne skupine i korištenje zaštitnih skupina na terminalnoj amino-skupini jedne aminokiseline i karboksilnoj skupini druge aminokiseline.

2. LITERATURNI PREGLED

Prije reakcije kondenzacije, odnosno spajanja dviju aminokiselina bitno je aktivirati karboksilnu skupinu. To se postiže prevođenjem hidroksilne skupine kiseline (loše odlazeća skupina) u dobro odlazeću skupinu.^{25,26} Osim toga, problem koji može nastati kod reakcije kondenzacije je potencijalan gubitak kiralne čistoće (racemizacija) aminokiseline zbog ionizacije α -vodika i stvaranja intermedijera oksazolona.²⁷ Najčešće korišteni reagensi za spajanje su karbodiimidi i soli 1-hidroksibenzotriazola (HOBt) i njegovi derivati.¹⁹ Dodavanje triazola (HOBt) i njegovih derivata poput 1-hidroksi-7-aza-benzotriazol (HOAt) može spriječiti racemizaciju prilikom aktiviranja karbodiimida. Među češće korištene reagense spadaju i heksafluorofosfat benzotriazol tetrametiluronij (HBTU), 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminijevtetrafluorborat (TBTU), benzotriazol-1-iloksitriprolidinofosfonijev heksafluorofosfat (PyBOP) te O-(1H-6-klorobenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronijev heksafluorofosfat (HCTU).²⁸ Oni smanjuju proces racemizacije i djeluju kao reagensi za spajanje zahvaljujući svojim iminskim, fosfonijevim ili uronijevim solima ne-nukleofilnog aniona (tetrafluoroborat ili heksafluorofosfat).¹⁹ Na shemi 2 prikazan je primjer mehanizma aktivacije karboksilne skupine u prisutnosti baze s HBTU reagensom. Karboksilat anion napada uronijev ugljik HBTU-a, zatim se nastali anionski benzotriazol *N*-oksid (OBt-) veće na karbonilni ugljik kiseline, stvarajući nusprodukt tetrametil ureu i aktivirani ester. Sada amino-skupina druge aminokiseline napada karbonilni ugljik s dobrom odlazećom skupinom, pri čemu nastaje peptidna veza, odnosno dipeptid.²⁶

2. LITERATURNI PREGLED

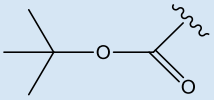
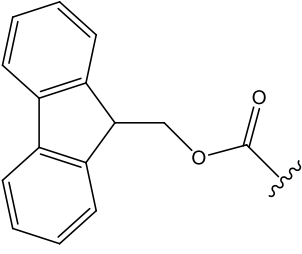
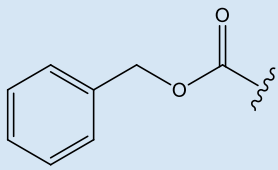


Shema 2. Primjer aktivacije karboksilne skupine aminokiseline s HBTU reagensom i stvaranje peptidne veze.

Kako bi se pojednostavila sinteza peptida i spriječila racemizacija potrebno je zaštititi amino-skupinu. U sintezi peptida bitno je trajno zaštititi bočni lanac aminokiseline, ali uvesti 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 Spojevi sa zaštitnim skupinama trebali bi biti topljivi u najčešće korištenim otapalima, spriječiti epimerizaciju (prelazak jednog epimera u drugi) te njihovo uklanjanje mora biti jednostavno i brzo, s lako uklonjivim nusproduktima. Najčešće α amino-zaštitne skupine za sintezu na čvrstom nosaču i sintezu u otopini 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-nitrofenilsulfenil (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 trimetilsililkloridom (TMS-Cl) u diklormetanu, 4 M HCl u dioksanu i 2 M MeSO₃H 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.

2. LITERATURNI PREGLED

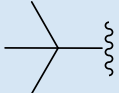
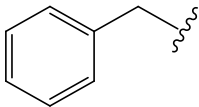
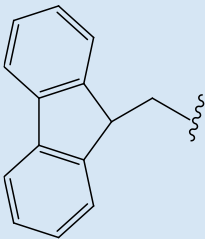
Tablica 1. Primjeri najčešće korištenih zaštitnih skupina za α amino-skupinu²⁹

Naziv i struktura	Mjesto zaštite	Način uvođenja	Mogući uvjeti uklanjanja
<p><i>tert</i>-Butiloksikarbonil (Boc)</p> 	α amino-skupina	Boc ₂ O, NaHCO 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-Fluorenilmetskikarbonil (Fmoc)</p> 	α amino-skupina	Fmoc-Cl, NaHCO ₃ , dioksan, H ₂ O	1) NH ₃ (l) (10 h) - otopina 2) Morfolin ili piperidin u organskim otapalima (nekoliko minuta) – čvrsti nosač 3) 10 % DEA, DMA (2 h)
<p>Benziloksikarbonil (Z)</p> 	α amino-skupina	Cbz-Cl, NaHCO ₃ , dioksan, H ₂ O	1) H ₂ cat 2) Jake kiseline (HBr u AcOH, TFA pri visokim temperaturama, TFA-tioanizol, tekući HF) 3) BBr ₃

Zaštita C-terminalne karboksilne kiseline kod sinteze na čvrstom nosaču razlikuje se od one u otopini.²⁹ Kod sinteze peptida na čvrstom nosaču C-kraj je uglavnom povezan s nosačem te poveznica ima ulogu zaštitne skupine. Ipak, u slučajevima kada je peptid povezan s čvrstim nosačem preko bočnog lanca aminokiseline ili kod sinteze u obrnutom *N*–*C* smjeru, potrebna je zaštita C-kraja. Najčešće korištene zaštitne skupine za α -karboksilnu skupinu su *tert*-butilna (*t*Bu), benzilna (Bz), 9-fluorenilmetilna (Fm), metiloksikarbonilna (COOMe) te etiloksikarbonilna (COOEt) (tablica 2).²⁹ 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 9-fluorenilmetilna (Fm) zaštitna skupina može ukloniti uz 20 % piperidin u DMF-u.

2. LITERATURNI PREGLED

Tablica 2. Primjeri najčešće korištenih zaštitnih skupina za α -karboksilnu skupinu²⁹

Naziv i struktura	Mjesto zaštite	Način uvođenja	Mogući uvjeti uklanjanja
tert-Butil (tBu) 	α -karboksilna skupina	t-BuOH, EDC • HCl, DMAP, DCM	1) 90 % TFA /DCM – čvrsti nosač i otopina 2) 4 M HCl / dioksan – otopina
Benzil (Bn) 	α -karboksilna skupina	O-benzil-N,N'- diizopropilizourea, THF	1) Pd-C / H ₂ 2) HF
9-Fluorenilmetil (Fm) 	α -karboksilna skupina	FmOH, EDC • HCl, DMAP, DCM	1) 20 % piperidin /DMF 2) Pd-C / H ₂ - otopina

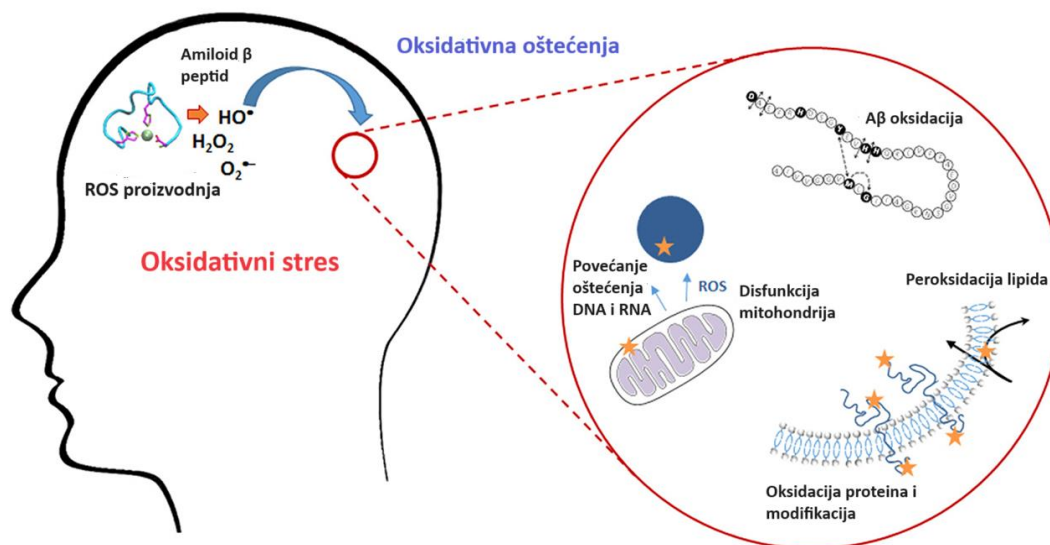
2.1.3. Primjer bolesnih stanja uzrokovanih agregiranjem peptida/proteina: amiloidni β -protein ($A\beta$) i Alzheimerova bolest

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 -proteinskog plaka u mozgu i intraneuronsko nakupljanje neurofibrilarnih čvorova (engl. *neurofibrillary tangles*, NFTs) hiperfosforiliranog τ -proteina, što također pridosnosi disfunkciji sinapsi i degeneraciji aksona.³² $A\beta$ -protein i τ -protein i dalje su glavne mete za razvoj lijekova za liječenje bolesti. Nakupljanje amiloidnog β -proteina pokreće reaktivne kisikove čestice (engl. *reactive oxygen species*, ROS), na način da povećana proizvodnja ROS-a pokreće promjenu toksičnog

2. LITERATURNI PREGLED

amiloidnog β -prekursorskog proteina (engl. *β -amyloid precursor protein*, APP) koji potom pokreće stvaranje $A\beta$ -proteina (slika 2).³³

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.³⁴ Tijekom normalnog metabolizma dolazi do proizvodnje superoksidnog kisikovog radikala ($O_2^{\cdot-}$) i neradikalnog oksidansa vodikovog peroksida (H_2O_2) 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, poput bakra u superoksid-dismutazi (SOD1) ili željeza u katalazi, gdje uništavaju superoksidni anion ili vodikov peroksid.³⁵ 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 $A\beta$ -proteina u Alzheimerovoj bolesti (slika preuzeta i prilagođena).³⁵

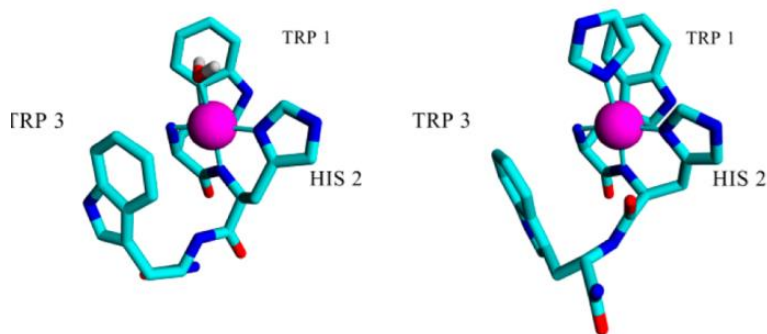
Metabolit $A\beta$ -proteina odgovoran za agregiranje čine 38 do 43 aminokiselinska ostatka slijeda DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIAT. Nastaje nakon

enzimskog cijepanja β - i γ -sekretaze APPa, koji prolazi puteve proteolitičkog cijepanja i daju $A\beta_{1-40}$ i $A\beta_{1-42}$ peptide.³⁶ $A\beta_{4-42}$ je najzastupljeniji od ovih peptida, a $A\beta_{5-42}$ je otkriven upravo u $A\beta$ -peptidnom plaku osoba oboljelih od Alzheimerove bolesti.³⁷ Podrijetlo $A\beta_{5-x}$ 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). $A\beta_{5-x}$ peptidi sadrže histidin na položaju C-2 (His^2) i zbog takvog rasporeda stvara se specifično vezno mjesto za bakrov kation (Cu^{2+}), koje se razlikuje od dinamičkog sustava mikrokelatnih $A\beta_{1-x}$ peptida i krutih kelatnih sustava $A\beta_{4-x}$ peptida.

2.1.4. Peptid triptofan-histidin-triptofan (WHW) i kompleksiranje bakra

Uz istaknutu ulogu bakrovog kationa (Cu^{2+}) u kompleksiranju peptida i kontroli njihovih bioloških (i patoloških) funkcija važna je i uloga histidina, koji ukoliko je u središnjem položaju (His^2) u tripeptidnim sekvencama, postaje učinkovit kelator u biorelevantnim uvjetima za metalne ione kao što su bakar(II), nikal(II) ili cink(II).³⁸ 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 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 $\text{W}^1\text{H}^2\text{W}^3$ ($\text{X}^1\text{H}^2\text{X}^3$) prema bakru(II) je relativno niska pK_a vrijednost imidazalnog dušika (N_{im}) histidinskog bočnog lanca ($pK_a \sim 6,0$).³⁹ 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 ovisan i o pH, odnosno povećanjem pH vrijednosti povećava se i afinitet vezanja.⁴⁰ Kako bi došlo do kompleksiranja, metalni ion mora zamijeniti vodikove ione peptida.

2. LITERATURNI PREGLED



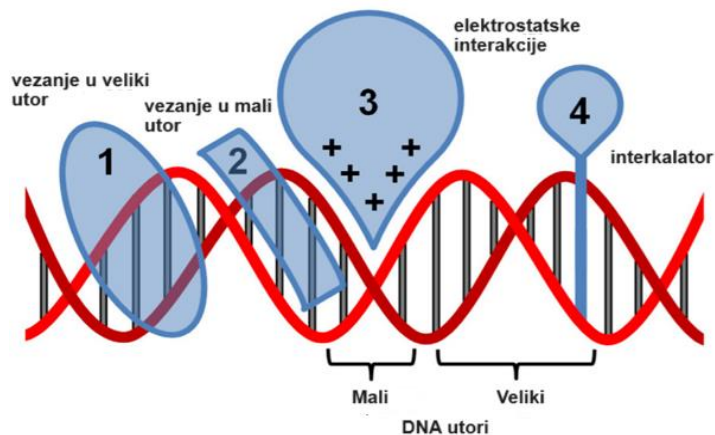
Slika 3. Strukture Cu(II) kompleksa dobivenih molekulskim modeliranjem. Lijevo: binarni kompleks s vodom koja zauzima četvrto koordinacijsko mjesto; desno: ternarni kompleks s Im. Cu(II) je prikazan pomoću ružičaste kugle, a atomi dušika i kisika su prikazani u tamnoplavoj i crvenoj boji, redom (slika preuzeta i prilagođena).³⁸

Metali su prisutni u više od trećine proteina koji se pojavljuju u prirodi i imaju važnu biološku ulogu.⁴¹ Važnost kompleksiranja metala očituje se u strukturnoj i funkcijskoj ulozi metala. Strukturna uloga može se objasniti stvaranjem veza s proteinima, kojima može biti narušena tercijarna struktura 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 konformaciju α -heliksa.⁴² Bakar(II) zbog svog oksidacijsko-redukcijskog potencijala ima ulogu prijenosnika elektrona u plastocijaninima,⁴³ superoksidnoj dismutazi,⁴⁴ mitohondrijskoj citokrom c-oksidazi⁴⁵ i drugim bakrovim enzimima⁴⁶.

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

Interakcije malih organskih molekula s nukleinskim kiselinama mogu biti nepovratne poput stvaranja kovalentnih veza male molekule i polinukleotida (slika 4) ili cijepanja polinukleotidnih lanaca te ravnotežne, koje su bazirane na nekovalentnim interakcijama.⁴⁷ Primjena DNA nekovalentnih proba je vrlo široka, a njihova optimizacija zahtjeva dobro poznavanje mehanizama načina vezanja.⁹

2. LITERATURNI PREGLED



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

Postoji nekoliko načina nekovalentnog vezanja malih molekula na dvolančane DNA (engl. *double-stranded*, 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 uzvojnica 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, etidijev 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 čime je olakšano 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 parovima baza adenina i timina (AT) te ne uzrokuju značajne deformacije dvostruke uzvojnice DNA.^{8,48} Ostale karakteristike malih molekula koje se vežu u utore su pozitivan naboj, struktura molekule u obliku polumjeseca i fleksibilno povezani aromatski prstenovi. 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).⁴⁹ Primjer spoja koji se veže na DNA dominantno uz pomoć elektrostatskih sila je spermin. Ostale bitne sile koje

2. LITERATURNI PREGLED

također utječu na načine vezanja su Van der Waalsove sile⁸ i hidrofobne interakcije,⁵⁰ kod kojih dolazi do energijskog doprinosa pri napuštanju vodenog medija od strane male organske molekule u manje polarni utor biomakromolekule te Londonova disperzijska međudjelovanja.

U istraživanjima interakcija malih molekula s DNA 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.^{51,52}

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) ₂ (AT–DNA)	11.2	6.3	8.5	7.5
^[c] poli(dGdC) ₂	13.5	9.5	10.0	7.2

^[a] A - heliks

^[b] B - heliks

^[c] B - heliks s malim utorom koji sadrži 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 poput kationskog lizina ili arginina za elektrostatske interakcije s polianionskom okosnicom DNA/RNA. Jedna od aminokiselina s fluoroforom, triptofan (trp) tvori nekovalentne interakcije s DNA bazirane na aromatskim interakcijama slaganja i hidrofobnim interakcijama.⁵³ Aromatske aminokiseline, 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.⁵⁴ U interakcijama s DNA, Trp preferira vezanje za gvanin i citozin.⁵⁵ Veća je vjerojatnost da će se vezati na veznim mjestima RNA što može ukazivati na njegovu ulogu u informiranju proteina o prepoznavanju

između nukleinskih kiselina. Poznato je da aromatske aminokiseline, kao što je triptofan, mogu stvarati perokside u prisutnosti singletnog kisika.⁵⁶ 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.⁵⁷ 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 u potpoglavljima 2.14. i 2.1.5 se posebno razabire interes istraživanja bis-triptofanskog niza s histidinom u sredini peptida WHW, koji objedinjuje DNA-aktivne komponente na krajevima i Cu^{2+} vezujuću 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 slijedovima DNA/RNA, uz dodatnu mogućnost bakrom-promoviranog oksidativnog cijepanja DNA/RNA i posljedičnih bioloških utjecaja.

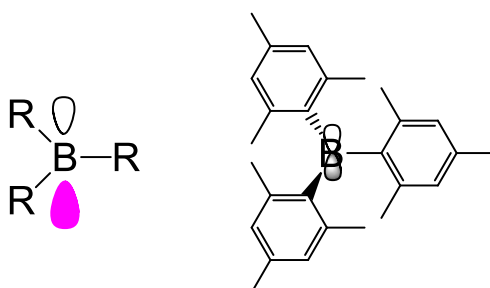
2.2. Triarilborani

2.2.1. Općenito o triarilboranima

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.⁵⁸ 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.⁵⁹ 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 tetrakoordiniranih borovih vrsta.⁶⁰ Takva nestabilnost u vodi je prevladana uz pomoć velikih supstituenata koji sterički onemogućavaju nukleofilni napad otapala (vode) na centralni atom bora, a zaštitne skupine koje se često koriste

2. LITERATURNI PREGLED

su mesitil (Mes) i 2,4,6-(CF₃)₃C₆H₂ (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.⁶¹ 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 izaziva promjene u fotofizičkim svojstvima, odnosno do promjena u luminiscenciji. Upravo iz tih razloga mogu biti korišteni i kao senzori za detekciju aniona.



Slika 5. Lijevo: trikoordinirani bor sa supstuentima R (često Mes ili FMes); desno: trimesitilboran.⁶²

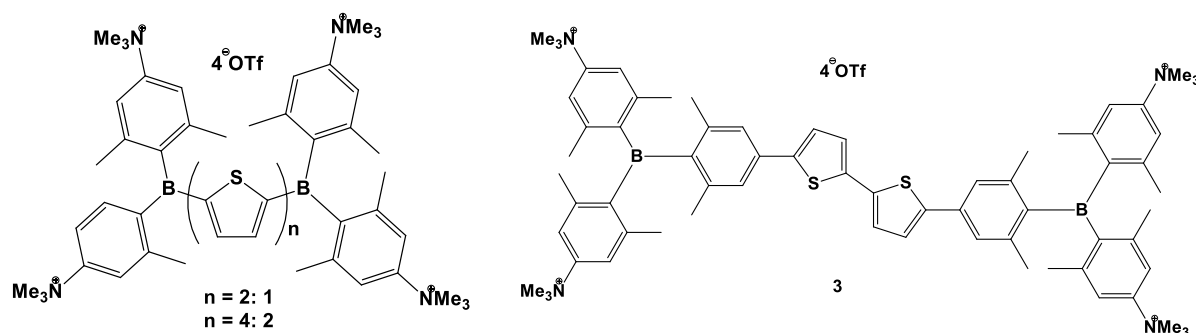
Zbog velike promjene dipolnog momenta pri pobuđivanju triarilborana, kao elektron-akceptora, dolazi do hiperpolarizacije prvog i drugog reda što upućuje da su i odlični kromofori, pogodni za dvofotonsku apsorpciju (engl. *two-photon absorption*, TPA), odnosno pogodni za fluorescenciju iniciranu dvofotonskom apsorpcijom (engl. *two-photon excited fluorescence*, TPEF) mikroskopiju živih stanica i tkiva.⁶⁰ Problem predstavlja njihova loša topljivost u vodenom mediju, zbog primjene u *in vivo* i *in vitro* pokusima, a prvi su ga uspješno riješili Gabbaï i suradnici, zamjenom *para*-metilne skupine trimesitilborana s kationskim amonijevim supstuentima.⁶³ 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 tiosfenskih poveznica i prirodom arilnog supstuenta vezanog za centralni atom bora može utjecati na fotofizička svojstva u primjeru sintetiziranih kvadrupolarnih triarilborana (slika 6).⁶⁰ Spoj **3** kod kojeg je borov atom okružen s tri mesitilne skupine je sintetiziran upravo

2. LITERATURNI PREGLED

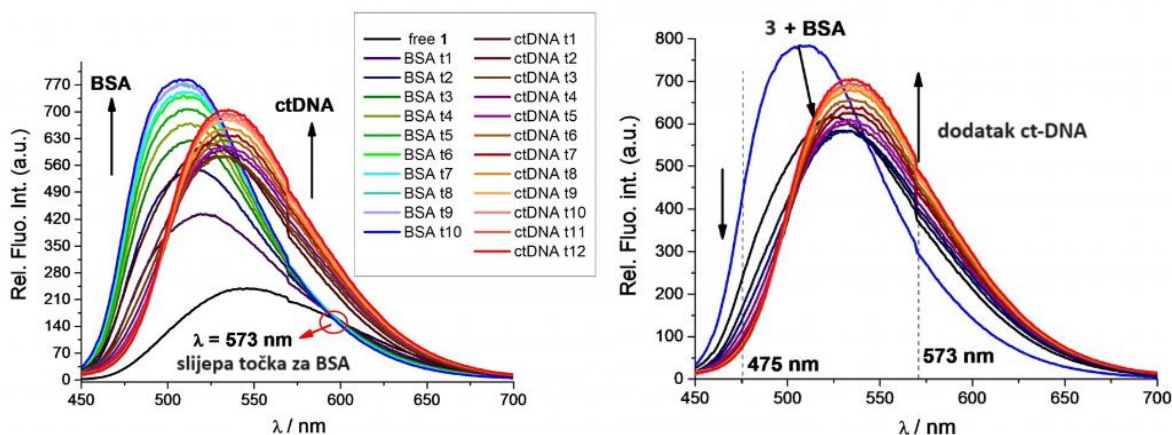
zbog poboljšanja stabilnosti kromofora u vodi za biooslikavanje, za razliku od spojeva **1** i **2**, koji zbog manjeg volumena tiofena povezanog uz borov atom nisu stabilni u vodi.



Slika 6. Kvadrupolarni triarilborani s tiofenskim mostovima.

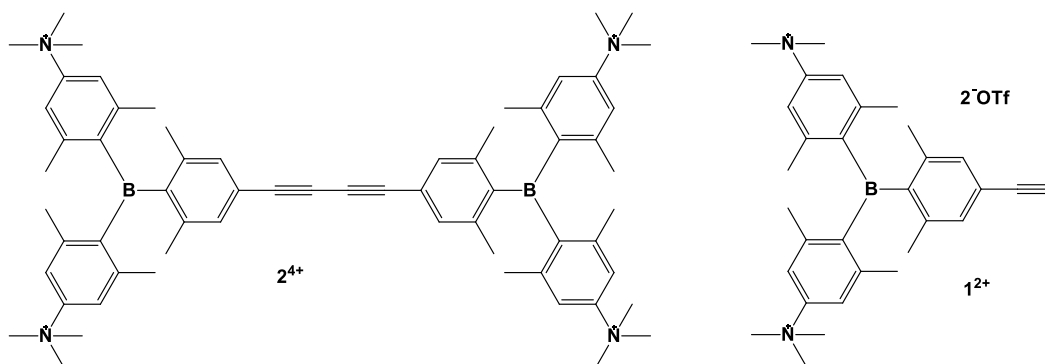
S obzirom da se kationski bis-triarilboran **3** pokazao kao novi fluorofor pogodan za fluorescenciju iniciranu jedno- i dvofotonskom apsorpcijskom mikroskopijom, a stabilan je i topljiv u vodi, istraživane su i njegove biološke mete (npr. DNA, protein).¹⁷ Zbog hidrofobnosti same molekule provedena su ispitivanja interakcija s goveđim 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, odnosno 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 (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.

2. LITERATURNI PREGLED



Slika 7. Kompeticijski BSA/DNA eksperiment; lijevo: fluorimetrijska titracija spoja **3** ($c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$, $\lambda_{\text{exc}} = 425 \text{ nm}$ s BSA; preklapljena titracija s *ct*-DNA (*ct*DNA t1-t12); desno: kompleks **3**/BSA titiran je s *ct*-DNA (slika preuzeta i prilagođena).¹⁷

Fluorimetrijske titracije s DNA/RNA/BSA pokazale su važnost kromoforne poveznice (bitiofena) između dva triarilborana na spektroskopske odgovore i afinitet.⁶⁴ Uz bitiofen, pozornost je privukao i buta-1,3-diin, koji je rigidan, linearan 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} . Stoga je sintetiziran tetrakationski spoj **2⁴⁺**, u kojem su dvije triarilboranske podjedinice povezane buta-1,3-diinskom poveznicom, kao kombinirana fluorofor–Raman proba za nekovalentno prepoznavanje DNA/RNA i proteina. Radi usporedbe sintetiziran je i dikationski monomer **1²⁺** (slika 8).



Slika 8. Bis-triarilboran buta-1,3-diin (**2⁴⁺**) i etiniltriarilboran (**1²⁺**).

Dodatak DNA/RNA ili proteina spojevima **2⁴⁺** ili **1²⁺**, uzrokovao je gašenje fluorescencije spojeva, za razliku od bitiofenskog analoga **3**, gdje je dodatak bilo kojeg polinukleotida ili

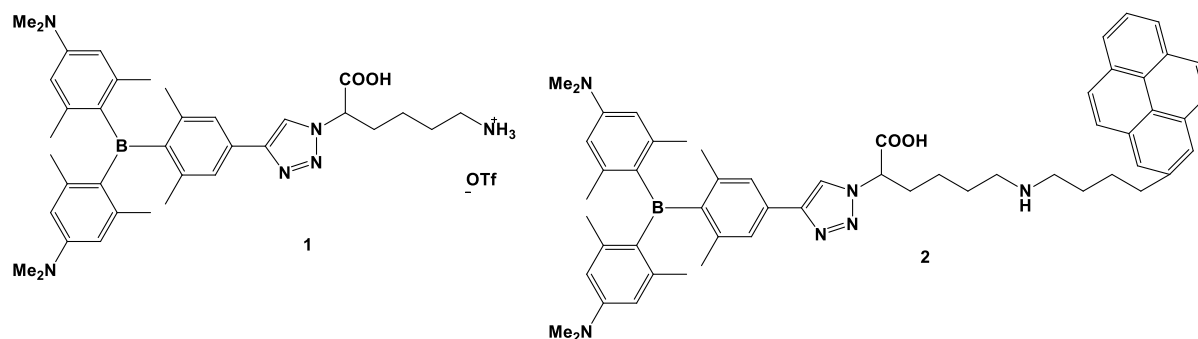
2. LITERATURNI PREGLED

proteina uzrokovao snažan porast fluorescencije, što ukazuje na važnost poveznice na fluorescencijsku emisiju triarilborana. Monomer 1^{2+} nije pokazao značajne interakcije s proteinom BSA, ukazujući na nužnu prisutnost 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.⁶⁴ To upućuje da je alifatska, linearna poveznica, malog volumena (2^{4+} 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 (1^{2+} i 2^{4+}) te je kationski monomer pokazao samo red veličine niži afinitet vezanja za polinukleotide, nego tetrakationski 2^{4+} . To upućuje na mali utjecaj elektrostatskih interakcija s negativno nabijenom fosfatnom okosnicom DNA/RNA te vezanje u ds-DNA/RNA utore. Analog 2^{4+} pokazao je i snažni afinitet prema ss-RNA, a rezultati ispitivanja cirkularnim dikroizmom (CD) potvrdili su omatanje ss-RNA oko analoga 2^{4+} . Značajno je da 2^{4+} 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 afinitetom (50–10 nM) isključivo na proteine, ali ne i na DNA/RNA, ističući tako važnost elektrostatskih interakcija s polianionskim okosnicama DNA/RNA.⁶⁵ Neutralni konjugirani sustavi koji sadrže donor NMe_2 i 3-koordinirani borov akceptor dovode do apsorpcije s prijenosom naboja i posljedično do snažnog batokromnog pomaka UV/Vis i fluorescencijskog emisijskog spektra u odnosu na kationske analoge. To se može primijeniti u fluorescencijskom bioslikavanju te su stoga ispitane 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 predstavnik M49 metalopeptidaza i cink-ovisna je aminopeptidaza.⁶⁶ 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 smatra se korisnim u daljnjem istraživanju fiziološke uloge ovog enzima. Radi što veće strukturalne prilagodljivosti probe, sintetiziran je konjugat triarilborana i aminokiseline sa

2. LITERATURNI PREGLED

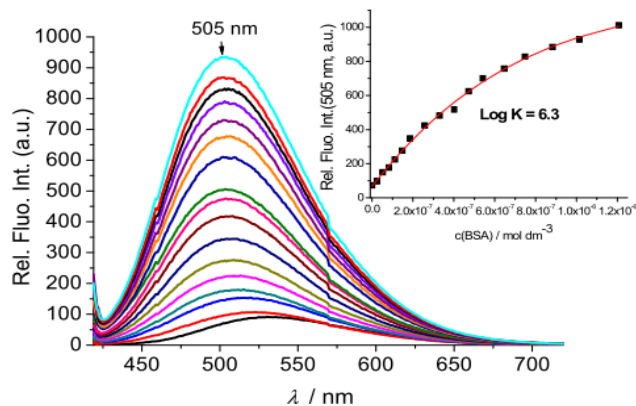
slobodnim N- i C-krajevima, što bi trebalo omogućiti jednostavno umetanje sintetiziranog peptidoida u inhibicijsko mjesto DPP III enzima.⁶⁵ Sintetiziran je triarilboran-aminokiselinski-pirenski konjugat, gdje je piren uveden zbog ranije objavljenih dobrih rezultata DPP III inhibitora temeljenih na pirenim, a sama prisutnost pirena omogućuje Försterov rezonancijski prijenos energije (FRET) između pirena ($\lambda_{exc} = 342 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 400\text{--}450 \text{ nm}$) 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 konjugata **1** i **2** (slika 9) provedena je uz pomoć klik reakcije, odnosno azid-alkin cikloadicijom kataliziranom Cu(I) (CuAAC). 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 pokazuju brojna biološka djelovanja.



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

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).⁶⁵ 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 smatraju se prvim nekovalentnim probama za DPP III enzim koje se mogu koristiti i tijekom enzimskih reakcija.

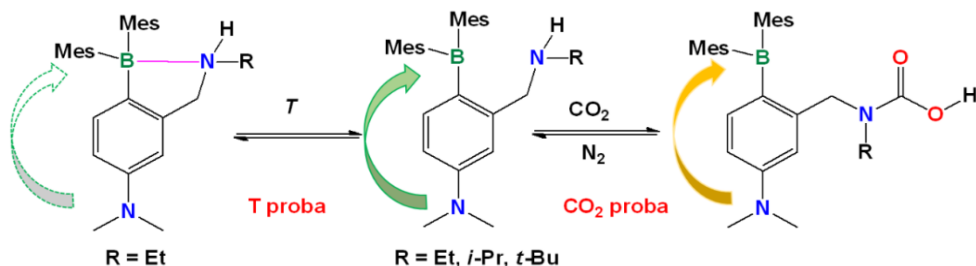
2. LITERATURNI PREGLED



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

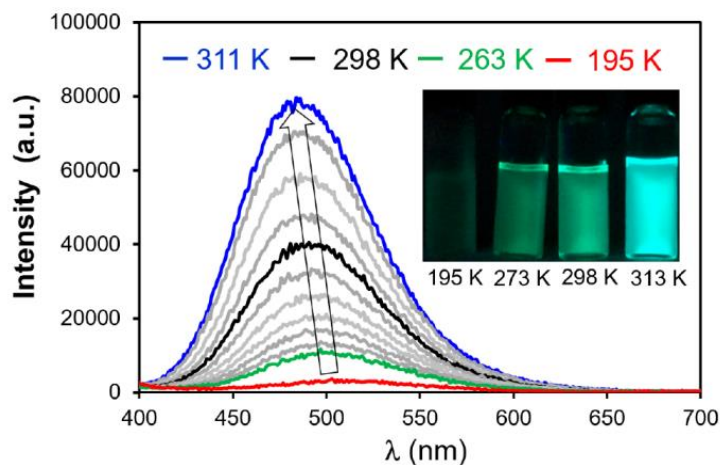
Zanimljiva je upotreba triarilborana kao fluorescentnih senzora za CO₂, s obzirom da su CO₂ i njegovo skladištenje i transformacija jedna od bitnijih tema sadašnjice.⁶⁷ Zbog svog negativnog učinka na okoliš i zdravlje čovjeka ulaže se mnogo u razvoj meta za praćenje i detekciju CO₂, a metode koje se koriste temelje se na elektrokemiji ili infracrvenoj spektroskopiji (IR). Fluorescentni senzori su odlična opcija za detekciju CO₂ upravo zbog svoje osjetljivosti i mogućnosti prijenosa, a nedostatak im je što rijetko koji ima nisku granicu detekcije i ne mogu se koristiti više puta. Dobra metoda za vezanje CO₂ je korištenjem primarnih ili sekundarnih amina, koji formiraju karbamatne soli. Metoda se temelji na činjenici da donor- π -akceptor (D- π -A) boranski sustav pokazuje fluorescenciju osjetljivu na geometriju donor-akceptor i polarost otapala. Učinkoviti sensor mogao bi se razviti kombinirajući amino-skupinu koja veže CO₂ i D- π -A boranski sustav, što je i provedeno. Razvijen je alkilamino-funkcionalizirani donor- π -akceptor triarilborana, odnosno senzor za vezanje CO₂, stvarajući derivat karbaminske kiseline. Kako jeaminski supstituent jako blizu atomu bora, pri vezanju CO₂ dolazi do intramolekularnog prijenosa naboja, što dovodi do reverzibilne emisijske promjene/promjene u boji (shema 3). Prednost ovog senzora je vrijeme odgovora i granica detekcije koja je niska (100 ppm u metanolu). Osim za vezanje CO₂ ovaj sustav je učinkovit i kao temperaturni senzor, jer mu se povećava emisija s temperaturom, upravo zbog dinamičke disocijacije/asocijacije B \leftarrow N veze. Reverzibilno mijenjanje između otvorene i zatvorene forme ovih molekula dovodi do njihovog korištenja kao 'turn on' senzora (shema 3).

2. LITERATURNI PREGLED



Shema 3. D- π -A triarilboran kao fluorescentna proba za CO₂ i praćenje promjene temperature (shema preuzeta i prilagođena).⁶⁷

Iz grafa fluorescencije (slika 11) može se vidjeti i pojačanje emisije fluorescencije porastom temperature. Protična otapala poput MeOH, mogu stupiti u interakcije s N-1 atomom preko vodikove veze, što dovodi do slabljenja B-N veze u D- π -A triarilboranu. Sva tri D- π -A triarilborana pokazala su sličnu ovisnost o polarnosti 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 izvijeni intramolekulski prijenos naboja (TICT) otvorene forme.

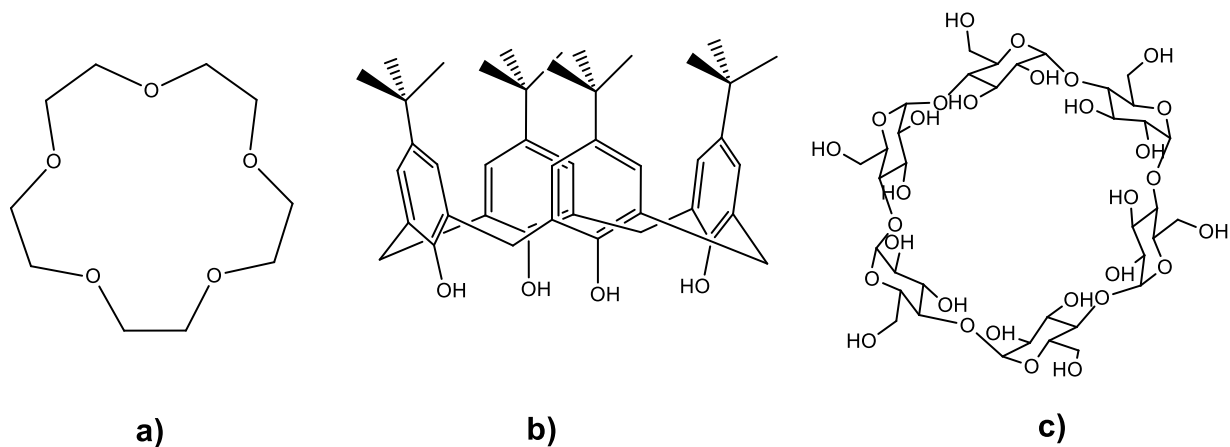


Slika 11. Promjena fluorescencijskog spektra spoja **1** uzrokovana povećanjem temperature u CH₂Cl₂ ($1,0 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³, $\lambda_{\text{exc}} = 370$ nm); umetnuto: fotografija koja pokazuje promjene boje pri četiri različite temperature (slika preuzeta).⁶⁷

2.3. Kaliksareni

2.3.1. Supramolekulska kemija i makrociklički ligandi

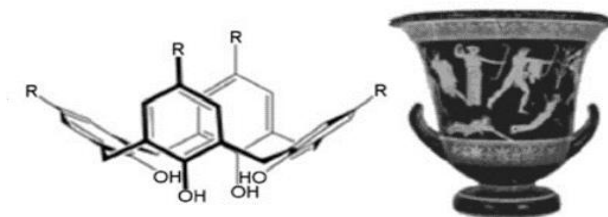
Kaliksareni su još jedna zanimljiva skupina spojeva, za koje se dosad nije ni znalo da su fluorescentni u vodenim otopinama. Kaliksareni zajedno s ciklodekstrinima, krunastim eterima, kukurbit[n]urilima te ciklofanima spadaju u makrocikličke supramolekulske sustave (slika 12).⁶⁸ Razvoj supramolekulske 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.⁶⁹ Te interakcije uključuju H-veze, van der Waalsove interakcije te hidrofobne/hidrofilne interakcije, π - π interakcije slaganja, itd.⁷⁰ Prednosti tih interakcija su jednostavan i lak pristup za izgradnju supramolekularnih struktura, čime se izbjegava višestupnjevita sinteza i komplicirano pročišćavanje spojeva.⁶⁸ 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, bitno je i definirati sustav domaćin–gost, gdje u tom kompleksu, molekula domaćina inkapsulira molekulu gosta unutar svoje šupljine, nekovalentnim interakcijama. Supramolekulski domaćini su upravo makrociklički ligandi, jer sadrže šupljine u koje mogu smjestiti molekulu gosta. Primjena ovakvih sustava je moguća u medicini, od dostave lijekova, dostave gena, fotodinamske terapije (PDT), biooslikavanja, itd.⁶⁸



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

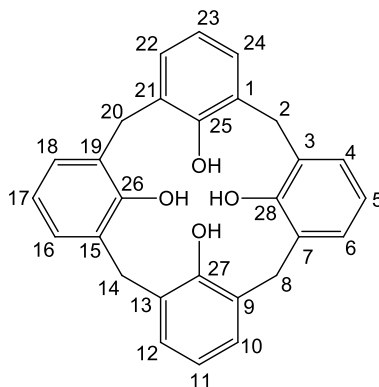
2.3.2. Kaliks[n]areni općenito

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).⁷¹ Broj u uglatim zagradama označava broj fenolnih podjedinica u prstenu.⁷² Prefiks nazivu je ime fenolnog derivata korištenog kao polazna molekula u sintezi, npr. *p-tert*-butilkaliks[4]aren.



