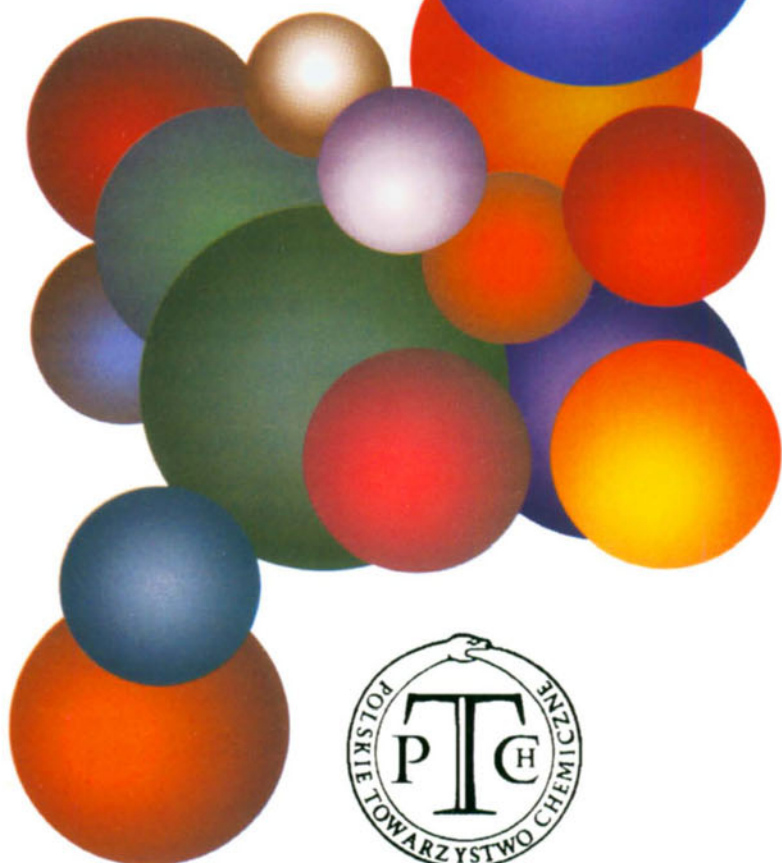


WIADOMOŚCI *chemiczne*



CZASOPISMO POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO

Publikacja dotowana przez KBN

RADA REDAKCYJNA

RYSZARD ADAMIAK, JERZY BŁAŻEJOWSKI, JÓZEF CEYNOWA,
JACEK GAWROŃSKI, JACEK KIJEŃSKI, TADEUSZ M. KRYGOWSKI,
JACEK MŁOCHOWSKI, PIOTR PANETH, LEONARD M. PRONIEWICZ,
WŁADYSŁAW RUDZIŃSKI, STANISŁAW SŁOMKOWSKI, JAN ZAWADIAK

KOMITET REDAKCYJNY

BOGDAN BURCZYK, JERZY P. HAWRANEK, ADAM JEZIERSKI, ADOLF KISZA,
LUDWIK KOMOROWSKI, ZDZISŁAW LATAJKA, PRZEMYSŁAW MASTALERZ,
IGNACY Z. SIEMION, MIROŚLAW SOROKA, MARIA SUSZYŃSKA

REDAKTOR NACZELNY

JÓZEF J. ZIÓLKOWSKI

SEKRETARZ REDAKCJI

KRYSTYNA MARKSOWA

Korespondencję należy kierować pod adresem:

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław
tel.: 071 375 73 89, tel./fax: 071 322 14 06
e-mail: wchem@wchuwr.chem.uni.wroc.pl

INTERNET (English abstracts) <http://www.chem.uni.wroc.pl/wiadchem.htm>

„Wiadomości Chemiczne” są wydawane w ramach serii *Acta Universitatis Wratislaviensis*

© Copyright by Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, Wrocław 2006

ISSN 83-2292084-9

Maszynopis niniejszego numeru przekazano Wydawcy w czerwcu 2006

Przygotowanie do druku i druk:

Firma Wydawnicza K2, al. Stanów Zjednoczonych 51, 04-026 Warszawa
tel.: 022 517 78 12, fax: 022 517 78 11, e-mail k2@druk-k2.pl

**SPEKTROSKOPIA POJEDYNCZYCH
FLUOROFORÓW**
SINGLE-FLUOROPHORE SPECTROSCOPY

Andrzej Molski

*Pracownia Dynamiki Procesów Fizykochemicznych, Wydział Chemii,
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza,
ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań*

Abstract
Wstęp
Podstawy
Migotanie fluorescencji barwników organicznych
Fluorescencja punktów kwantowych
Obserwacja aktywności pojedynczych cząstek enzymów
Podsumowanie i perspektywy
Piśmiennictwo cytowane

Andrzej Molski jest profesorem na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu gdzie kieruje Pracownią Dynamiki Procesów Fizykochemicznych.

Jego zainteresowania naukowe koncentrują się wokół modelowania i symulacji procesów kinetycznych, a w ostatnim czasie dotyczą spektroskopii pojedynczych fluoroforów (SPF). Sygnał mierzony w SPF, np. trajektoria intensywności fluorescencji, wymaga analizy statystycznej w celu wydobycia użytecznej informacji. Badania prowadzone w pracowni kierowanej przez A. Molskiego rozwijają metody analizy statystycznej eksperymentów SPF poprzez modelowanie analityczne oraz symulacje komputerowe.

ABSTRACT

This article is an introduction to single-fluorophore spectroscopy (SFS). The basic phenomenon seen in SFS is the fluctuations of fluorescence intensity of single nano-objects (dyes, biopolymers, nano-crystals, aggregates). These fluctuations are called fluorescence blinking and carry information on the dynamics of a fluorophore and its surroundings. In the simplest case the fluorescence trajectory jumps between two levels, a bright one (*on*) and a dark one (*off*). In this article *on-off* fluorescence blinking associated with triplet states of organic dyes, excitation of quantum dots, and enzymatic reactions at room temperatures are reviewed. The cited literature indicates current problems and may serve as an introduction to modelling and simulations of SFS.

Keywords: single-fluorophore spectroscopy, fluorescence blinking, organic dyes, quantum dots, single-enzyme fluorescence

Słowa kluczowe: spektroskopia pojedynczych fluoroforów, migotanie fluorescencji, barwniki organiczne, punkty kwantowe, fluorescencja pojedynczych enzymów

WSTĘP

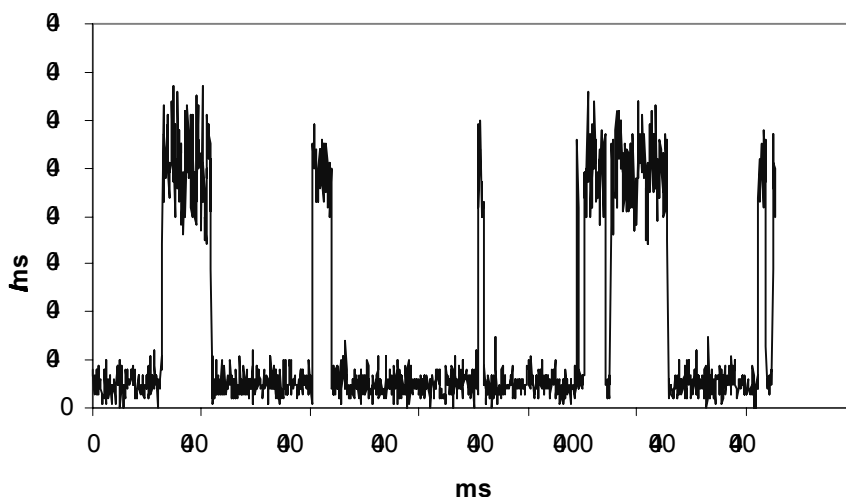
Termin spektroskopia pojedynczych fluoroforów (SPF) odnosi się do obserwacji fluorescencji wywołanej światłem laserowym, pochodzącej od pojedynczych fluoroforów umieszczonych w fazie skondensowanej. Pojęcie fluorofor obejmuje cząsteczki barwników organicznych i fluoryzujących biocząsteczek (np. białek, RNA), a także fluoryzujące nanokryształy. Termin spektroskopia pojedynczych fluoroforów jest propozycją polskiego odpowiednika angielskiego terminu *single molecule spectroscopy* (SMS). Słowo cząsteczka zostało zastąpione ogólniejszym terminem fluorofor, ponieważ SMS odnosi się współcześnie nie tylko do cząsteczek, lecz także do innych fluoroforów np. nanokryształów.