Slika 13. Molekulska struktura kaliks[4]arena i grčke krater vaze (slika preuzeta).⁷³

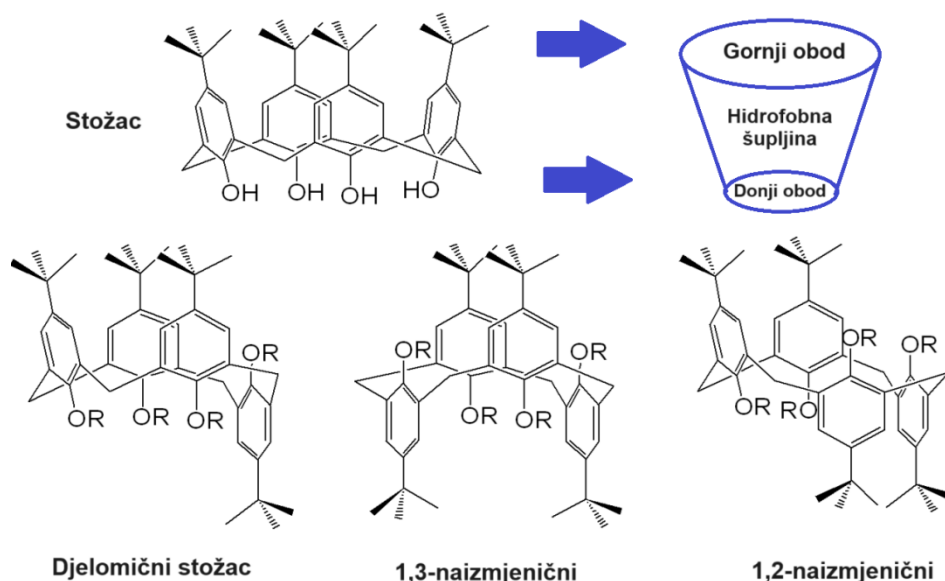
Takvi hidrofobni aromatski makrocikli sastoje se od fenolnih podjedinica međusobno povezanih metilenskim mostovima.⁷⁴ Broj podjedinica može biti od 4 do 20, ali sustavi koji su najčešće proučavani su tetrameri, heksameri i oktameri.⁷⁵ Gornji i donji obod služi za uvođenje različitih veznih mjesta, dozvoljavajući 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 $C_{11}H_{14}O$.⁷⁵ Zbog korištenja *p*-supstituiranog fenola, koji može reagirati samo u dva *o*-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-25,26,27,28-tetrol.

2. LITERATURNI PREGLED

Veliki kaliksareni ($n > 5$) mogu biti prisutni u različitim konformacijama i prilično su fleksibilni i bez specifične orijentacije supstituenata na rubovima.⁷⁶ Prvi je to primijetio Cornforth, u slučaju kaliks[4]arena i predložio postojanje četiri konformacije.⁷⁷ Te četiri konformacije su: stožac, djelomični stožac, 1,3-naizmjenični i 1,2-naizmjenični stožac (slika 15).⁷⁸ 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.⁷⁵ Andreetti, Ungaro i Pochini objavili su prvu kristalnu strukturu inkluzijskog kompleksa, adukta između *p*-*tert*-butilkaliks[4]arena.⁷⁹ 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.⁷³ Stupaju u nekovalentne interakcije s dvostrukom uzvojnicom nukleinskih kiselina, preferirajući umetanje u veliki utor DNA ili stvaranje elektrostatskih interakcija.¹⁸



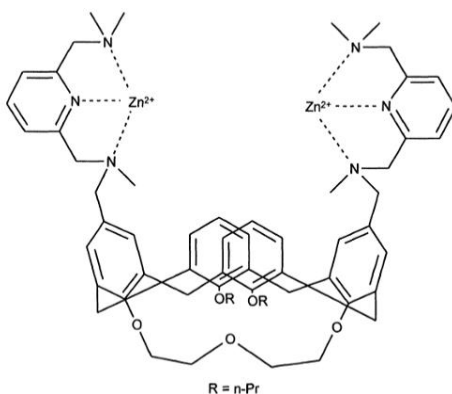
Slika 15. Konformacije kaliks[4]arena: Stožac, djelomični stožac, 1,3-naizmjenični i 1,2-naizmjenični stožac.

2.3.3. Kaliksareni kao receptori

Molekularno prepoznavanje je proces koji uključuje vezanje i odabir supstrata od strane molekule receptora, a potaknuo je i veliki razvoj umjetnih receptora.⁸⁰ Velika upotreba

2. LITERATURNI PREGLED

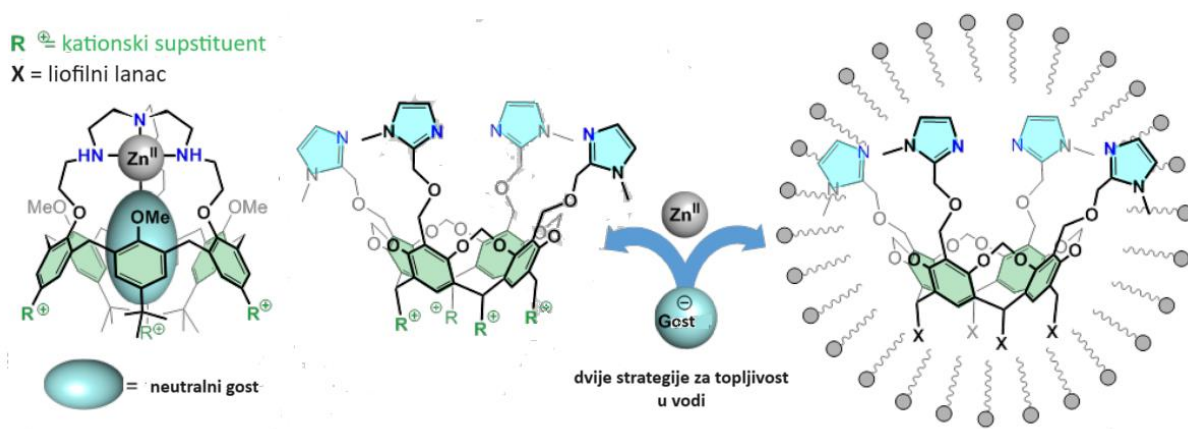
kaliksarena posljedica je jednostavnosti višegradske sinteze iz lako dostupnih početnih materijala i mogućnosti selektivne funkcionalizacije na različitim položajima.⁸¹ Njihova primjena proizlazi iz njihove sposobnosti kao receptora. Ovisno o supstituciji, kaliksareni mogu uspješno reverzibilno kompleksirati razne katione, anione ili neutralne spojeve, ali za razliku od drugih makrocikla (npr. ciklodekstrina) nisu kiralni. Kaliksareni mogu postati kiralni ako se uvedu supstituenti. 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 se dobile važne informacije uz razumijevanje molekularnih mehanizama, 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 enzima s hem skupinom, a kod druge 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*-nitrofenilfosfatu (HPNP) koji oponaša fosfodieterske veze kod RNA.



Slika 16. Dinuklearni kaliks[4]arenski Zn(II) model (slika preuzeta).⁸¹

2. LITERATURNI PREGLED

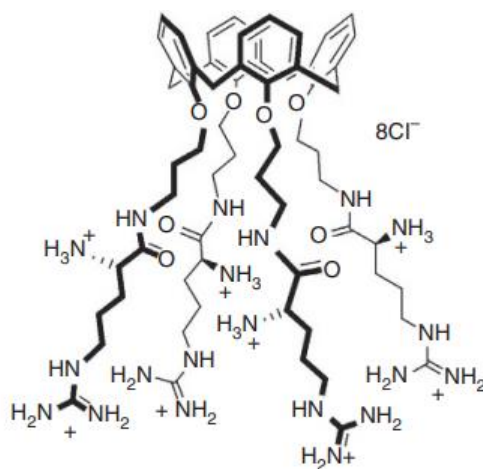
Molekularno prepoznavanje polarnih organskih molekula od biološkog interesa, kao što su ugljikohidrati i aminokiseline od velike je važnosti, a idealno je ako može biti provedeno u vodi, što je izrazito zahtjevno zbog same prirode medija.⁸⁴ Dvije su strategije za sintezu biomimetičkih metalo-receptora 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 organo-topljivog metaloreceptora u micele dodecilsulfokolina (DPC) koje oponašaju proteinsko okruženje aktivnog mjesta metaloenzima. Ligand rezorcinarena putem obje strategije u vodi uspješno veže Zn(II) u širokom rasponu pH vrijednosti. Poznat je i kaliks[6]aren koji je topljiv u vodi, a koristi se kao 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 proučavani su i njihovi sulfonatni derivati koji su topljivi u vodi. Uvođenje 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 i sl.



Slika 17. Lijevo: kompleks lijevka topiv u vodi; desno: dvije 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 umjesto dugih peptida mogu se kovalentno povezati 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.

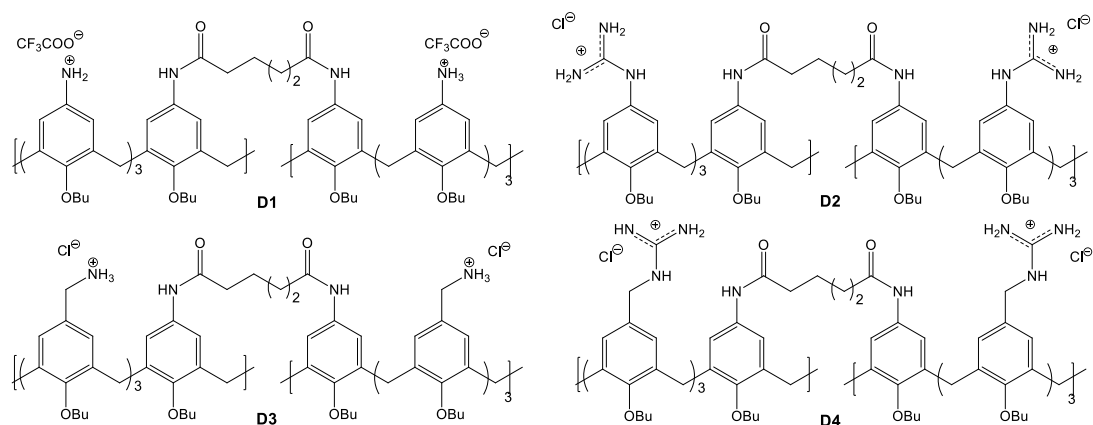


Slika 18. Struktura peptidokaliks[4]arena (slika preuzeta).⁸⁷

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 a nekovalentni načini vezanja za DNA prikazani su u potpoglavlju 2.1.5. Već dulje vrijeme je poznato da kationski kaliks[4]areni pokazuju velik afinitet prema DNA. Ungaro⁹⁰ i Schneider⁹¹ sintetizirali su trialkilamonijeve i gvanidijeve vrste. Pretpostavljeno je da kaliksareni mogu prepoznati negativno nabijenu fosfatnu okosnicu DNA te da elektrostatske interakcije mogu dovesti do uvijanja DNA uzvojnice, što je i dokazano pomoću mikroskopije atomskih sila (engl. *atomic force microscopy*, AFM). Dimerni anilinokaliks[4]areni

2. LITERATURNI PREGLED

s jednostavnim alkilnim poveznicama razvijeni su kao novi agensi za vezanje na DNA (slika 19).¹⁸ Mjerenja provedena uz pomoć fluorescencijske spektroskopije, spektroskopije UV/Vis i 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, blokiranjem određene promotorske sekvence, a modificirani analozi mogli bi se koristiti u dijagnozi i kao citotoksični agensi u tumorskoj terapiji.

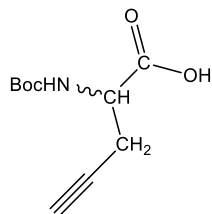


Slika 19. Strukture dimernih anilino-kaliks[4]arena koji se vežu u veliki utor DNA.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

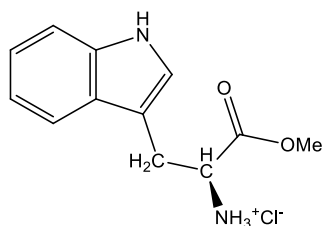
3.1. SINTEZA DERIVATA PEPTIDA WHW

Opće metode i materijali: Pripravljene derivati peptida WHW okarakterizirani su pomoću spektroskopije NMR i spektrometrijom masa visoke razlučivosti (engl. *high resolution mass spectrometry*, HRMS). ^1H NMR i ^{13}C NMR spektri snimljeni su na spektrometrima 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 tetrametilsilan (TMS), a od otapala su korišteni: deuterirani kloroform (CDCl_3), deuterirani metanol (CD_3OD) i dimetilsulfoksid ($\text{DMSO-}d_6$) (oznake u spektrima: Trp = triptofanski prsten; Py = pirenski prsten). Kemijski pomaci (δ) izraženi su u jedinicama 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*), brd-široki dublet. Kod dijastereomernih spojeva pojedini signali protona i C-atoma prisutni su dvostruko (npr. u ^1H NMR spektru 8,32 i 8,25 (2xd, $J = 7,7$ i $7,4$ Hz, 1H, NH-C=O) prisutna su dva dubleta za amidne protone dijastereoizomera s ukupnim integralom 1H; u ^{13}C NMR spektru 170,4 i 170,2 (NH-C=O) razlikuju se signali s kemijskim pomacima amidnih C-atoma dijastereoizomera). Spektri masa snimljeni su na Agilent 6410 Triple quad spektrometru masa (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA). Spektri masa visoke rezolucije (HRMS) snimljeni su na kvadrupolnom spektrometru masa s analizatorom vremena preleta (Q-Tof2 hybrid quadrupole time-of-flight) (Micromass, Cary, NC, USA) u pozitivnom modu. Tijekom reakcija praćen je tankoslojnom kromatografijom, na pločicama Kieselgel 60 F 245 (Merck, KGaA, Darmstadt, Njemačka), a supstancije su detektirane pomoću UV svjetla valne duljine 254 i 365 nm. Za pročišćavanje produkata korištena je preparativna tankoslojna kromatografija (2 mm), na Merck 60 F254 pločama (Merck, KGaA, Darmstadt, Njemačka). Temperature tališta pripremljenih spojeva određene su na Koflerovom mikroskopu i nisu korigirane. Peptid 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-inska kiselina (1)

Spoj **1** je pripravljen 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), a onda i di-*tert*-butildikarbonat (2,14 g, 9,81 mmol). Reakcijska smjesa je miješana 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 do pH 2–3 sa zasićenom otopinom KHSO₄ (7 mL), te je provedena ekstrakcija s etil-acetatom (3 × 40 mL). Dobiveni organski sloj ispran je vodom i (25 mL) i osušen iznad Na₂SO₄. Otapalo je upareno i dobiven je spoj **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 (Cq, 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-aminijev klorid (2)

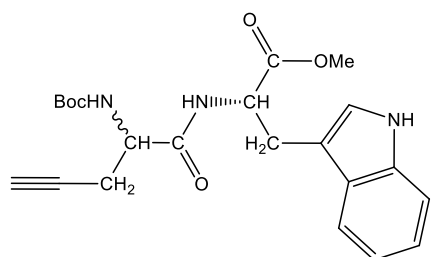
Spoj **2** je pripravljen prema poznatoj proceduri.⁹³

Svježe destilirani klortrimetilsilan (2,588 mL, 20,4 mmol) polako je dodan u 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 spoj **2** (2,34 g, 90 %), kao bijela krutina: *R*_f = 0,65 (CH₂Cl₂/MeOH = 9:1); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ/ppm: 11,15 (s, 1H, NH-Trp), 8,70 (s, 3H, NH₃⁺), 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*

3. EKSPERIMENTALNI DIO

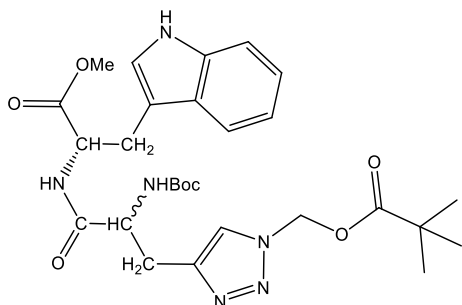
= 7,3 Hz, 1H, Trp), 7,00 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H, Trp), 4,19 (t, $J = 6,0$ Hz, 1H, CH), 3,63 (s, 3H, OCH₃), 3,42–3,27 (m, 2H, CH₂); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆) δ /ppm: 169,7 (MeO-C=O), 136,2 (Cq, Trp), 126,9 (Cq, Trp), 125,0 (CH, Trp), 121,1 (CH, Trp), 118,6 (CH, Trp), 118,0 (CH, Trp), 111,5 (CH, Trp), 106,3 (Cq, Trp), 52,6 (CH ili OCH₃), 52,57 (CH ili OCH₃), 26,1 (CH₂); slika D.8.2.

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



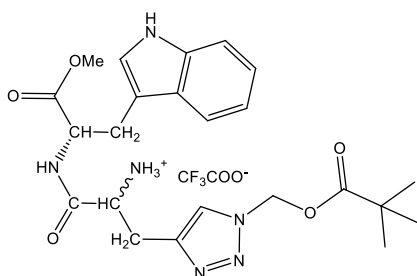
Spoj **1** (83 mg, 0,39 mmol) i spoj **2** (100 mg, 0,39 mmol) su otopljeni u suhom CH₃CN (7 mL) pri suhim uvjetima, te su dodani HOBt (97 %, 54 mg, 0,39 mmol), HBTU (98 %, 151 mg, 0,39 mmol) i suhi Et₃N (0,22 mL, 1,56 mmol). Reakcijska smjesa miješana je 16 h pri sobnoj temperaturi. Spoj **3** (114 mg, 71 %) izoliran je preparativnom kromatografijom (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1) kao žuto ulje: $R_f = 0,86$ (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1); ¹H NMR (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, OCH₃), 3,20–3,01 (m, 2H, CH₂), 1,38 (s, 9H, Me₃C-O-); ¹³C NMR (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 (Me₃C-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, Me₃C-O-), 78,3 i 78,27 (HC≡C-), 72,6 i 72,58 (HC≡C-), 53,1 i 53,0 (CH ili OCH₃), 52,9 i 52,7 (CH ili OCH₃), 51,8 i 51,78 (CH), 28,1 (Me₃C-O-), 27,1 i 26,9 (CH₂), 21,9 (CH₂); slika D.8.3a. ESI/MS: m/z : izračunato za C₂₂H₂₇N₃NaO₅ [M+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)

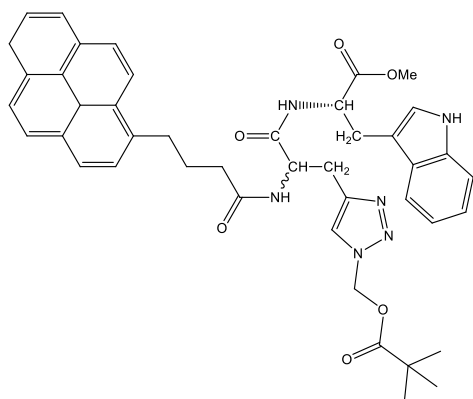


U miješanu otopinu klormetilpivalata (0,1 mL, 0,7 mmol, 97 %) u EtOH/H₂O (7:3, 1,8 mL), dodani su NaN₃ (45 mg, 0,7 mmol), CuI (13 mg, 0,07 mmol), natrijev askorbat (7 mg, 0,035 mmol, 99 %) i *N,N'*-dimetiletilendiamin (DMEDA) (12 μL, 0,105 mmol, 95 %). Nakon dodatka DMEDA-a, otopina poplavi, potom pozeleni i na kraju požuti. Nakon 30 min miješanja, žuta otopina pozeleni. Otopina je zagrijavana na 100 °C tijekom 1 h, potom su dodani spoj **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 %). Reakcijska smjesa je zagrijavana na 100 °C tijekom 30 min, a nakon hlađenja sirovi produkt profiltriran je kroz kratku SiO₂ kolonu i uparen. Prekristalizacijom iz metanola izoliran je spoj **4** (139 mg, 87 %) kao žuta krutina: *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), 7,19–7,11 (m, 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 (Cq, Trp), 127,0 i 126,98 (Cq, 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 (Cq, Trp), 78,2 (Cq, 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.

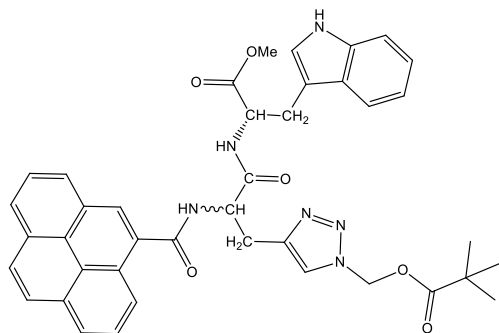
1-(((S)-3-(1*H*-indol-3-il)-1-metoksi-1-oksopropan-2-il)amino)-1-okso-3-(1-((pivaloiloksi)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)propan-2-aminijum 2,2,2-trifluor-acetat (5)



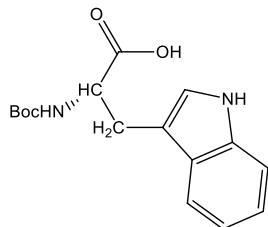
Spoj **4** (139 mg, 0,24 mmol) otopljen je u otopini TFA/CH₂Cl₂ (1:1, 6 mL) i miješan 20 h na sobnoj temperaturi. Nakon uklanjanja zaostalog TFA uparavanjem, dobiven je spoj **5** (140 mg, 100 %) kao tamnoplava krutina: $R_f = 0,45$ (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ /ppm: 10,92 (s, 1H, NH-Trp), 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-(1*H*-indol-3-il)-1-metoksi-1-oksopropan-2-il)amino)-3-okso-2-(4-(piren-1-il)butanamido)propil)-1*H*-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 %) otopljeni su u suhom CH₃CN (10 mL) u struji argona te su dodani HOBt (56 mg, 0,4 mmol, 97 %), HBTU (155 mg, 0,4 mmol, 98 %) i suhi Et₃N (222 μL, 1,6 mmol). Reakcijska smjesa je miješana 16 h pri sobnoj temperaturi. Spoj **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.

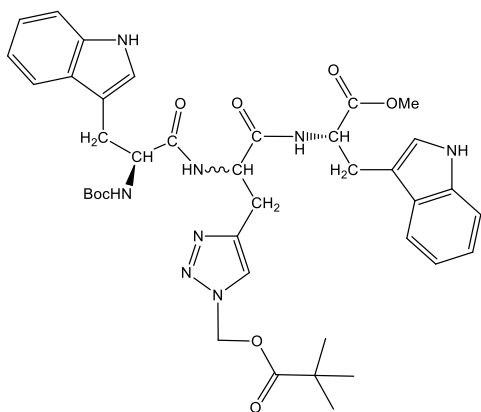
(4-(3-(((S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-metoksi-1-oksopropan-2-il)amino)-3-okso-2-(piren-4-karboksamido)propil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)metil-pivalat (7)

Dipeptid **5** (108 mg, 0,185 mmol) i 1-pirenkarboksilna kiselina (47 mg, 0,185 mmol) otopljeni su u suhom DMF-u (5 mL) u struji argona te su dodani HOBt (26 mg, 0,185 mmol), HBTU (72 mg, 0,185 mmol) i suhi Et₃N (103 μL, 0,74 mmol). Reakcija smjesa je miješana 16 h pri sobnoj temperaturi. Spoj **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)

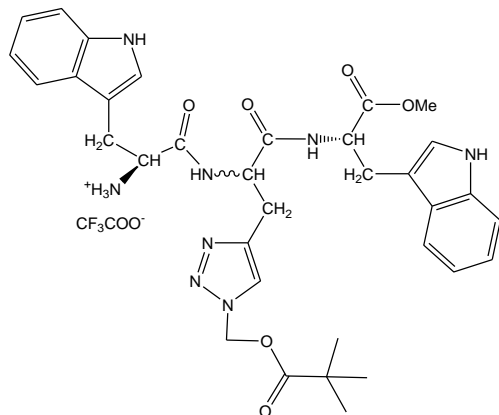
Spoj **8** je pripravljen prema poznatoj proceduri.⁹⁴ L-triptofan (98 %, 1 g, 4,8 mmol) otopljen je u 1 M NaOH (4,8 mL) te razrijeđen s *tert*-butilnim alkoholom (3,6 mL). Tijekom 20 min dodavan je di-*tert*-butildikarbonat (1,237 g, 5,28 mmol). Reakcija je miješana 15 h pri sobnoj temperaturi. Otapalo je upareno, a dobiveno ulje otopljeno je u vodi. Vodena otopina zakiseljena je do 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 osušen iznad Na₂SO₄. Otapalo je upareno, a spoj **8**, izoliran 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-olat (9)



Spoj **5** (231 mg, 0,395 mmol) i spoj **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). Reakcijska smjesa je miješana 16 h pri sobnoj temperaturi. Spoj **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.

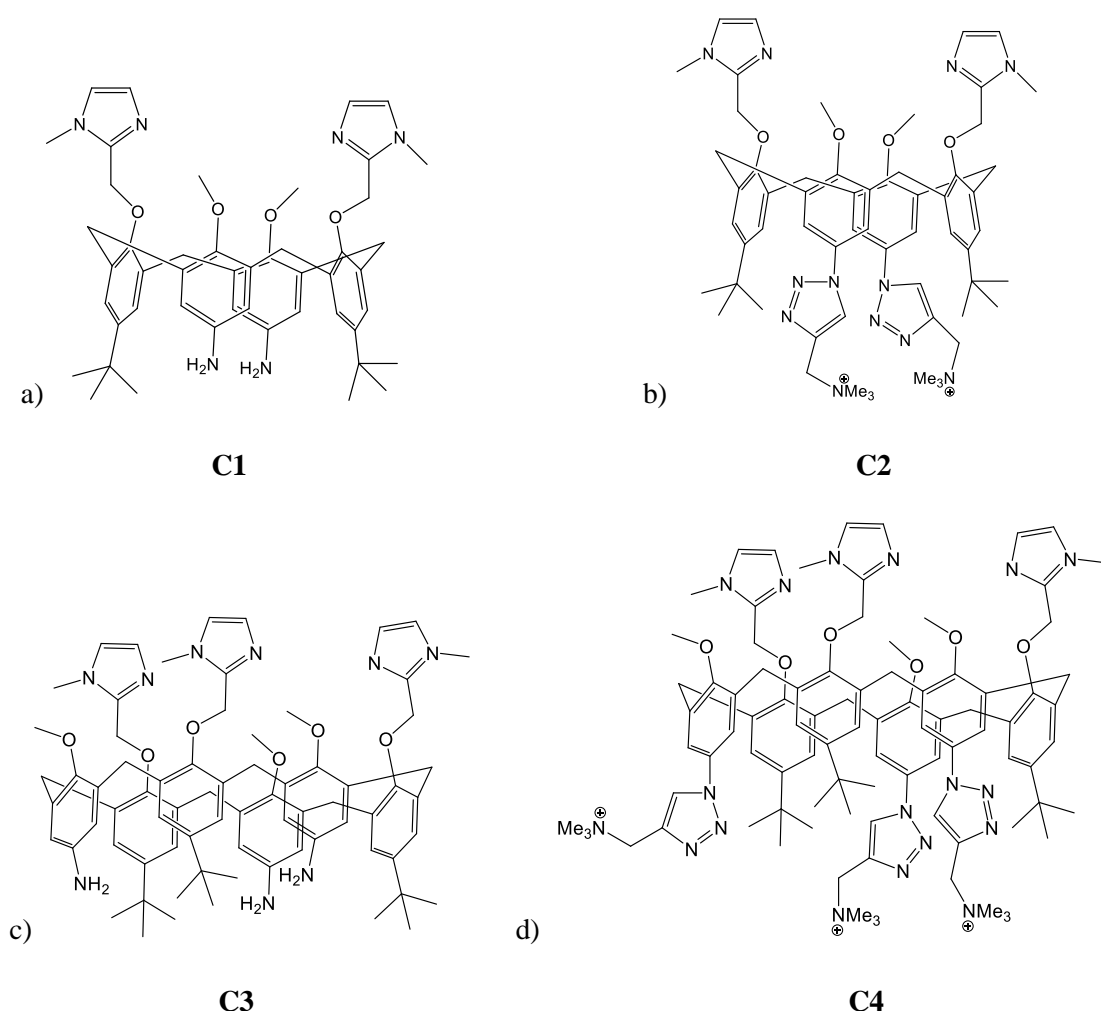
(2S)-1-(((1-(((S)-3-(1H-indol-3-yl)-1-metoksi-1-oksopropan-2-yl)amino)-1-okso-3-(1-((pivaloiloksi)metil)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)propan-2-yl)amino)-3-(1H-indol-3-yl)-1-oksopropan-2-aminijev 2,2,2-trifluor-acetat (10)



Spoj **9** (42 mg, 0,24 mmol) otopljen je u 1:1 smjesi TFA/CH₂Cl₂ (1,2 mL) i reakcija je miješana 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.

3.3. Analози kaliksarena

U izradi doktorskog rada ispitana je i skupina analoga 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).



Slika 21. Analози kaliksarena: 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

Otopine analoga peptida WHW pripremljene su, zbog slabe topljivosti u vodi, otapanjem u DMSO-u ($c = 5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$). Otopine triarilboranskih derivata pripremljene su otapanjem u vodi ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$). 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 dikroizma (CD) snimljeni su na Jasco J-815 spektropolarimetru s brzinom skeniranja od 200 nm/min, kao prosjek od tri uzastopno snimljena spektra. Sva mjerenja provedena 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-koreliranog 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 fluorescencije za analoge kaliksarena 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 iz otopine uklonio kisik, koji je gasitelj fluorescencije, otopine u kivetama bile su pod strujom argona 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 loma 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 – površina 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 je postavljen 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 peptidu ($c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) pet puta više Cu^{2+} 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 (p(dGdC)_2), poli dAdT–poli dAdT (p(dAdT)_2), calf thymus DNA (*ct*-DNA) i poli rA–poli

3. EKSPERIMENTALNI DIO

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 ($p(dGdC)_2$), poli dAdT–poli dAdT ($p(dAdT)_2$), 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 ($p(dGdC)_2$), poli dAdT–poli dAdT ($p(dAdT)_2$). 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 fluorofora 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^{100,101}:

3. EKSPERIMENTALNI DIO

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

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 analoga kaliksarena korišteni su i nukleotidi: AMP, GMP, UMP i CMP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, SAD) ($c = 1 \times 10^{-2}$ mol dm⁻³). Fluorimetrijske titracije provedene su dodavanjem alikvota ishodne otopine nukleobaze u otopinu kaliksarena ($c = 5 \times 10^{-6}$ mol dm⁻³), s valnom duljinom pobude 300 nm te je praćena 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 korišten je i fluorescentni analog nukleobaze D8-111TFA. Fluorimetrijske titracije provedene su dodavanjem alikvota ishodne otopine nukleotida u otopinu kaliksarena ($c = 1 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³), s valnom duljinom pobude na 350 nm te je praćena 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.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Metoda kompetitivnog istiskivanja referentne boje (DAPI) za mali utor AT-DNA provedena je za analoge peptida WHW i analoge kaliksarena, na Jasco J-815 spektropolarimetru, u 1,5 mL natrijevog kakodilatnog pufera ($\text{pH} = 7,0$; $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$), u rasponu valnih duljina 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 etidijeva 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 etidijeva bromida ($c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$: Int(EB)), potom je dodan polinukleotid ($c = 5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) te je snimljena emisija EB/polinukleotid (Int(EB/DNA)). Slijedilo je dodavanje alikvota kaliksarena u rasponu omjera etidijeva 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 emisija na 600 nm smanjila 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 na temelju promjene apsorpcije DNA/RNA pri 260 nm kao funkcije temperature.¹⁰² Krivulje su korigirane za apsorbanciju liganda, a skala apsorbancije 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

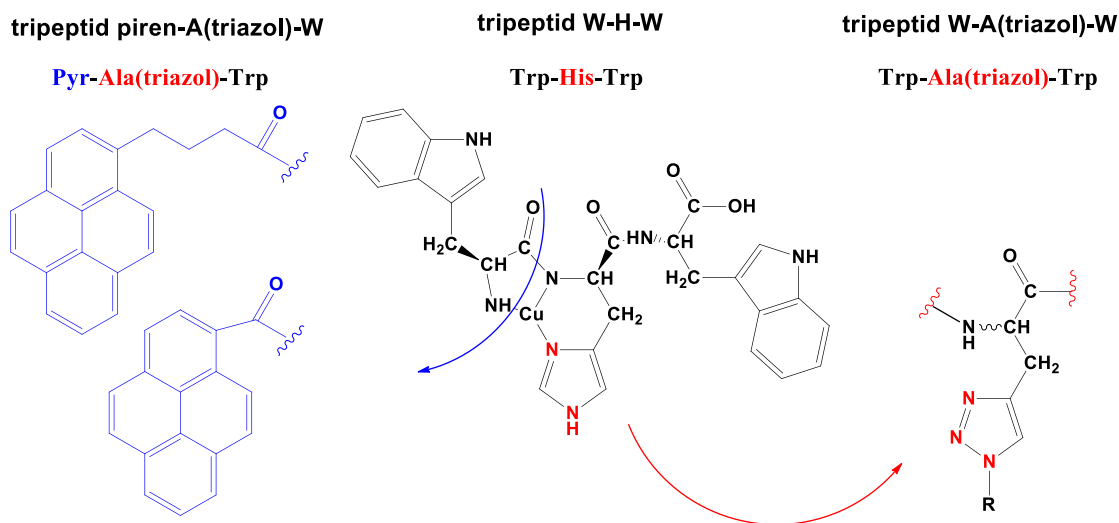
Rezultati i rasprava podijeljeni su na tri glavna dijela. U prvom dijelu prikazani su pripremljeni analozi peptida WHW, odnosno njihova sinteza, spektroskopska karakterizacija, njihove interakcije s DNA i RNA te titracije s Cu^{2+} kationima. Zaključno su prikazana biološka ispitivanja. U drugom dijelu prikazana je spektroskopska karakterizacija triarilborana i njihove interakcije s DNA i RNA. U trećem dijelu prikazana je spektroskopska karakterizacija analoga kaliksarena i njihove interakcije s nukleotidima (AMP, GMP, CMP, UMP) te polinukleotidima (DNA, RNA).

4.1. Analozi peptida WHW

4.1.1. Sinteza analoga peptida WHW

Usporedbom u prirodi prisutnog peptidnog slijeda WHW i u ovom radu opisanih analoga s Ala-(triazolom), zamjetna je strukturna i metal-koordinacijska sličnost između histidinskog heterocikla i triazolnog prstena (shema 4). Naime, 1,2,3-triazol posjeduje dva atoma dušika koji mogu koordinirati metale i predstavlja dobar ligand za komplekse prijelaznih metala.^{103,104} Struktura 1,4-disupstituiranih 1,2,3-triazola u peptidima oponaša *trans*-amidne veze,¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ a služi i kao atraktivna premošćujuća skupina za povezivanje dvaju farmakofora.^{108,109} Još važnije, uvođenje 1,2,3-triazola bakrom(I) kataliziranom klik reakcijom (CuAAC) često se koristi za uvođenje raznih molekularnih skupina, poput fluorofora ili slično. U cilju pripreme novih analoga peptida WHW sintetiziran je A(triazol)-W dipeptid **5** (shema 5). Kondenzacijom zaštićenih triptofana i propargilglicina sintetiziran je dipeptid A(alkin)-Trp **3** i razvijena je sintetska metoda pripreme 1,2,3-triazolnog derivata cikloadicijskom reakcijom kataliziranom bakrom (CuAAC) *in situ* pripremljenim azidom. Dipeptid A(triazol)-W **5** je vrlo pogodan međuprodukt za naknadnu supstituciju s triptofanom, pri čemu nastaje tripeptid W-A(triazol)-W **10**, ili s drugim fluoroforima (shema 6). Pretpostavku da će 1,2,3-triazol zadržati svojstvo koordinacije bakrovih iona slično histidinu nedavno smo poduprli sličnom zamjenom kod peptida FRH.¹¹⁰

4. REZULTATI I RASPRAVA



Shema 4. Plan sinteze analoga tripeptida WHW.

Nadalje, pripremljena su dva analogna tripeptida, u kojima je jedan triptofanski (W) fluorofor zamijenjen pirenima, dajući Pyr-A(triazol)-W **6** i **7** (shema 6). Analog **6** s pirenom je vezan fleksibilnom i dužom poveznicom i odgovara po broju atoma poveznice W-A(triazol)-W peptidu **10**; za razliku od analoga **7**, koji ima kratku i krutu poveznicu, 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 svjetla 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 mogu pobuditi i svjetlom na oko 700 nm, te tako primijeniti kao vrlo učinkoviti fotosenzibilizatori.^{115,116,117,118}

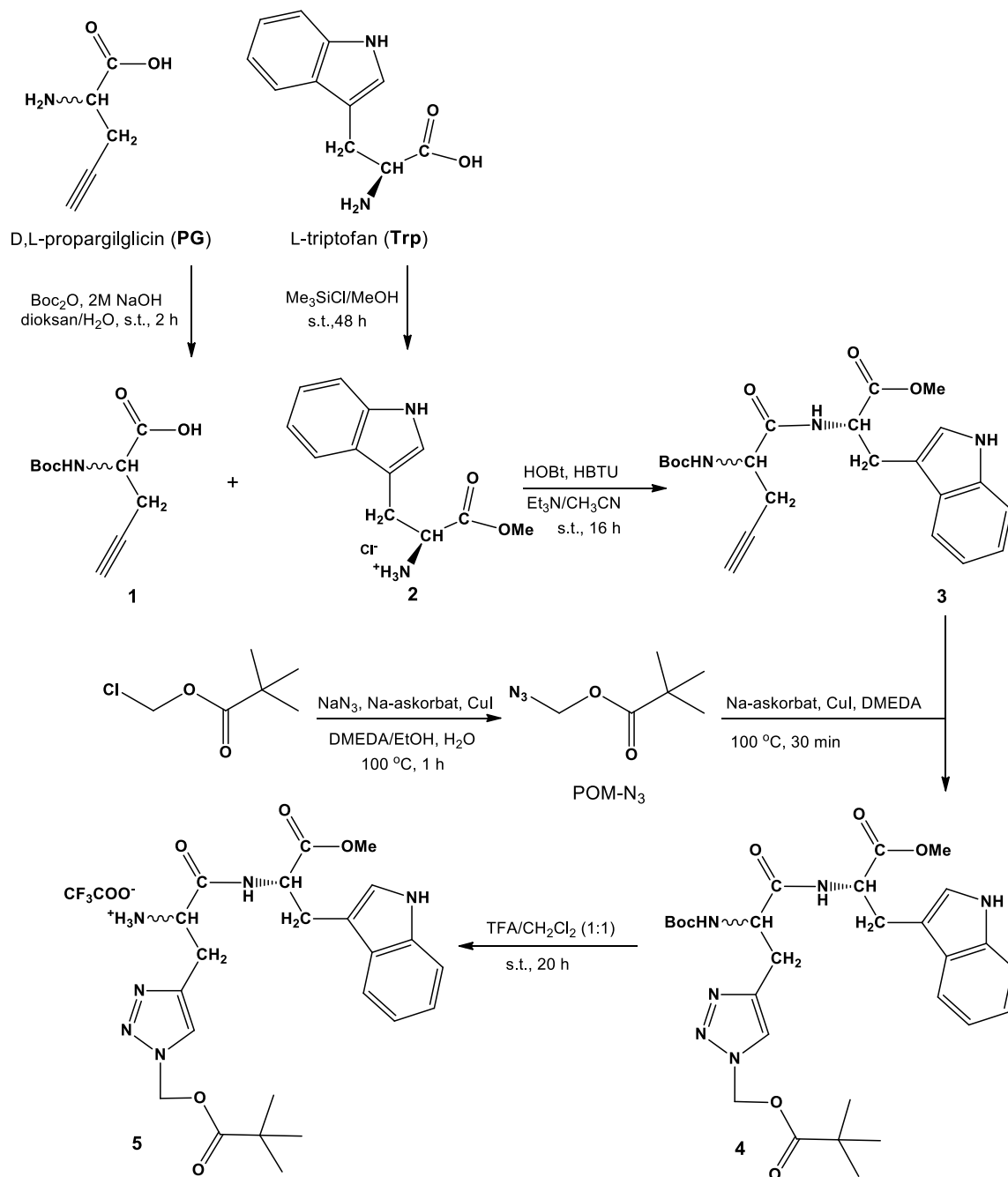
Sinteza dipeptida A(triazol)-W **5** provedena je u pet stupnjeva iz komercijalno dostupnih početnih reagenasa, D,L-propargilglicina (PG) i L-triptofana (shema 5). Amino-skupina D,L-propargilglicina zaštićena je poznatom metodom⁹² s di-*tert*-butil-dikarbonatom uz NaOH i spoj **1** izoliran je u 97

4. REZULTATI I RASPRAVA

%-tnom iskorištenju. Esterifikacija triptofana provedena je primjenom efikasne metode⁹³ s metanolom pomoću trimetilklorosilana te je metilni ester triptofana **2** izoliran u 90 %-tnom iskorištenju. Boc-propargilglicin **1** i metilni ester triptofana **2** povezani su peptidnom vezom koristeći HBTU/HOBt uz suvišak baze trietilamina u acetonitrilu. HBTU je korišten za aktiviranje karboksilne kiseline, a HOBt za smanjenje vjerojatnosti racemizacije i nastanak nusprodukata. Dipeptid A(alkin)-Trp **3** izoliran je u iskorištenju od 71 %. ¹H NMR spektar dijastereomerne smjese **3** (D,L + L,L) pokazao je dvostruke signale u dijastereomernom omjeru 1:1 (slika D.8.3b.: dva dubleta signala za protone -NH skupine na δ 8,31 i 8,25 ppm s ukupnim integralom 1H za oba signala; dva singleta za protone -OCH₃ skupine na δ 3,58 i 3,55 ppm s ukupnim integralom 3H za oba signala).

U sljedećem stupnju uveden je 1,2,3-triazolni prsten cikloadicijskom reakcijom kataliziranom bakrom (CuAAC) iz alkina **3** s *in situ* pripremljenim azidom. U prvom stupnju reakcijom pivaloiloksimetil-klorida (POM-Cl) s natrijevim azidom i uz katalizator CuI, natrijev askorbat i bazu *N,N'*-dimetiletilendiamin (DMEDA) u smjesi EtOH/H₂O pripremljen je azidni derivat POM-N₃. Reakcijom azida POM-N₃ dipeptidom A(alkin)-Trp **3** uz dodatnu količinu katalizatora CuI, Na-askorbata i baze DMEDA sintetiziran je dipeptid **4** u visokom iskorištenju od 87 %. U zadnjem stupnju uklanjanjem zaštitne Boc skupine s TFA/CH₂Cl₂, dipeptid A(triazol)-W **5** dobiven je u kvantitativnom iskorištenju.

4. REZULTATI I RASPRAVA



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

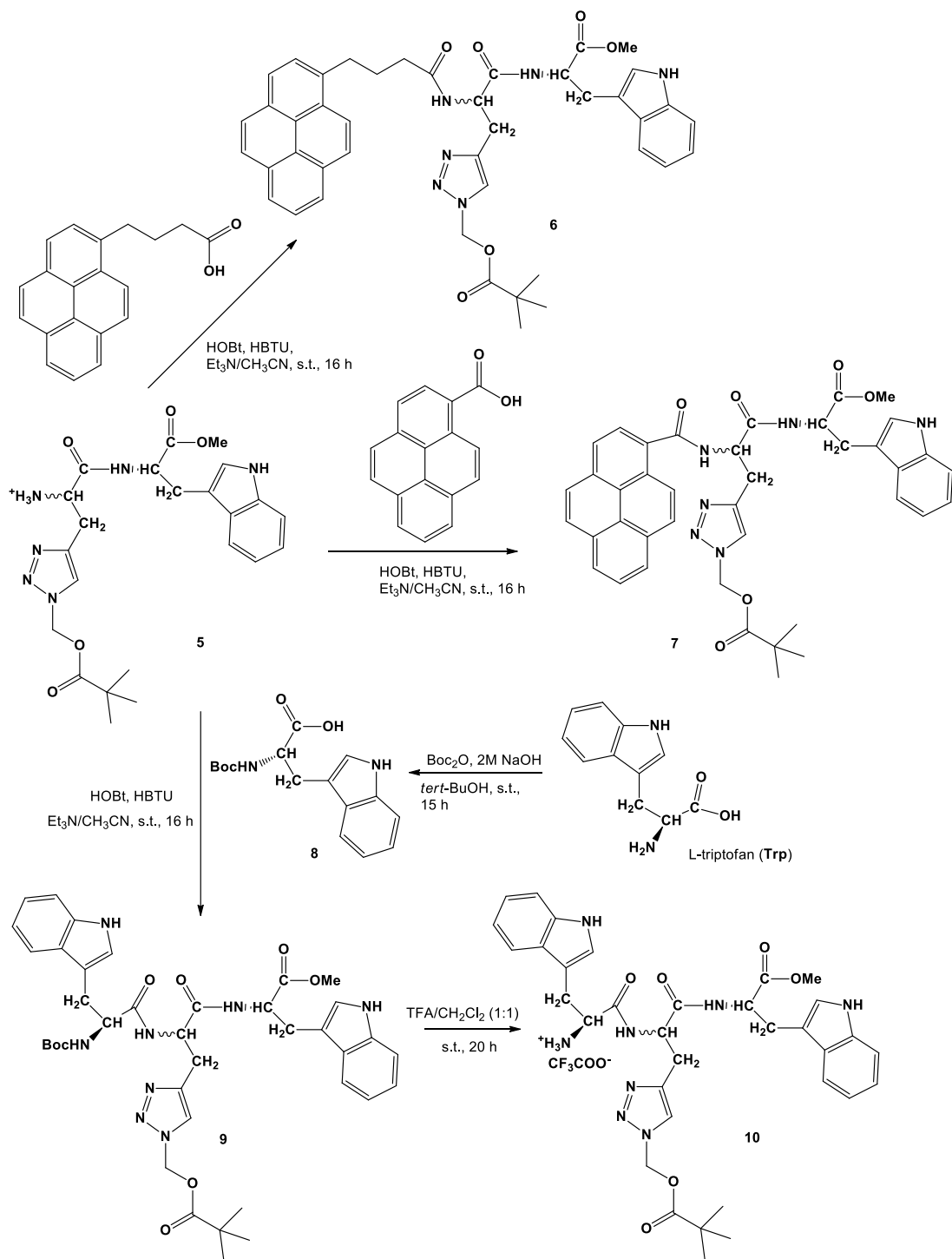
Dipeptid A(triazol)-W 5 je pogodan međuprodukt za vezivanje drugih molekula, aminokiselina, aromata ili heteroaromata, a u ovom radu za naknadnu nadogradnju s pirenima i triptofanom.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Tripeptidi W-A(triazol)-W **6** i **7** pripremljeni su reakcijom kondenzacije dipeptida A(triazol)-W s odgovarajućim piren karboksilnim kiselinama i (*tert*-butoksikarbonil)-L-triptofana (shema 6). U pirenskim tripeptidima pireni su vezani na slobodnu amino-skupinu dipeptida **5** s dužim, fleksibilnijim amidnim mostom u spoju **6** i vrlo kratkim karboksamidnim mostom u spoju **7**. Reakcijom kondenzacije dipeptida (A)triazol-W **5** i 1-pirenbutanske ili 1-pirenkarboksilne kiseline u prisutnosti HBTU/HOBt i trietilamina u acetonitrilu pripremljen je tripeptid Pyr-A(triazol)-W **6** u iskorištenju od 66 %, dok je tripeptid Pyr-A(triazol)-W **7** sintetiziran u iskorištenju od 64 %.

Za sintezu tripeptida W-A(triazol)-W **10** pripremljen je Boc-zaštićeni triptofan **8** u iskorištenju 81 %, poznatom metodom iz L-triptofana i di-*tert*-butildikarbonata u vodenoj otopini NaOH u *tert*-butilnom alkoholu.⁹⁴ Reakcijom kondenzacije Boc-L-Trp **8** i dipeptida **5** uz HBTU/HOBt i trietilamin u acetonitrilu izoliran je zaštićeni tripeptid **9** u dobrom iskorištenju od 63 %, a nakon uklanjanja zaštitne skupine s TFA/CH₂Cl₂ dobiven je željeni tripeptid W-A(triazol)-W **10** u odličnom iskorištenju od 95 %.

4. REZULTATI I RASPRAVA

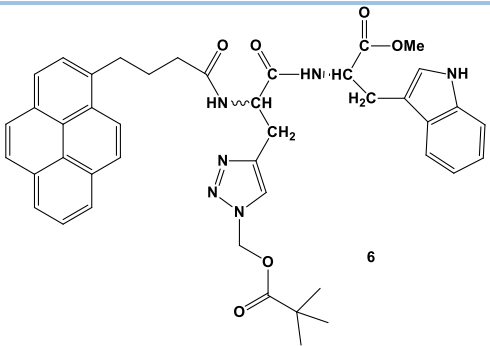
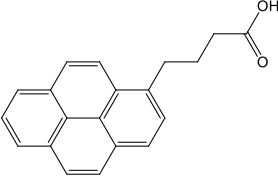
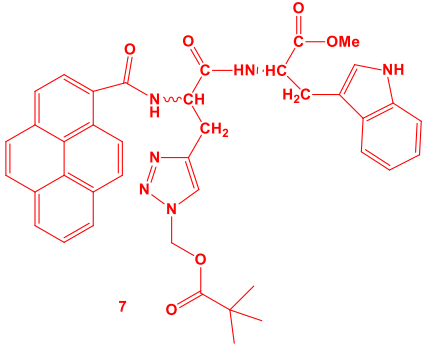
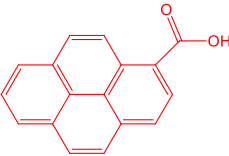
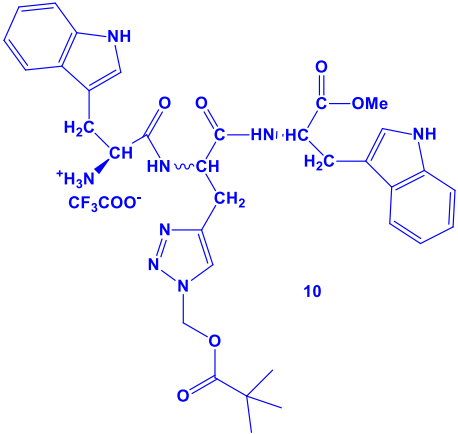
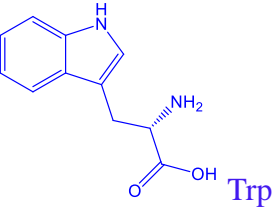


Shema 6. Sinteza tripeptida **6**, **7** i **10**

4.1.2. Spektrofotometrijska karakterizacija analoga peptida WHW

U tablici 4 su prikazane strukture nosintetiziranih analoga peptida WHW: fleksibilnog analoga Pyr-A(triazol)-W **6**, rigidnog Pyr-A(triazol)-W **7** i W-A(triazol)-W tripeptida **10** i odgovarajućih referentnih spojeva.

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

Sintetizirani tripeptidi	Referentni spojevi
 <p>Chemical structure of tripeptide 6, showing a flexible linker between the pyrrolysine and tryptophan residues.</p>	 <p>Chemical structure of referent compound A, 4-(1H-indol-3-yl)butanoic acid.</p>
 <p>Chemical structure of tripeptide 7, showing a rigid linker between the pyrrolysine and tryptophan residues.</p>	 <p>Chemical structure of referent compound B, 1H-indole-3-carboxylic acid.</p>
 <p>Chemical structure of tripeptide 10, showing a W-A-W tripeptide structure.</p>	 <p>Chemical structure of referent compound Trp, L-tryptophan.</p>

4. REZULTATI I RASPRAVA

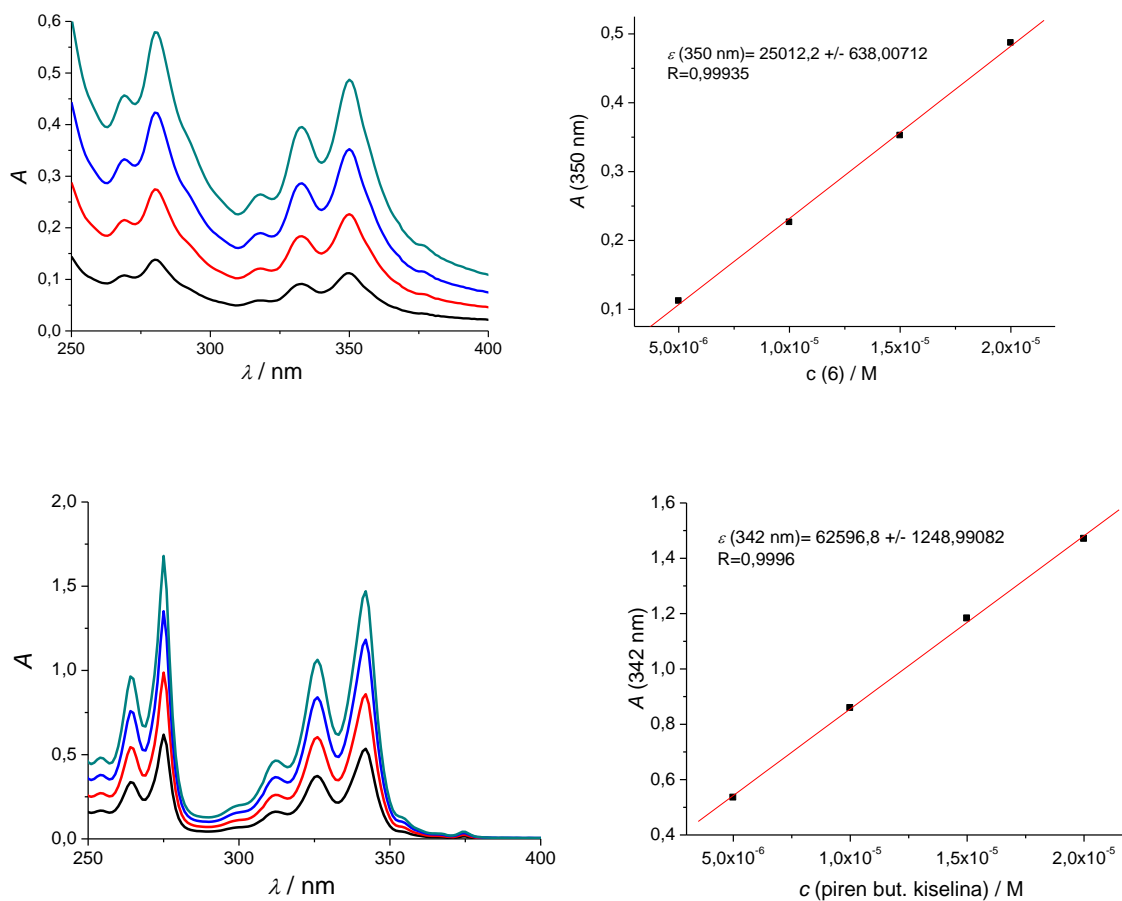
Ovisnost UV/Vis ili fluorescencijskog spektra o koncentraciji spoja je jedna od najpouzdanijih indikacija postoje li intermolekulske interakcije između molekula ispitanog uzorka.^{119,120,121} Nelinearnost grafa ovisnosti ukazuje da dolazi do intermolekulskih interakcija, kao posljedice nastanka agregata. S druge strane, spoj koji ima više kromofora može dati koncentracijski linearan spektroskopski odgovor, no UV i/ili fluorimetrijski spektri bitno različiti od referentnih kromofora (tablica 5) – mogu se 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-vrpci, odnosno J-agregatima, a kod hipsokromnog pomaka o H-vrpci, 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 kraćim valnim duljinama u apsorpcijskom i emisijskom spektru, a naziva ga se i plavim pomakom (engl. *blue-shift*). Mnogi J-agregati pokazuju fluorescenciju koja može biti izraženija nego fluorescencija monomera, za razliku od H-agregata čija se fluorescencija uglavnom gasi. U apsorpcijskom spektru može biti prisutan i hipokromni i hiperkromni pomak, odnosno smanjene apsorbanije i porast apsorbanije. Više je 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, ekscipleksa (engl. *exciplex*), gdje se npr. slaže jedan monomer pirena u pobuđenom stanju s nekim drugim aromatom. Valna duljina emisije ekscimera ili ekscipleksa pirena tada je pomaknuta prema značajno višim valnim duljinama, za oko 100 nm, primjerice s oko 400 nm (pirenski monomer) na oko 500 nm. Tako nastali ekscimer ili ekscipleks pirena je karakteriziran u vremenski razlučivom fluorescentnom eksperimentu.¹³

Sintetizirani tripeptidi 6, 7 i 10 pokazuju vrpce u UV i fluorescencijskim spektrima proporcionalne njihovim koncentracijama (slike 22, 23, D8.12., D8.13., D.8.14.), što ne ukazuje na intermolekularne interakcije. No UV i fluorescencijski spektri spojeva **6**, **7**, **10** se bitno razlikuju od spektara referentnih spojeva, što ukazuje na intramolekulske interakcije kromofora

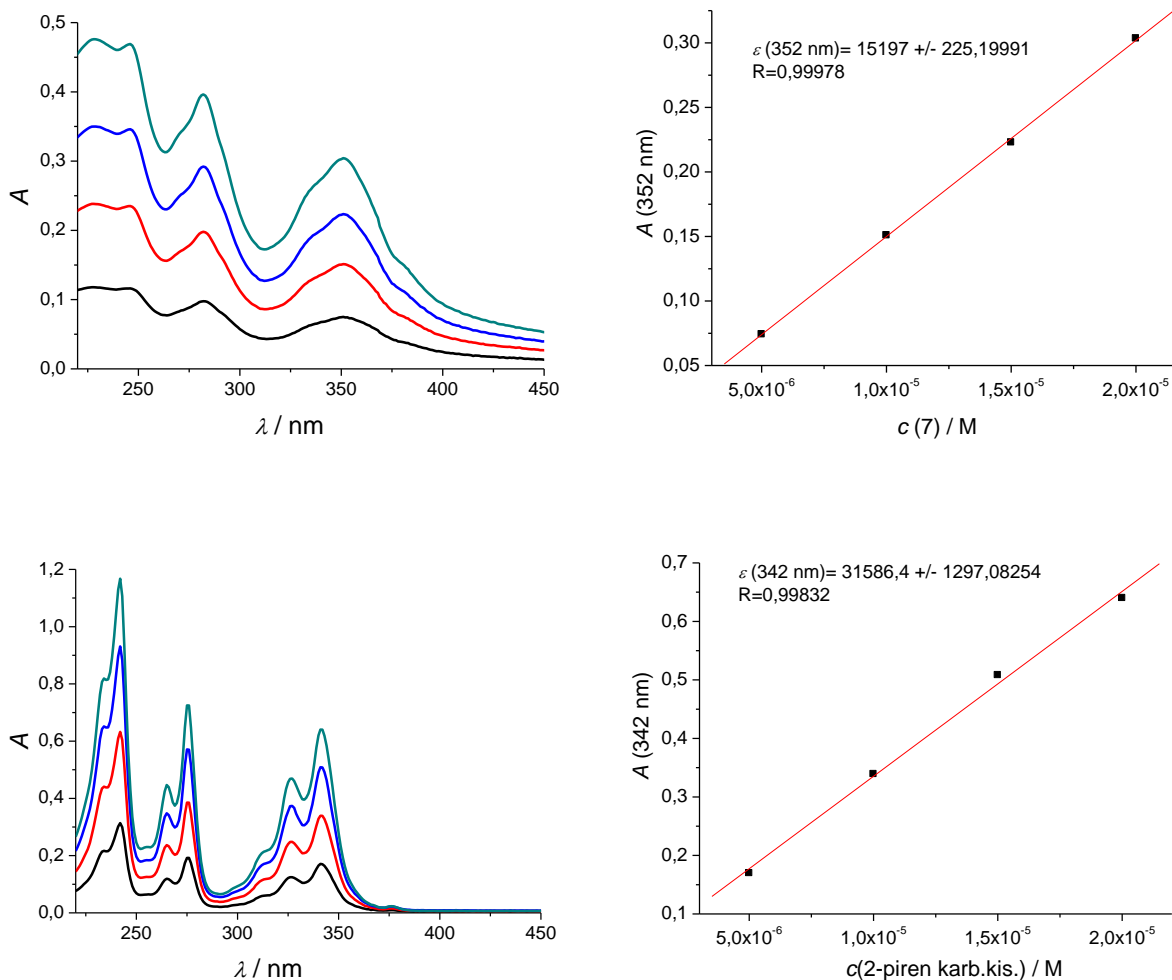
4. REZULTATI I RASPRAVA

unutar iste molekule: 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 stvaranju ekscipleksa intramolekulskim preklapanjem triptofana i pirena (u pobuđenom stanju).¹²³



Slika 22. Ovisnost apsorbancije o koncentraciji (5×10^{-6} – 2×10^{-5} mol dm^{-3}) spoja **6** (GORE) i njegovog referentnog spoja pirenbutanske kiseline (DOLJE) u natrijevom kakodilatnom puferu ($\text{pH} = 7$, $I = 0.05$ mol dm^{-3}).

4. REZULTATI I RASPRAVA



Slika 23. Ovisnost apsorbancije o koncentraciji (5×10^{-6} – 2×10^{-5} mol dm⁻³) spoja **7** (GORE) i njegovog referentnog spoja pirenkarboksilne kiseline (DOLJE) u natrijevom kakodilatnom puferu (pH = 7,0; $I = 0.05$ mol dm⁻³).

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

4. REZULTATI I RASPRAVA

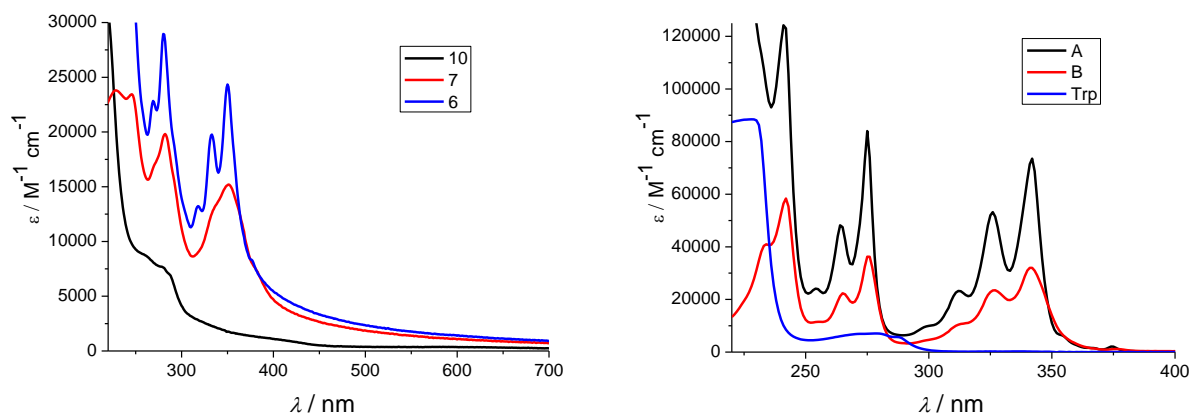
Tablica 5. Emisijski (λ_{em}/nm) i apsorpcijski (λ_{max}/nm) maksimumi, pripadajući molarni apsorpcijski koeficijenti ($\epsilon/M^{-1}cm^{-1}$) te vremena života (τ/ns) i kvantni prinos fluorescencije (ϕ_f) spojeva **10** i njegovog referentnog spoja **Trp**, **6** i referentne pirenbutanske kiseline **A** te spoja **7** i referentne pirenkarboksilne kiseline **B**.

Spoj	λ_{max}/nm	$\epsilon/M^{-1}cm^{-1}$	ϕ_f^a	λ_{exc}/nm^b	λ_{em}/nm	τ/ns^c	χ^2
A ¹³	342	63000±1000	0,15±0,02	340	398	2,5 (1%) 100,3 (99%)	1,060
B ¹³	341	31586±1297	0,16±0,03	340	401	38,3 (-) 566,2 (-B)	1,207
6	350	25012±638	0,020±0,005	340	472	11,6 (62 %) 36,4 (37%)	1,223
7	352	15197±225	0,080±0,001	340	481	32,2 (100%)	1,286
Trp ¹³	295	5600	0,14±0,02	280	366	0,53 3,1	-
10	295	8322±0,5	0,017±0,002	280	360	0,96 (29%) 4,1 (71%)	1,091

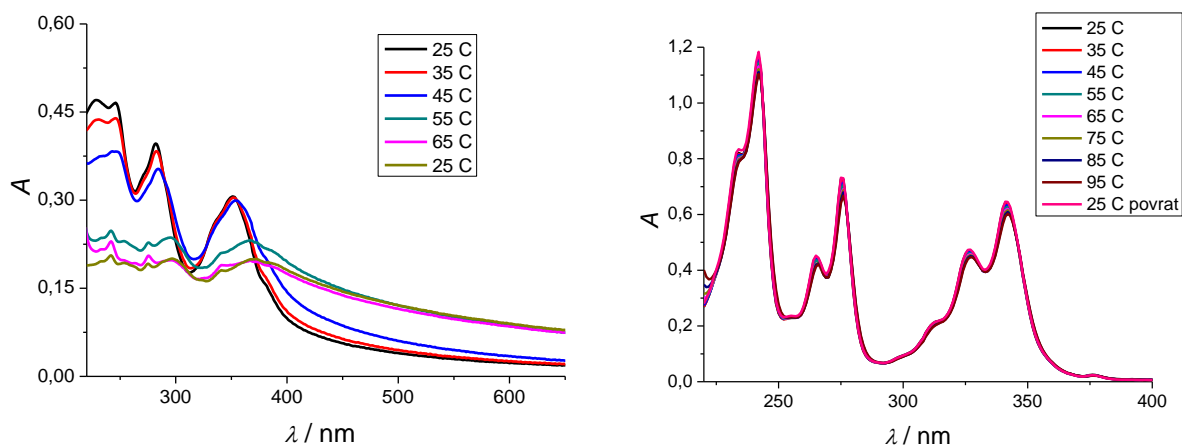
^a Apsolutno kvantno iskorištenje fluorescencije određeno je uz pomoć integracijske sfere SC-30, Edinburgh Inst., za otopine propuhane argonom, za $\lambda_{exc} = 353 nm$; ^b Uzorci su pobuđeni pulsirajućim diodama pri 340 nm i pri 280 nm. Mjerenja su provedena tri puta i uzete su prosječne vrijednosti. Pogreške odgovaraju maksimalnom apsolutnom odstupanju; ^c Dobiveni negativni predeksponencijalni faktor upućuje na nastanak ekscimera u pobuđenom stanju.

U UV/Vis spektrima (slika 24) mogu se uočiti 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** (s dugom i fleksibilnom poveznicom) se kao i kod ostalih može primijetiti hipokromni efekt, odnosno smanjenje apsorpcije, uzrokovano upravo aromatskim slaganjem, ali za razliku od tripeptida **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** (slike 25, D.8.11.), gdje dolazi do vidljivih promjena, što upućuje na intramolekulsko aromatsko slaganje.

4. REZULTATI I RASPRAVA



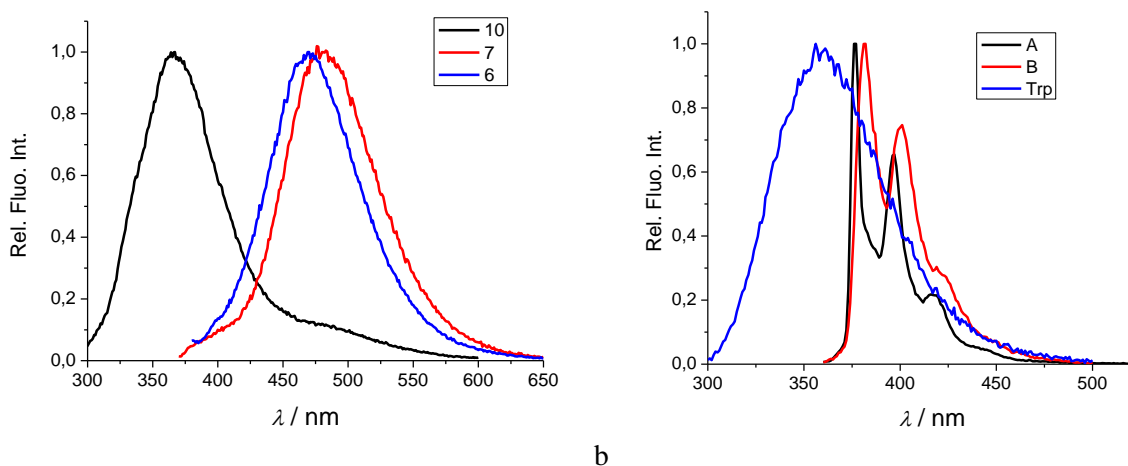
Slika 24. UV/Vis spektar ispitivanih peptida i njihovih referentnih spojeva.



Slika 25. Temperaturna ovisnost UV/Vis spektra peptida **7** i referentne pirenkarboksilne 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 ispitivanih spojeva **6**, **7** i **10** 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 dolazi 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 vjerojatno 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 $\Delta\lambda \sim 100$ 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 vjerojatno se može 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 emisija tripeptida **6** i **7** bila proporcionalna njihovoj koncentraciji, može se zaključiti da je došlo do formiranja ekscipleksa (slike D.8.12., D.8.13., D.8.14.).



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

Vrijednosti kvantnih prinosa (ϕ_f) određene 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.

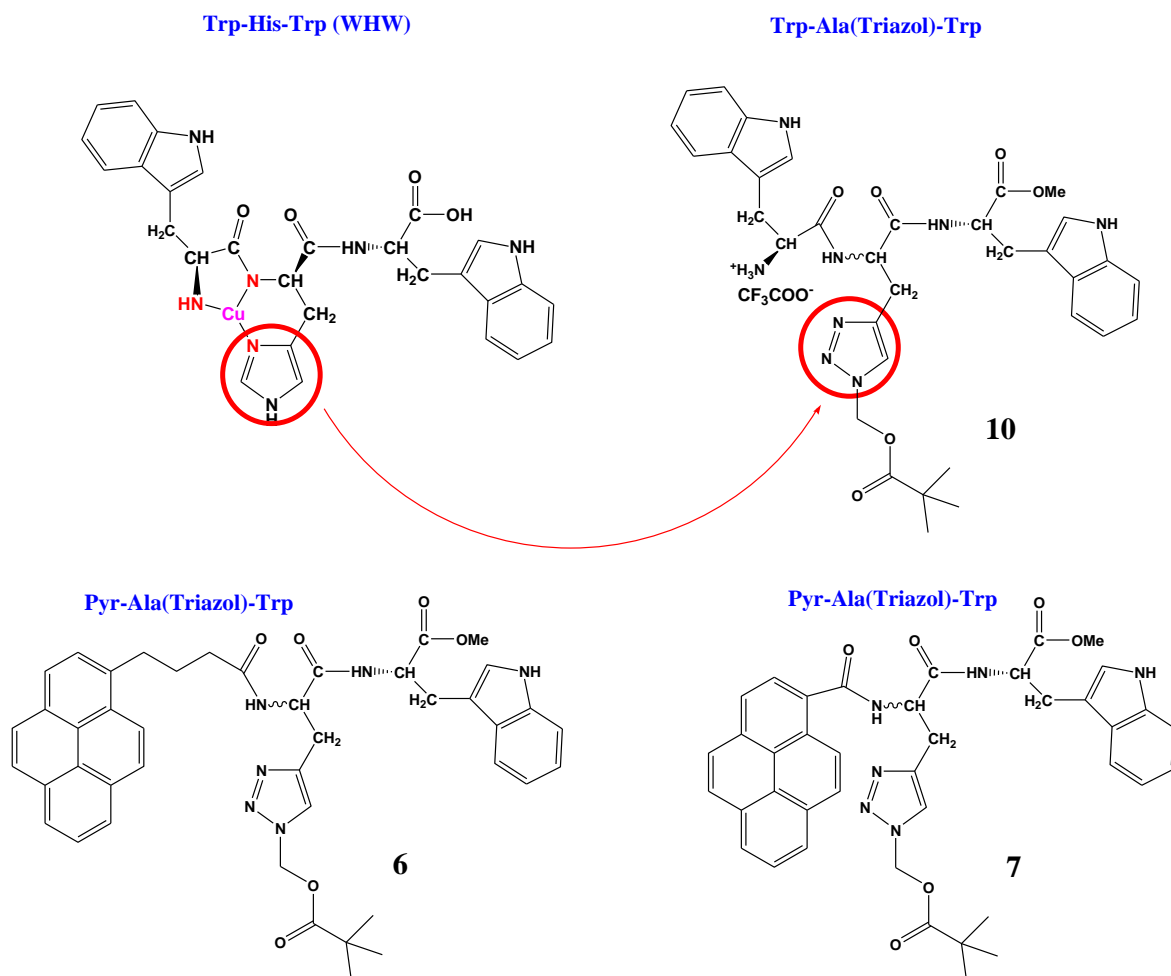
Određena vremena života metodom vremenski koreliranog pojedinačnog brojanja fotona (engl. *time-correlated single photon counting*, TCSPC) uz prisustvo kisika i bez prisustva kisika u vodenim otopinama. Otopine bez prisustva kisika pripremljene su neposredno prije mjerenja, propuhivanjem argonom vodene otopine u kivetu u trajanju od pola sata. Iz vremena života (τ)

dobivenih za tripeptid W-A(triazol)-W **10**, nakon uklanjanja kisika iz otopine 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 spoja **10**. Referentni Trp također karakterizira dvo-eksponencijalno vrijeme života, gdje druga, dulje živeća vrsta ($\tau = 3$ ns) ima kraće vrijeme života nego ono kod W-A(triazol)-W **10** ($\tau = 4$ ns). Vremena života pirenskih analoga **A**, **B**, **6** i **7** nisu se pokazala osjetljivima na kisik (slike D.8.18.-D.8.21.), dajući dvoeksponencijalni profil vremena života. Mono-eksponencijalni profil vremena života primijećen je jedino kod spoja **7** u odsutnosti kisika i kod referentnog spoja **A** u prisutnosti kisika, a razlog je vjerojatno niski udio druge emisijske vrste. Vrijeme života fluorescencije spojeva **6** i **7** se prilično razlikuje od njihovih referentnih spojeva **A** i **B**, upravo zbog već spomenutog stvaranja ekscipleksa pirena kod spojeva **6** i **7**. S obzirom da piren ima dugačko vrijeme života (~ 400 ns),¹³ što se i može vidjeti u tablici 5 za referentne spojeve **A** i **B**, zbog formiranja ekscipleksa kod spojeva **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 slici 27, novosintetizirani spojevi **6**, **7** i **10** tvore komplekse s Cu^{2+} kationom u vodenom mediju s biorelevantnim konstantama stabilnosti. Emisija pirena novosintetiziranih tripeptida **6**, **7**, isto kao i tripeptida W-A(triazol)-W **10** je djelomično ugašena vežanjem Cu^{2+} , no spektri su zadržali svoj oblik i emisijski maksimum (slika 28). U referentnom eksperimentu s peptidom 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 ($pK_a \sim 6,0$)³⁹ drugačije koordinira Cu^{2+} i intereagira s fluoroforima u usporedbi s triazolom u spoju **10**.

4. REZULTATI I RASPRAVA



Slika 27. Usporedba strukture peptida WHW s nosintetiziranim tripeptidima **10**, **6** (duljina pirenske poveznice odgovara poveznici spoja **10** za Trp) i **7** (kratki i rigidni pirenski analog).

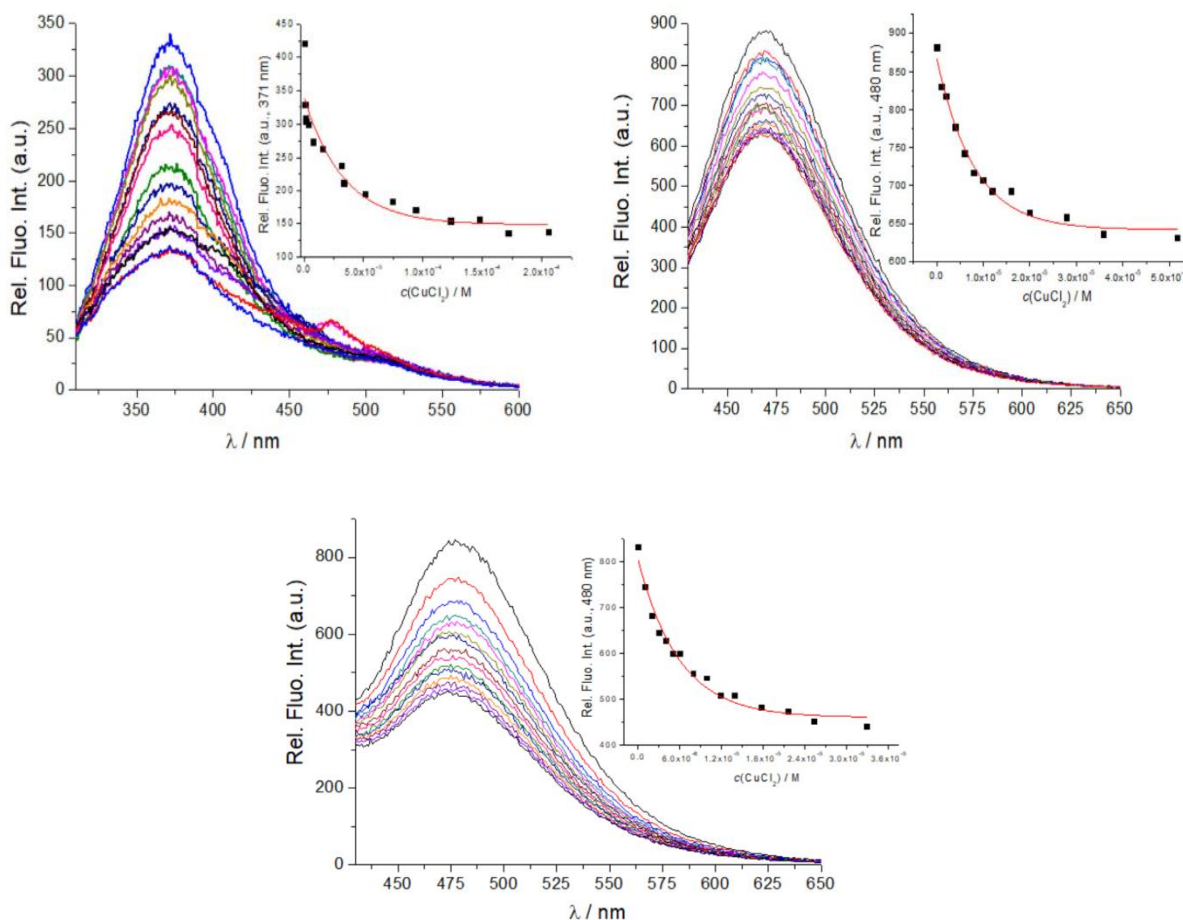
Obrada podataka titracija (promjene u cijelom spektru) metodom multikomponentne nelinearne regresije (SpecFit)^{96,97,126} dala je najbolje slaganje s eksperimentalnim podacima za stehiometriju spoj:Cu²⁺ = 1:1, dajući snažne konstante vezanja (log *K_s*). Zanimljivo, dobivena stehiometrija 1:1 se razlikuje 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) je za red veličine niži nego afinitet pirenskih analoga **6** (log *K_s* = 6,9) i **7** (log *K_s* = 6,8).

Vrijeme života fluorescencije za pirenske analoge **6** i **7** nije se značajno promijenilo nakon dodatka Cu²⁺ kationa, npr. za spoj **6** τ₁ iznosi 2,68 ns, a τ₁ iznosi 2,24 ns, a za spoj **7** τ₁ iznosi 2,54 ns, a nakon dodatka Cu²⁺ kationa τ₁ iznosi 2,77 ns, što upućuje na statički mehanizam gašenja fluorescencije (tablica D.1.). Kod statičkog mehanizma gašenja fluorescencije dolazi do nastanka

4. REZULTATI I RASPRAVA

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 pH = 7,0 u natrijevom kakodilatnom puferu, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$.