Pierwsze badania optyczne pojedynczych jonów i atomów w fazie gazowej zostały wykonane ponad 20 lat temu. W roku 1989 zademonstrowano detekcję pojedynczych cząsteczek pentacenu w temperaturze ciekłego helu w stałej matrycy *p*-terfenylu stosując metodę spektroskopii absorpcyjnej [1]. Za datę narodzin SPF można przyjąć rok 1990, kiedy to wykazano, że spektroskopia emisji fluorescencji jest metodą dogodniejszą od spektroskopii absorpcyjnej dla detekcji pojedynczych cząsteczek w niskich temperaturach [2], oraz zademonstrowano detekcję pojedynczych fluoroforów w cieczach w temperaturze pokojowej [3]. Pokazanie, że detekcja pojedynczych cząsteczek jest możliwa w temperaturze pokojowej otworzyło możliwości badania aktywności pojedynczych biocząsteczek i komórek, i było jednym z ważnych impulsów do dalszego żywiołowego rozwoju SPF. Struktury komórkowe były od dawna rutynowo badane mikroskopowo. Postęp mikroskopii optycznej i powstanie SPF sprawiły, że białka, DNA, RNA, motory molekularne mogą być teraz badane z dokładnością do pojedynczych cząsteczek. Ma to podstawowe znaczenie dla poznania procesów komórkowych, gdyż wiele z nich zachodzi z udziałem niewielkiej liczby cząsteczek, bądź też z udziałem izolowanych biocząsteczek.

W ostatnim czasie ukazało się szereg prac przeglądowych poświęconych różnym aspektom SPF. Artykuły [4] i [5] podsumowują pierwsze dziesięciolecie SPF. W pracy [6] omówiono metody badań eksperymentalnych, a praca [7] omawia szczegóły konstrukcji prostego zestawu optycznego zdolnego do detekcji pojedynczych fluoroforów. Analiza statystyczna fluorescencji jest omówiona w [8]. Zagadnienia teoretyczne przedstawione są w [9], a dalsze perspektywy rozwoju SPF w [10]. Wiele zagadnień badanych współcześnie omówiono niedawno w specjalnym zeszycie „Accounts of Chemical Research” [11].

Podstawowym zjawiskiem obserwowanym w SPF są fluktuacje intensywności fluorescencji, tzw. migotanie fluorescencji (ang. *fluorescence blinking*), które niosą informacje o dynamice fluoroforu i jego otoczenia. W eksperymencie rejestruje się zależność intensywności fluorescencji od czasu zwaną trajektorią fluorescencji (ang. *fluorescence trajectory*), która następnie poddawana jest analizie statystycznej. W najprostszym przypadku trajektoria fluorescencji wykazuje skoki intensywności pomiędzy dwoma stanami. Stan o wysokiej intensywności fluorescencji jest nazywany stanem jasnym (stan *on*), a stan o niskiej intensywności jest nazywany

stanem ciemnym (stan *off*). Jak to ilustruje Rys. 1 czasy trwania stanów *on* i stanów *off* nie są stałe, lecz są zmiennymi losowymi. Rozkłady prawdopodobieństwa dla czasów *on* i *off*, $p_{on}(t)$ i $p_{off}(t)$, są zależne od mechanizmu migotania fluorescencji.



Rysunek 1. Przykład trajektorii intensywności fluorescencji typu *on-off* [13]. Intensywność fluorescencji w stanie jasnym (*on*): $I_{on} = 50$ kHz, intensywność w stanie ciemnym (*off*): $I_{off} = 5$ kHz, stałe szybkości migotania fluorescencji $k_{on} = k_{off} = 0,01$ kHz

Celem niniejszym artykułu jest zwięźle wprowadzenie do SPF i pokazanie, że rozkłady czasów trwania stanów *on* i *off* charakteryzujące migotanie fluorescencji niosą istotne informacje o dynamice fluoroforu. W artykule omówiono migotanie fluorescencji typu *on-off* związane ze stanami trypletowymi barwników organicznych, jonizacją punktów kwantowych i reakcjami enzymatycznymi obserwowanymi w temperaturze pokojowej. Małe cząsteczki barwników organicznych stosowane są do znakowania biocząsteczek oraz jako sondy molekularne przekazujące informacje o swym najbliższym otoczeniu. Niestety cząsteczki barwników organicznych ulegają fotowysbieleniu (ang. *photobleaching*) tj. tracą zdolność do fluorescencji po wyemitowaniu określonej liczby fotonów, np. 10^6 [12–15]. Większą trwałość odnośnie zdolności do fluorescencji wykazują punkty kwantowe (ang. *quantum dots*), które są półprzewodnikowymi (np. InP, CdTe, CdSe) cząstkami koloidalnymi [16–22]. Punkty kwantowe są stosowane m.in. do znakowania elementów komórek oraz do śledzenia procesów wewnątrzkomórkowych. Migotanie fluorescencji związane z reakcjami enzymatycznymi jest wywołane np. zmianami właściwości fotofizycznych cząsteczki enzymu powodowanej przyłączeniem się substratu i reakcją enzymatyczną [23–27], lub powstawaniem fluoryzującego produktu [28–31].

W artykule ograniczono się do omówienia zjawisk zachodzących w wolnej skali czasu (rzędu milisekund i sekund), gdzie nie są istotne efekty rozgrupowania

(ang. *antibunching*) fotonów związane ze skończonym czasem życia stanów wzbudzonych i skończoną szybkością wzbudzenia. Cytowana literatura wskazuje na pozycje, które zdaniem autora poruszają aktualne problemy i mogą stanowić wprowadzenie do modelowania i symulacji zjawisk SPF.

PODSTAWY

W SPF obserwuje się fluorescencję pochodzącą od pojedynczego nanoobiekty (np. cząsteczki, nanokryształu). Jednym ze sposobów selekcji pojedynczego nanoobiekty jest zminimalizowanie objętości wzbudzanej tak, aby zawierała tylko jeden fluorofor [4–6]. Wymagana jest przy tym niezwykle czuła detekcja fluorescencji tak, aby słaby sygnał pochodzący od nanoobiekty przewyższał fluorescencję pochodzącą od tła, światła błędzącego itd. [4–6]. W celu uzyskania wyraźnego sygnału fluorescencji należy dobrać fluorofory o wysokiej wydajności kwantowej fluorescencji i odpowiedniej trwałości [4–6].

Rozważmy wielkości fizyczne charakterystyczne dla układów pomiarowych dla pojedynczych fluoroforów. Typowe stężenia stosowane w SPF są rzędu nano- do pikomoli na litr, $c = 10^{-9} \text{ M} - 10^{-12} \text{ M}$. Jeśli objętość V roztworu o stężeniu c zostanie umieszczona na szkiełku mikroskopowym o powierzchni A , to stężenie powierzchniowe fluoroforów ρ wyniesie:

$$\rho = c N_A V/A. \quad (1)$$

Na przykład, przyjmując $c = 10^{-9} \text{ M}$, $V = 100 \mu\text{l}$, oraz $A = 6 \text{ cm}^2$ otrzymujemy stężenie powierzchniowe $\rho \approx 100$ fluoroforów/ μm^2 . Jeśli użyjemy bardziej rozcieńczonego roztworu z $c = 10^{-12} \text{ M}$, to stężenie powierzchniowe wyniesie $\rho = 0,1$ fluoroforu/ mm^2 . Przyjmując, że pole obserwowane ma wymiary $10 \mu\text{m}^2 \times 10 \mu\text{m}^2$, to w polu widzenia znajdzie się od 10^4 fluoroforów przy stężeniu $c = 10^{-9} \text{ M}$, lub 10 cząsteczek przy $c = 10^{-12} \text{ M}$.