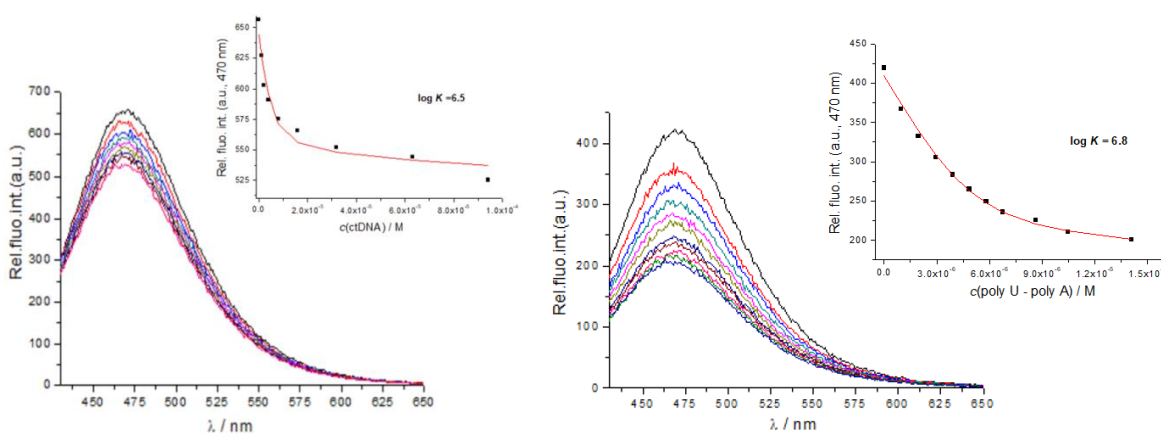
4.1.4. Interakcije analoga peptida WHW s ds-DNA i ds-RNA u prisutnosti/odsutnosti Cu^{2+} kationa

Interakcije analoga peptida WHW **6**, **7** i **10** ispitane su s *ct*-DNA, tipičnog predstavnika B-uzvojnice⁵² 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

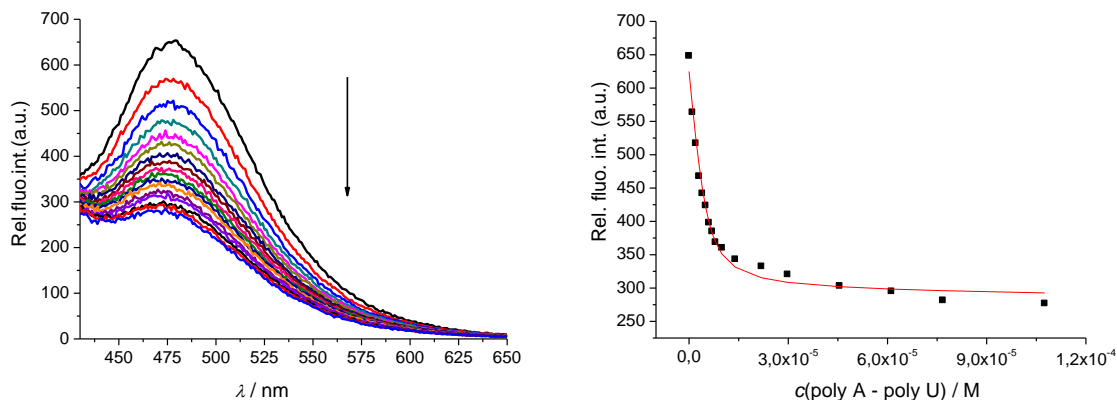
Svi ovdje ispitivani analozi peptida WHW **6**, **7** i **10**, kao i prirodni peptid WHW, su fluorescentni, što je omogućilo provedbu fluorimetrijskih titracija dodavanjem malih alikvota ishodnih otopina DNA ili RNA, te su mjerene promjene emisije fluorofora.

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 utorom DNA) (tablica 3),^{51,52} što više odgovara ispitivanim spojevima. Kod titracije s poli rA–poli rU može se primijetiti i mali hipsokromni pomak emisije (slika 29 desno).



Slika 29. Fluorimetrijska titracija spoja **6** ($c = 1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$; $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$) s *ct*-DNA (lijevo) i poli rA–poli rU (desno). Umetnuto: Ovisnost intenziteta emisije pri $\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ nm}$ o $c(\text{polinukleotid})$, izračunato prema Scatchardovoj jednadžbi^{100,101} (pH = 7,0 u natrijevom kakodilatnom puferu, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$).

4. REZULTATI I RASPRAVA



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 (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 pomoću 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 Trp-Ala(triazol)-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 tripeptida **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	$\log K_s$	
	<i>ct</i> -DNA	poli rA–poli rU
6	6,5	6,8
7	6,8	6,6
10	4,6	-
WHW	4,1	-

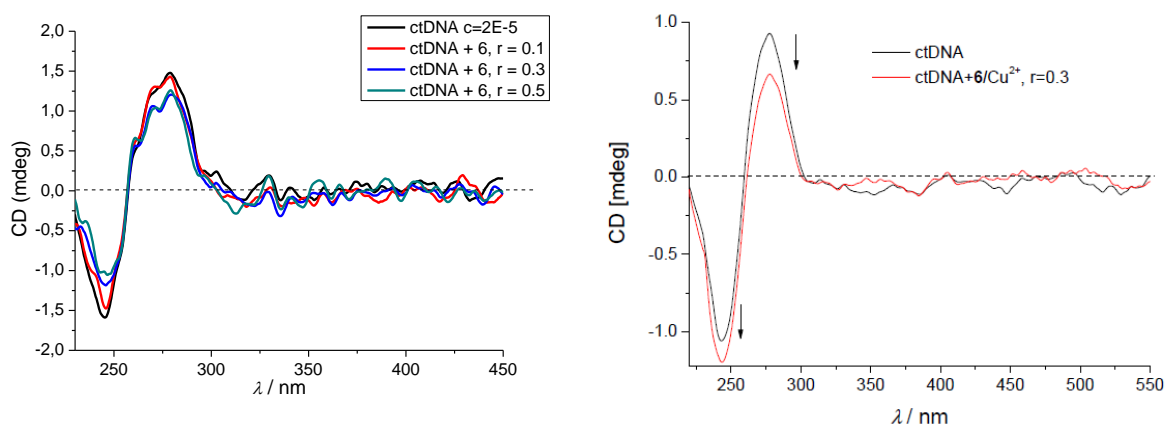
^a Podaci su obrađeni korištenjem Scatchardove jednadžbe^{100,101} i dobiveni su omjeri n [vezani ligand] / [polinukleotid] = 0,1 i 0,3. Sve K_s vrijednosti su ponovno izračunate za fiksni $n = 0,2$. Korelacijski koeficijenti su $>0,99$ za sve izračunate vrijednosti $\log K_s$.

Kako navedeni peptidi tvore komplekse s Cu^{2+} (potpoglavlje 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 bili u formi bakrovog kompleksa). Otopina metalnog kompleksa titrirana je s ds-DNA/RNA, no promjene emisije pirena nisu bile značajne, budući da 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 $\log K_s = 5-6$.

4.1.4.2. Cirkularni dikroizam

Konformacijske promjene sekundarne strukture polinukleotida nakon vezanja liganda ispitivane su spektroskopijom cirkularnog dikroizma, kao i za procjenu načina vezanja liganda na polinukleotid.¹²⁷ Apsorpcijski spektri ispod 300 nm mogu se pripisati nukleinskim kiselinama. Pri interakcijama akiralnih liganada s polinukleotidom mogu se pojaviti odgovarajući inducirani CD spektri (ICD) iznad 300 nm te nam mogu dati informacije o načinima vezanja liganada i geometriji vezanja.

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 tome je jer imaju racemičnu smjesu aminokiselina, a piren kao jedini kromofor koji apsorbira >300 nm, je udaljen od asimetričnog centra.



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

Dodatak spojeva **6**, **7** i **10** polinukleotidima ds-DNA ili ds-RNA (slike 31, 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 produžiti,¹²⁸ što obično rezultira značajnim smanjenjem inenziteta CD spektra polinukleotida.

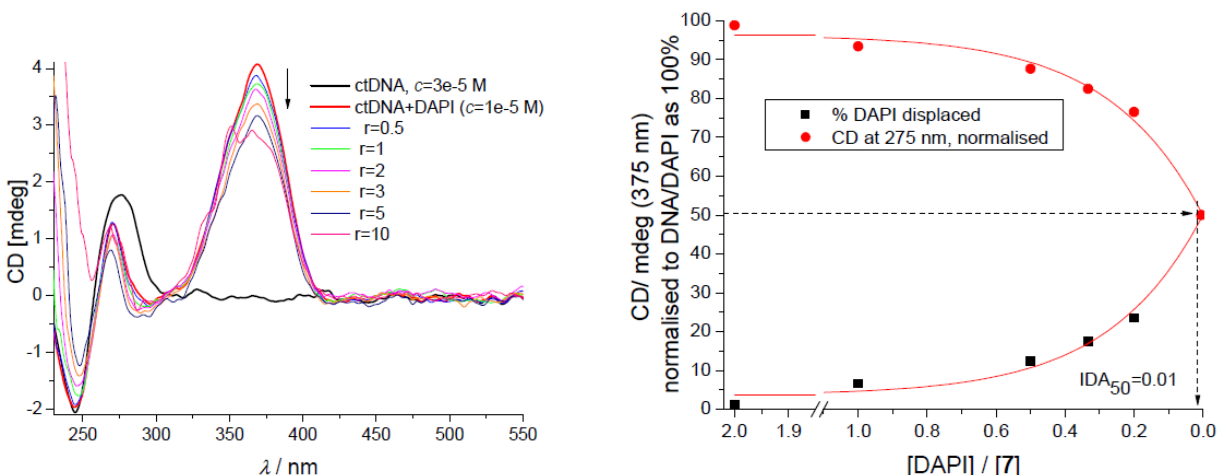
Dodatno, pri dodatku spojeva **6** ili **7** u otopine DNA/RNA nisu zamijećene inducirane CD vrpce iznad 300 nm, što upućuje na neujednačenu orijentaciju pirenskog kromofora prema kiralnoj osi polinukleotida.

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, male molekule poznate po vezanju u mali utor AT-DNA uz pojavljivanje vrlo jakog inducirano CD signala u području $\lambda = 300\text{--}400$ nm.¹²⁹ Kao metoda neovisna o fluorescenciji odabran je cirkularni dikroizam, zbog nepreklapanja 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).

4. REZULTATI I RASPRAVA



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

4.1.4.3. Temperaturno mekšanje dvolančanih DNA i RNA

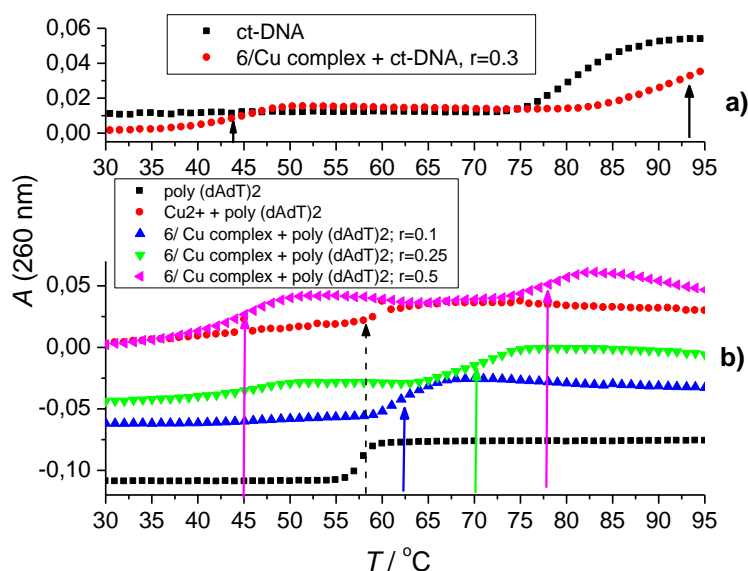
Promjene vrijednosti temperaturnog mekšanja dvolančanih DNA i RNA u prisustvu ispitivanih spojeva mogu dati dodatne informacije o načinu vezanja sintetiziranih analoga peptida WHW.¹⁰² S obzirom da male molekule mogu stabilizirati dvostruku uzvojnici DNA, te tako povisiti njezinu temperaturu mekšanja,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

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 pripremljenim kompleksima spojeva s Cu²⁺ 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 Cu²⁺ u ds-DNA/RNA nije imao nikakav utjecaj na temperaturu mekšanja polinukleotida. Dodatak **7**/Cu²⁺ kompleksa s kratkom poveznicom izazvao je malu stabilizaciju ds-DNA/RNA (slika D.8.23.), dok je kompleks **6**/Cu²⁺ s fleksibilnijom poveznicom izazvao velike promjene u temperaturi mekšanja

4. REZULTATI I RASPRAVA

(slika 33). S obzirom da je *ct*-DNA stabilizirana preko mjernih sposobnosti metode ($T_m > 100$ °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 vrstu 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⁺ ($r = 0,5$) uzrokovao je nastanak dvostupanjske krivulje, odnosno snažnu stabilizaciju i destabilizaciju, 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 uzrokovao je stabilizaciju (tablica 7), što znači da su dvostupanjske krivulje karakteristične samo za ds-DNA, što se može objasniti strukturom polinukleotida. Male molekule se većinom nekovalentno vežu u mali utor DNA ili u veliki utor

4. REZULTATI I RASPRAVA

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 utjecati na destabilizaciju same uzvojnice pri povišenju temperature, jer je 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 bakrov kation 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 ($^a\Delta T_m/^\circ\text{C}$) *ct*-DNA ($c(\text{ct-DNA}) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $r_{[\text{spoj}]/[\text{ctDNA}]} = 0,25$) i poli rA–poli rU ($c(\text{RNA}) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $r_{[\text{spoj}]/[\text{poli rA–poli rU}]} = 0,25$) pri pH = 7,0 (natrijev kakodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$) pri dodatku tripeptida **6**, **7** ili **10** ili dodatku prethodno pripremljenih kompleksa tripeptida **6**, **7** ili **10** s pet puta više Cu²⁺ kationa.

Spoj	$\Delta T_m/^\circ\text{C}$		
	<i>ct</i> -DNA	poli rA–poli rU	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 ΔT_m : $\pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$; ^b Kompleks tripeptida **6**, **7** i **10** s 5 ekvivalenata Cu²⁺ kationa 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 ΔT_m vrijednosti. ^c Dvofazne krivulje mekšanja upućuju da su pri omjeru r prisutna dva različita tipa ds-DNA/spoj kompleksa: destabilizirana ds-DNA ($\Delta T_m = -38 \text{ }^\circ\text{C}$) i termalno stabilizirana ds-DNA ($\Delta T_m = +>12 \text{ }^\circ\text{C}$)

4.1.5. Biološka i biokemijska ispitivanja

4.1.5.1. Induciranje cijepanja plazmidne DNA izlaganjem spojeva **6** i **7** i njihovih kompleksa **6**/ Cu^{2+} i **7**/ Cu^{2+} UV svjetlosti

Ispitivanja su provedena od strane dr. sc. Dragomire Majhen i dr. sc. Ksenije Božinović (Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković), a cijepanje plazmidne DNA praćeno je gel elektroforezom. 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 potom može uzrokovati cijepanje ds-DNA. Oksidativno cijepanje DNA mogu uzrokovati i kompleksi peptida s bakrom, što rezultira promjenama plazmidne DNA.^{132,133} S obzirom na već potvrđene interakcije s ds-DNA i ds-RNA s pirenskim derivatima **6** i **7** i njihovih kompleksa s Cu^{2+} kationima, 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**/ Cu^{2+} ili **7**/ Cu^{2+} pri 37 °C ili 50 °C.

Na agaroznom gelu su vidljive tri forme plazmidne DNA: linearni oblik, pocijepani (engl. *nicked*) i „*supercoiled*“ kružni oblik. Sve tri forme su kvantitativno analizirane, iz čega je razvidno da izlaganje UV zračenju ne utječe 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 ranija saznanja o pirenskim analogima^{13,114,115} i njihovoj aktivnosti, spojevi **6** i **7** su pokazali znatno slabije djelovanje, zbog vezanja u mali utor DNA i intramolekulskog slaganja (engl. *stacking*) pirena i triptofana, što je spriječilo potpuno cijepanje i linearizaciju DNA.

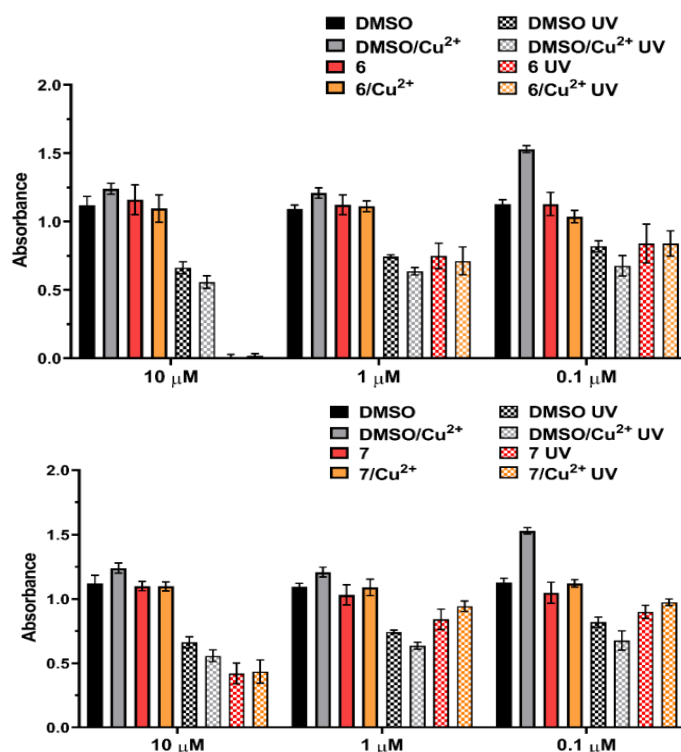
Ispitano je i termalno inducirano cijepanje DNA s prethodno pripremljenim **6**/ Cu^{2+} i **7**/ Cu^{2+} kompleksima. Uzorci plazmidne DNA s dodanim kompleksima su bili inkubirani pri sobnoj temperaturi, 37 °C i 50 °C tijekom 24 h. Kao negativne ili pozitivne kontrole služile su plazmidna DNA pUC19 bez dodanih kompleksa, plazmidna DNA s Cu^{2+} kationom i plazmidna DNA linearizirana s restriksijskim enzimom (RE). Rezultati su pokazali da **6**/ Cu^{2+} i **7**/ Cu^{2+} ne cijepaju plazmidnu DNA značajno bolje od samog Cu^{2+} kationa. Razlog je vjerojatno intramolekulsko slaganje kompleksa unutar malog utora DNA te ograničen dohvat Cu^{2+} kationa prema šećernim komponentama DNA okosnice, koje bi bile podložne kemijskom cijepanju.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Konfokalnom mikroskopijom i MTT testom ispitana je *in vitro* potencijalna bioprimejivost 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**/Cu²⁺ i **7**/Cu²⁺ 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**/Cu²⁺, **7** i **7**/Cu²⁺ bez/s izlaganjem UV zračenju (350 nm) 30 min. Mjerena apsorbancija ($\lambda = 600$ 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.

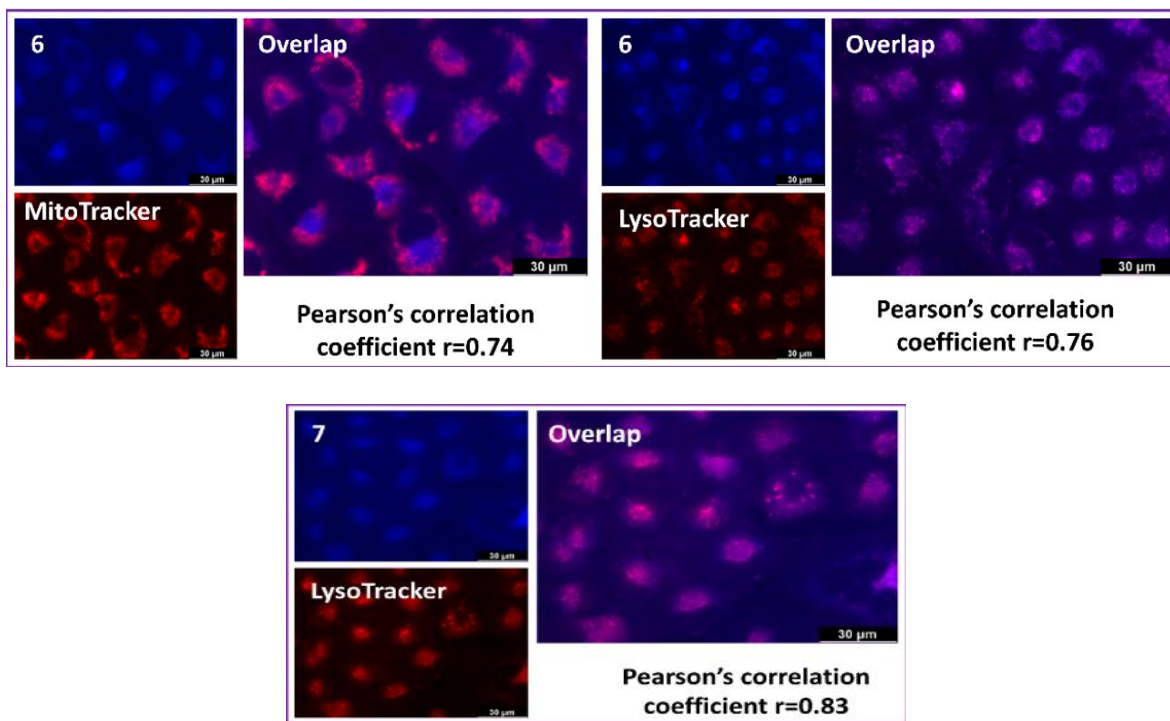
Stanice su tretirane s 10 μM, 1 μM i 0,1 μM spojeva **6** i **7** i njihovih kompleksa s bakrom. Spojevi **6** i **7** i njihovi kompleksi s bakrom nisu pokazali toksičnost prema stanicama ni u jednoj od ispitanih koncentracija. Nakon UV zračenja stanica tretiranih spojevima **6** i **7** u trajanju od 30

4. REZULTATI I RASPRAVA

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 potpoglavlju 4.1.5.1.

4.1.5.3. Konfokalna mikroskopija

Eksperimenti konfokalne mikroskopije provedeni su radi ispitivanja ulaze li sintetizirani analozi **6**, **7** i **10** 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 zamijećena je 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 spojeva **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 ($\lambda_{\text{exc}} = 348$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 430\text{--}550$ nm). Za analizu je korišten ImageJ software i prikladan JACoP plugin.

4. REZULTATI I RASPRAVA

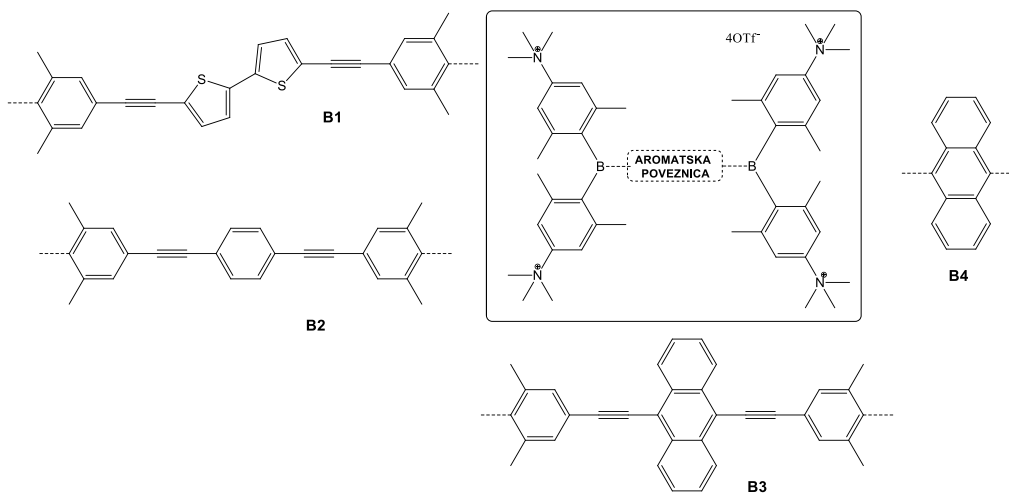
Kolokalizacija je kvantificirana uz pomoć Pearsonovog koeficijenta korelacije (PCC) (tablica 8). Spoj **6** pokazao je jednaku distribuciju u mitohondrijima i lizosomima, bez određene selektivnosti. Spoj **7** pokazao je snažnu kolokalizaciju s lizosomima, dok su rezultati kolokalizacije spoja **7**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

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 okarakterizirana četiri derivata bis-triarilborana (**B1**–**B4**). Spojevi **B1** i **B2** su se pokazali kao jako dobre kombinirane fluorimetrijske i Ramanove probe za selektivno prepoznavanje DNA, RNA i proteina.^{17,64} Kratki antracenski analog **B4**, koji je također poznat od prije,⁹⁵ korišten je radi prikaza važnosti duljine poveznice. Strukture ispitanih spojeva **B1**–**B4** prikazane su na slici 36.



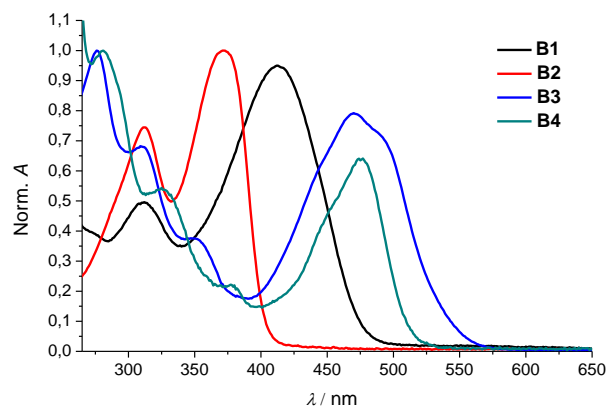
Slika 36. Ispitivani derivati bis-triarilborana **B1**–**B4**.

4.2.1. Spektrofotometrijska karakterizacija derivata bis-triarilborana

Spojevi **B1**–**B4** 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 su prije ispitivanja njihovih interakcija s DNA/RNA detaljno spektrofotometrijski okarakterizirani u vodenom mediju.

UV/Vis spektri ispitivanih spojeva **B1**–**B4** proporcionalni su njihovim koncentracijama u rasponu $c = 5\text{--}15 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, 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 bliskim maksimumima apsorpcije, $\lambda_{\text{abs}}(\mathbf{B3}) = 485 \text{ nm}$, a $\lambda_{\text{abs}}(\mathbf{B4}) = 476 \text{ nm}$, 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

4. REZULTATI I RASPRAVA



Slika 37. UV/Vis spektri 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. Emisijski (λ_{em}/nm) i apsorpcijski (λ_{abs}/nm) maksimumi te pripadajući molarni apsorpcijski koeficijenti ($\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) analoga bis-triarilborana **B1–B4**.

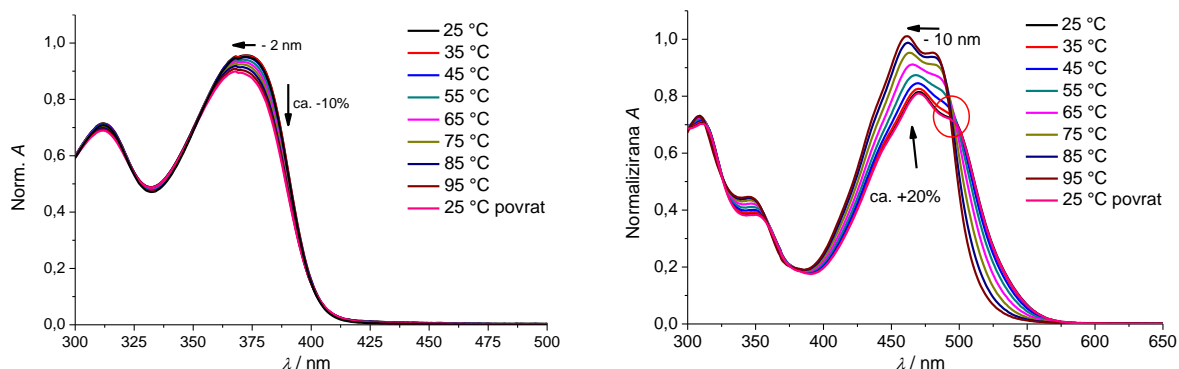
	Otopalo	λ_{abs}/nm	$\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	λ_{em}/nm
B1	MeCN	413	65000	535
	H ₂ O	413	62000	558
B2	MeCN	373	60000	452
	H ₂ O	371	62000	452
B3	MeCN	483	52000	505
	^a H ₂ O	485	47000	501
B4	H ₂ O	476	8270	527

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 u spektrima spojeva **B2** i **B4** (slika 38) može se primijetiti malo smanjenje apsorbanije, dok spektri spojeva **B1** i **B3** pokazuju snažno povećanje apsorbanije i izraženi pomak maksimuma prema nižim valnim duljinama (hipsokromni pomak). Opažene promjene nisu posljedica kemijske degradacije spojeva, pošto su sve spektralne promjene u potpunosti reverzibilne nakon ponovnog hlađenja na 25 °C. Velike reverzibilne promjene UV/Vis spektara ukazuju na intermolekularno nekovalentno aromatsko slaganje, odnosno zagrijavanjem

4. REZULTATI I RASPRAVA

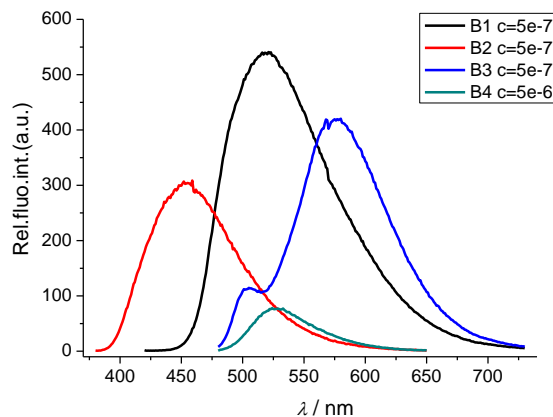
dolazi do procesa deagregacije. Sustavni pomak preklapanja spektara (slika 38 desno, crveni krug) upućuje na više tipova agregata.



Slika 38. Temperaturna ovisnost UV/Vis spektara pri $c = 1,3\text{--}1,7 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ 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.

Ispitivani analozi **B1–B4** pokazuju vrlo jaku fluorescencijsku emisiju (slika 39). Kod spojeva **B2** i **B4** su emisijski intenziteti proporcionalni koncentraciji spoja do $c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ (**B2**) i $c = 8 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ (**B4**), a prilikom zagrijavanja do $95 \text{ }^\circ\text{C}$ pokazali su male promjene, što znači da ne dolazi 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 $c < 1 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$, a emisija oba spoja pri zagrijavanju do $95 \text{ }^\circ\text{C}$ i koncentraciji $c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ se značajno promijenila.

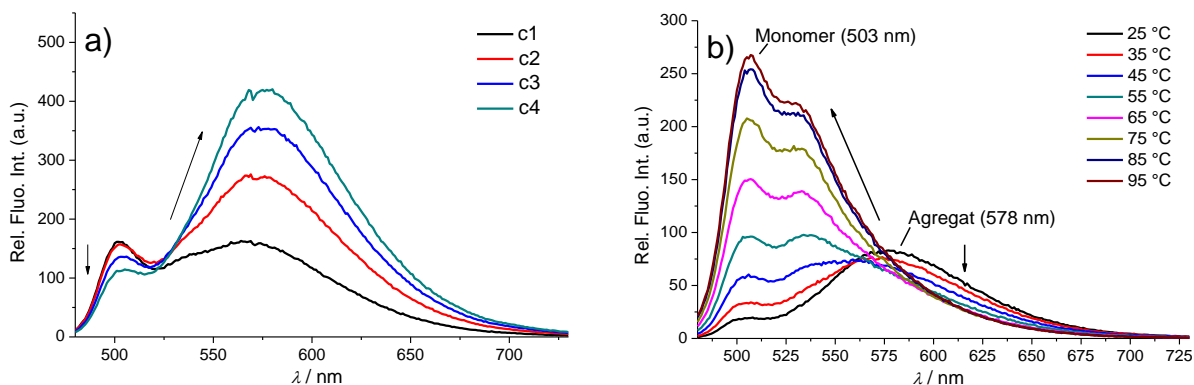
4. REZULTATI I RASPRAVA



Slika 39. Fluorencijski 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.

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 **B3** 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 je u čistoj vodi primijećeno prisustvo agregata samo kod spoja **B3** pri koncentracijama višim od 1×10^{-5} mol dm⁻³ iz čega je razvidno 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.⁶⁴ Posebno je zanimljivo odsustvo agregacije antracenskog analoga **B4** (analog spoja **B3**), gdje sterička ometanja voluminoznim trairilboranskim kationima ne dozvoljavaju intermolekularne interakcije slaganja vrlo kratke antracenske premosnice.

4. REZULTATI I RASPRAVA



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

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

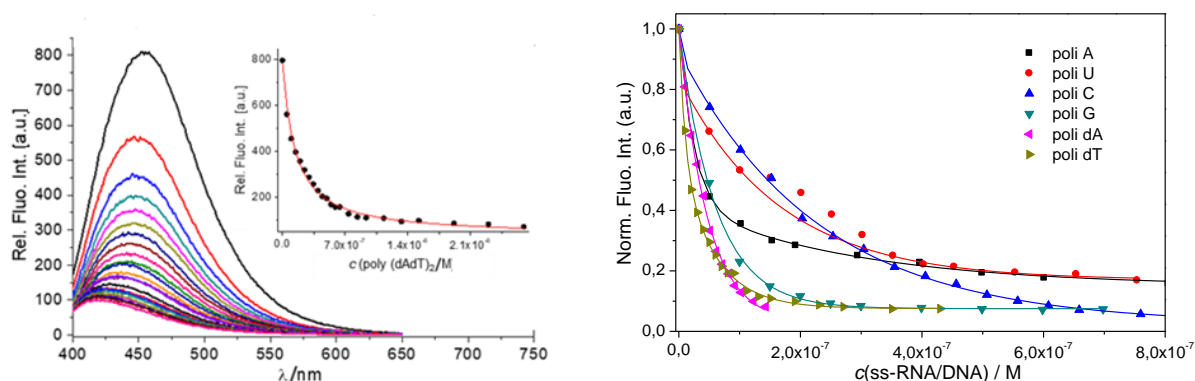
Interakcije bis-triarilborana **B1–B4** ispitane su s *ct*-DNA, tipičnog predstavnika B-uzvojnice koja se sastoji od podjednakog udjela AT i GC parova baza (58 % GC parova baza). Korišteni su i sintetski alternirajući DNA polinukleotidi poli(dGdC)₂ i poli(dAdT)₂, koji sadrže samo GC i AT parove baza, s obzirom da se male molekule 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 (tablica 3). 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

Za ispitivanje afiniteta vezanja bis-triarilborana **B1–B4** na ds-DNA i ds-RNA prvedene su fluorimetrijske titracije. Zbog agregiranja spojeva **B1** i **B3**, titracije su provedene pri što moguće nižim koncentracijama prema spoju **B1**, ($5 \times 10^{-9} \text{ mol dm}^{-3}$ ili $5 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$), ali svejedno nije izbjegnuta agregacija kod nekih polinukleotida pri omjerima $r_{[\text{B1}]/[\text{polinukleotid}]} > 0,25$ (slika 44). Titracije spojeva **B2** i **B4** također su provedene pri istim koncentracijama radi lakše usporedbe.

4. REZULTATI I RASPRAVA

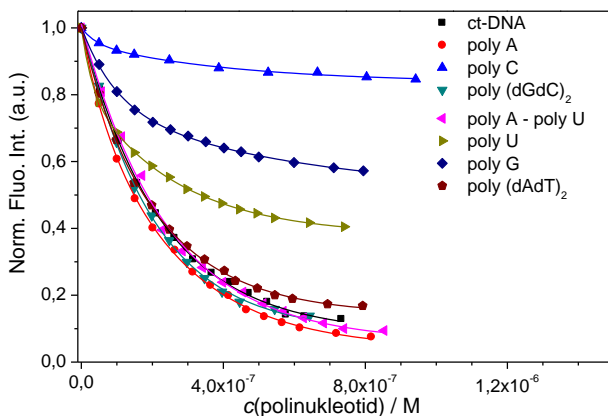
Podaci su za većinu titracija obrađeni uz pomoć nelinearne regresije na Scatchardovu jednadžbu,^{100,101} dajući konstante stabilnosti i Scatchardov omjer n [vezani ligand] / [polinukleotid] (tablica 10).



Slika 41. Lijevo: Fluorimetrijska titracija spoja **B2** ($c = 5 \times 10^{-9}$ mol dm⁻³; $\lambda_{exc} = 372$ nm) s poli(dAdT)₂ kao primjer svih dsDNA/RNA titracija; umetak: ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 448 nm o $c(\text{poly}(\text{dAdT})_2)$. Desno: Ovisnost normalizirane fluorescencije pri $\lambda_{max} = 448$ nm o $c(\text{ssDNA/RNA})$, 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** doveo 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 ss-RNA (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).

4. REZULTATI I RASPRAVA



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–B4** s polinukleotidima, pri pH = 7,0 (natrijev kakodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$).

		$\log K_s$			
		B1	B2	B3	B4
ds	ct-DNA	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 rA–poli rU	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

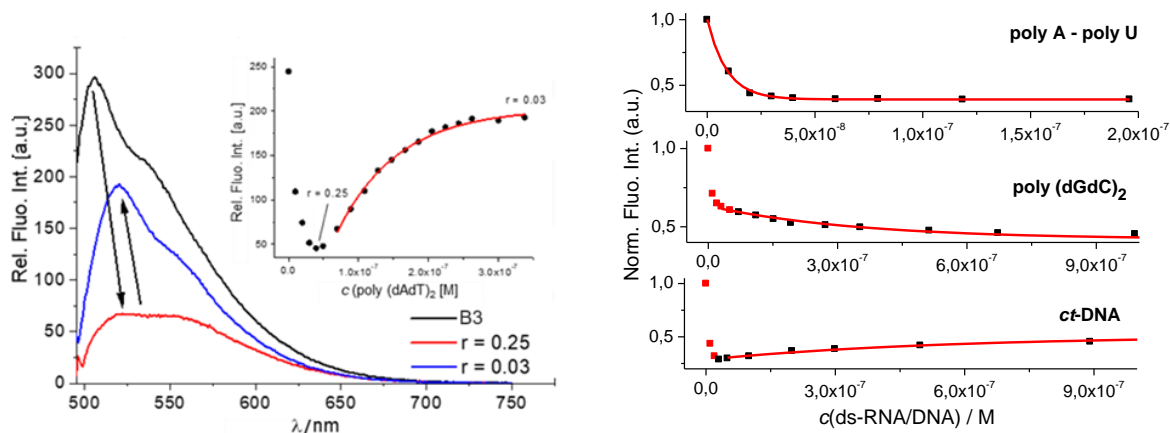
Zbog kompeticije između vezanja slobodne molekule i agregiranja, vezne konstante su niže.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Iz tablice 10, u kojoj su prikazane konstante vezanja, 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 na vrlo kratku i krutu premosnicu 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 43) može se primijetiti proces agregacije-deagregacije što je razvidno iz batokromnog pomaka emisijskog maksimuma prema 550 nm za omjere $r_{[B3]/[poli(dAdT)_2]} > 0,25$ i hipsokromnog pomaka emisijskog maksimuma natrag na 520 nm za omjere $r_{[B3]/[poli(dAdT)_2]} < 0,25$. 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 pliće malog utora poli(dAdT)₂.

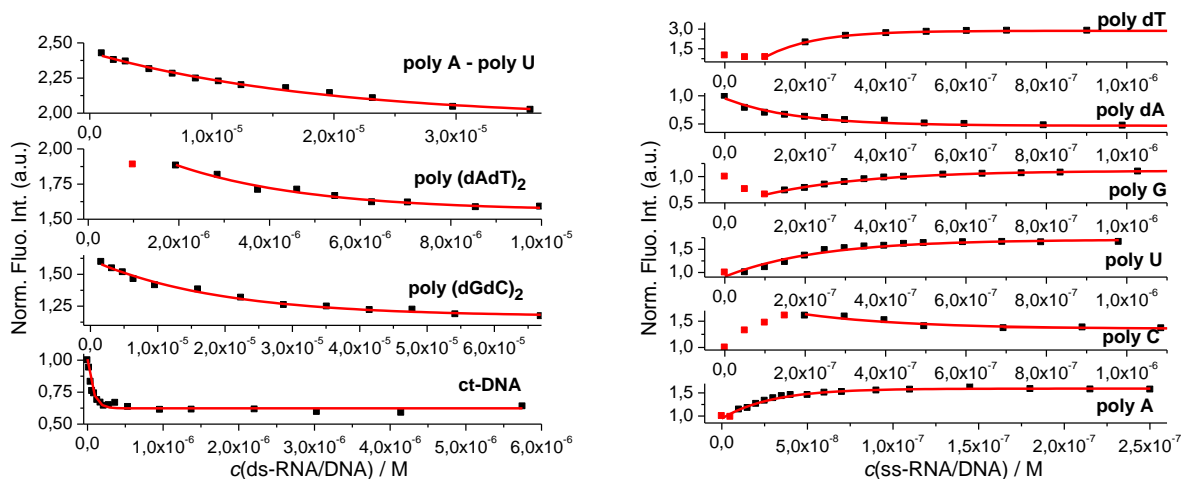
4. REZULTATI I RASPRAVA



Slika 43. Lijevo: Promjene u emisijskom spektru spoja **B3** pri titraciji s poli(dAdT)₂, umetak: ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 520 nm o $c(\text{poli}(\text{dAdT})_2)$. 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} ($\text{pH} = 7,0$ u natrijevom kakovilatom puferu, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$) dajući konstante vezanja ($\log K_s$) prikazane u tablici 10.

Slično je primijećeno i kod spoja **B1** koji je također sklon agregiranju. Titracije su provedene 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).

4. REZULTATI I RASPRAVA



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} ($\text{pH} = 7,0$ u natrijevom kakodilatnom puferu, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$) dajući konstante vezanja ($\log K_s$) prikazane u tablici 10.

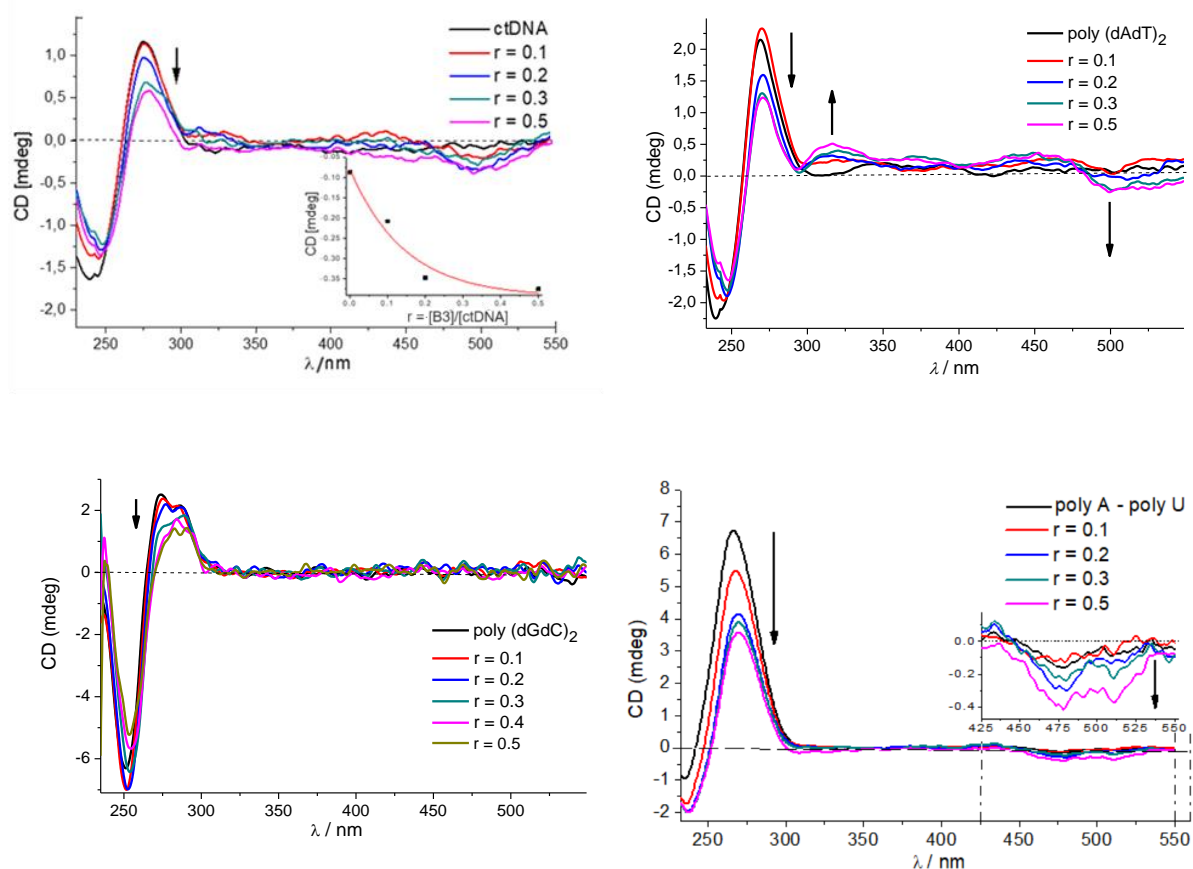
4.2.2.3. Cirkularni dikroizam

Konformacijske promjene sekundarne strukture polinukleotida nakon vezanja liganda proučavane su metodom 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** polinukleotidima uzrokovao je malo smanjenje intenziteta u CD spektru dsDNA/RNA, bez mjerljivih ICD vrpci 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 vrpci, što upućuje da njegovo vezanje nije uzorkovalo 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 vrpci. Spoj **B3** jedini je uzrokovao odmotavanje dvostruke uzvojnice dsDNA/RNA i djelomični gubitak kiralnosti, što je razvidno iz jakog smanjenja intenziteta CD spektra dsDNA/RNA (slika 45). Pri dodatku spoja **B3** u *ct*-DNA, poli rA–poli rU i poli(dAdT)₂ došlo je do pojave ICD vrpci u području spoja ($\lambda =$

4. REZULTATI I RASPRAVA

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 vrpce, 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 utore, odnosno u mali utor DNA i veliki utor RNA.



Slika 45. CD titracije *ct*-DNA (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 kakovodilatnom puferu, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$).

4.2.2.3. Temperaturno mekšanje

Eksperimenti temperaturnog mekšanja ukazuju da spojevi **B1**, **B2** i **B3** stabiliziraju dvostruku uzvojniju 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 **B1–B3** 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

4. REZULTATI I RASPRAVA

(tablica 10). Očigledno vrlo kruta i kratka poveznica spoja **B4** bitno ograničava elektrostatske interakcije s DNA/RNA veznim mjestima, i posebno negativno nabijenom okosnicom.

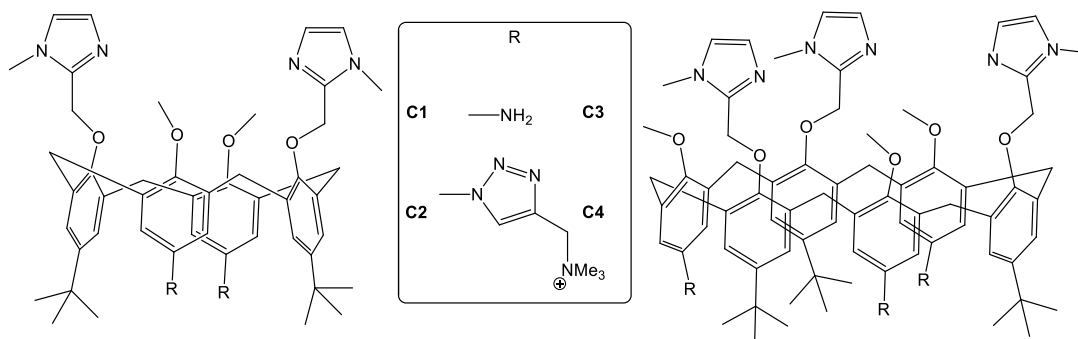
Tablica 11. Temperature mekšanja ($^a\Delta T_m/^\circ\text{C}$) dsDNA/RNA pri dodatku **B1**, **B2**, **B3** ili **B4** pri pH = 7,0 (natrijev kakodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$) pri omjeru $r = r_{\text{spoj}}/[\text{polinukleotid}]$.

	r^b	ct-DNA	poli rA-poli rU	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.

^aPogreška u ΔT_m : $\pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$;

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} Spojevi **C2** i **C4** su oligokationi (slika 46) i za njih smo pretpostavili da bi mogli vezati polianionske DNA/RNA, ali i nukleotide. Radi usporedbe ispitani su i neutralni analози **C1** i **C3** (slika 46). Okarakterizirani su kaliksareni s pozitivnim nabojem **C2** (dikation, u obliku kloridne soli) i **C4** (tetrakation, u obliku nitratne soli), te njihovi neutralni analози **C1** i **C3**.



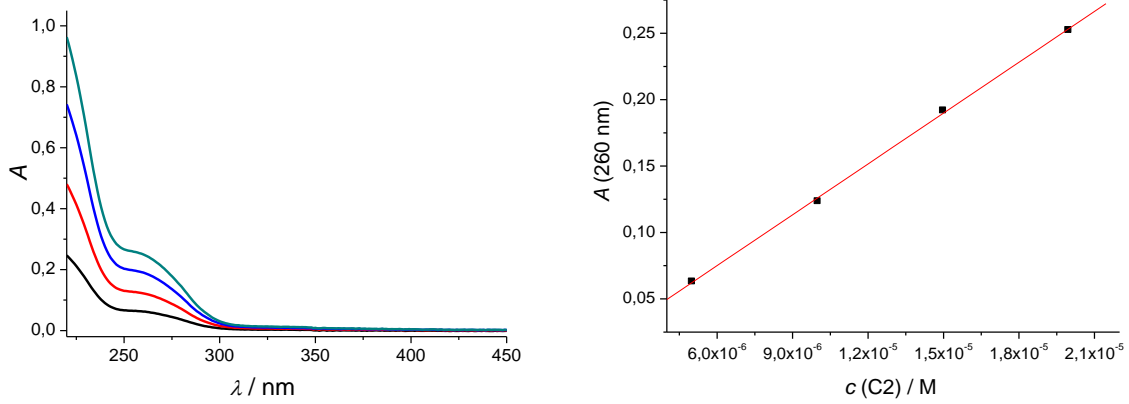
Slika 46. Strukture analoga kaliksarena **C1–C4**.

Svojstva ispitivanih analoga kaliksarena u biorelevantnim uvjetima su bila nepoznata te su prije ispitivanja njihovih interakcija s DNA/RNA detaljno spektrofotometrijski okarakterizirani u vodenom mediju.

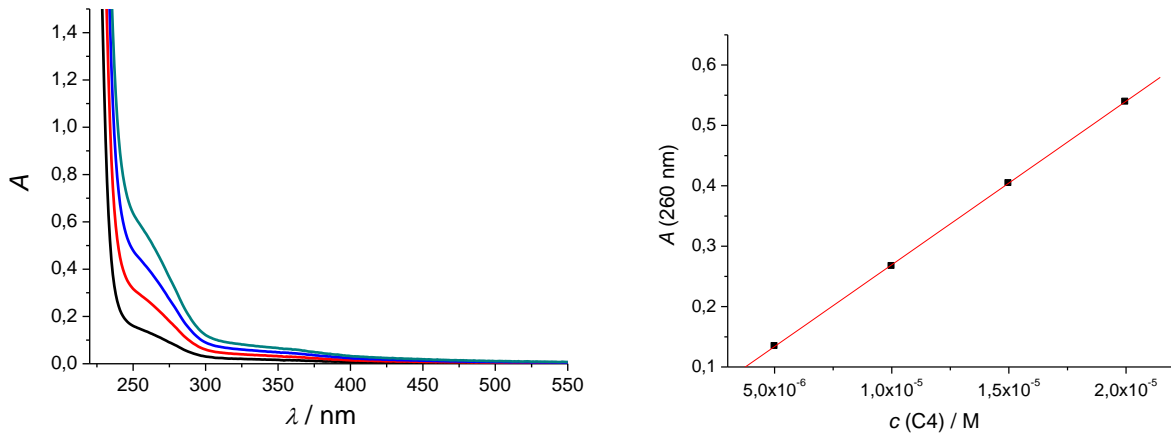
4.3.1. Spektrofotometrijska karakterizacija analoga kaliksarena

Apsorpcije ispitivanih analoga kaliksarena **C1–C4** 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 pokazuju 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.

4. REZULTATI I RASPRAVA

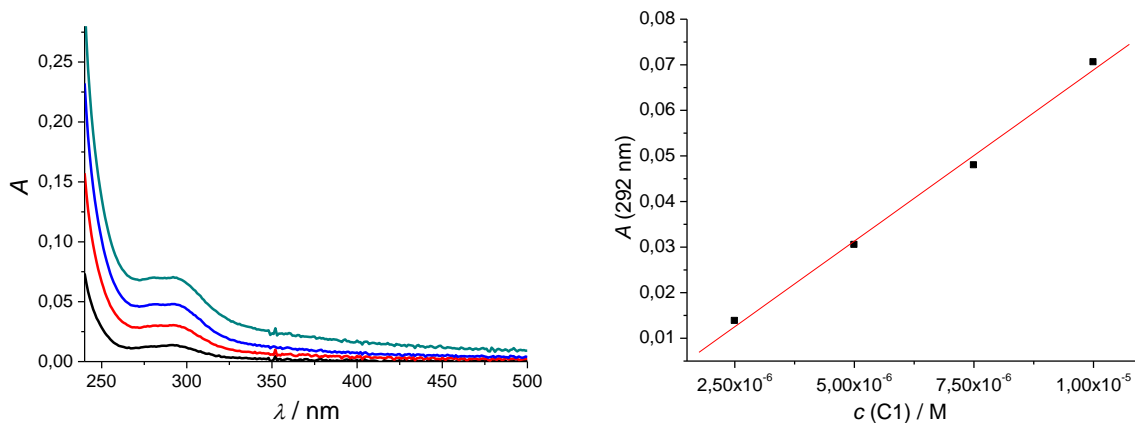


Slika 47. Ovisnost koncentracije spoja **C2** (5×10^{-6} – 2×10^{-5} mol dm⁻³) u natrijevom kakodilatnom puferu (pH = 7,0; $I = 0.05$ mol dm⁻³).

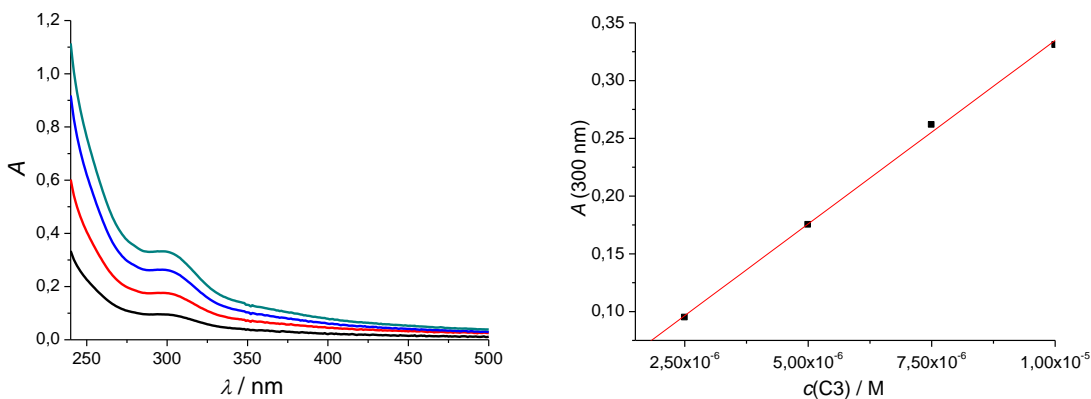


Slika 48. Ovisnost koncentracije spoja **C4** (5×10^{-6} – 2×10^{-5} mol dm⁻³) u natrijevom kakodilatnom puferu (pH = 7,0; $I = 0.05$ mol dm⁻³).

4. REZULTATI I RASPRAVA



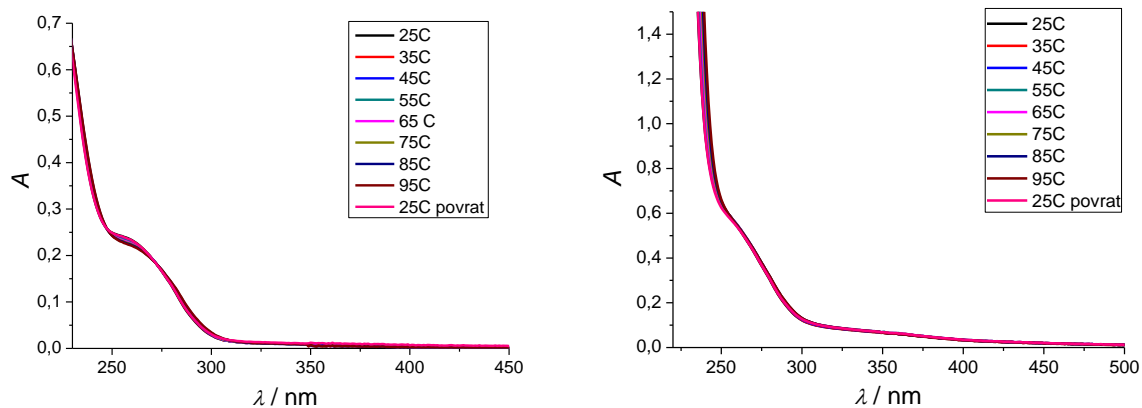
Slika 49. Ovisnost koncentracije spoja **C1** ($2,5 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u natrijevom kakodilatnom puferu ($\text{pH} = 7,0$; $I = 0.05 \text{ mol dm}^{-3}$).



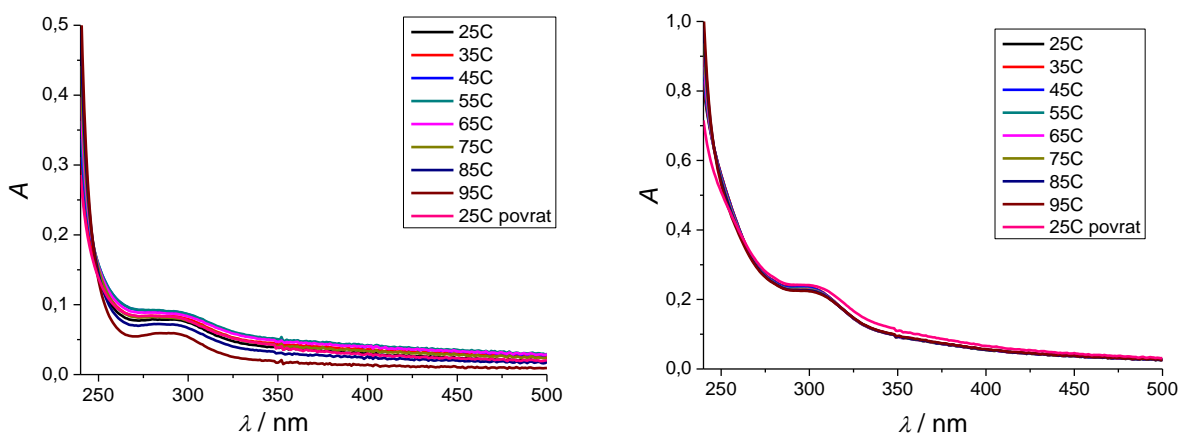
Slika 50. Ovisnost koncentracije spoja **C3** ($2,5 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u natrijevom kakodilatnom puferu ($\text{pH} = 7,0$; $I = 0.05 \text{ mol dm}^{-3}$).

Pri zagrijavanju spojeva, značajna promjena uočena je jedino kod neutralnog kaliksarena **C1** ($c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) gdje apsorbancija raste do temperature od $65 \text{ }^\circ\text{C}$, a nakon toga na temperaturama do $95 \text{ }^\circ\text{C}$ apsorbancija pada (slike 51 i 52). Prisutan je i porast bazne linije, što upućuje na nastanak koloida.

4. REZULTATI I RASPRAVA



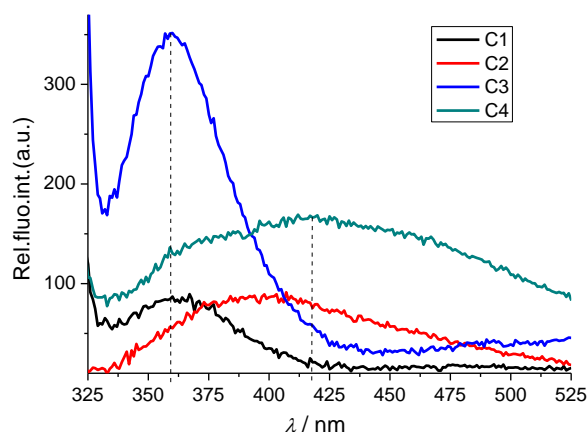
Slika 51. Temperaturna ovisnost UV/Vis spektara pozitivno nabijenih kaliksarena **C2** (lijevo) i **C4** (desno) pri koncentraciji spoja ($c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u natrijevom kakodilatnom puferu ($I = 0,05 \text{ M}$, $\text{pH} = 7,0$).



Slika 52. Temperaturna ovisnost UV/Vis spektara 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 ekscitacije 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 sukladno NATA standardu (*N*-acetil-L-triptofanamid, $\phi_R = 0,14$; $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 300\text{--}360 \text{ nm}$) su jako niski, $\phi_f < 0,005$ (Tablica 12), a usporedba kvantnog prinosa sva četiri analoga kaliksarena **C1–C4** 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.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Tablica 12. Emisijski (λ_{em}/nm) i apsorpcijski (λ_{max}/nm) maksimumi, pripadajući molarni apsorpcijski koeficijenti ($\epsilon/M^{-1}cm^{-1}$) spojeva C1, C2, C3 i C4 te relativni kvantni prinosi (ϕ_f) kaliksarena C1–C4 određeni sukladno NATA standardu (*N*-acetil-L-triptofanamid, $\phi_R = 0,14$; $\lambda_{exc} = 280$ nm; $\lambda_{em} = 300–360$ 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	$31782 \pm 0,972$	360	$0,0029 \pm 0,001$
				$0,0031 \pm 0,001$
				$0,0047 \pm 0,001$
C4	260	$27091 \pm 0,126$	400	b0,0003
				b0,0002
				b0,0008

^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 $\phi_f < 0,001$.

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

Interakcije analoga kaliksarena **C1–C4** ispitane su uz korištenje polinukleotida odabranih na temelju njihovih strukturalnih karakteristika (tablica 3).^{51,52} 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).

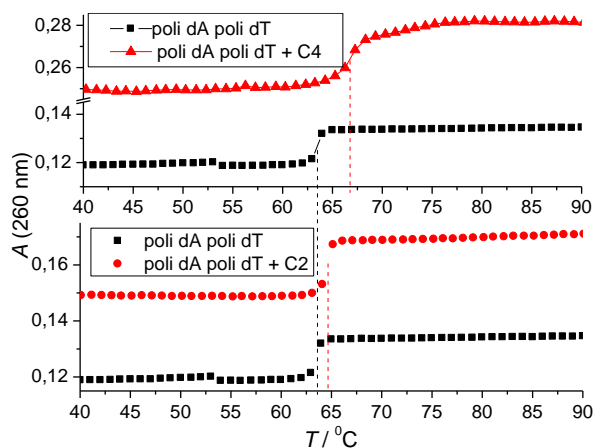
4.3.2.1. Temperaturno mekšanje

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-skupinama na gvaninu te elektrostatske interakcije, dodatak spojeva **C1–C4** uzorkovao je selektivnu stabilizaciju dvostrukih uzvojnica DNA/RNA. Utjecaj neutralnih kaliksarena **C1** i **C3** bio je zanemariv i nije uzrokovao 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-skupina na gvaninu koji čine polovicu veznih mjesta same

4. REZULTATI I RASPRAVA

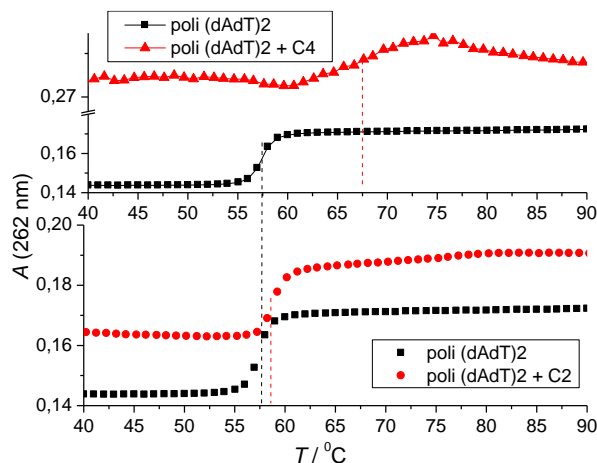
ct-DNA što upućuje i da su utori dominantna vezna mjesta. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 13.

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 (pH 7,0; $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$) nakon dodatka spojeva **C2** i **C4**. Greška u vrijednostima ΔT_m iznosi $\pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$.

4. REZULTATI I RASPRAVA



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	ΔT_m			
		<i>ct</i> -DNA	poli rA–poli rU	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

U emisijskim spektrima proučavanih spojeva **C1–C4** nije uočena značajna promjena dodatkom bilo kojeg polinukleotida, 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.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Zbog niske emisije kaliksarena pri vezanju na dsDNA/RNA korištena je metoda istiskivanja etidijevog bromida, čija je provedba opisana u potpoglavlju 3.4.4. Ispitane su interakcije spojeva **C1–C4** s dvolančanim polinukleotidima *ct*-DNA, 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.

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

	IDA50%			
	<i>ct</i> -DNA	poli(dAdT) ₂	poli(dGdC) ₂	poli rA–poli rU
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

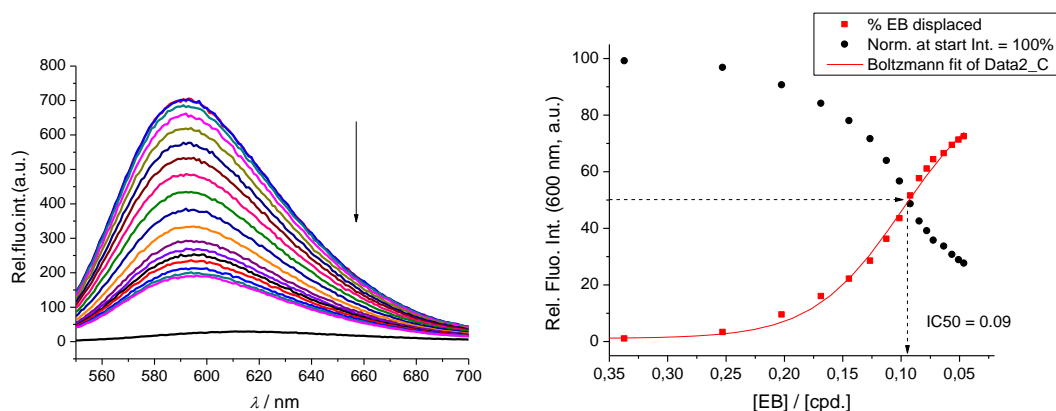
^aIDA50% vrijednosti izračunate su iz omjera $[\text{EtBr}]/[\text{kaliksaren}] = (\text{Int}(\text{EtBr-DNA kompleks}) - \text{Int}(\text{EtBr}))/2$.

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

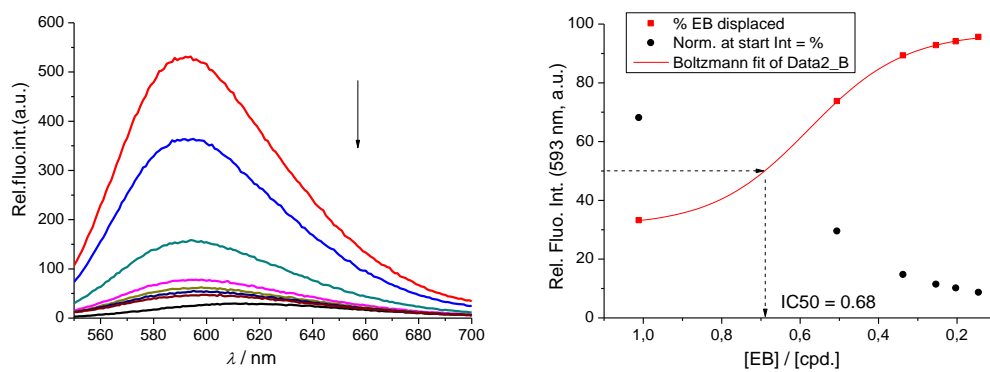
Dobiveni rezultati istiskivanja etidijevog bromida prikazani su u tablici 14, iz kojih je razvidan utjecaj elektrostatskih interakcija na vezanja za polinukleotid. Spoj **C4** koji posjeduje tri pozitivna naboja istisnuo je etidijev bromid 3–6 puta uspješnije nego spoj **C2** koji sadrži dva pozitivna 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 istiskuje 50 % etidijevog bromida iz polinukleotida, pri manjim koncentracijama spoja (slike 56 i 57). S obzirom da je etidijev

4. REZULTATI I RASPRAVA

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.



Slika 56. 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 **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 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 **C4**.

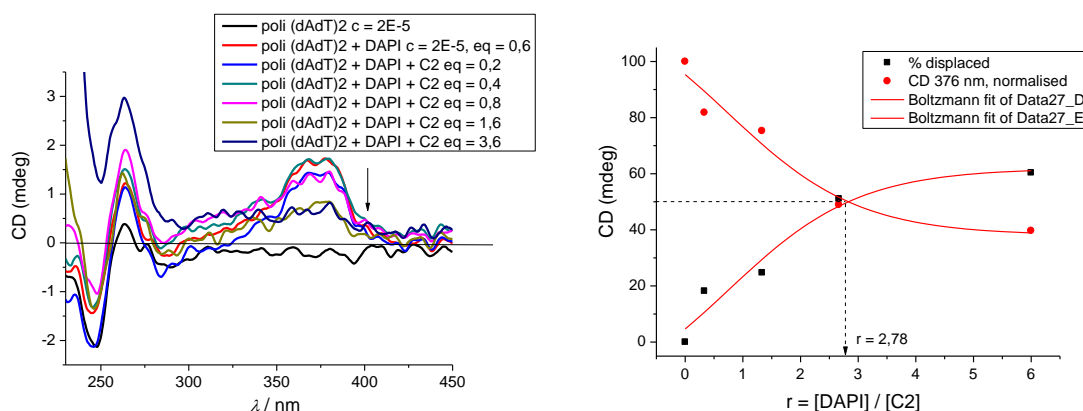
4.3.2.3. Cirkularni dikroizam

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

4. REZULTATI I RASPRAVA

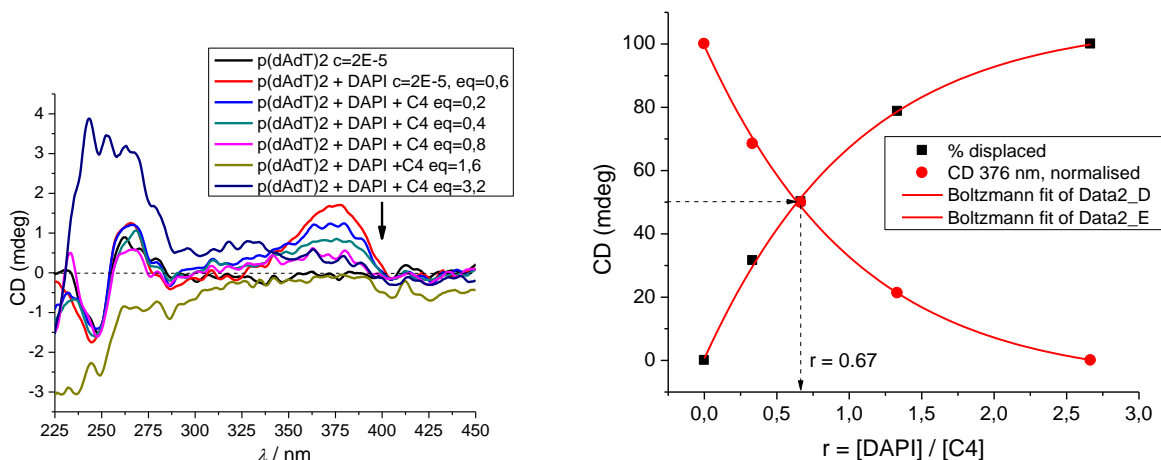
provedeno je uz pomoć cirkularnog dikroizma kao metode neovisne o fluorescenciji i zbog preklapanja valnih duljina pobude kaliksarena i DAPI-ja. Praćene su interakcije dvolančanih polinukleotida *ct*-DNA, poli(dAdT)₂ i poli rA–poli rU sa spojevima **C2** i **C4** (slika D.8.33.). Metoda je provedena 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 što je razvidno iz smanjivanja ICD signala (slike 58 i 59). IDA50% vrijednost poprilično se razlikuje, tako manji spoj **C2** čija je IDA50% vrijednost 2,8, uspješnije istiskuje 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 analoga kaliksarena **C2** pri istiskivanju DAPI-ja ($c = 2 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3}) nakon vezanja s polinukleotidom poli dAdT–poli dAdT ($c = 2 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3}) u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0; $I = 0,05$ mol dm^{-3}); Desno: Ovisnost ICD signala pri valnoj duljini 376 nm o omjeru koncentracija DAPI-ja i spoja **C2**.

4. REZULTATI I RASPRAVA



Slika 59. Lijevo: CD spektri analoga kaliksarena **C4** pri istiskivanju DAPI-ja ($c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) 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

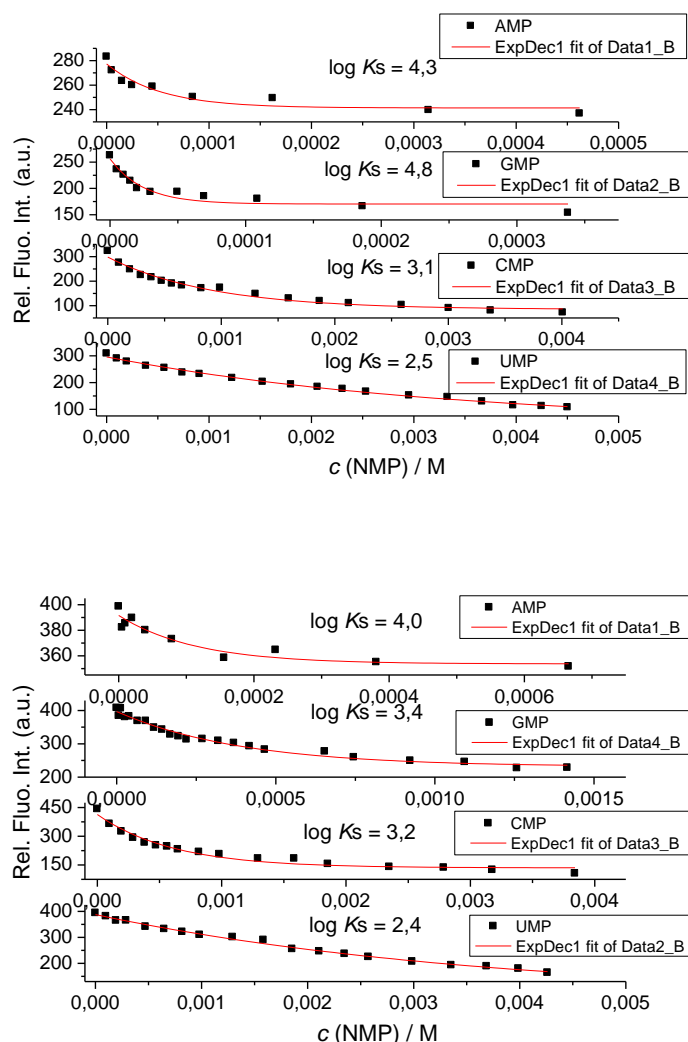
4.3.3.1. Interakcije kaliksarena s nukleozid-monofosfatima

Za ispitivanje dodatnih interakcija 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 fluorimetrijskim titracijama, na način opisan u poglavlju 3.4.4. Rezultati fluorimetrijskih titracija dobiveni su pomoću nelinearne regresije primjenom eksponencijalne jednadžbe prvog reda za stehiometriju 1:1. Korištenjem SpecFit programa^{96,97} za multivarijantnu analizu za druge stehiometrije (2:1 ili 1:2) nije dalo bolje slaganje ili logičniju raspodjelu. Dobivene konstante vezanja ($\log K_s$) prikazane su 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 gašenje fluorescencije. Zbog slabe emisije kaliksarena, podatci titracija pokazuju varijacije i

4. REZULTATI I RASPRAVA

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.



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.

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 značajne. Nadalje, samo neutralni kaliksareni **C1** i **C3** pokazali su

4. REZULTATI I RASPRAVA

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 ispitanih spojeva ne dopušta duboko umetanje nukleobaza u samu šupljinu, ali fleksibilnost i razmak aromatskih podjedinica na oba kraja kaliksarena dopušta interakcije s aromatskim ligandom, kao što su nukleobaze. Kaliksaren tvori kompleks koji podsjeća na pincetu unutar kojeg su nukleobaze.

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 ± 0,1 ($\Delta Int = 0,8$)	4,8 ± 0,2 ($\Delta Int = 0,6$)	2,5 ± 0,3 ($\Delta Int = 0,3$)	3,1 ± 0,3 ($\Delta Int = 0,4$)
C2	^d 4,0 ($\Delta Int = 0,9$)	3,4 ± 0,3 ($\Delta Int = 0,6$)	2,4 ± 0,3 ($\Delta Int = 0,4$)	3,2 ± 0,2 ($\Delta Int = 0,2$)
C3	5,0 ± 0,1 ($\Delta Int = 0,8$)	4,7 ± 0,1 ($\Delta Int = 0,8$)	4,1 ± 0,2 ($\Delta Int = 0,6$)	^c NP
C4	4,7 ± 0,1 ($\Delta Int = 0,6$)	5,0 ± 0,1 ($\Delta Int = 0,5$)	5,0 ± 0,1 ($\Delta Int = 0,6$)	4,7 ± 0,2 ($\Delta Int = 0,6$)

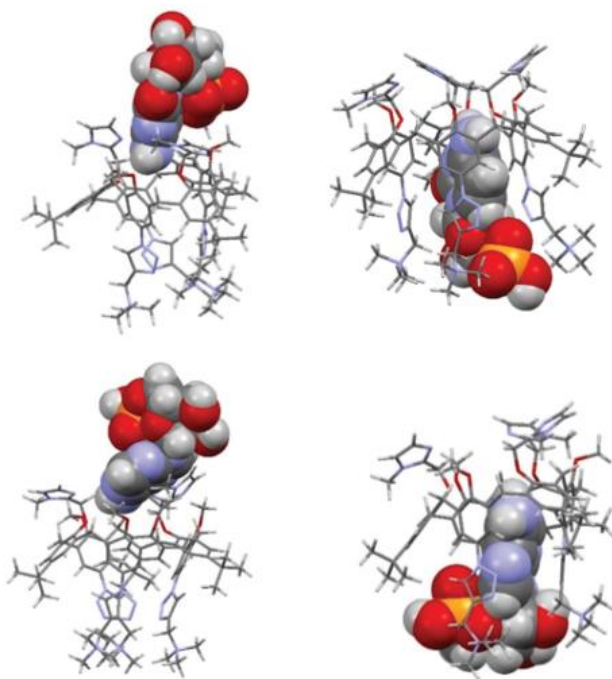
^a Dobiveni obradom podataka titracija uz korištenje nelinearne regresije primjenom eksponencijalne jednadžbe prvog reda (Origin 7,0) prema modelu spoj/NMP = 1:1 stehiometriji kompleksa; korelacijski koeficijent $R > 0,99$. ^b $\Delta Int = Int(100\% \text{ kompleks})/Int0$. ^c NP = premale promjene intenziteta emisije za pouzdanu obradu podataka. ^d Zbog male promjene intenziteta emisije moguća je samo procjena log K_s .

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 između imidazolnih podjedinica, dok kod kationskih analoga **C2** i **C4** postoji dodatna opcija vezanja između triazolnih 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.)

4. REZULTATI I RASPRAVA

pokazuje selektivnost, gdje je pri dodatku pirimidinskih baza (C i U) kationskim kaliksarenima **C2** i **C4** uočeno jače gašenje 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.

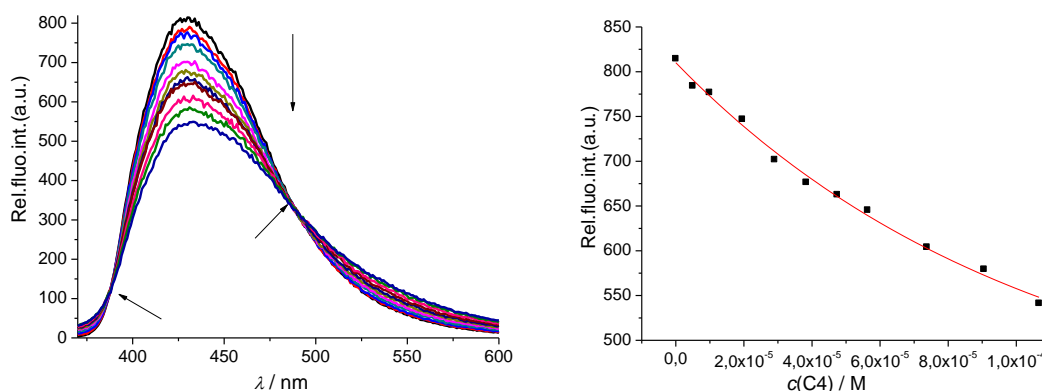
S obzirom na nisku topljivost analoga kaliksarena, koja je ometala NMR studije, korištene su i računalne metode koje je provela dr. sc. Ivana Nikšić-Franjić (Zavod za fizičku kemiju, IRB) kako bi se utvrdila mogućnost inkluzije pirimidinske i purinske baze, specifično CMP i AMP unutar šupljine pozitivno nabijenog **C4**. Pripremljena su dva kompleksa kaliksarena **C4** sa svakim mononukleotidom, gdje je jedan mononukleotid orijentiran između imidazolnih prstenova (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 **D8-111TFA** (slika 63)¹¹² pri dodatku kaliksarena **C4**. Ispitivani kaliksareni imaju različite spektralne karakteristike od fluorescentne nukleobaze **D8-111TFA** ($\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 400\text{--}500 \text{ nm}$). Interakcije su ispitane fluorimetrijskim titracijama opisanim u poglavlju 3.4.4., dodavanjem kaliksarena u otopinu **D8-111TFA**. Rezultati fluorimetrijskih titracija su obrađeni pomoću nelinearne regresije primjenom eksponencijalne jednadžbe prvog reda za određivanje vrijednosti konstante vezanja ($\log K_s$).

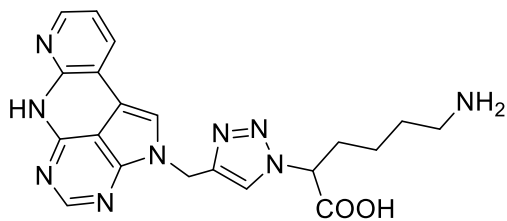


Slika 62. Lijevo: Emisijski spektri pri fluorimetrijskoj titraciji **D8-111TFA** ($c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$; $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$) sa spojem **C4** ($c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0; $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$). 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) fluorescentnoj nukleobazi rezultirali su snažnim promjenama emisije pri 400–500 nm, gdje dvije izoemisijske 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 $\log K_s = 4,0$ koja je usporediva s vrijednosti kompleksa **C4/AMP**

4. REZULTATI I RASPRAVA

(Tablica 14). Na taj način je potvrđena izračunata vrijednost konstanti stabilnosti ($\log K_s$) za nukleotide (tablica 15).