Jak widać pomiary SPF wymagają ekstremalnie małych stężeń. W praktyce dobór właściwego stężenia dokonuje się metodą prób i błędów poprzez kolejne rozcieńczenia roztworu wyjściowego. Detekcję pojedynczych fluoroforów potwierdza się poprzez obserwację skokowego fotowysyblania i/lub migotania fluorescencji.

Dwa podstawowe parametry fluoroforu decydujące o szybkości emisji fluorescencji, to przekrój czynny na absorpcję promieniowania σ i wydajność kwantowa fluorescencji α_f .

Przekrój czynny na absorpcję promieniowania σ jest zdefiniowany wzorem:

$$\ln(I_0/I) = \sigma n l, \quad (2)$$

gdzie I_0 to natężenie wiązki padającej, I natężenia wiązki przechodzącej, n to stężenie liczbowe substancji absorbującej, a l grubość warstwy absorbującej. Jeśli wiązka światła wzbudzającego skupiona jest na powierzchni przekroju A równej lub więk-

szej wartości granicznej wyznaczonej przez dyfrakcję $\approx (\lambda/2)^2$, gdzie λ to długość światła wzbudzającego, to szybkość absorpcji fotonów jest równa iloczynowi przekroju czynnego σ (np. w cm^2) i strumienia fotonów [np. w fotonach/(s cm^2)]. Inaczej mówiąc, prawdopodobieństwo absorpcji pojedynczego fotonu jest równe σ/A , a przekrój czynny to efektywna powierzchnia przekroju cząsteczki, która absorbuje padające fotony światła wzbudzającego.

Chemicy przyzwyczajeni są do określania zdolności fluoroforu do wzbudzania przy pomocy pojęcia molowego współczynnika absorpcji ε definiowanego poprzez prawo Beera wyrażane w postaci:

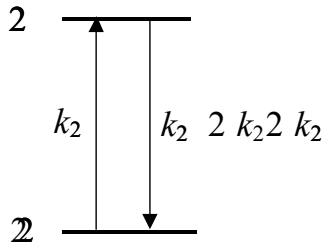
$$\log(I_0/I) = \varepsilon cl, \quad (3)$$

gdzie c stężenie molowe substancji absorbującej, l grubość warstwy absorbującej. Związek pomiędzy ε i σ ma postać:

$$\sigma = \varepsilon (\ln 10) / N_A, \quad (4)$$

gdzie N_A to liczba Avogadro. W literaturze można spotkać inną postać tej zależności: $\sigma = 2,303 \times 1000 \times \varepsilon / N_A$, dla której zakłada się, że ε jest wyrażone w $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$, a σ w cm^2 .

Dla przykładu, molowy współczynnik absorpcji ε punktów kwantowych CdSe o średnicy 3,5 nm dla długości fali $\lambda = 532 \text{ nm}$ wynosi $\varepsilon(\text{CdSe}) = 1,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$, a molowy współczynnik absorpcji barwnika R6G przy tej samej długości fali wynosi $\varepsilon(\text{R6G}) = 1,14 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ [7]. Zdolność do absorpcji dla tych fluoroforów wyrażona równoważnie poprzez przekrój czynny to $\sigma(\text{CdSe}) = 6,12 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$ oraz $\sigma(\text{R6G}) = 4,36 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$.



Rysunek 2. Układ dwupoziomowy. Oznaczenia: $|0\rangle$ – stan podstawowy, $|1\rangle$ – stan wzbudzony, k_{01} – stała szybkości wzbudzenia, k_{10} – stała szybkości dezaktywacji, a k_r i k_{nr} – stałe szybkości dezaktywacji odpowiednio promienistej i bezpromienistej

Najprostszy model fluoroforu to układ dwóch poziomów pokazany na Rys. 2, gdzie stan $|0\rangle$ to podstawowy stan singletowy, a stan $|1\rangle$ to pierwszy zbudzony stan singletowy. Stała szybkości wzbudzenia k_{01} dana jest wyrażeniem:

$$k_{01} = I\sigma/h\nu, \quad (5)$$

gdzie I to strumień energii lasera [np. w $J/(s \text{ cm}^2) = W/\text{cm}^2$], σ przekrój czynny na absorpcję, oraz ν to częstość światła wzbudzającego. Dla przykładowej intensywności wiązki wzbudzającej $I = 1 \text{ kW}/\text{cm}^2$ przy długości fali $\lambda = 532 \text{ nm}$ ($h\nu = 3,73 \times 10^{-19} \text{ J}$), ze wzoru (5) otrzymujemy częstość wzbudzenia $k_{01}(\text{CdSe}) = 1,6 \times 10^6 \text{ fotonów}/\text{s} = 1,6 \times 10^3 \text{ kHz}$ dla punktu kwantowego CdSe, oraz $k_{01}(\text{R6G}) = 1,2 \times 10^6 \text{ fotonów}/\text{s} = 1,2 \times 10^3 \text{ kHz}$ dla cząsteczki R6G.

Wydajność kwantowa fluorescencji α_f jest zdefiniowana jako:

$$\alpha_f = k_r / (k_r + k_{nr}) \quad (6)$$

gdzie k_r to stałą szybkości dezaktywacji promienistej (ang. *radiative decay*), tj. dezaktywacji z emisją fotonu fluorescencji, a k_{nr} to stałą szybkości zaniku bezpromienistego (ang. *nonradiative decay*). Stała k_{nr} jest sumą stałych zaniku dla wszystkich kanałów bezpromienistych takich jak konwersja wewnętrzna (ang. *internal conversion*) i przejście międzysystemowe (ang. *intersystem crossing*), $k_{nr} = k_{ic} + k_{isc}$. Typowe wartości wydajności kwantowej fluorescencji dla fluoroforów stosowanych w SPF to $\alpha_f = 0,5-0,9$.

Szybkość detekcji fotonów fluorescencji I_f (np. w fotonach/s = Hz) określona jest przez obsadzenie stanu wzbudzonego P_1 , szybkość zaniku stanu wzbudzonego k_{10} , wydajność kwantową fluorescencji α_f i wydajność detektora φ :

$$I_f = \varphi \alpha_f k_{10} P_1, P_1 = k_{01} / (k_{01} + k_{10}) \quad (7)$$

Typowe wartości wydajności detektora to $\varphi = 0,05-0,1$, tzn. jedynie 5–10% emitowanych fotonów jest rejestrowanych. Zgodnie ze wzorem (7), dla dużych intensywności wzbudzenia obserwuje się nasycenie emisji, co może być wyrażone w postaci:

$$I_f / \varphi \alpha_f k_{10} = \frac{I / I_s}{1 + I / I_s}, \quad (8)$$

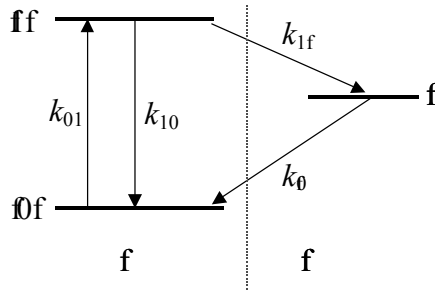
gdzie I to intensywność, tj. strumień energii, wiązki lasera, a I_s to charakterystyczna intensywność nasycenia (ang. *saturation intensity*). Dla układu dwupoziomowego jak na Rys. 2, $I_s = h\nu k_{10} / \sigma$. Dla małych intensywności wzbudzenia, $k_{01} \ll k_{10}$, obsadzenie stanu wzbudzonego $P_1 = k_{01} / k_{10}$, i wzór (7) redukuje się do:

$$I_f = \varphi \alpha_f k_{01}, \quad (9)$$

tzn. szybkość detekcji rośnie proporcjonalnie wraz z szybkością wzbudzenia.

MIGOTANIE FLUORESCENCJI BARWNIKÓW ORGANICZNYCH

Procesem kinetycznym obserwowanym powszechnie w SPF jest migotanie fluorescencji związane z przechodzeniem wzbudzonej cząsteczki barwnika organicznego w stan trypletowy.



Rysunek 3. Uproszczony diagram energetyczny cząsteczki fluoroforu organicznego

Rys. 3 przedstawia uproszczony diagram energetyczny typowej cząsteczki barwnika organicznego. Strzałki oznaczają przejścia między stanami singletowymi $|0\rangle$ oraz $|1\rangle$, i stanem trypletowym $|2\rangle$. Wyższe stany singletowe i trypletowe nie muszą być uwzględnione jeśli stosowane są małe intensywności wzbudzenia. Cząsteczka barwnika oświetlana ciągłym promieniowaniem laserowym ulega wzbudzeniu, $|0\rangle \rightarrow |1\rangle$, a następnie ulega dezaktywacji, $|1\rangle \rightarrow |0\rangle$, oddając energię wzbudzenia najczęściej w postaci kwantu promieniowania. Ponieważ cząsteczka oświetlana jest w sposób ciągły, następują kolejne akty aktywacji i dezaktywacji i obserwujemy ciągłą emisję fluorescencji. Będąc w stanie $|1\rangle$ cząsteczka może nie wrócić bezpośrednio do stanu podstawowego $|0\rangle$, lecz przejść do stanu trypletowego $|2\rangle$. Przejście $|1\rangle \rightarrow |2\rangle$ następuje rzadko, raz na wiele cykli $|0\rangle \rightarrow |1\rangle \rightarrow |0\rangle$, i jest obserwowane jako skokowe zmniejszenie się intensywności fluorescencji do poziomu tła. Cząsteczka przebywa w stanie trypletowym stosunkowo długo (czasy rzędu $1 \mu\text{s}$ do 1ms) i w tym czasie nie obserwuje się fluorescencji powyżej poziomu tła. W końcu następuje przejście $|2\rangle \rightarrow |0\rangle$ i cząsteczka zaczyna znowu fluoryzować wykonując cykle $|0\rangle \rightarrow |1\rangle \rightarrow |0\rangle$. Okresy „jasne” (fluorescencji) są przerywane okresami „ciemnymi”, gdy cząsteczka przebywa w stanie trypletowym.

Prawdopodobieństwa obsadzeń P_0, P_1, P_2 stanów $|0\rangle, |1\rangle, |2\rangle$ spełniają równania kinetyczne:

$$dP_0/dt = -k_{01}P_0 + k_{10}P_1 + k_{20}P_2, \quad (10)$$

$$dP_1/dt = k_{01}P_0 - (k_{10} + k_{12})P_1, \quad (11)$$

$$dP_2/dt = k_{12}P_1 - k_{20}P_2, \quad (12)$$

oraz warunek normalizacji $P_0 + P_1 + P_2 = 1$. W zwykłych warunkach proces dezaktywacji $|1\rangle \rightarrow |0\rangle$ jest znacznie szybszy od pozostałych procesów, i trójstanowy układ na Rys. 3 staje się równoważny układowi dwóch stanów, jasnego (**on**) i ciemnego (**off**) [32]:



gdzie $k_{\text{on}} = \alpha_{\text{isc}} k_{01}$, $\alpha_{\text{isc}} = k_{12}/(k_{10} + k_{12})$, i $k_{\text{off}} = k_{20}$ to szybkości ucieczki (ang. *escape rates*) ze stanów **on** i **off**. Intensywność fluorescencji w stanie **on** równa jest $I_{\text{on}} = \varphi \alpha_{\text{isc}} k_{01}$, a w stanie **off** $I_{\text{off}} = 0$. Często należy uwzględnić fluorescencję pochodzącą od tła I_{b} , co prowadzi do $I_{\text{on}} = \varphi \alpha_{\text{isc}} k_{01} + I_{\text{b}}$ oraz $I_{\text{off}} = I_{\text{b}}$.

Prawdopodobieństwa obsadzeń P_{on} i P_{off} stanów **on** i **off** spełniają zgodnie z (13) równania kinetyczne

$$dP_{\text{on}}/dt = -k_{\text{on}}P_{\text{on}} + k_{\text{off}}P_{\text{off}} \quad (14)$$

$$dP_{\text{off}}/dt = k_{\text{on}}P_{\text{on}} - k_{\text{off}}P_{\text{off}} \quad (15)$$

oraz warunek normalizacji $P_{\text{on}} + P_{\text{off}} = 1$. Zgodnie z (14) i (15) czasy trwania stanów **on** i **off** są zmiennymi losowymi o rozkładzie wykładniczym

$$p_{\text{on}}(t) \square e^{-k_{\text{on}}t}, p_{\text{off}}(t) \square e^{-k_{\text{off}}t}$$

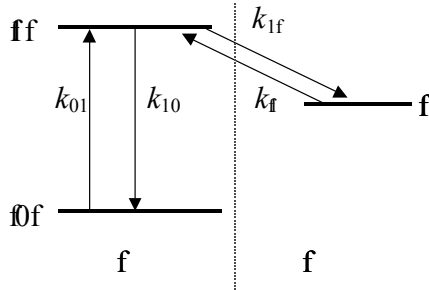
Histogram H_{off} zbudowany z czasów **off** zmierzonych eksperymentalnie jest proporcjonalny do gęstości prawdopodobieństwa $p_{\text{off}}(t)$ i ma kształt wykładniczy. Dla dostatecznie długiej trajektorii fluorescencji, histogram H_{off} pozwala wyznaczyć stałą szybkości k_{off} a tym samym czas życia trypletu $t_{\text{off}} = (k_{\text{off}})^{-1}$. Podobnie, histogram H_{on} eksperymentalnie zmierzonych czasów **on** ma kształt wykładniczy i pozwala wyznaczyć stałą szybkości k_{on} .

Cząsteczka fluoroforu oddziałuje z cząsteczkami środowiska, w którym się znajduje. Oddziaływanie to ma charakter dynamiczny i zmienia w czasie właściwości fluoroforu, np. wartości stałych szybkości k_{on} , k_{off} [33]. Jeśli w wyniku oddziaływania z otoczeniem zmieniają się właściwości fotofizyczne fluoroforu to zmienia się także intensywność fluorescencji I_{on} . Fakt, że otoczenie wpływa na właściwości cząsteczki pozwala wykorzystywać pojedyncze fluorofory jako sondy molekularne raportujące o dynamice zmian środowiska.

FLUORESCENCJA PUNKTÓW KWANTOWYCH

Fluorescencja punktów kwantowych wykazuje, podobnie jak fluorescencja barwników organicznych, okresy intensywnej fluorescencji (okresy jasne, **on**), które przeplatają się z okresami zaniku fluorescencji (okresy ciemne, **off**). Mechanizm fluorescencji punktów kwantowych nie jest jednak do końca poznany. Układ poziomów

energetycznych punktu kwantowego pokazany jest na Rys. 4, gdzie $|0\rangle$ oznacza stan podstawowy, $|1\rangle$ stan wzbudzony, zaś $|2\rangle$ stan zjonizowany, w którym elektron opuszcza nanokryształ.