Slika 63. Fluorescentna nukleobaza **D8-111TFA**.¹¹²

5. ZAKLJUČAK

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

Pirenski analozi **6** i **7** pokazali su batokromni pomak apsorbancije (~ 400 nm) s obzirom na referentne pirenske spojeve 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 peptida WHW 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. Kompleksi peptid/ Cu^{2+} pokazali su drugačiji afinitet prema ds-DNA i ds-RNA, pogotovo kod stabilizacije ds-DNA u eksperimentu temperature mekšanja, gdje su **7**/ Cu^{2+} i **10**/ Cu^{2+} uzrokovali stabilizacije ds-DNA, a **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 uz primjenu dvofotonske apsorpcije.

U radu su uspješno ispitani tetrakationski bis-triarilborani **B1–B4**, novi DNA i RNA senzori. 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

5. ZAKLJUČAK

samo antracen kao poveznicu. UV/Vis i fluorescencijska ispitivanja 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 spojevima **B1–B3**, a slabiju stabilizaciju dvostrukih uzvojnica pokazao je kratki antracenski analog **B4** što ukazuje na važnost duljine i fleksibilnosti aromatske poveznice za uspješnu temperaturnu stabilizaciju uzvojnice. Proučavani analozi triarilborana 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, što upućuje na već poznatu činjenicu da se ss-RNA omotava oko spojeva kao nit oko vretena.^{17,64} Spoj **B4** pokazao je nešto slabiji afinitet vezanja za polinukleotide od ostalih ispitivanih spojeva **B1–B3**, što je u skladu s prethodno provedenim eksperimentom temperaturnog mekšanja i potvrđuje važnost duljine poveznice. Fluorimetrijskim titracijama s polinukleotidima, utvrđen je proces agregacije–deagregacije kod spojeva **B1** i **B3**, što 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. Stoga se može 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**. Rezultati dobiveni cirkularnim dikroizmom 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.

Neutralni i kationski analozi kaliksarena pokazali su slabu, ali primjenjivu fluorescenciju. Kako to svojstvo kaliksarenskog kostura do sad nije poznato, može se pretpostaviti da su za fluorescenciju odgovorni vjerojatno fenol-aminska i fenol-triazolna podjedinica kaliksarena, no za potvrdu je potrebno provesti opsežna dodatna istraživanja.

Ovisno o meti, kaliksareni su pokazali dva tipa interakcija. Pri fluorimetrijskim titracijama s mononukleotidima (NMP) nastaju kompleksi, u kojima se mononukleotid djelomično umetnuo sa svojom nukleobazom u šupljinu kaliksarena (oblik 'pincete'). Interakcije se temelje na aromatskom slaganju i hidrofobnim interakcijama, uz moguć doprinos elektrostatskih interakcija kod kationskih kaliksarena. Dobiveni selektivan odgovor prema pirimidinskim bazama (UMP,

5. ZAKLJUČAK

CMP) upućuje na važnost veličine budući da su umetnute nukleobaze manje od purinskih AMP i GMP, što utječe na umetanje u kaliksaren.

Fluorimetrijskim eksperimentima pokazano je da samo 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 CD spektrofotometrijom istiskivanjem 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 uzvojnica. Iz svega se može zaključiti da je način vezanja analoga kaliksarena umetanje u mali tor DNA ili veliki tor 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 spektroskopiji NMR

br-d – široki dublet u spektroskopiji NMR

C – citozin

CD – cirkularni dikroizam

CMP – citozin-monofosfat

ct-DNA – DNA iz timusa goveda (engl. *calf thymus* DNA)

d – dublet u spektroskopiji NMR

DAPI – 4',6'-diamidino-2-fenilindol

dd – dublet dubleta u NMR spektroskopiji

DMEDA – *N,N'*-dimetiletildiamin

DMF – *N,N*-dimetilformamid

DMSO – dimetilsulfoksid

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

ds – dvolančani polinukleotid

6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

dt – dublet tripleta u spektroskopiji NMR

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 – spektrometrija masa visoke rezolucije (engl. *high resolution mass spectrometry*)

ICD – inducirani cirkularni dikroizam

IDA50% – test istiskivanja indikatora (engl. *Indicator Displacement Assay*)

K_s – konstanta stabilnosti

m – multiplet u spektroskopiji NMR

MALDI-TOF/TOF – matricom potpomognuta ionizacija desorpcijom laserskog zračenja analizator masa s vremenom preleta (engl. *matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight*)

MS – spektrometrija masa

NATA – *N*-acetil-L-triptofanamid

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

PCC – Pearsonov koeficijent korelacije (engl. *Pearson correlation coefficient*)

poli(dAdT)₂ – alternirajući polinukleotid AT parova baza

poli(dGdC)₂ – alternirajući polinukleotid GC parova baza

6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

Ph – fenilna skupina

poli dA (dA) – jednolančana struktura adenina koja sadrži šećer deoksiribozu

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

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

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

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

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

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

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

pUC19 – vektor za kloniranje plazmida u *E. Coli*

Py – pirenski prsten

q – kvartet u spektroskopiji NMR

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

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

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

s – singlet u spektroskopiji NMR

SERS – površinski pojačana Ramanova spektroskopija (engl. *surface-enhanced Raman spectroscopy*)

t – triplet u spektroskopiji NMR

T – timin

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

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

6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

THF – tetrahidrofur

TICT – izvijeni intramolekulski prijenos naboja (engl. *twisted intramolecular charge transfer*)

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

T_m – temperatura mekšanja polinukleotida

Trp – triptofan

T_t – temperatura tališta

U – uracil

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

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

Q-TOF – kvadrupolno vrijeme preleta (engl. *Quadrupole Time-of-Flight*)

δ – oznaka za kemijski pomak u spektroskopiji NMR

7. LITERATURNI IZVORI

- ¹ A. W. Czarnik, *Acc. Chem. Res.* **27** (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) 7105–7123.
- 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.* **97** (1997) 1515–1566.
- ⁴ Y. Fang, W. Dehaen, *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, str. 132–203.
- ⁹ A. A. Almaqwashi, T. Paramanathan, I. Rouzina, M. C. Williams, *Nucleic Acids Res.* **44** (2016) 3971–3988.
- ¹⁰ C. Ma, F. Hong, S. Yang, *Molecules* **27** (2022) 1210.
- ¹¹ A. Abelein, S. Ciofi-Baffoni, C. Mörman, R. Kumar, A. Giachetti, M. Piccioli, H. Biverstål, *J. Am. Chem. Soc. Au.* **11** (2022) 2571–2584.
- ¹² M. Egli, W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer-Verlag, New York, 1983.
- ¹³ J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer: Boston, MA, USA, 2006.
- ¹⁴ E. Kostenko, M. Dobrikov, D. Pyshnyi, V. Petyuk, N. Komarova, V. Vlassov, M. Zenkova, *Nucleic Acids Res.* **29** (2001) 3611–3620.
- ¹⁵ M. E. Østergaard, P. J. Hrdlicka, *Chem. Soc. Rev.* **40** (2011) 5771–5788.
- ¹⁶ S. Mukherjee, J. Das Sarma, R. Shunmugam, *Acs Omega* **1** (2016) 755–764.
- ¹⁷ Ž. Ban, S. Griesbeck, S. Tomić, J. Nitsch, T. B. Marder, I. Piantanida, *Chem. Eur. J.* **26** (2020) 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, *Molecules* **26** (2021) 430.
- ²⁰ R. Das, B. Gayakvad, S. D. Shinde, J. Rani, A Jain, B. Sahu, *ACS Applied Bio Materials* **3** (2020) 5474–5499.
- ²¹ S. Chandrudu, P. Simerska, I. Toth, *Molecules* **18** (2013) 4373–4388.
- ²² N. Ming, *Revista Bionatura* **4** (2019), 763–764.
- ²³ M. Stawikowski, G. B. Fields, *Curr. Protoc. Protein Sci.* **18** (2012) 1–13.
- ²⁴ M. Verlander, *Int. J. Pept. Res. Ther.* **13** (2007) 75.
- ²⁵ A. El-Faham, F. Albericio, *Chem. Rev.* **111** (2011) 6557–6602.
- ²⁶ E. Valeur, M. Bradley, *Chem. Soc. Rev.* **38** (2009) 606–631.
- ²⁷ S. -Y. Han, Y.-A. Kim, *Tetrahedron*, **60** (2004) 2447–2467.
- ²⁸ T. I. Al-Warhi, H. M. A. Al-Hazimi, A. El-Faham, *J. Saudi Chem. Soc.* **16** (2012) 97–116.
- ²⁹ A. Isidro-Llobet, M. Alvarez, F. Albericio, *Chem. Rev.* **109** (2009) 2455–2504.
- ³⁰ S. Manoharan, G. J. Guillemain, R. S. Abiramasundari, M. M. Essa, M. Akbar, M. D. Akbar, *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016** (2016) 8590578.
- ³¹ S. Bhatt, L. Puli, C. R. Patil, *Drug Discov. Today* **3** (2021) 794–803.
- ³² R. Rajmohan, P. Hemachandra Reddy, *J. Alzheimers Dis.* **57** (2017) 975–999.
- ³³ C. Sharma, S. R. Kim, *Antioxidants*, **10** (2021) 1231.
- ³⁴ W. Huang, X. Zhang, W. Chen, *Biomed. Rep.* **4** (2016) 519–522.
- ³⁵ C. Cheignon, M. Tomas, D. Bonnefont-Rousselot, P. Faller, C. Hureau, F. Collin, *Redox Biol.* **14** (2018) 450–464.

7. LITERATURNI IZVORI

- ³⁶ L. Rajendran, M. Honsho, T. R. Zahn, P. Keller, K. D. Geiger, P. Verkade, K. Simons, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **103** (2006) 11172–11177.
- ³⁷ N. E. Wezynfeld, A. Tobolska, M. Mital, U. E. Wawrzyniak, M. Z. Wiloch, D. Plonka, K. Bossak-Ahmad, W. Wroblewski, W. Bal, *Inorg. Chem.* **59** (2020) 14000–14011.
- ³⁸ K. Bossak, M. Mital, J. Poznański, A. Bonna, S. Drew, W. Bal, *Inorg. Chem.* **55** (2016) 7829–7831.
- ³⁹ I. Ufnalska, U. E. Wawrzyniak, K. Bossak-Ahmad, W. Bal, W. Wroblewski, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **862** (2020) 114003.
- ⁴⁰ P. Gonzalez, K. Bossak, E. Stefaniak, C. Hureau, L. Raibaut, W. Bal, P. Faller, *Chem. Eur. J.* **24** (2018) 8029–8041.
- ⁴¹ M. M. Harding, M. W. Nowicki, M. D. Walkinshaw, *Crystallogr. Rev.* **16** (2010) 247–302.
- ⁴² J. Zou, N. Sugimoto, *BioMetals* **13** (2000) 349–359.
- ⁴³ S. Katoh, *Photosynth. Res.* **76** (2003) 255–261.
- ⁴⁴ N. G. Robinett, R. L. Peterson, V. C. Culotta, *J. Biol. Chem.* **293** (2017) 4636–4643.
- ⁴⁵ D. Horn, A. Barrientos, *IUBMB Life* **60** (2008) 421–429.
- ⁴⁶ E. I. Solomon, D. E. Heppner, E. M. Johnston, J. W. Ginsbach, J. Cirera, M. Qayyum, L. Tian, *Chem. Rev.* **114** (2014) 3659–3853.
- ⁴⁷ I. Piantanida, *Kem. Ind.* **52** (2003) 545–552.
- ⁴⁸ A. Lauria, A. Montalbano, P. Barraja, G. Dattolo, A. M. Almerico, *Curr. Med. Chem.* **14** (2007) 2136–2160.
- ⁴⁹ J. Lipfert, S. Doniach, R. Das, D. Herschlag, *Annu. Rev. Biochem.* **83** (2014) 813–841.
- ⁵⁰ S. K. Pal, A. H. Zewail, *Chem. Rev.* **104** (2004) 2099–2124.
- ⁵¹ W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer-Verlag **1983**, New York
- ⁵² C. R. Cantor, P. R. Schimmel, *Biophysical Chemistry*. WH Freeman and Co. **1980**, San Francisco str. 1109-1181.
- ⁵³ A. Erben, I. Sviben, B. Mihaljević, I. Piantanida, N. Basarić, *Molecules* **26** (2021) 4315.

7. LITERATURNI IZVORI

- ⁵⁴ A. V. Strizhak, V. Y. Postupalenko, V. V. Shvadchak, N. Morellet, E. Guittet, V. G. Pivovarenko, A. S. Klymchenko, Y. Mely, *Bioconjugate Chem.* **23** (2012) 2434–2443.
- ⁵⁵ C. M. Baker, G. H. Grant, *Biopolymers* **85** (2007) 456–470.
- ⁵⁶ K. P. Mahon Jr., M. D. Roy, J. R. Carreon, E. G. Prestwich, J. L. Rouge, S. Shin, S. O. Kelley, *ChemBioChem* **7** (2006) 766–773.
- ⁵⁷ X. Zhang, Y. Yang, M. Zhao, L. Liu, M. Zheng, Y. Wang, J. Wu, S. Peng, *Eur. J. Med. Chem.* **46** (2011) 3410–3419.
- ⁵⁸ K. Parab, K. Venkatasubbaiah, F. Jakle, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) 12879–12885.
- ⁵⁹ Z. M. Hudson, S. Wang, *Dalton Trans.* **40** (2011) 7805–7816.
- ⁶⁰ 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.
- ⁶¹ J. Jia, P. Xue, Y. Zhang, Q. Xu, G. Zhang, T. Huang, H. Zhang, R. Lu, *Tetrahedron* **70** (2014) 5499–5504.
- ⁶² C. D. Entwistle, T. B. Marder, *Chem. Mater.* **16** (2004) 4574–4585.
- ⁶³ C.-W. Chiu, Y. Kim, F. P. Gabbaï, *J. Am. Chem. Soc.* **131** (2009) 60–61.
- ⁶⁴ 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.* **26** (2020) 6017–6028.
- ⁶⁵ Ž. Ban, Z. Karačić, S. Tomić, H. Amini, T. B. Marder, I. Piantanida, *Molecules* **26** (2021) 4816.
- ⁶⁶ C. Prajapati, S. S. Chauhan, *FEBS Journal* **278** (2011) 3256–3276.
- ⁶⁷ H. -J. Li, S. K. Mellerup, X. Wang, S. Wang, *Org. Lett.* **21**(8) (2019) 2838–2842.
- ⁶⁸ X. Ma, Y. Zhao, *Chem. Rev.* **115** (2015) 7794–7839.
- ⁶⁹ F. Huang, E. V. Anslyn, *Chem. Rev.* **115** (2015) 6999–7000.
- ⁷⁰ G. Yu, X. Chen, *Theranostics* **9** (2019) 3041–3074.
- ⁷¹ L. Baldini, A. Casnati, F. Sansone, *Eur. J. Org. Chem.* **32** (2020) 5056–5069.

7. LITERATURNI IZVORI

- ⁷² C. D. Gutsche, B. Dhawan, K. H. No, R. Muthukrishnan, *J. Am. Chem. Soc.* **103** (1981) 3782–3792.
- ⁷³ V. I. Kalchenko, *Theor. Exp. Chem.* **54** (2018) 74–84.
- ⁷⁴ R. Perrin, R. Lamartine, M. Perrin, *Pure & App. Chem.* **65** (1993) 1549-1559.
- ⁷⁵ C. D. Gutsche, *Calixarenes: An introduction*, Royal Society of Chemistry, 2.izdanje, 2008.
- ⁷⁶ M. S. Peters, M. Li, T. Schrader, *Nat. Prod. Commun.* **7** (2012) 409–417.
- ⁷⁷ J. W. Cornforth, P. D’Arcy Hart, G.A. Nicholls, R. J. W. Rees, J. A. Stock, *Br. J. Pharmacol.* **10** (1955) 73.
- ⁷⁸ M. M. Naseer, M. Ahmed, S. Hameed, *Chem. Biol. Drug Des.* **89** (2017) 243–256.
- ⁷⁹ G. D. Andreetti, R. Ungaro, A. Pochini, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **22** (1979) 1005–1007.
- ⁸⁰ Y. K. Agrawal, H. Bhatt, *Bioinorg. Chem. Appl.* **2** (2004) 237–274.
- ⁸¹ M. Tlustý, V. Eigner, H. Dvoráková, P. Lhoták, *Molecules* **27** (2022) 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.* **44** (2015) 467–489.
- ⁸⁴ S. Collin, O. Parrot, L. Marcelis, E. Brunetti, I. Jabin, G. Bruylants, K. Bartik and O. Reinaud, *Chem. Eur. J.* **24** (2018) 17964–17974.
- ⁸⁵ Y. Rondalez, G. Bertho, O. Reinaud, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **41**(6) (2002) 1044–1046.
- ⁸⁶ O. Bistri, B. Colasson and O. Reinaud, *Chem. Sci.* **3** (2012) 811–818.
- ⁸⁷ V. Bagnacani, V. Franceschi, M. Bassi, M. Lomazzi, G. Donofrio, F. Sansone, A. Casnati, R. Ungaro, *Nat. Commun.* **4** (2013) 1721.
- ⁸⁸ M. Lomazzi, V. Franceschi, V. Bagnacani, C. A. Vezzoni, G. Donofrio, A. Casnati, F. Sansone, *Eur. J. Org. Chem.* **29** (2021) 1–13.
- ⁸⁹ Z. X. Chong, S. K. Yeap, W. Y. Ho, *PeerJ.* **9** (2021) 11165.

7. LITERATURNI IZVORI

- ⁹⁰ M. Dudic, A. Colombo, F. Sansone, A. Casnati, G. Donofrio, R. Ungaro, *Tetrahedron* **60** (2004) 11613–11618.
- ⁹¹ Y. Shi, H.-J. Schneider, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **2** (1999) 1797–1803.
- ⁹² N. J. Stanley, D. Sejer Pedersen, B. Nielsen, T. Kvist, J. M. Mathiesen, H. Bräuner-Osborne, D. K. Taylor, A. D. Abell, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20** (2010) 7512–7515.
- ⁹³ J. Li, Y. Sha, *Molecules* **13** (2008) 1111–1119.
- ⁹⁴ O. Keller, W. E. Keller, G. van Look, G. Wersin, *Org. Synth.* **63** (1985) 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.* **25** (2019) 7679–7688.
- ⁹⁶ H. Gamp, M. Maeder, C. J. Meyer and A. D. Zuberbuehler, *Talanta*, **32** (1985) 257–264.
- ⁹⁷ M. Maeder and A. D. Zuberbuehler, *Anal. Chem.* **62** (1990) 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.* **3** (2005) 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* **13** (2003) 515–537.
- ¹⁰³ J. D. Crowley, D. A. McMorran, *Top. Heterocycl. Chem.* **28** (2012) 31.
- ¹⁰⁴ S. Bedeche, J. -C. Daran, J. Ruiz, D. Astruc, *Inorg. Chem.* **47** (2008) 4903–4908.
- ¹⁰⁵ I. E. Valverde, T. L. Mindt, *CHIMIA* **67** (2013) 262–266.
- ¹⁰⁶ F. Hamdan, F. Tahoori, S. Balalaie, *RSC Adv.* **8** (2018) 33893–33926.
- ¹⁰⁷ L. –M. Rečnik, W. Kandioller, T. L. Mindt, *Molecules* **25** (2020) 3576.
- ¹⁰⁸ S. G. Agalave, S. R. Maujan, V. S. Pore, *Chem. Asian J.* **6** (2011) 2696–2718.
- ¹⁰⁹ R. Kharb, P. C. Sharma, M. S. Yar, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **26** (2010) 1–21.
- ¹¹⁰ M. Kosčak, I. Krošl, B. Žinić, I. Piantanida, *Chemosensors* **10** (2022) 34.

- ¹¹¹ Ž. Ban, B. Žinić, M. Matković, A. Tomašić Paić, I. Crnolatac, I. Piantanida, *New J. Chem.* **43** (2019) 8204–8214.
- ¹¹² Ž. Ban, J. Matić, B. Žinić, A. Foller Füchtbauer, L. M. Wilhelmsson, I. Piantanida, *Molecules* **25** (2020) 2188.
- ¹¹³ I. V. Astakhova, V. A. Korshun, J. Wengel, *Chem. Eur. J.* **14** (2008) 11010–11026.
- ¹¹⁴ T. Kanamori, A. Matsuyama, H. Naito, Y. Tsuga, Y. Ozako, S. Ogura, S. Okazaki, H. Yuasa, *J. Org. Chem.* **83** (2018) 13765–13775.
- ¹¹⁵ Y. Yang, L. Wang, H. Cao, Q. Li, Y. Li, M. J. Han, H. Wang, J. B. Li, *Nano. Lett.* **19** (2019) 1821–1826.
- ¹¹⁶ A. Dobos, W. Steiger, D. Theiner, P. Gruber, M. Lunzer, J. Van Hoorick, S. Van Vlierberghe, A. Ovsianikov, *Analyst* **144** (2019) 3056–3063.
- ¹¹⁷ F. Bolze, S. Jenni, A. Sour, V. Heitz, *Chem. Commun.* **53** (2017) 12857–12877.
- ¹¹⁸ B. B. Sun, L. Wang, Q. Li, P. P. He, H. L. Liu, H. Wang, Y. Yang, J. B. Li, *Biomacromolecules* **18** (2017) 3506–3513.
- ¹¹⁹ A. S. Klymchenko, *J. Nanosci. Lett.*, **3** (2013) 21.
- ¹²⁰ U. Rosch, S. Yao, R. Wortmann, F. Wurthner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **45** (2006) 7026–7030.
- ¹²¹ S. Ma, S. Du, G. Pan, S. Dai, B. Xu, W. Tian, *Aggregate* **2** (2021) 96.
- ¹²² R. Nandy, M. Subramoni, B. Varghese, S. Sankararaman, *J. Org. Chem.* **72** (2007) 938–944.
- ¹²³ W. T. Yip, D. H. Levy, *J. Phys. Chem.* **100** (1996) 11539–11545.
- ¹²⁴ I. Orehovec, D. Glavac, I. Dokli, M. Gredicak, I. Piantanida, *Croat. Chem. Acta* **90** (2017) 603–611.
- ¹²⁵ G. K. Bains, S. H. Kim, E. J. Sorin, V. Narayanaswami, *Biochemistry* **51** (2012) 6207–6219.
- ¹²⁶ J. Extebarria, A. Vidal-Ferran, P. Ballestar, *Chem. Commun.* **45** (2008) 5939–5941.
- ¹²⁷ T. Šmidlehner, I. Piantanida, G. Pescitelli, *Beilstein J Org Chem.* **14** (2017) 84–105.
- ¹²⁸ M. Eriksson, B. Nordén, *Methods in Enzymology*, San Diego: Academic Press, 2001. str. 68–98.

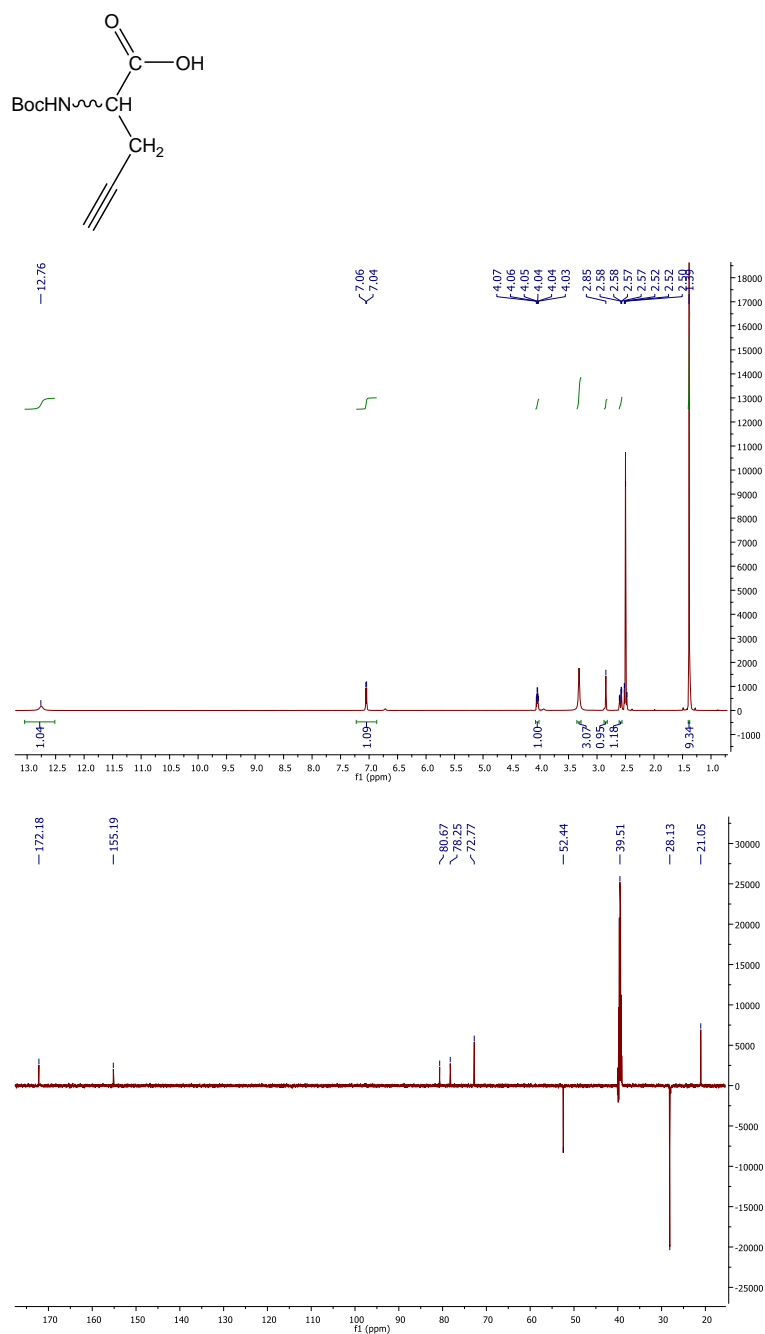
7. LITERATURNI IZVORI

- ¹²⁹ N. H. List, J. Knoops, J. Rubio-Magnieto, J. Ide, D. Beljonne, P. Norman, M. Surin, M. Linares, *J. Am. Chem. Soc.* **139** (2017) 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.* **50** (2021) 9–38.
- ¹³¹ M. Demeunynck, C. Bailly, W. D. Wilson, Wiley-VCH: Weinheim, Njemačka, 2004.
- ¹³² S. Ida, K. Iwamaru, M. Fujita, Y. Okamoto, Y. Kudo, H. Kurosaki, M. Otsuka, *Bioorg. Chem.* **62** (2015) 8–14.
- ¹³³ X. Y. Le, Q. Gu, Z. J. Song, C. X. Zhuang, X. L. Feng, *J. Coord. Chem.* **60** (2007) 1359–1371.
- ¹³⁴ K. Yang, G. Zhang, Q. Song, *Chem. Sci.* **9** (2018) 7666–7672.
- ¹³⁵ M. Lebtow, I. Helmers, V. Stepanenko, R. Q. Albuquerque, T. B. Marder, G. Fernandez, *Chem. Eur. J.* **23** (2017) 6198–6205.
- ¹³⁶ P. Krishnamoorthy, P. Sathyadevi, A. H. Cowley, R. R. Butorac, N. Dharmaraj, *Eur. J. Med. Chem.* **46**(8) (2011) 3376–3387.
- ¹³⁷ A. Maurin, S. Varatharajan, B. Colasson, O. Reinaud, *Org. Lett.* **16** (2014) 5426–5429.
- ¹³⁸ I. Piantanida, B. S. Palm, P. Cudic, M. Zinic, H. J. Schneider, *Tetrahedron* **60** (2004) 6225–6231.
- ¹³⁹ I. Piantanida, B. S. Palm, P. Cudic, M. Zinic, H. J. Schneider, *Tetrahedron Lett.* **42** (2001) 6779–6783.

8. PRILOZI

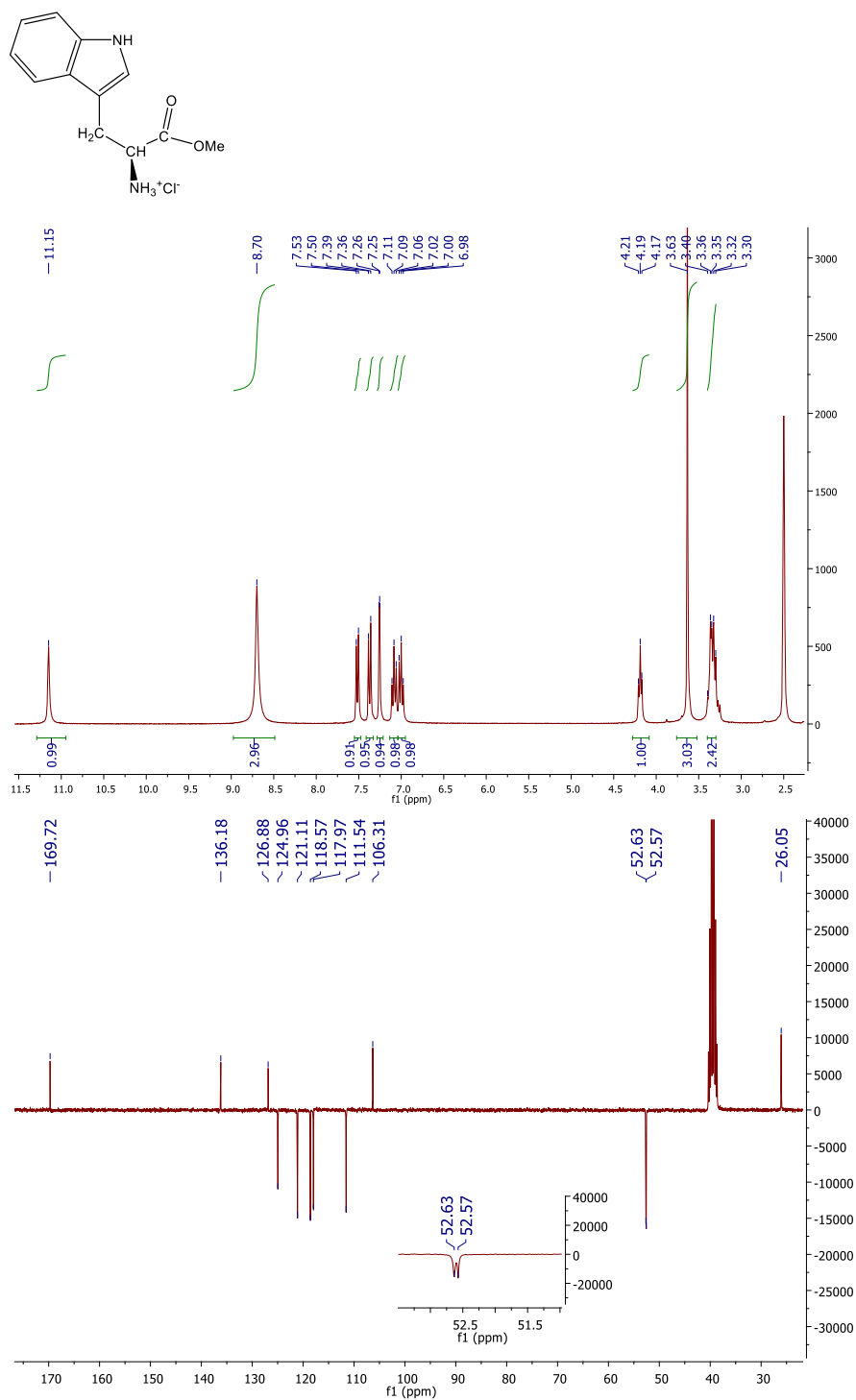
8.1. Dodatak derivatima peptida WHW

8.1.1. Dodatak poglavlju 3.1.



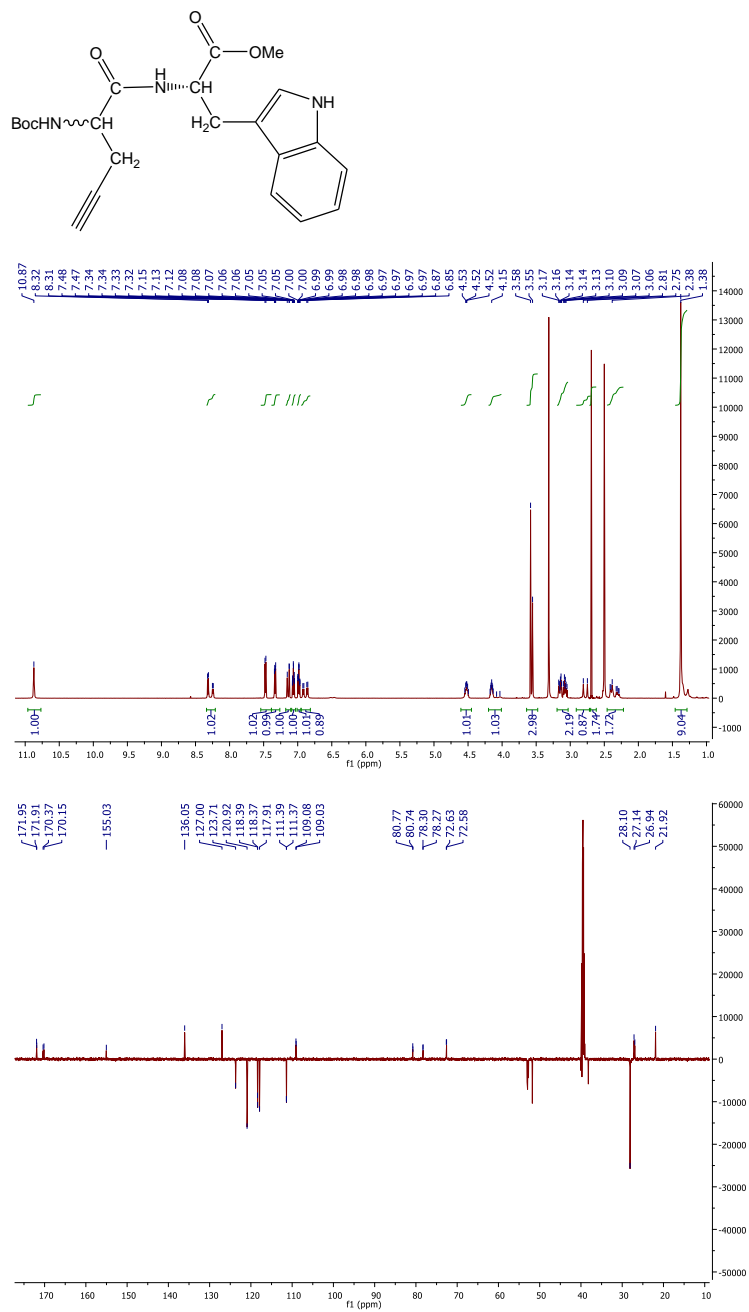
Slika D.8.1. Struktura spoja **1** i ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) i ¹³C NMR (151 MHz, APT, DMSO-*d*₆) spektri spoja **1**.

8. PRILOZI

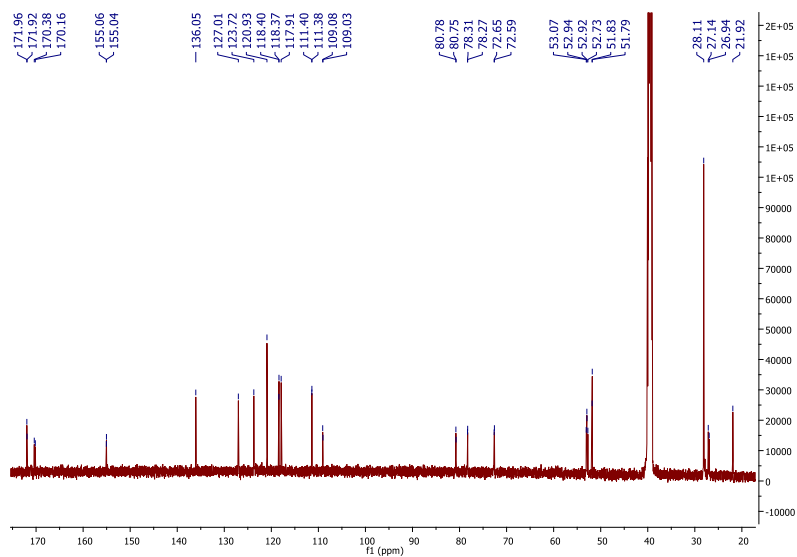


Slika D.8.2. Struktura spoja **2** i ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) i ^{13}C NMR (75 MHz, APT, DMSO- d_6) spektri spoja **2**.

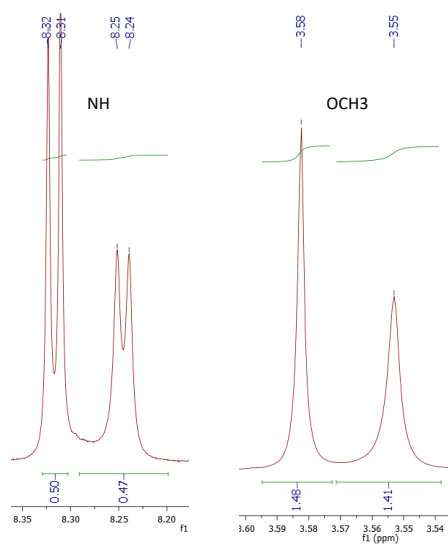
8. PRILOZI

Slika D.8.3a. Struktura spoja **3** i ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆), APT i spektri spoja **3**.

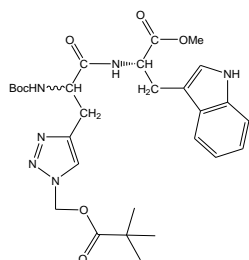
8. PRILOZI



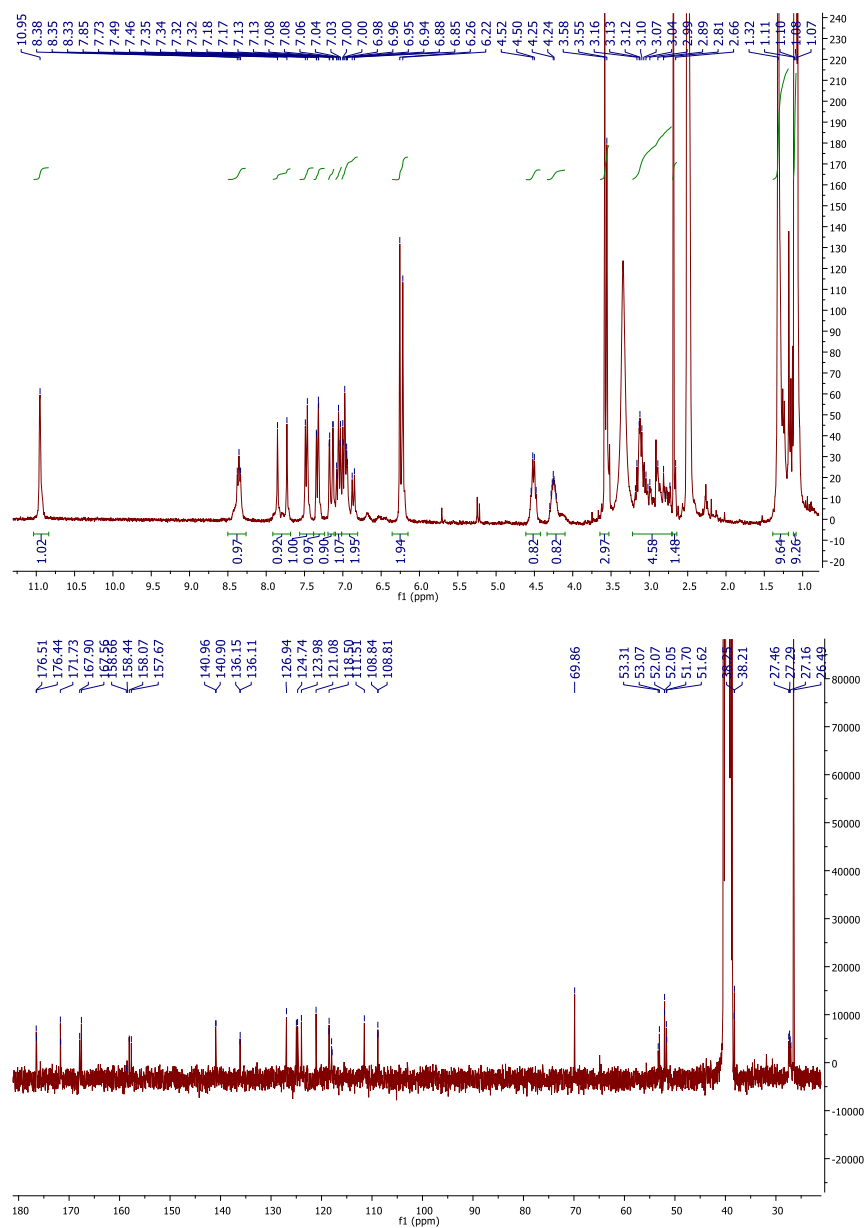
Slika D.8.3a1. ^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) spektar spoja **3**.