Rysunek 4. Poziomy energetyczne punktu kwantowego

Przejście $|0\rangle \rightarrow |1\rangle$ o stałej szybkości k_{01} to wzbudzenie pod wpływem absorpcji promieniowania. Przejście $|1\rangle \rightarrow |0\rangle$ to dezaktywacja zachodząca ze stałą szybkości k_{10} . Przejście $|1\rangle \rightarrow |2\rangle$ to jonizacja, zaś $|2\rangle \rightarrow |1\rangle$ to rekombinacja zachodząca ze stałymi szybkości k_{12} i k_{21} . Stan jasny (**on**) odpowiada przejściom $|0\rangle \rightarrow |1\rangle \rightarrow |0\rangle$. Przejście $|1\rangle \rightarrow |2\rangle$ prowadzi do stanu ciemnego, zaś przejście $|2\rangle \rightarrow |1\rangle$ to powrót do stanu jasnego. Przykładowe wartości parametrów punktu kwantowego to stała szybkości wzbudzenia $k_{01} = 5 \times 10^2 \text{ kHz} - 5 \times 10^5 \text{ kHz}$; stała szybkości fluorescencji $k_{10} = 1 \times 10^4 \text{ kHz}$; stała szybkości przechodzenia w stan ciemny $k_{12} = 1 \times 10^2 \text{ kHz} - 1 \times 10^5 \text{ kHz}$; stała szybkości powrotu do stanu jasnego $k_{21} = 1 \times 10^2 \text{ kHz} - 1 \times 10^5 \text{ kHz}$ [16]. Układ poziomów punktu kwantowego prowadzi do skoków fluorescencji typu **on** \leftrightarrow **off**. Stała szybkości ucieczki ze stanu **on** to $k_{on} = k_{01}k_{12}/(k_{10} + k_{12})$, a stała szybkości ucieczki ze stanu **off** to $k_{off} = k_{21}$. Jeśli k_{on} i k_{off} nie zmieniałyby się w czasie, to czasy **on** i **off** miałyby rozkład wykładniczy. W eksperymencie obserwuje się jednak rozkład potęgowy [16]:

$$p_{on}(t) \propto t^{-(1+\alpha_{on})}, p_{off}(t) \propto t^{-(1+\alpha_{off})} \quad (17)$$

gdzie α_{on} i α_{off} to stałe charakterystyczne dla punktu kwantowego. Typowe wartości to $\alpha_{on} \approx 0,5$ i $\alpha_{off} \approx 0,5$.

Jeden z modeli fluorescencji punktów kwantowych zgodny z (17) zakłada, że wartości stałych szybkości k_{12} i k_{21} zmieniają się losowo po każdym przejściu $|1\rangle \rightarrow |2\rangle$ lub $|2\rangle \rightarrow |1\rangle$, gdyż zmienia się losowo wysokość bariery energetycznej pomiędzy stanami $|1\rangle$ i $|2\rangle$ [16]. Zmiany wysokości bariery energetycznej są opisane dwoma zmiennymi losowymi x , y , które są odwrotnie proporcjonalne do energii aktywacji dla przejść $|1\rangle \rightarrow |2\rangle$ i $|2\rangle \rightarrow |1\rangle$. Zmienne x i y mają rozkład wykładniczy z parametrami α_{12} i α_{21} :

$$p(x) = \alpha_{12} e^{-\alpha_{12}x}, p(y) = \alpha_{12} e^{-\alpha_{12}y}. \quad (18)$$

Po każdym przejściu *on* \leftrightarrow *off* energia aktywacji przyjmuje nową wartość zgodnie z rozkładem (18), a stałe szybkości są równe:

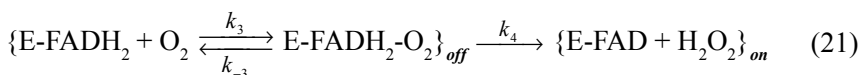
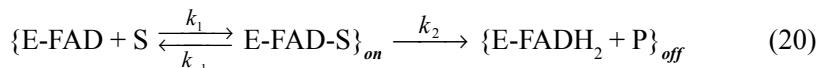
$$k_{12}(x) = k_{12}^0 e^{-x}, k_{21}(y) = k_{12}^0 e^{-y} \quad (19)$$

Model ten, dla odpowiednio dobranych parametrów α_{12} , α_{21} , k_{12}^0 , k_{12}^0 , prowadzi do potęgowego rozkładu czasów *on* i *off* [16].

OBSERWACJA AKTYWNOŚCI POJEDYNCZYCH CZĄSTECZEK ENZYMÓW

Jednym z obiecujących zastosowań SMS jest możliwość śledzenia aktywności pojedynczych biocząsteczek. Poważnym utrudnieniem przy obserwacji pojedynczych fluoroforów w warunkach fizjologicznych są ruchy Browna, które przesuwają fluorofor w polu widzenia mikroskopu. Można to pokonać unieruchamiając fluorofor np. w żelu poliakrylamidowym, bądź w agarze. Małe cząsteczki substratów poruszają się w żelu swobodnie, zaś duża cząsteczka np. enzymu jest unieruchomiona, lecz w pełni funkcjonalna.

Wiązanie ligandu z enzymem może zmienić właściwości spektroskopowe zarówno enzymu jak i substratu. Przykładem jest utlenianie cholesterolu przez oksydazę cholesterolową [23]. Schemat tej reakcji może być zapisany jako:

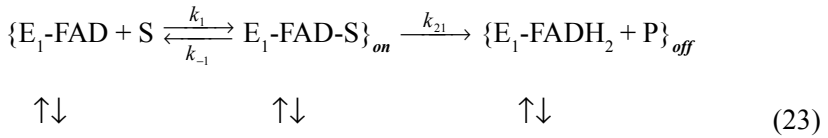


gdzie FAD to dinukleotyd flawinoadeninowy, który znajduje się w miejscu aktywnym enzymu. FAD fluoryzuje, w przeciwieństwie do formy zredukowanej FADH₂. Symbol E-FAD oznacza cząsteczkę enzymu z utlenioną (fluoryzującą) formą FAD w miejscu aktywnym. W wyniku przyłączenia się cząsteczki cholesterolu (substrat S) tworzy się kompleks enzym-substrat, E-FAD-S, w wyniku czego utleniona zostaje cząsteczka cholesterolu (produktu P) z jednoczesną redukcją FAD do (niefluoryzującego) FADH₂. Aby miejsce aktywne mogło utlenić kolejną cząsteczkę cholesterolu, cząsteczka FADH₂ musi być z powrotem utleniona do FAD, co następuje pod wpływem tlenu. Jeśli cząsteczka enzymu jest oświetlana w sposób ciągły, aktywność enzymatyczna objawia się skokowymi zmianami intensywności fluorescencji związanymi z cyklem FAD \rightarrow FADH₂ \rightarrow FAD.

Trajektoria fluorescencji wykazuje migotanie pomiędzy dwoma stanami o różnej intensywności fluorescencji, **on** \leftrightarrow **off**. Eksperymentalnie wyznaczony rozkład czasów **on** jest zgodny z reakcją (20), jeśli przyjąć, że $k_{-1} = 0$:

$$p_{on}(t) = \frac{k_2 k_2}{k_2 - k_2} 2k^{-k_2 t} - k^{-k_2 t} 2. \quad (22)$$

Analiza ilościowa mierzonych fluktuacji fluorescencji pokazała, że aktywność pojedynczej cząsteczki enzymu zmienia się w czasie. Jedną z interpretacji przyjmuje, że cząsteczka enzymu zmienia dynamicznie swoją konformację, co powoduje fluktuacje jej aktywności enzymatycznej. W najprostszym modelu reakcja (20) jest zastąpiona przez:



Mechanizm (23) i (21) oznacza, że enzym posiada efektywnie dwie konformacje, E_1 i E_2 , różniące się zdolnością E-FAD utleniania cząsteczki cholesterolu (stałe k_{21} i k_{22}), a nie różniące się szybkością wiązania cholesterolu przez FAD, ani też szybkością utleniania FADH₂ do FAD. Konformacje E_1 i E_2 nie różnią się także zdolnością do fluorescencji, tzn. dwie konformacje cząsteczki odpowiadają jednemu stanowi jasnemu **on** ($on = on_1 + on_2$).

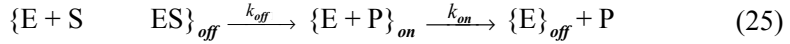
W warunkach, gdy etapy $E\text{-FAD-S} \rightarrow E\text{-FADH}_2 + P$, oraz $E\text{-FADH}_2\text{-O}_2 \rightarrow E\text{-FAD} + \text{H}_2\text{O}_2$ określają szybkości tworzenia produktu P i regeneracji miejsca aktywnego E-FAD, reakcje (23) i (21) redukują się do [24]:



gdzie $k_{on1} = k_{21}$, $k_{on2} = k_{22}$, oraz $k_{off} = k_4$. Stan **on**₁ jest stanem jasnym o konformacji 1, a stan **on**₂ jest stanem jasnym o konformacji 2. Podobnie, stany **off**₁ i **off**₂ to stan ciemny o konformacjach odpowiednio 1 i 2. Warto podkreślić, że trajektoria fluorescencji wykazuje dwie intensywności I_{on} i I_{off} ale czasy trwania czasów **on** i **off** nie są

już opisane rozkładem wykładniczym gdyż występują przejścia między konformacjami $1 \leftrightarrow 2$.

Reakcje enzymatyczne można również śledzić poprzez obserwację powstawania fluoryzującego produktu P z niefluoryzującego substratu S [29–31]:

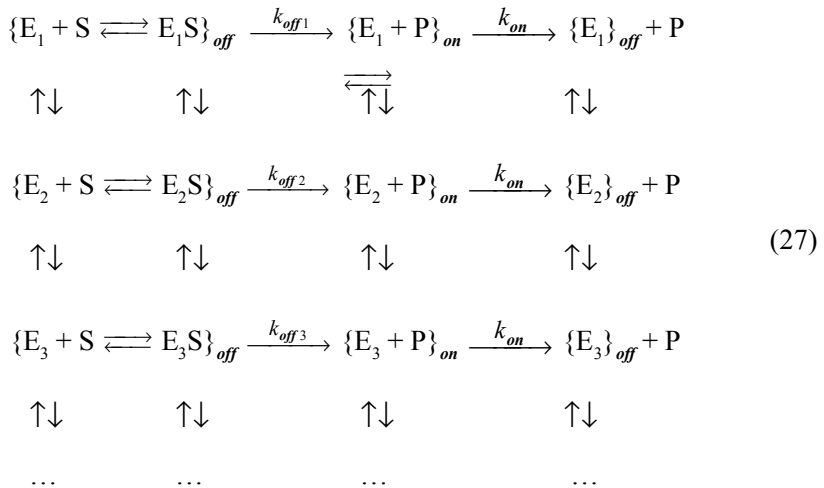


gdzie $\{E + P\}_{on}$ oznacza fluoryzującą cząsteczkę produktu, znajdującą się w pobliżu cząsteczki enzymu, a $\{E\}_{off} + P$ oznacza, że w polu obserwacyjnym, w którego centrum znajduje się cząsteczka enzymu nie ma już cząsteczki produktu. Mechanizmem przejścia *off* → *on* jest powstanie fluoryzującego produktu P, a mechanizm przejścia *on* → *off* to dyfuzja produktu poza pole widzenia.

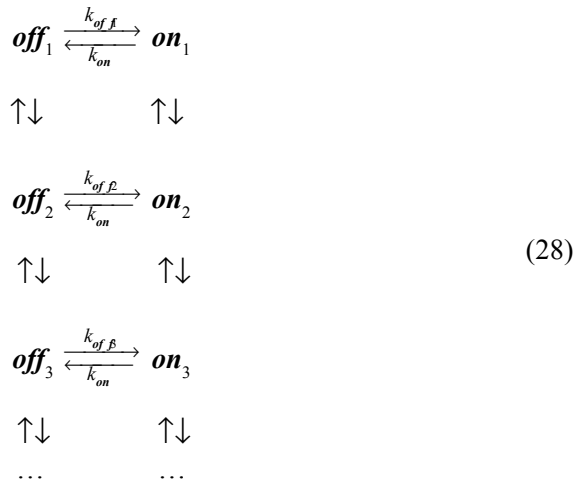
W pracach [29] i [30] stwierdzono, że histogram czasów *off* dla lipazy B z *Candida antractica* (CALB) opisany jest funkcją wykładniczo-potęgową:

$$P_{off}(t) \propto e^{-(t/\tau)^\alpha} \quad (26)$$

gdzie $\tau = 1,15 \mu\text{s}$ i $\alpha = 0,15$. Proponowana interpretacja zakłada istnienie wielu konformacji enzymu E_1, E_2, E_3, \dots , różniących się szybkością tworzenia produktu:



W warunkach, gdy etap $ES \rightarrow E + P$ określa całkowitą szybkość tworzenia produktu, schemat (27) redukuje się do schematu:



Rozkład wykładniczo-potęgowy (26) jest wynikiem „złożenia” się szeregu rozkładów wykładniczych związanych z przejściami $\text{on}_i \leftrightarrow \text{off}_i$, $i = 1, 2, 3, \dots$.

PODSUMOWANIE I PERSPEKTYWY

Badania spektroskopowe pojedynczych fluoryzujących nanoobjektów stały się dojrzałą dyscypliną naukową, która wykroczyła poza etap demonstracji możliwości detekcji pojedynczych cząsteczek i weszła w etap rozwiązywania specyficznych problemów w badaniach podstawowych oraz określenia obszarów zastosowań.

Celem niniejszego artykułu było wprowadzenia do spektroskopii fluorescencyjnej pojedynczych nanoobjektów poprzez omówienie trzech charakterystycznych przykładów zjawisk: migotania trypletu barwników organicznych, fluorescencji punktów kwantowych, oraz obserwacji aktywności pojedynczych cząsteczek enzymów.

W niniejszym artykule skupiono się na analizie trajektorii fluorescencji jako źródle informacji o fluoroforze. Dla badania zachowania się pojedynczych fluoroforów wykorzystywane są różne charakterystyki emitowanego światła. Pomiar polaryzacji umożliwia śledzenie zmian orientacji fluoroforu w czasie [4, 6]. Jeśli fluorofor jest związany z np. białkiem lub nukleotydem daje to informacje odnośnie zmian konformacyjnych. Pomiar fluorescencji z rozdzielczością czasową rzędu piko- i nanosekund (10^{-12} – 10^{-9} s) pozwalają zmierzyć czas życia fluoroforu. Czas życia jest cechą charakterystyczną dla fluoroforu i może być wykorzystany do detekcji i rozróżniania biocząsteczek znaczonych różnymi fluoroforami. Czas życia zależy od środowiska, w jakim fluorofor przebywa i informuje o hetero- lub homogeniczności środowiska, w jakich znajdują się biocząsteczki.

Szybki rozwój technologii sprawia, że dalszy kierunek rozwoju tej dziedziny jest trudny do przewidzenia. Można jednak przypuszczać, że podstawowe ograni-

czenia SPF (słaby sygnał fluorescencji, fotowycielenie fluoroforów) będą kompensowane postępowaniem technicznym umożliwiającym jednoczesny pomiar kilku parametrów (intensywność fluorescencji, widmo, czas życia, polaryzacja) [34].

SPF nie jest jedyną techniką detekcji i manipulacji pojedynczych cząsteczek i będzie łączona z metodami pozwalającymi na korelowanie przyłożonych sił i pól ze zmianami konformacyjnymi pojedynczych cząsteczek (np. AFM, ang. *atomic force microscopy*). Nieinwazyjność, wysoka rozdzielczość czasowa i przestrzenna SPF będą wykorzystywane do śledzenia zjawisk w pojedynczych komórkach i w nanośrodowiskach kontrolowanych biochemicznie (ang. *microfluidic devices*).