Slika D.8.3b. Dio ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) spektra spoja **3**; δ/ppm za $-\text{NH}$ i $-\text{OCH}_3$ protoni.

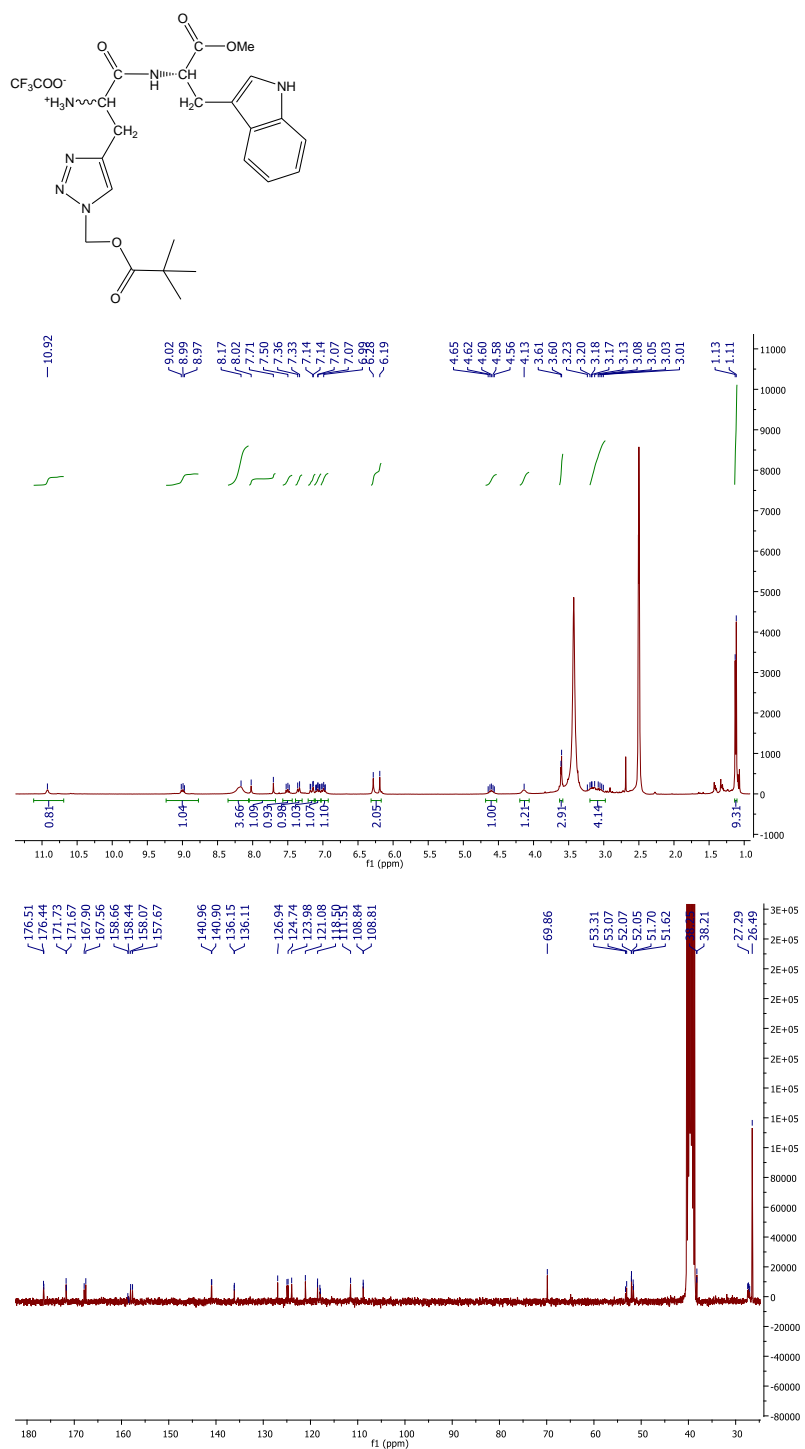


8. PRILOZI



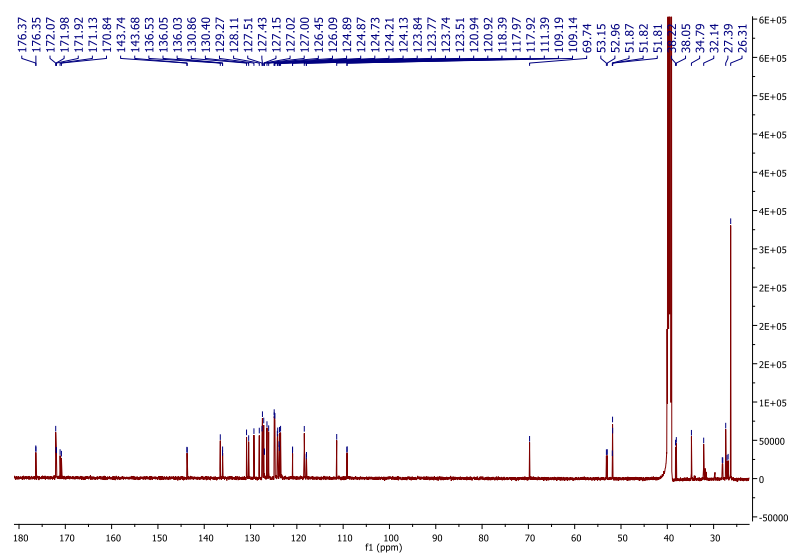
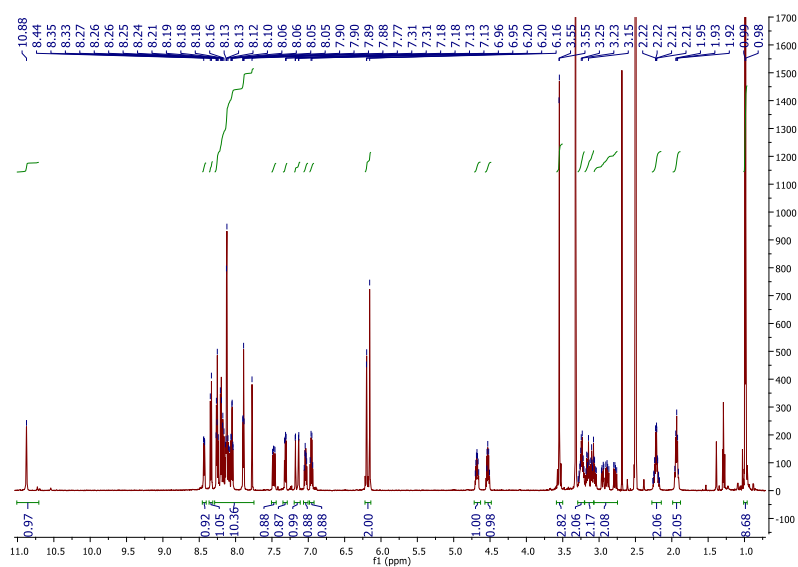
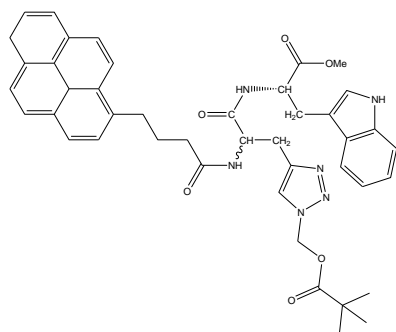
Slika D.8.4. Struktura spoja **4** i ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) i ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) spektri spoja **4**.

8. PRILOZI



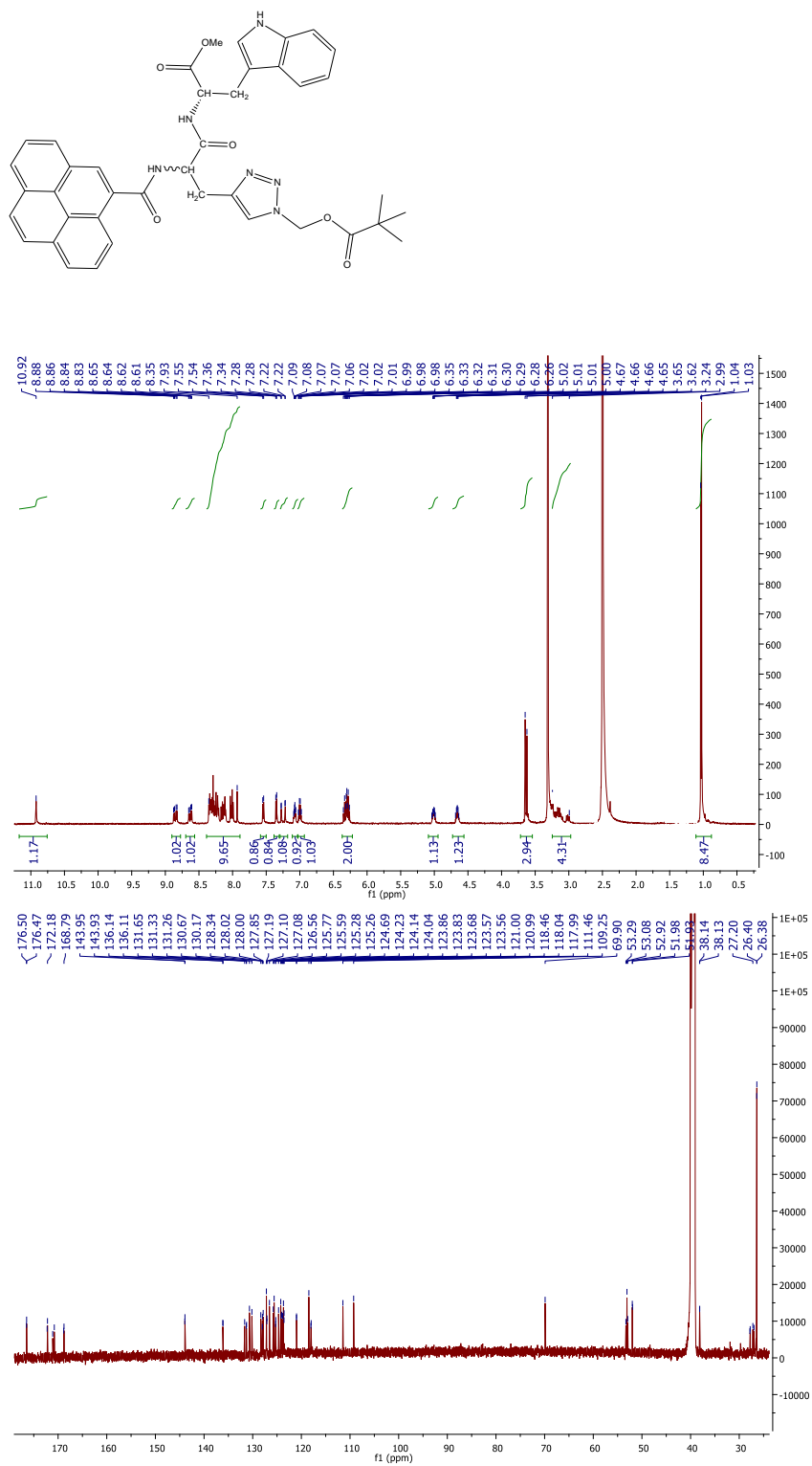
Slika D.8.5. Struktura spoja **5** i ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) i ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) spektri spoja **5**.

8. PRILOZI



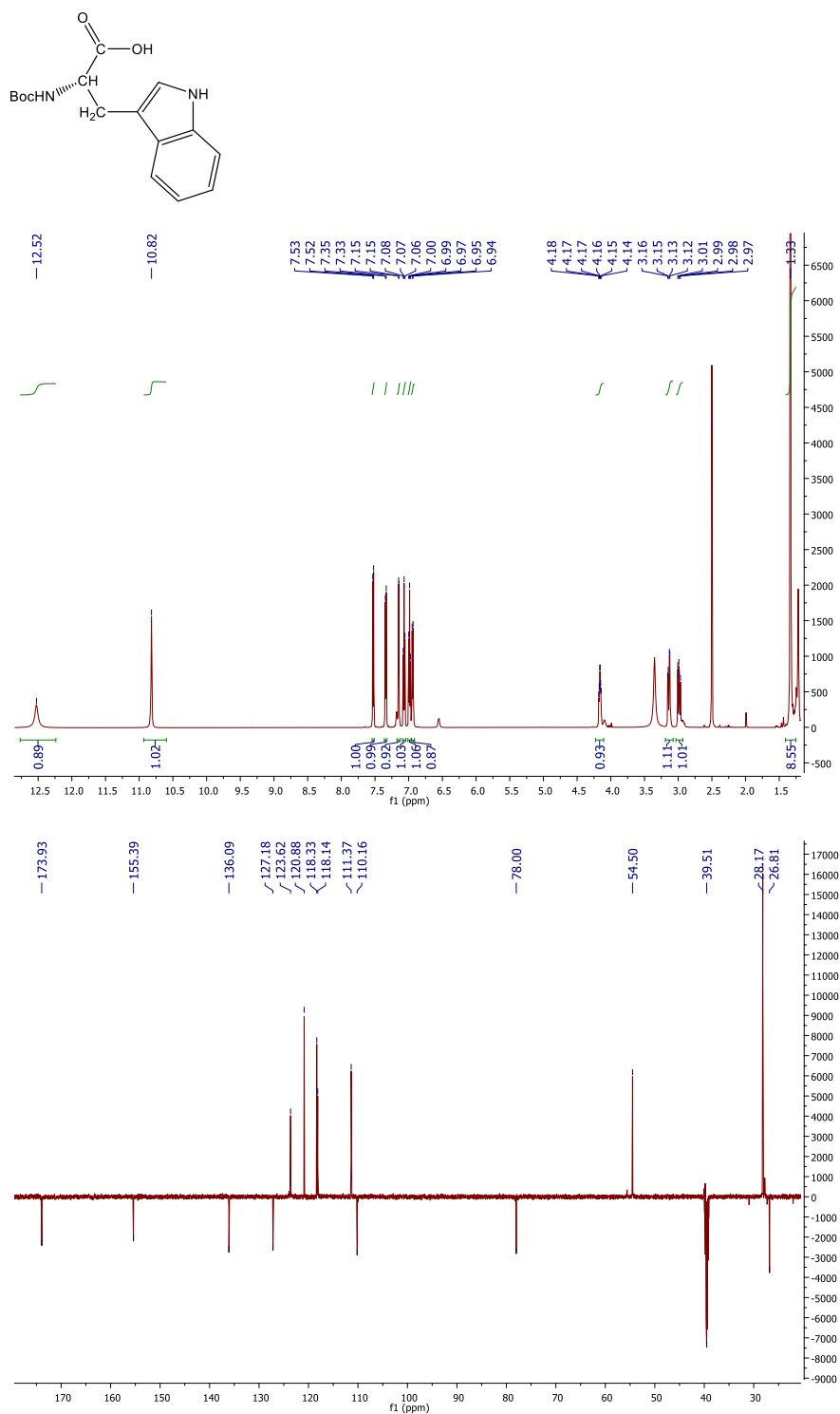
Slika D.8.6. Struktura spoja **6** i ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) i ^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) spektri spoja **6**.

8. PRILOZI



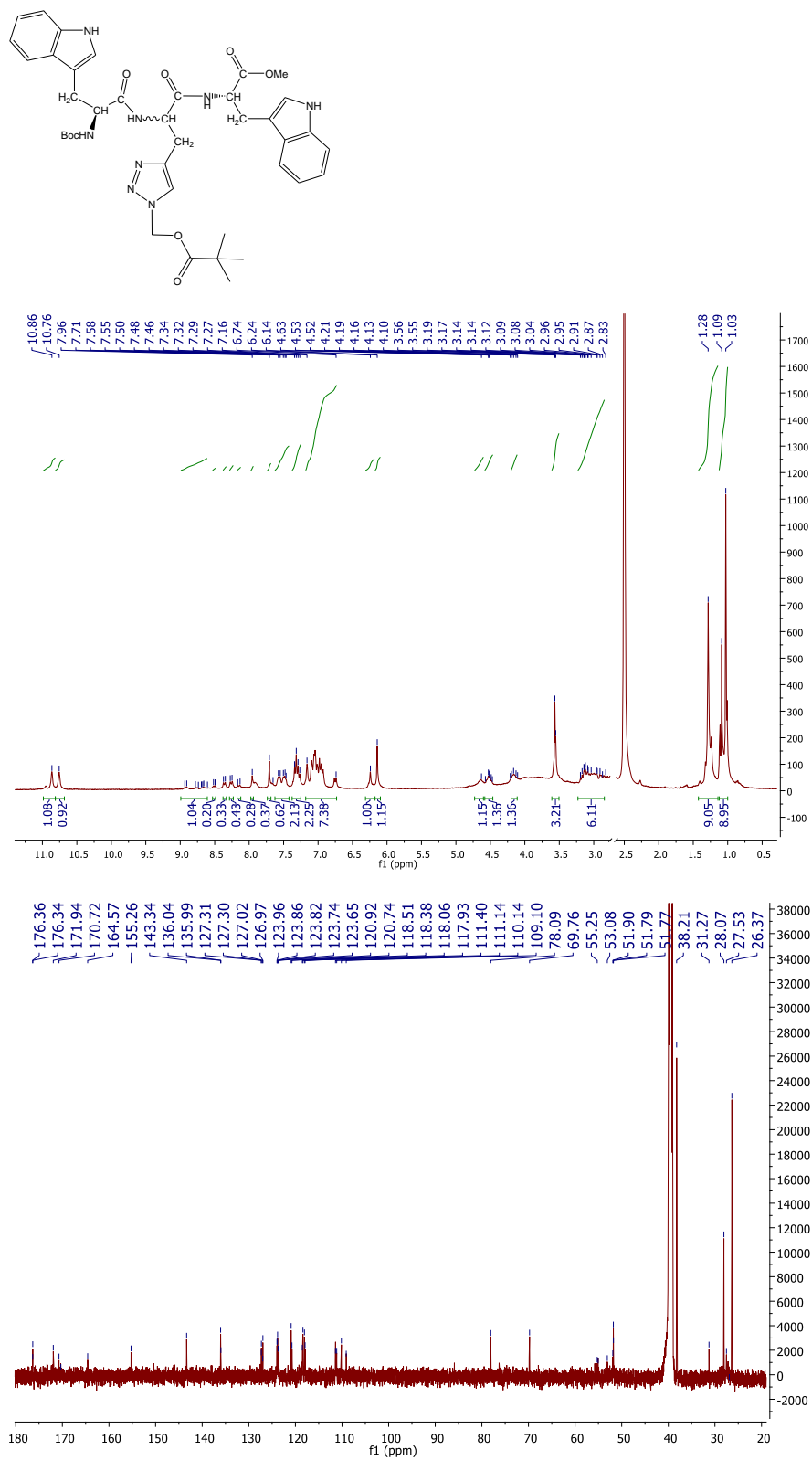
Slika D.8.7. Struktura spoja **7** i ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) i ^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) spektri spoja **7**.

8. PRILOZI



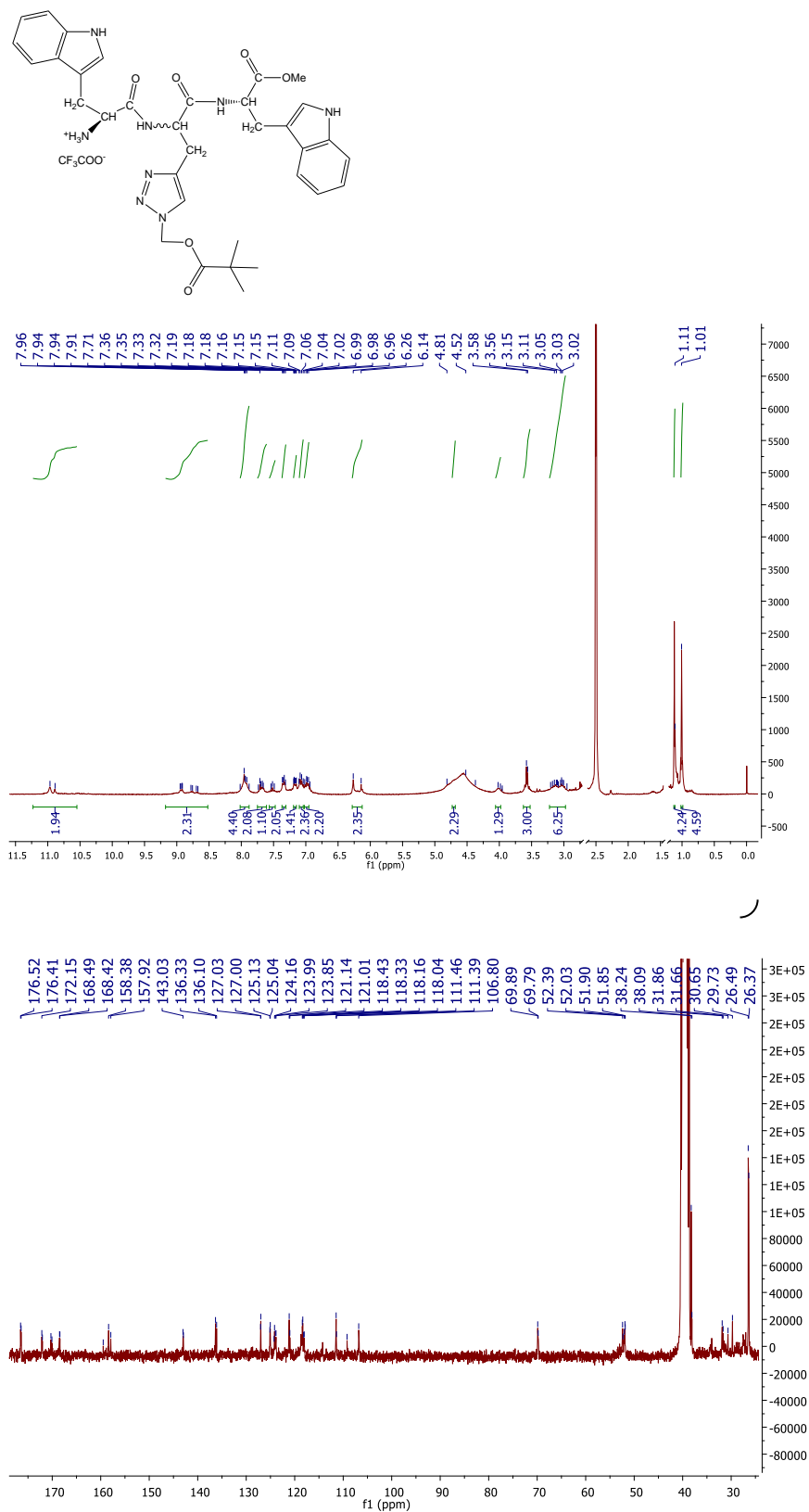
Slika D.8.8. Struktura spoja **8** i ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) i ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) spektri spoja **8**.

8. PRILOZI



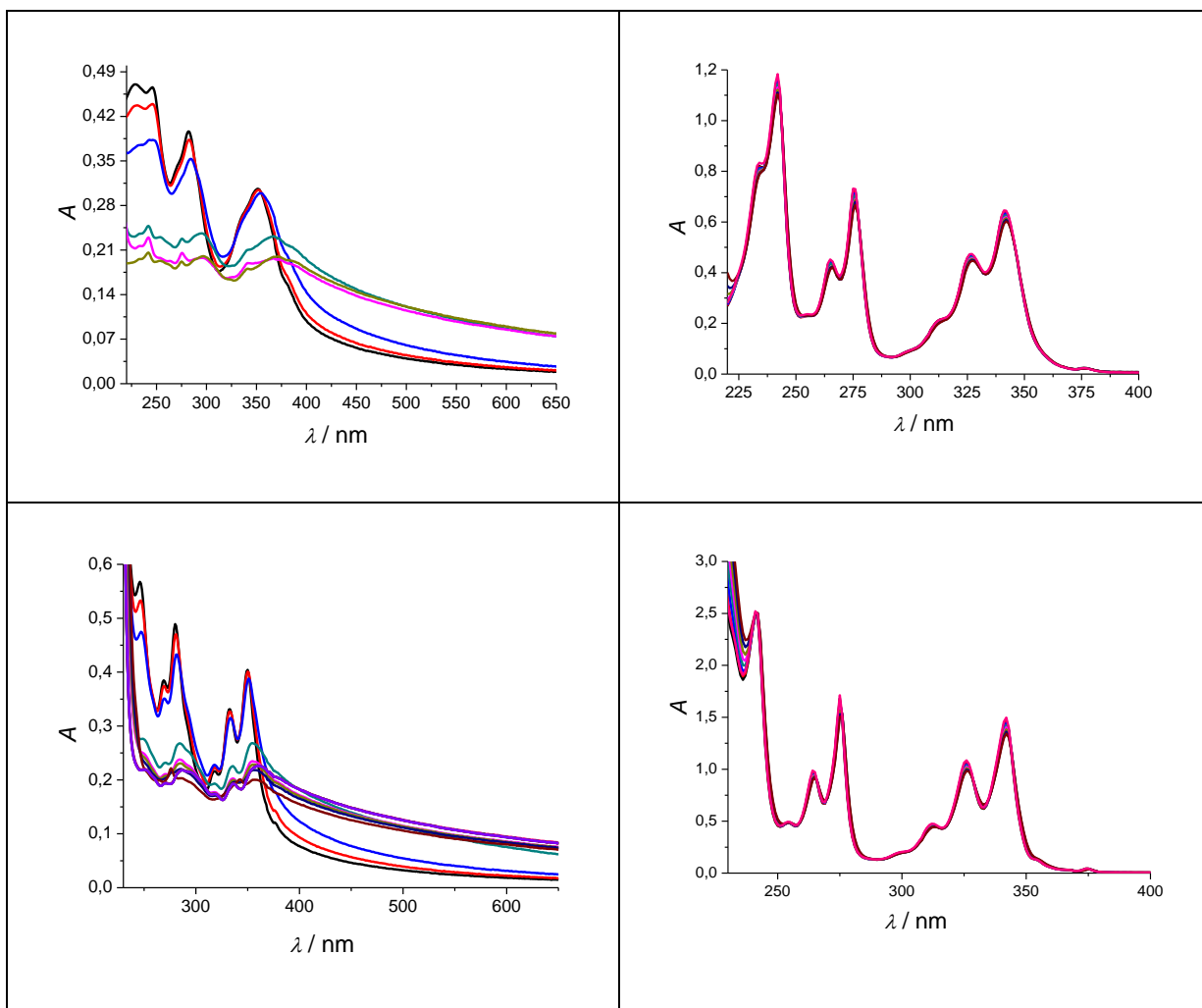
Slika D.8.9. Struktura spoja **9** i ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) i ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) spektri spoja **9**.

8. PRILOZI



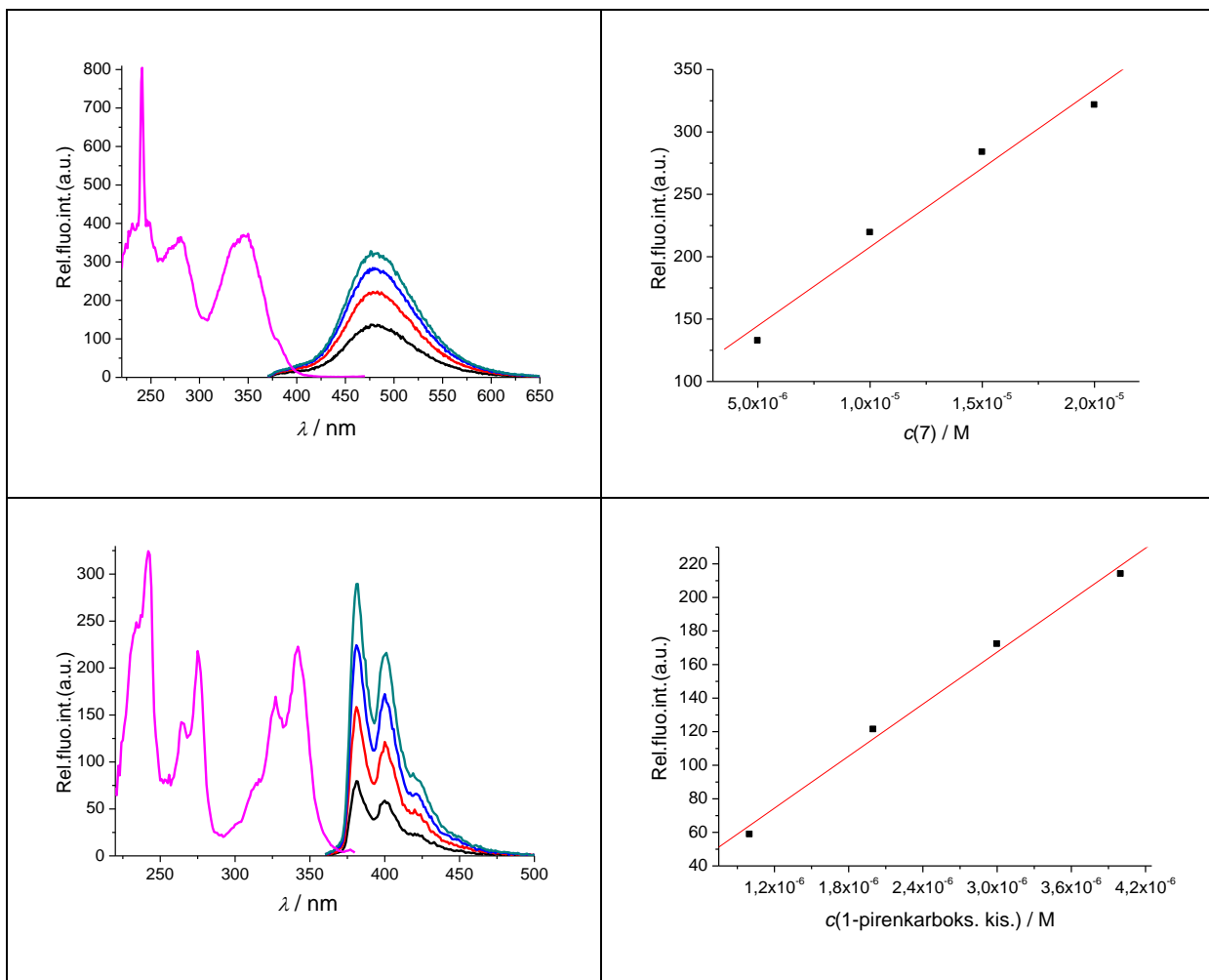
Slika D.8.10. Struktura spoja **10** i ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) i ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) spektri spoja **10**.

8.1.2. Dodatak poglavlju 4.1.2.



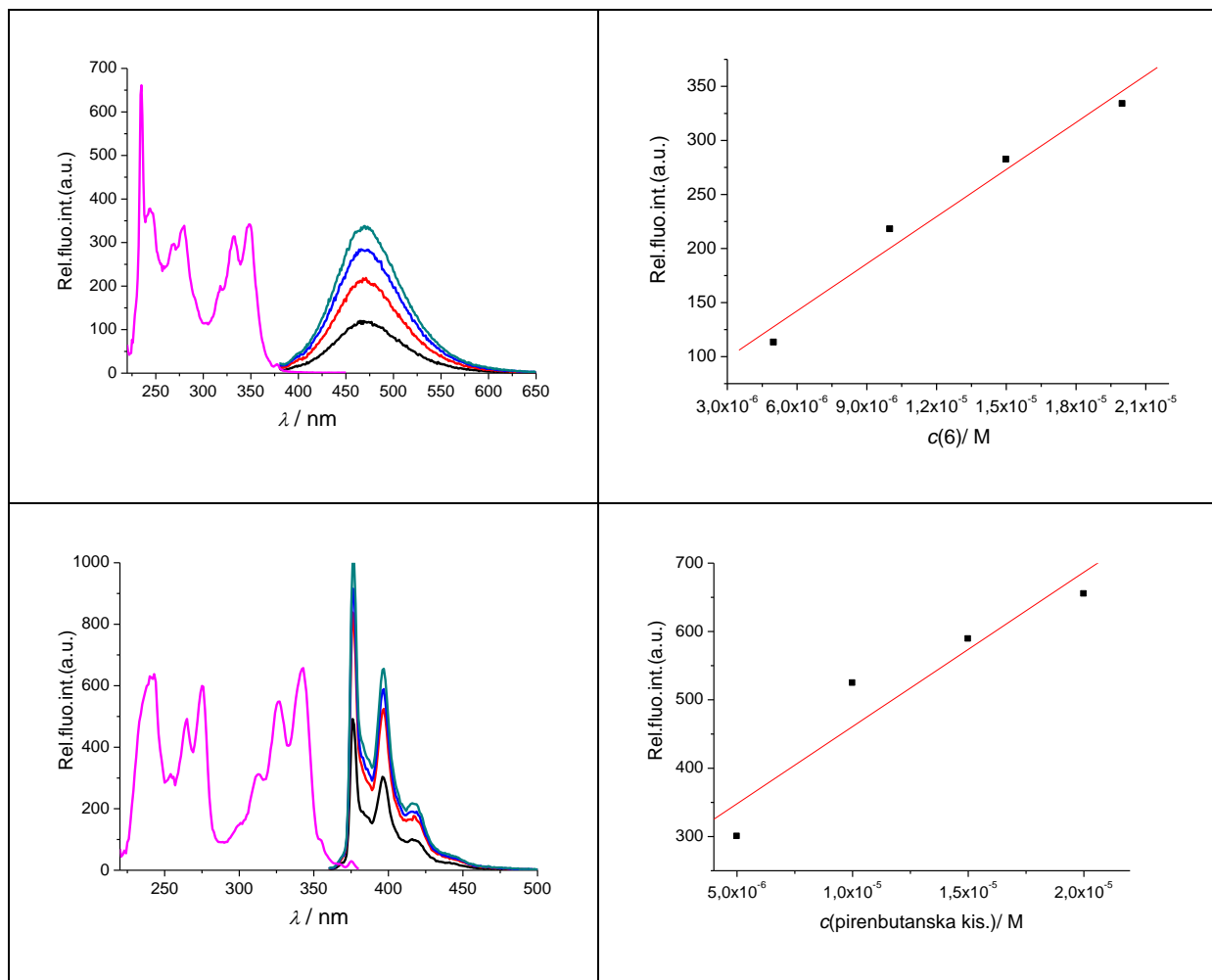
Slika D.8.11. Temperaturna ovisnost UV/vis spektra spojeva **7**, **1-pirenkarboksilne kiseline**, **6** i **pirenbutanske kiseline** ($c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) u natrijevom kakodilatnom puferu pH 7,0; $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$.

8. PRILOZI

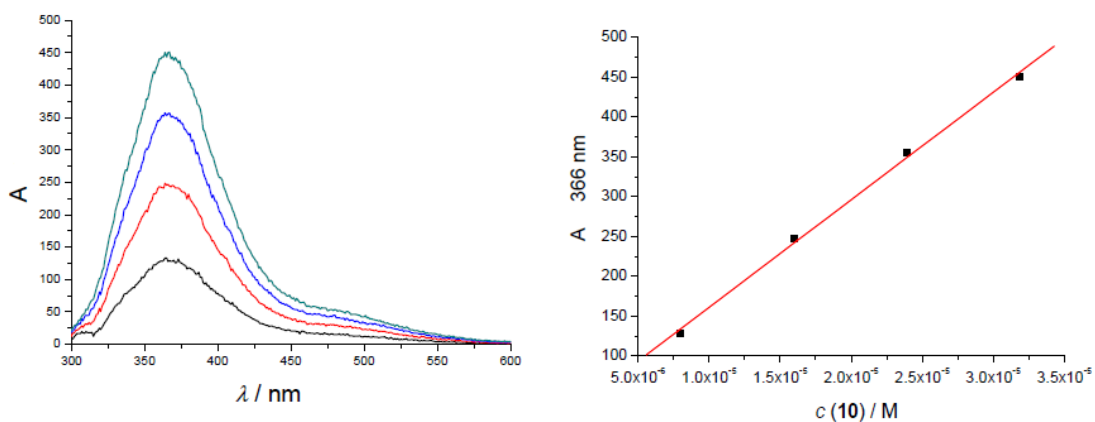


Slika D.8.12. Fluorescencijski spektar spoja **7** ($\lambda_{\text{exc}} = 352 \text{ nm}$) pri koncentracijama 5×10^{-6} – 2×10^{-5} mol dm^{-3}) i **1-pirenkarboksilne kiseline** ($\lambda_{\text{exc}} = 341 \text{ nm}$) pri koncentracijama (1×10^{-6} – 4×10^{-6} mol dm^{-3}), u natrijevom kakodilatnom puferu (pH 7,0; $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$).

8. PRILOZI

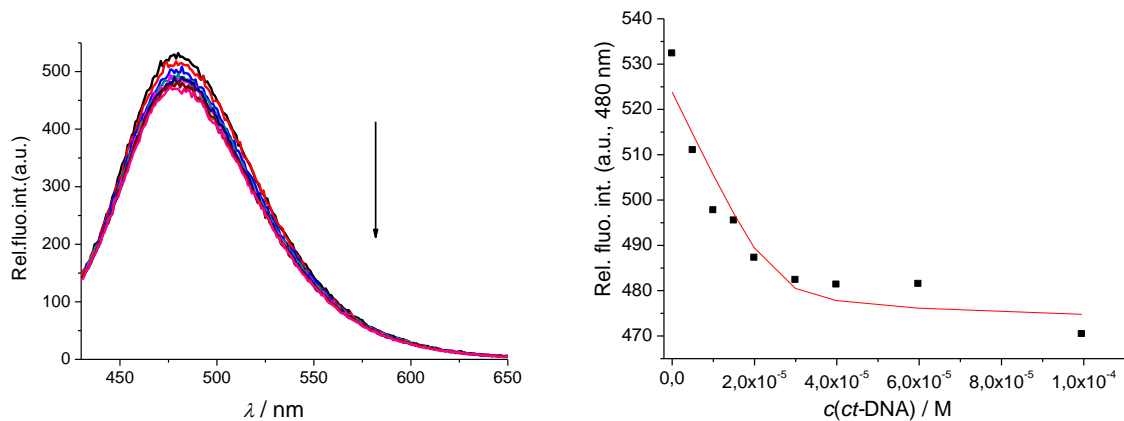


Slika D.8.13. Fluorescencijski spektar spoja **6** ($\lambda_{exc}= 350$ nm) pri koncentracijama 5×10^{-6} – 2×10^{-5} mol dm⁻³) i **pirenbutanske kiseline** ($\lambda_{exc}= 342$ nm) pri koncentracijama (1×10^{-6} – 4×10^{-6} mol dm⁻³), u natrijevom kakodilatnom puferu (pH 7,0; $I = 0.05$ mol dm⁻³).

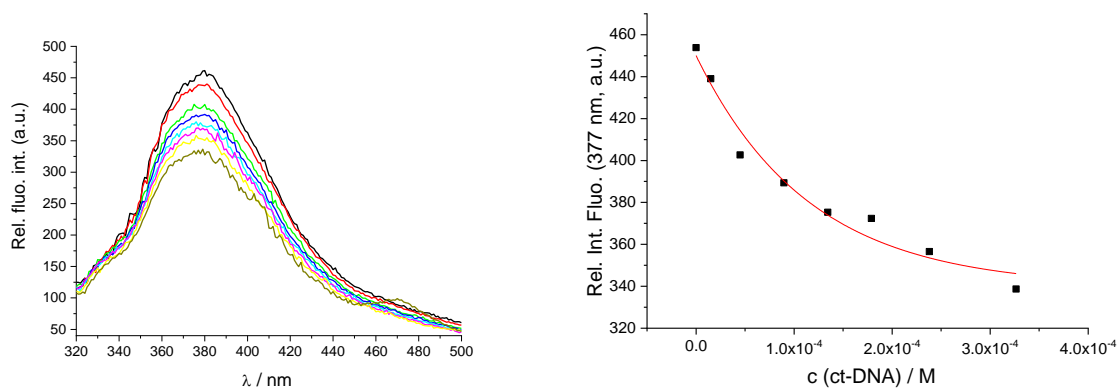


Slika D.8.14. Fluorescencijski spektar spoja **10** ($\lambda_{exc}= 280$ nm) pri koncentracijama 6×10^{-6} – $3,25 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³) u natrijevom kakodilatnom puferu (pH 7,0; $I = 0.05$ mol dm⁻³).