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] E. Moerner, L. Kador, *Phys. Rev. Lett.*, 1989, **62**, 2535.
- [2] M. Orrit, J. Bernard, *Phys. Rev. Lett.*, 1990, **65**, 2716.
- [3] E.B. Shera, N.K. Seitzinger, L.M. Davis, R.A. Keller, S.A. Soper, *Phys. Chem. Lett.*, 1990, **174**, 553.
- [4] X. Michalet, S. Weiss, *C.R. Physique*, 2002, **3**, 619.
- [5] W.E. Moerner, *J. Phys. Chem. B*, 2002, **106**, 910.
- [6] W.E. Moerner, D.P. Fromm, *Rev. Scientific Instr.*, 2003, **74**, 3597.
- [7] V. Protasenko, K.L. Hull, M. Kuno, *Chem. Educator*, 2005, **10**, 269.
- [8] M. Lippitz, F. Kulzer, M. Orrit, *Chem. Phys. Chem.*, 2005, **6**, 770.
- [9] E. Barkai, Y.-J. Jung, R. Silbey, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 2004, **55**, 437.
- [10] P. Tinnefeld, M. Sauer, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, **44**, 2642.
- [11] *Acc. Chem. Res.*, 2005, **38**, 503.
- [12] A. Molski, *J. Chem. Phys.*, 2001, **114**, 1142.
- [13] H. Piwoński, R. Kołos, A. Meixner, J. Sepioł, *Chem. Phys. Lett.*, 2005, **405**, 352.
- [14] T. Gensch, M. Böhmer, P.F. Aramendia, *J. Phys. Chem. A.*, 2005, **109**, 6652.
- [15] C. Julien, A. Debarre, D. Nutarelli, A. Richard, P. Tchenio, *J. Phys. Chem. B.*, 2005, **109**, 23145.
- [16] M. Kuno, D.P. Fromm, S.T. Johnson, A. Gallagher, D.J. Nesbitt, *Phys. Rev. B*, 2003, **67**, 125304.
- [17] X. Brokman, J.-P. Hermier, G. Messin, P. Desbiolles, J.-P. Bouhcaud, M. Dahan, *Phys. Rev. Lett.*, 2003, **90**, 2003.
- [18] G. Margolin, E. Barkai, *J. Chem. Phys.*, 2004, **121**, 1566.
- [19] F.D. Stefani, X. Zhong, W. Knoll, M. Han, M. Kreiter, *New J. Phys.*, 2005, **7**, 197.
- [20] S. Bianco, P. Grogolini, P. Paradisi, *J. Chem. Phys.*, 2005, **123**, 17404.
- [21] F.D. Stefani, W. Knoll, M. Kreiter, X. Zhong, M.Y. Han, *Phys. Rev. B*, 2005, **72**, 125304.
- [22] J. Tang, R.A. Marcus, *Phys. Rev. Lett.*, 2005, **95**, 107401.
- [23] H.P. Lu., L.X. Xun, X.S. Xie, *Science*, 1998, **282**, 1877.
- [24] G.K. Schenter, H.P. Lu., X.S. Xie, *J. Phys. Chem. A*, 1999, **103**, 104777.
- [25] H.-P. Lerch, R. Rigler, A.S. Michailov, *PNAS*, 2005, **102**, 10807.
- [26] J. Shi, B. A. Palfey, J. Dertous, K.F. Jensen, A. Gafni, D. Steel, *JACS*, 2004, **126**, 6914.
- [27] N.M. Antikainen, R.D. Smiley, S.J. Benkovic, G.G Hammes, *Biochemistry*, 2005, **44**, 16835.
- [28] L. Erdman, Z. Foldes-Papp, S. Wennmalm, R. Rigler, *Chem. Phys.*, 1999, **247**, 11.
- [29] K. Velonia, O. Flomenbom, D. Loos, S. Masuo, M. Cotlet, Y. Engelborghs, J. Hofkens, A.E. Rowan, J. Klafter, R.J.M. Nolte, F.C. de Schryver, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, **44**, 560.

-
- [30] O. Flomenbom, K. Velonia, D. Loos, S. Masuo, M. Cotlet, Y. Engelborghs, J. Hofkens, A.E. Rowan, R.J.M. Nolte, M. Van der Auweraer, F.C. de Schryver, J. Klafter, PNAS, 2005, **102**, 2368.
- [31] B. English, W. Min, A.M. van Oijen, K.T. Lee, G. Luo, H. Sun, B.J. Cheayil, S.C. Kou, X.S. Xie, Nature Chem. Biol., 2006, **2**, 87.
- [32] A. Molski, J. Hofkens, T. Gentsch, N. Boens, F. de Schryver, Chem Phys. Lett., 2000, **318**, 325.
- [33] J.A. Veerman, M.F. Garcia-Parajo, L. Kuipers, N.F. Van Hulst, Phys. Rev. Lett., 1999, **83**, 2155.
- [34] M. Prummer, B. Sick, A. Renn, U.P. Wild, Anal. Chem., 2004, **76**, 1633.

Praca wpłynęła do Redakcji 7 kwietnia 2006

**KOMPLEKSY METALI Z LIGANDAMI
BORYLOKSYLOWYMI**

METAL COMPLEXES WITH BOROXIDE LIGANDS

Sergiusz Luliński, Janusz Serwatowski

*Politechnika Warszawska, Wydział Chemiczny,
ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa*

Abstract

Wprowadzenie

1. Metody syntezy
2. Struktura boryloksylowych kompleksów metali
 - 2.1. Badania rentgenostrukturalne
 - 2.2. Ogólna charakterystyka wiązania bor-tlen
 - 2.3. Charakterystyka spektroskopowa NMR
3. Reakcje boryloksylowych kompleksów metali

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Prof. dr hab. Janusz Serwatowski, urodzony w Warszawie w 1948 r., jest profesorem nadzwyczajnym w Politechnice Warszawskiej na Wydziale Chemicznym, gdzie uzyskał dyplom mgr inż. w 1971, kolejne stopnie naukowe: dr w 1978, dr hab. w 1989 i tytuł profesora w 2001. Odbił dwa długoterminowe zagraniczne staże naukowe: trzyletni (w latach 1981–84) w Max-Planck-Institut für Kohlenforschung w Muelheim/Ruhr (Niemcy) i dwuletni (w latach 1989–91) w University of Kentucky w Lexington, KY (USA). Od roku 1993 kieruje Laboratorium Małych Technologii na Wydziale Chemicznym PW, w latach 1995–2002 pełnił funkcję prodziekana Wydziału. Jest członkiem PTChem i ACS.

Zajmuje się chemią związków metaloorganicznych metali grup głównych (głównie glinu i boru). Opublikował ponad 50 oryginalnych prac naukowych. Jest współautorem kilku patentów. Wypromował 3 doktorów.



Dr inż. Sergiusz Luliński ukończył studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej w 1996 roku, stopień doktora uzyskał w 2001 roku. Jest zatrudniony w Zakładzie Chemii Fizycznej (Laboratorium Małych Technologii) Wydziału Chemicznego PW na stanowisku adiunkta.

Zainteresowania naukowe: chemia metaloorganiczna, w tym szczególnie boro- i litoorganiczna oraz jej zastosowania w syntezie organicznej i katalizie, optymalizacja syntez związków boroorganicznych w skali wielkolaboratoryjnej, spektroskopia molekularna.

Jest autorem 12 artykułów naukowych.

ABSTRACT

The review deals with metal complexes bearing various types of boroxide ligands. It is divided into several chapters including synthesis, structural and spectroscopic (NMR) characterization followed by reactivity and catalytic properties of some novel compounds. Metal complexes with boroxide ligands can generally be defined as derivatives of hydroxydiorganoboranes R_2BOH or dihydroxyorganoboranes $RB(OH)_2$, where one or two hydrogen atoms are replaced with a metal. A few complexes with a closely related $R_2B_2O_3^{2-}$ ligand derived from triorganoboroxin $[RBO]_3$ have also been included. Boroxide ligands may be regarded as electron deficient analogues of alkoxide ligands, due to specific electronic properties of a trivalent boron atom, which is able to interact by means of its $2p$ orbital with a lone electron pair of an adjacent oxygen atom. As a result of this so-called back-bonding, the B–O bond order is increased, whereas the π -donor properties of oxygen are reduced. Accordingly, a metal oxygen bond is weakened. Another important point is that boroxides are sterically less crowding than bulky aryloxide ligands having comparable electronic properties. Hence, an increased reactivity of such complexes is expected, especially as catalysts or initiators in various polymerization processes.