8. PRILOZI

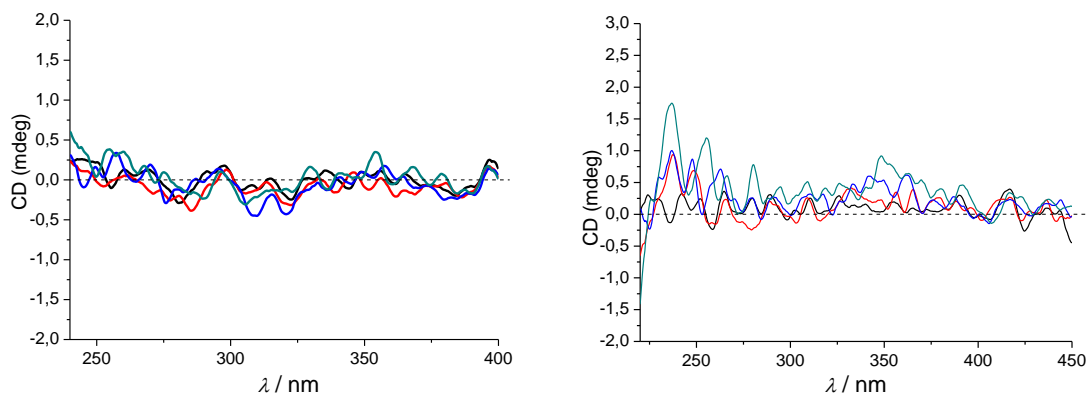


Slika D.8.15.a Fluorimetrijska titracija spoja **7** ($c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$; $\lambda_{\text{exc}} = 352 \text{ nm}$) s *ct*-DNA (lijevo); Ovisnost intenziteta emisije pri $\lambda_{\text{max}} = 480 \text{ nm}$ o c (polinukleotid), izračunato prema Scatchardovoj jednadžbi (pH = 7,0 u natrijevom kakodilatnom puferu, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$).

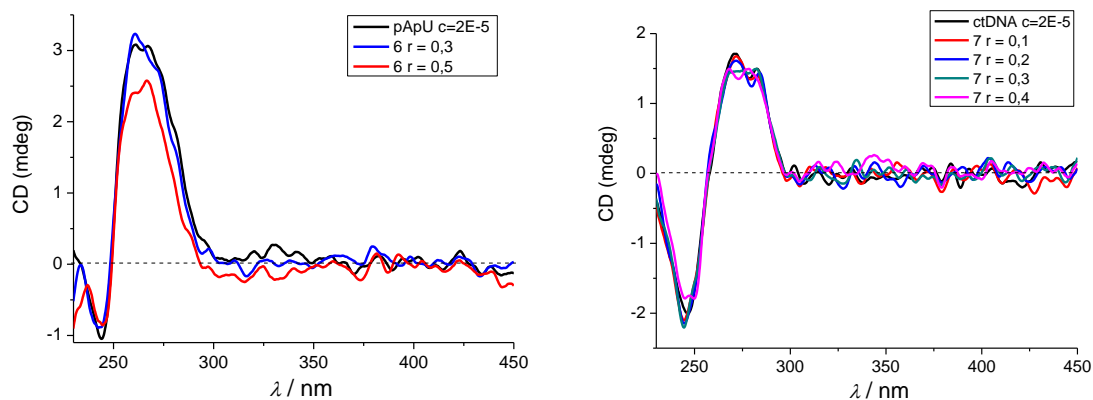


Slika D.8.15.b Fluorimetrijska titracija spoja **7** ($c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$; $\lambda_{\text{exc}} = 352 \text{ nm}$) s *ct*-DNA (lijevo); Ovisnost intenziteta emisije pri $\lambda_{\text{max}} = 480 \text{ nm}$ o c (polinukleotid), izračunato prema Scatchardovoj jednadžbi (pH = 7,0 u natrijevom kakodilatnom puferu, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$).

8. PRILOZI

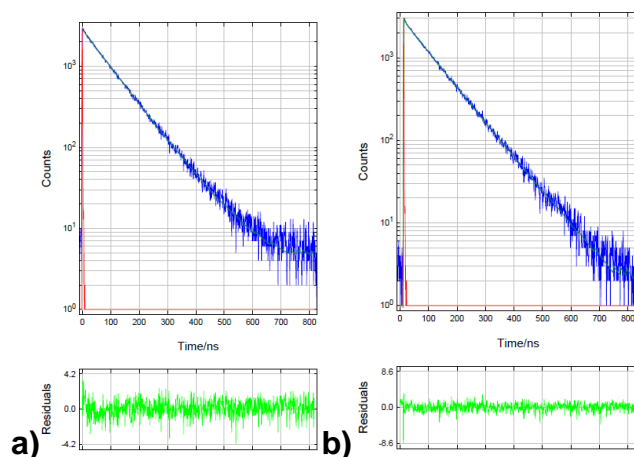


Slika D.8.16. Lijevo: CD spektar spoja **6** pri omjeru koncentracija $1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3} - 4 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$; Desno: CD spektar spoja **7** pri omjeru koncentracija $1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3} - 4 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ($\text{pH} = 7,0$ u natrijevom kakodilatnom puferu, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$).

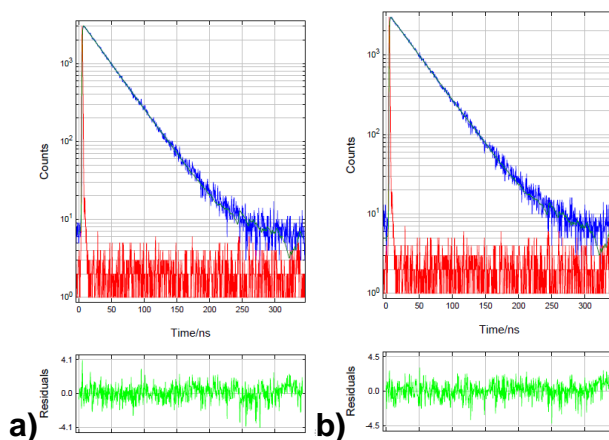


Slika D.8.17. Lijevo: CD titracija poli rA–poli rU sa spojem **6** pri molarnom omjeru $r = [\mathbf{6}] / [\text{poli rA–poli rU}]$; Desno: CD titracija *ct*-DNA sa spojem **7** pri molarnom omjeru $r = [\mathbf{7}] / [ct\text{-DNA}]$. Titracije provedene pri $\text{pH} = 7,0$ u natrijevom kakodilatnom puferu, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$.

8. PRILOZI

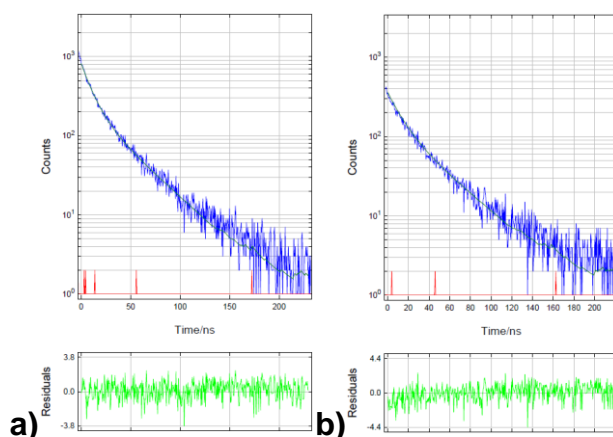


Slika D.8.18. Vrijeme života pirenbutanske kiseline dobiveno uz pomoć vremenski koreliranog pojedinačnog brojenja fotona (engl. *Time Correlated Single-Photon Counting*) u **a**) nedegazirano i **b**) degazirana otopina pri $\lambda_{\text{exc}} = 341 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{em}} = 419 \text{ nm}$ (pH 7,0, natrijev kakodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ M}$). Broj kanala korišten za fitiranje 1024 i 3000 cps. Funkcija odziva instrumenta (engl. *instrument response function* (IRF)) određen je s vodenom otopinom silike pri istim uvjetima kao i vrijeme poluživota. Vrijeme života, relativan prikaz i statistički parametar χ^2 su prikazani u Tablici 5.

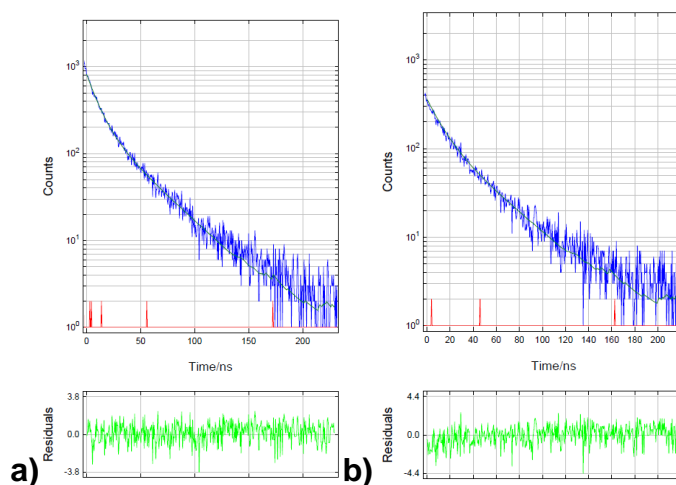


Slika D.8.19. Vrijeme života 1-pirenkarboksilne kiseline dobiveno uz pomoć vremenski koreliranog pojedinačnog brojenja fotona (engl. *Time Correlated Single-Photon Counting*) u **a**) nedegazirano i **b**) degazirana otopina pri $\lambda_{\text{exc}} = 342 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{em}} = 400 \text{ nm}$ (pH 7,0, natrijev kakodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ M}$). Broj kanala korišten za fitiranje 1024 i 3000 cps. Funkcija odziva instrumenta (engl. *instrument response function* (IRF)) određen je s vodenom otopinom silike pri istim uvjetima kao i vrijeme života. Vrijeme života, relativan prikaz i statistički parametar χ^2 su prikazani u Tablici 5.

8. PRILOZI

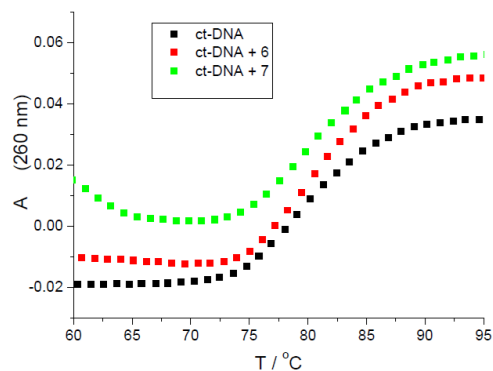


Slika D.8.20. Vrijeme života **6** dobiveno uz pomoć vremenski koreliranog pojedinačnog brojenja fotona (engl. *Time Correlated Single-Photon Counting*) u a) nedegazirano i b) degazirana otopina pri $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{em}} = 471 \text{ nm}$ (pH 7,0, natrijev kakodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ M}$). Broj kanala korišten za fitanje 1024 i 3000 cps. Funkcija odziva instrumenta (engl. *instrument response function* (IRF)) određen je s vodenom otopinom silike pri istim uvjetima kao i vrijeme života. Vrijeme života, relativan prikaz i statistički parametar χ^2 su prikazani u Tablici 5.

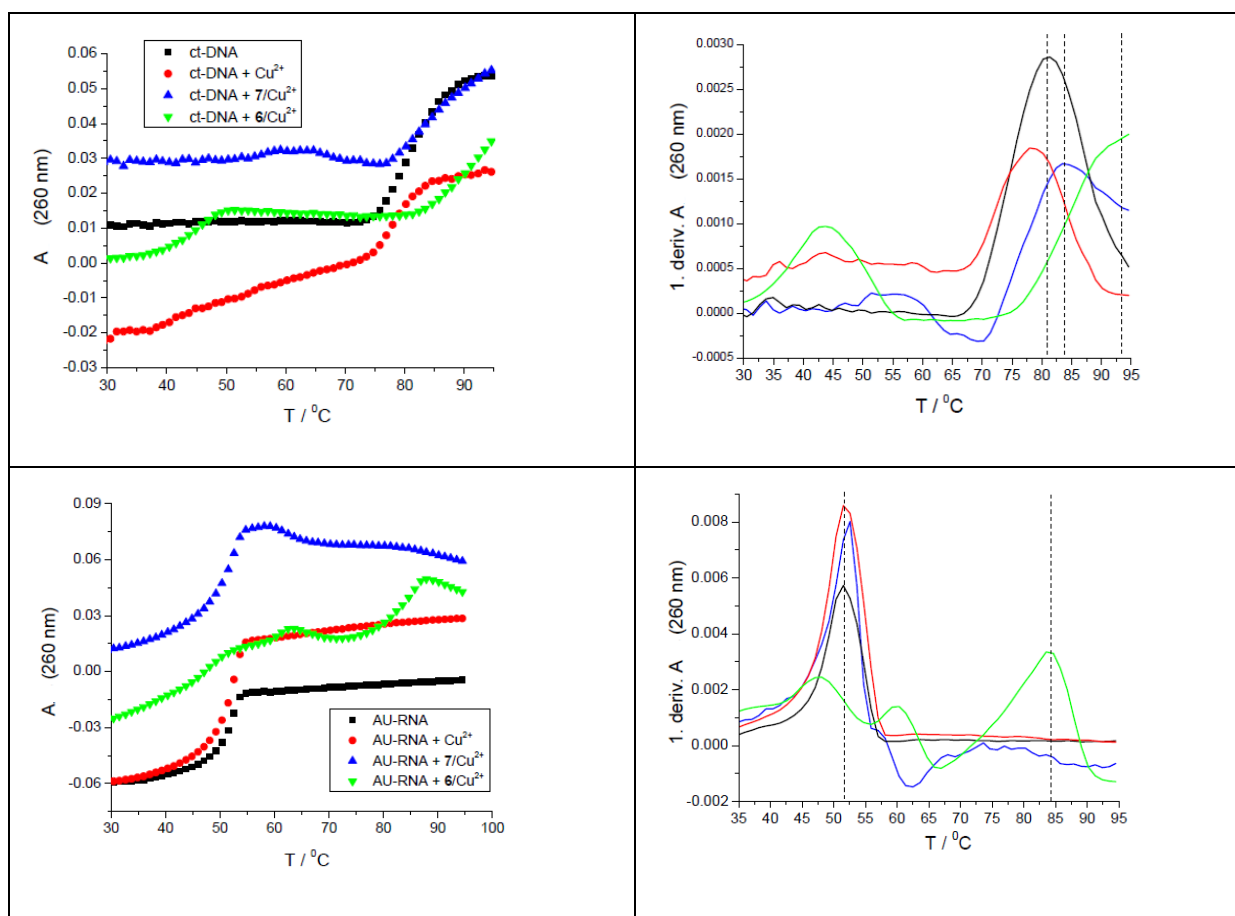


Slika D.8.21. Vrijeme života **7** dobiveno uz pomoć vremenski koreliranog pojedinačnog brojenja fotona (engl. *Time Correlated Single-Photon Counting*) u a) nedegazirano i b) degazirana otopina pri $\lambda_{\text{exc}} = 352 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{em}} = 472 \text{ nm}$ (pH 7,0; natrijev kakodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ M}$). Broj kanala korišten za fitanje 1024 i 3000 cps. Funkcija odziva instrumenta (engl. *instrument response function* (IRF)) određen je s vodenom otopinom silike pri istim uvjetima kao i vrijeme života. Vrijeme života, relativan prikaz i statistički parametar χ^2 su prikazani u Tablici 5.

8. PRILOZI



Slika D.8.22. Krivulje temperature mekšanja *ct*-DNA ($c(\textit{ct}\text{-DNA}) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $r_{[\text{peptid}]/[\textit{ct}\text{-DNA}]}$) pri dodatku spojeva **6** ili **7**, pH = 7,0 (natrijev kakodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$).



Slika D.8.23. Krivulje temperature mekšanja od: gore) *ct*-DNA ($c(\textit{ct}\text{-DNA}) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) i dolje) poli rA-poli rU ($c(\text{RNA}) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) pri pH = 7,0 (natrijev kakodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$) pri dodatku samo Cu^{2+} otopine, $\mathbf{6}/\text{Cu}^{2+}$ ili $\mathbf{7}/\text{Cu}^{2+}$ kompleksa pri omjeru $r[\mathbf{6}/\text{Cu}^{2+} \text{ ili } \mathbf{7}/\text{Cu}^{2+}]/[\text{polinukleotid}] = 0,25$.

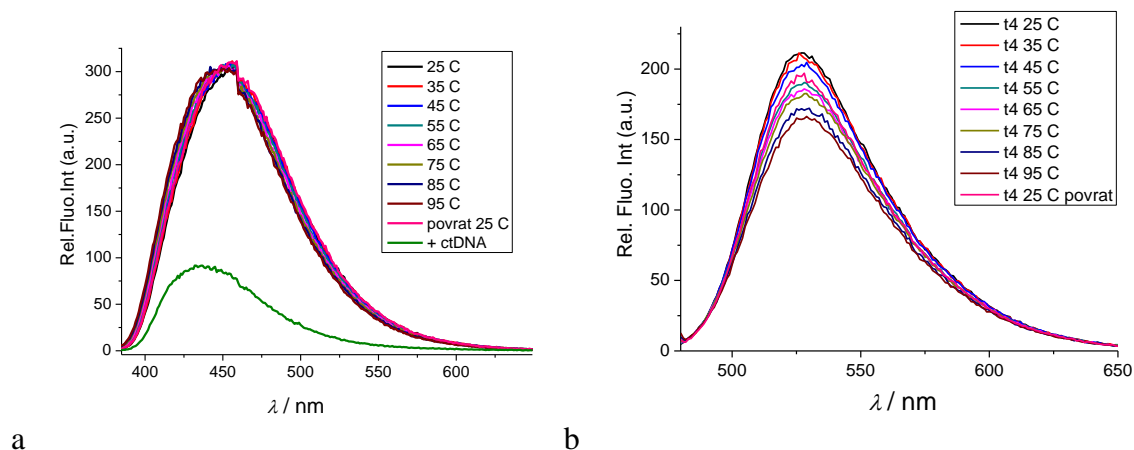
8. PRILOZI

Tablica D.1. Vrijeme života dobiveno mjerenjem degaziranih spojeva **6** i **7** i njihovih kompleksa s *ct*-DNA i CuCl₂.

	6	6 + ct-DNA	6 + CuCl₂
τ_1	2,682E-9 s	2,618E-9 s	2,241E-9 s
τ_2	1,034E-8 s	1,174E-8 s	9,496E-9 s
τ_3	3,548E-8 s	3,703E-8 s	3,374E-8 s
	7	7 + ct-DNA	7 + CuCl₂
τ_1	2,541E-9 s	2,720E-9 s	2,774E-9 s
τ_2	1,311E-8 s	1,320E-8 s	1,327E-8 s
τ_3	3,693E-8 s	3,842E-8 s	3,587E-8 s

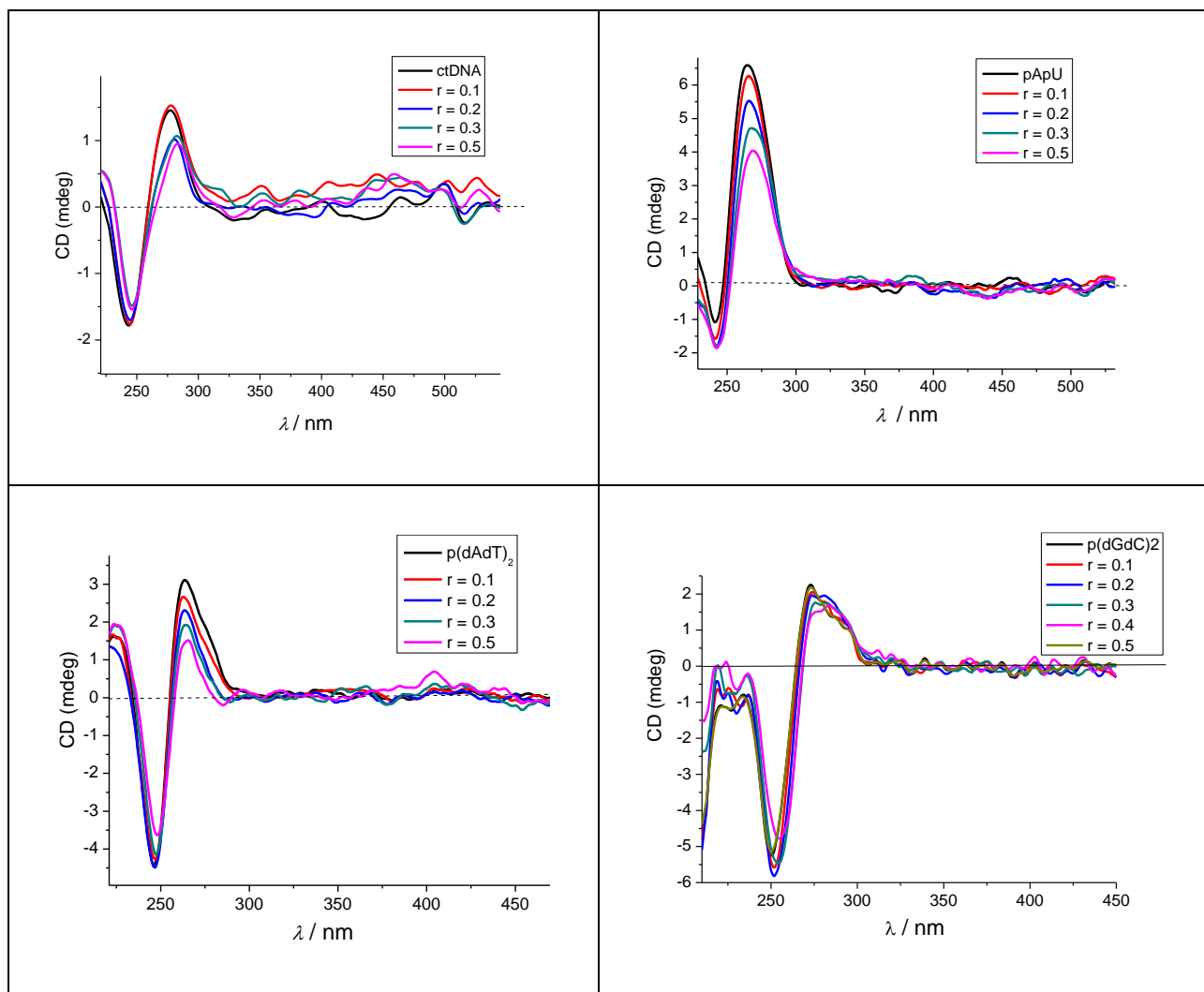
8.2. Dodatak bis-triarilboranima

8.2.1. Dodatak poglavlju 4.2.1.



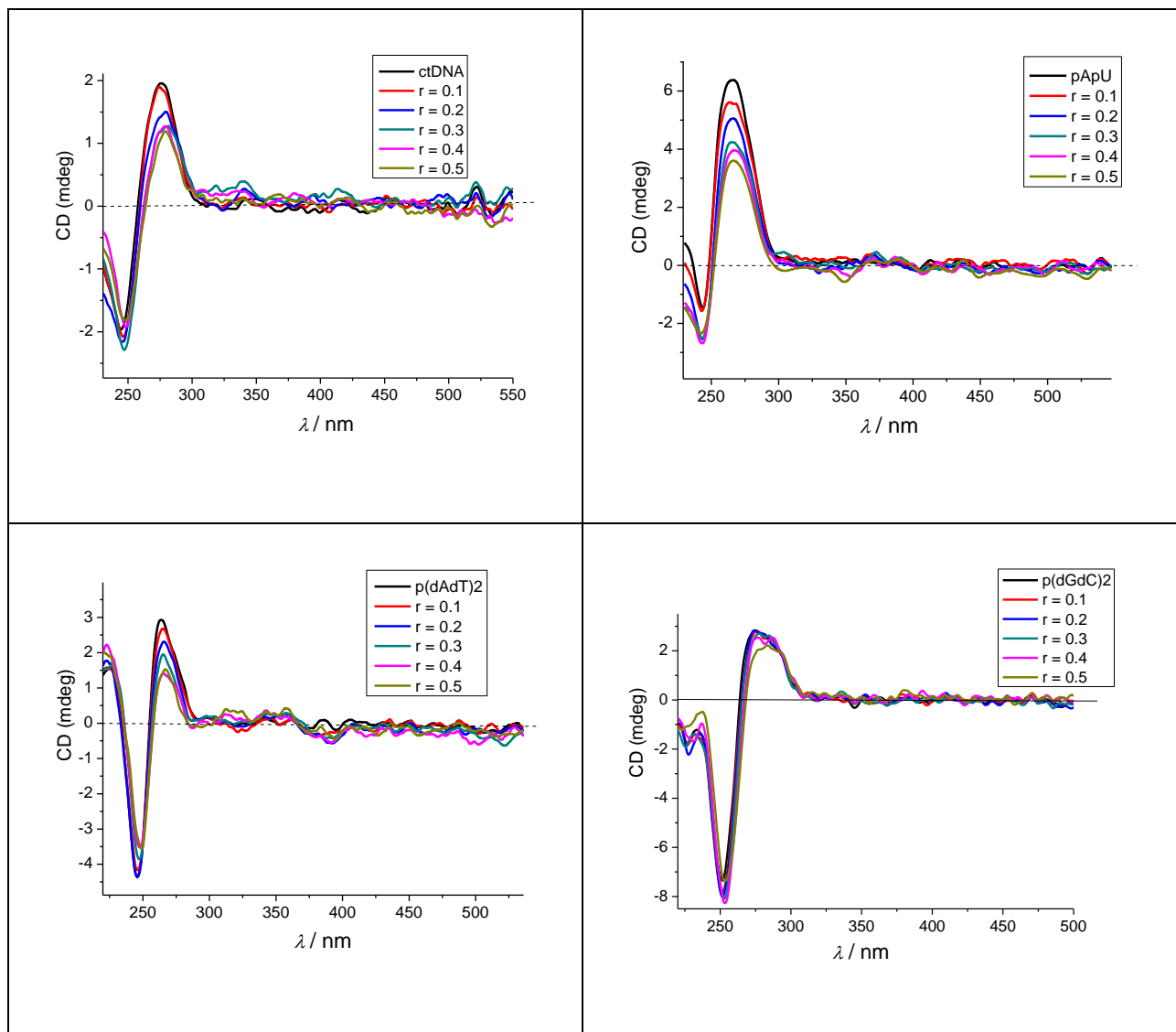
Slika D.8.24. Fluorencencijski spektar temperature ovisnosti spoja a) **B2** ($\lambda_{exc} = 372$ nm) pri koncentraciji $c(\mathbf{B2}) = 5 \times 10^{-7}$ mol dm⁻³, i b) **B4** ($\lambda_{exc} = 476$ nm) pri koncentraciji $c(\mathbf{B4}) = 8 \times 10^{-6}$ mol dm⁻³ u natrijevom kakodilatnom puferu (pH 7,0; $I = 0,05$ mol dm⁻³).

8.2.2. Dodatak poglavlju 4.2.2.3.



Slika D.8.25. CD titracija *ct*-DNA, poli rA - poli rU, poli (dAdT)₂, poli (dGdC)₂ (sve DNA/RNA $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) s **B1** pri molarnim omjerima $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$ (pH 7,0, natrijev kakodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$).

8. PRILOZI

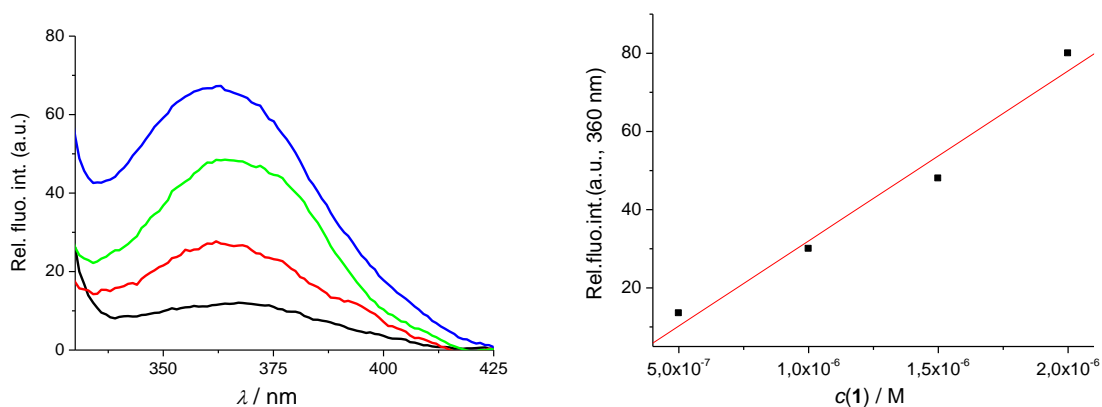


Slika D.8.26. CD titracija *ct*-DNA, poli rA - poli rU, poli (dAdT)₂, poli (dGdC)₂ (sve DNA/RNA $c=2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) s **B2** pri molarnim omjerima $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$ (pH 7,0; natrijev kakodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$).

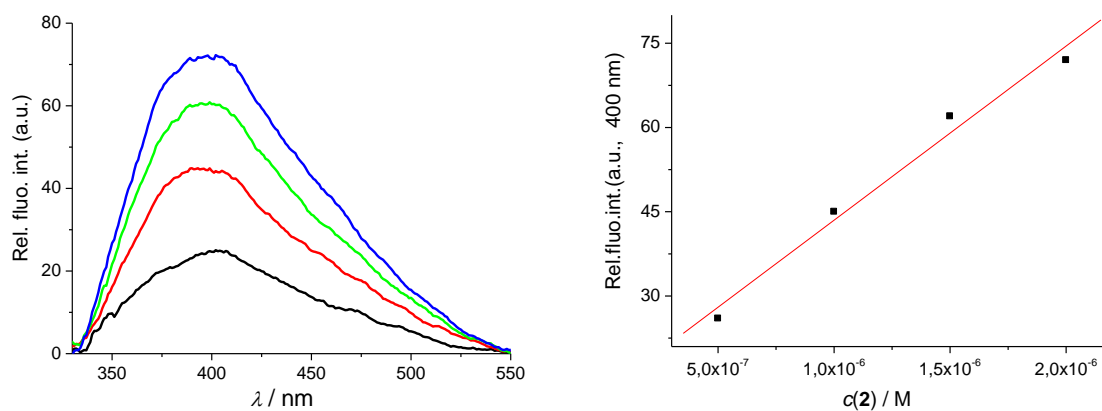
8. PRILOZI

8.3. Dodatak analozima kaliksarena

8.3.1. Dodatak poglavlju 4.3.1.

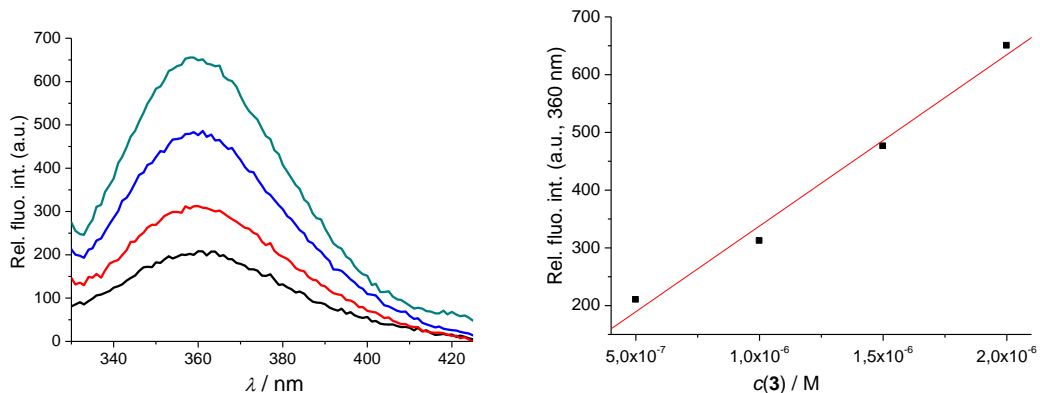


Slika D.8.27. Fluorescencijski spektar **C1** ($\lambda_{\text{exc}} = 300$ nm) pri mikromolarnim koncentracijama, u puferu natrijevog kakodilata (pH 7,0; $I = 0,05$ M). Primijetan porast bazne linije na >420 nm za najviše koncentracije, pripisano nastanku koloida.

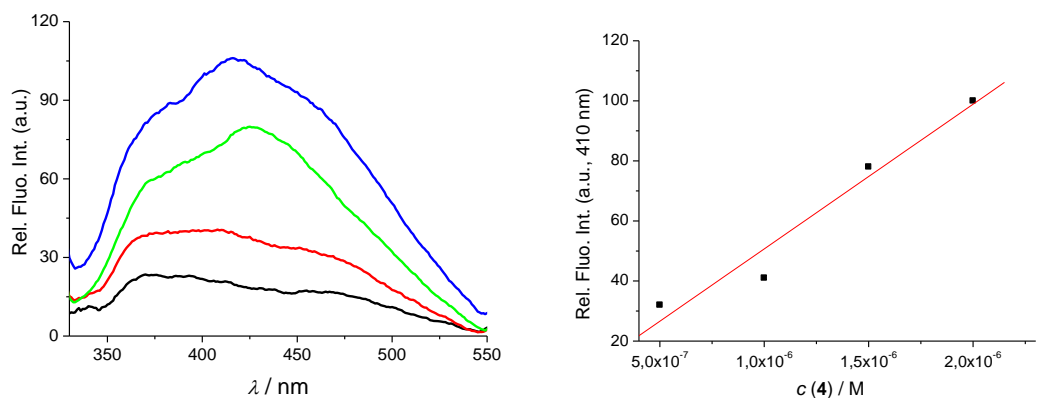


Slika D.8.28 Fluorescencijski spektar **C2** ($\lambda_{\text{exc}} = 300$ nm) pri mikromolarnim koncentracijama, u puferu natrijevog kakodilata (pH 7,0; $I = 0,05$ M).

8. PRILOZI

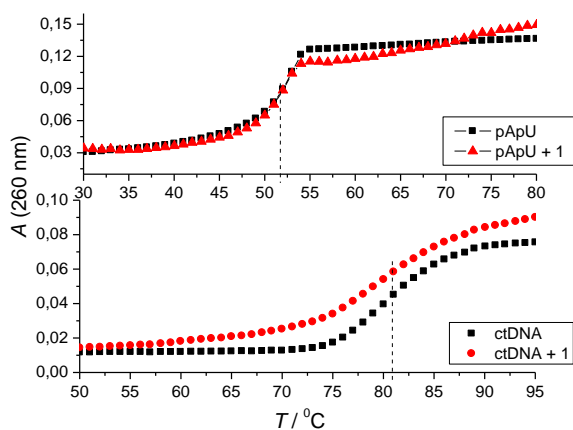


Slika D.8.29. Fluorescencijski spektar **C3** ($\lambda_{\text{exc}} = 300 \text{ nm}$) pri mikromolarnim koncentracijama, u puferu natrijevog kakodilata (pH 7,0; $I = 0,05 \text{ M}$). Primijetan porast bazne linije na $>420 \text{ nm}$ za najviše koncentracije, pripisano nastanku koloida.

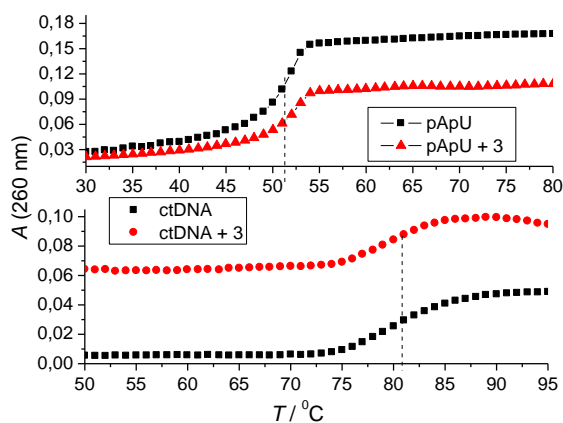


Slika D.8.30. Fluorescencijski spektar **C4** ($\lambda_{\text{exc}} = 300 \text{ nm}$) pri mikromolarnim koncentracijama, u puferu natrijevog kakodilata (pH 7,0; $I = 0,05 \text{ M}$).

8.3.2. Dodatak poglavlju 4.3.2.1.

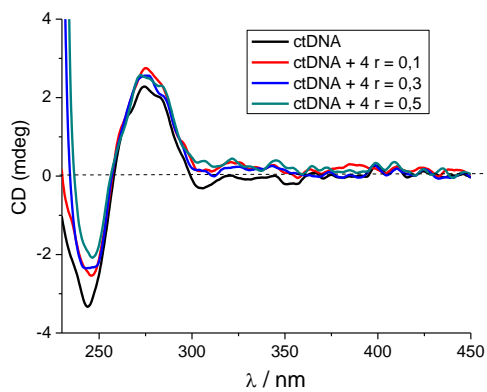


Slika D.8.31. Temperaturno mekšanje *ct*-DNA ($c(ct\text{-DNA}) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ M}$, $r_{[1]}/[ctDNA] = 0,3$) i poli rA - poli rU ($c(pApU) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ M}$, $r_{[1]}/[pApU] = 0,3$) pri pH 7,0 (natrijev kakodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ M}$) pri dodatku spoja **C1**. Pogreška u ΔT_m vrijednostima: $\pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$.

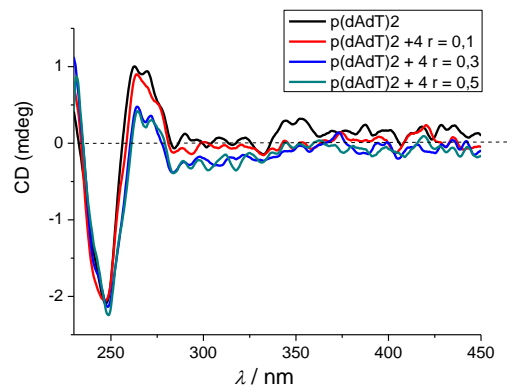


Slika D.8.32. Temperaturno mekšanje *ct*-DNA ($c(ct\text{-DNA}) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ M}$, $r_{[3]}/[ctDNA] = 0,3$) i poli rA - poli rU ($c(pApU) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ M}$, $r_{[3]}/[pApU] = 0,3$) pri pH 7,0 (natrijev kakodilatni pufer, $I = 0,05 \text{ M}$) pri dodatku **C3**. Pogreška u ΔT_m vrijednostima: $\pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$.

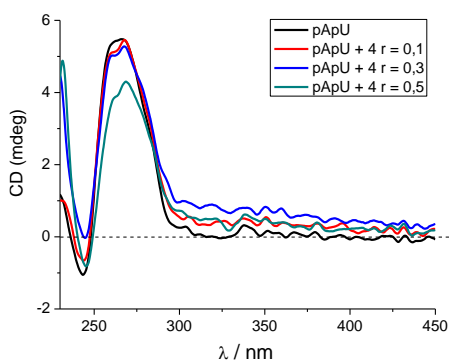
8.3.3. Dodatak poglavlju 4.3.2.3.



a



b



c

Slika D.8.33. a-c) CD titracije *ct*-DNA, poli (dAdT)₂ i poli rA – poli rU (sve DNA/RNA $c = 2 \times 10^{-5}$ M) s **C4** pri molarnim omjerima $r = 0,1; 0,3$ i $0,5$ ($r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$).

9. ŽIVOTOPIS

Ivona Krošl Knežević [REDACTED] Nakon završene Gimnazije u Požegi, 2012. godine upisala je preddiplomski studij Primijenjene kemije na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu. Za vrijeme trajanja preddiplomskog studija odradila je praksu u Olivalu. Završni rad izradila je pod mentorstvom prof. dr. sc. Silvane Raić-Malić pod naslovom *'Click' reakcijom do novih kumarinskih derivata 1,2,3-triazola*. Akademске godine 2015/2016. dobitnica je Rektorove nagrade za timski znanstveni rad iz područja tehničkih znanosti pod naslovom *"Odabir uvjeta redukcije grafenova oksida s ciljem dobivanja grafena za primjenu u superkondenzatorima i poluvodičkim diodama"* i nagrade za postersko priopćenje pod naslovom *"Sinteza novih hibrida kumarina i 1,2,3-triazola kao potencijalna antioksidativna sredstva"*. 2016. godine na istom fakultetu upisala je diplomski studij Primijenjene kemije, modul Primijenjena organska kemija. Diplomski rad izradila je pod mentorstvom prof. dr. sc. Silvane Raić-Malić pod naslovom *"Sinteza 2-supstituiranih benzimidazolnih derivata kao potencijalnih inhibitora p38 MAP kinaze"*. Na diplomskom studiju pohađala je program Erasmus+ na REGA institutu za medicinska istraživanja, Leuven, Belgija. 2019. godine zaposlila se na Institutu Ruđer Bošković, kao asistentica u Laboratoriju za biomolekularne interakcije i spektroskopiju, Zavoda za organsku kemiju i biokemiju i iste godine upisala doktorski studij Kemijsko inženjerstvo i primijenjena kemija (FKIT). Doktorski rad izradila je u području prirodnih znanosti, polje kemija. Do danas je koautorica 6 znanstvenih publikacija zastupljenih u tercijarnim bazama podataka. Sudjelovala je na međunarodnom skupu 28. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, 2023. godine s usmenim priopćenjem i drugim domaćim skupovima s posterskim priopćenjima. Sudjelovala je i na znanstveno-popularnom događaju, Frizbijadi i Festivalu znanosti.