Key words: boroxide ligands, metal alkoxides, hydroxyorganoboranes, polymerization

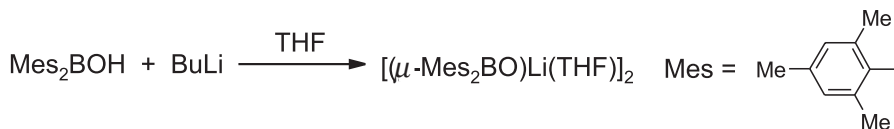
Słowa kluczowe: ligandy boryloksylowe, alkoholany, hydroksoorganoborany, polimeryzacja

WPROWADZENIE

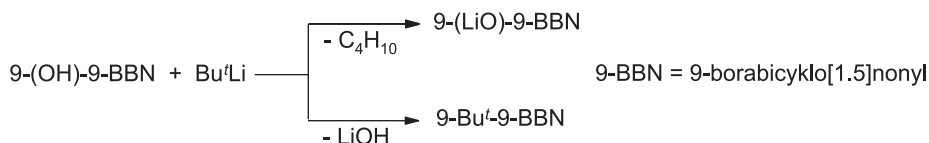
Przedmiotem niniejszego przeglądu są związki metali zawierające ligandy boryloksylowe. Można je zdefiniować jako pochodne hydroksydiorganoboranów R_2BOH lub dihydroksyorganoboranów $RB(OH)_2$, w których jeden lub dwa atomy wodoru są zastąpione atomami metalu. Omówiono także kompleksy z bardziej złożonym ligandem $R_2B_2O_3^{2-}$ wywodzącym się z triorganoboroksynu $[RBO]_3$. Ligandy boryloksylowe można traktować jako elektronodeficytowe analogi ligandów alkoksylowych. Specyficzna struktura elektronowa atomu boru, czyli obecność niezapełnionego orbitalu $2p$ wpływa na właściwości atomu tlenu. Chodzi tu w szczególności o występowanie tak zwanego wiązania zwrotnego pomiędzy borem a tlenem, które powoduje wzrost rzędu wiązania bor–tlen i równoległe osłabienie właściwości π -donorowych atomu tlenu. W efekcie wiązanie metal–tlen w kompleksach boryloksylowych powinno być słabsze i bardziej labilne niż w analogicznych kompleksach alkoksylowych. Jednocześnie nie ma takich przeszkód sterycznych w otoczeniu atomu metalu, jakie istnieją w przypadku kompleksów z objętościowymi ligandami aryloksylowymi o zbliżonym charakterze π -donorowym. Daje to nadzieję na zwiększoną reaktywność tych połączeń, szczególnie jako katalizatorów lub inicjatorów w różnych reakcjach polimeryzacji.

1. METODY SYNTEZY

Znanych jest kilka metod syntezy boryloksylowych kompleksów metali, z których najbardziej typową jest reakcja wymiany ruchliwych atomu(ów) wodoru w hydroksydiorganoboranie lub dihydroksyorganoboranie na metal. Spośród możliwych prekursorów najczęściej wykorzystywano reaktywne pochodne alkilowe, np. $BuLi$ [1], $ZnEt_2$ [2], cp_2ZrMe_2 [3]:



W niektórych przypadkach obserwuje się jednak przebiegającą równoległe lub następczo reakcję alkirowania atomu boru [4]:

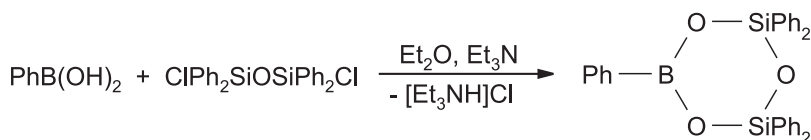


Utrudnia to otrzymanie z dobrą wydajnością wielu pochodnych gliinoorganicznych [5]. Reakcja przebiega jednak selektywnie w przypadku prekursorów z dużymi

grupami organicznymi np. Mes_2BOH [1], $[(\text{Me}_3\text{Si})_2\text{CH}]_2\text{BOH}$ [6], $2,6\text{-Pr}_2^t\text{C}_6\text{H}_3\text{B}(\text{OH})_2$ [7]. W kilku przypadkach zastosowano jako substraty amidki metali przejściowych, np. $\text{M}[\text{N}(\text{SiMe}_3)_2]_2$ ($\text{M} = \text{Mn}, \text{Fe}$) [8]:

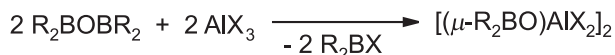


W syntezie pochodnych krzem- i cynoorganicznych użyteczne były halogenki, a nawet pochodne tlenkowe. Boracyklosiloksany powstają w reakcji kwasu borowego z odpowiednim dichlorosiloksanem w obecności trietyloaminy jako akceptora chlorowodoru [9]:



Innego typu produkty powstają w reakcji $(\text{Bu}^t_2\text{SnO})_3$ z kwasem mezytyloborowym [10].

Alternatywną metodą otrzymywania kompleksów boryloksylowych jest reakcja transmetalacji z użyciem tetraorganodiboroksanów R_2BOBR_2 (lub triorganoboroksynów $[\text{RBO}]_3$). Polega ona ogólnie na zastąpieniu grupy BR_2 (lub odpowiednio BR) przez atom metalu ze związanymi dodatkowymi ligandami. Jej użyteczność jest jednak ograniczona ze względu na mniejszą reaktywność boroksanów i boroksynów w porównaniu z substratami posiadającymi ruchliwe atomy wodoru. Z drugiej strony może być to zaletą w przypadku zastosowania reaktywnych związków metali, szczególnie o charakterze silnych kwasów Lewisa. Otrzymano w ten sposób po raz pierwszy z dobrą wydajnością dobrze zdefiniowane, krystaliczne połączenia zawierające ugrupowanie B-O-Al [11]:



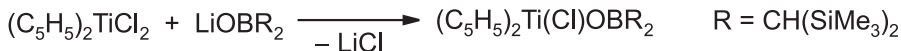
Głównym produktem reakcji $(9\text{-BBN})_2\text{O}$ z AlEt_3 (1:2) jest natomiast tris(dialumoksan) $[\text{Et}_4\text{Al}_2\text{O}]_3$, jednak udało się wydzielić w śladowych ilościach i zidentyfikować za pomocą spektrometrii masowej związek $[(\mu\text{-}9\text{-BBN-}9\text{-O})\text{AlEt}_2]_2$ [12].

W analogicznych reakcjach z użyciem triorganoboroksynów otrzymano kompleksy o bardziej złożonej strukturze [13]:



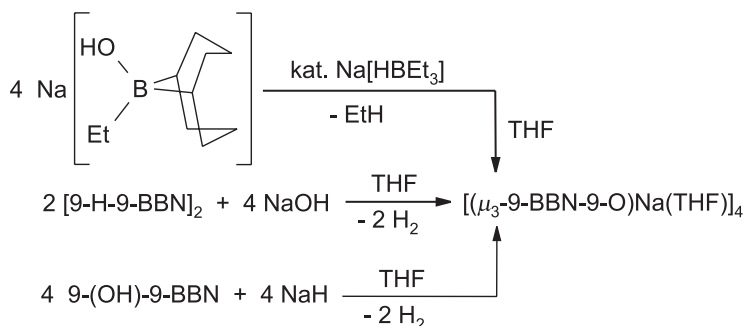
W niektórych przypadkach znalazła zastosowanie reakcja wymiany pomiędzy pochodną litową typu R_2BOLi a halogenkiem metalu. Otrzymano z wysoką wydajnością związek $9\text{-BBN-}9\text{-OSnMe}_3$ w reakcji wymiany $9\text{-BBN-}9\text{-OLi}$ z Me_3SnCl [14].

Ze względów sterycznych możliwe było podstawienie tylko jednego liganda chlorowego w $(C_5H_5)_2TiCl_2$ [6]:

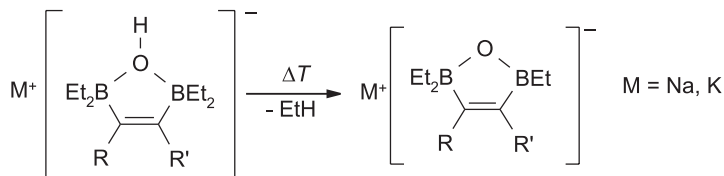


W reakcji Mes_2BOLi z $CoCl_2$ w stosunku 2:1 otrzymano natomiast krystaliczny bimetaliczny kompleks litowo-kobaltowy $[(THF)_2Li(\mu-OBMe_2)_2Co(\mu-Cl)_2Li(THF)_2]$ [1].

Reakcja dilakilohydroboranu z wodorotlenkiem sodu jest nietypowym przykładem syntezy układu typu B–O–Na [15]:

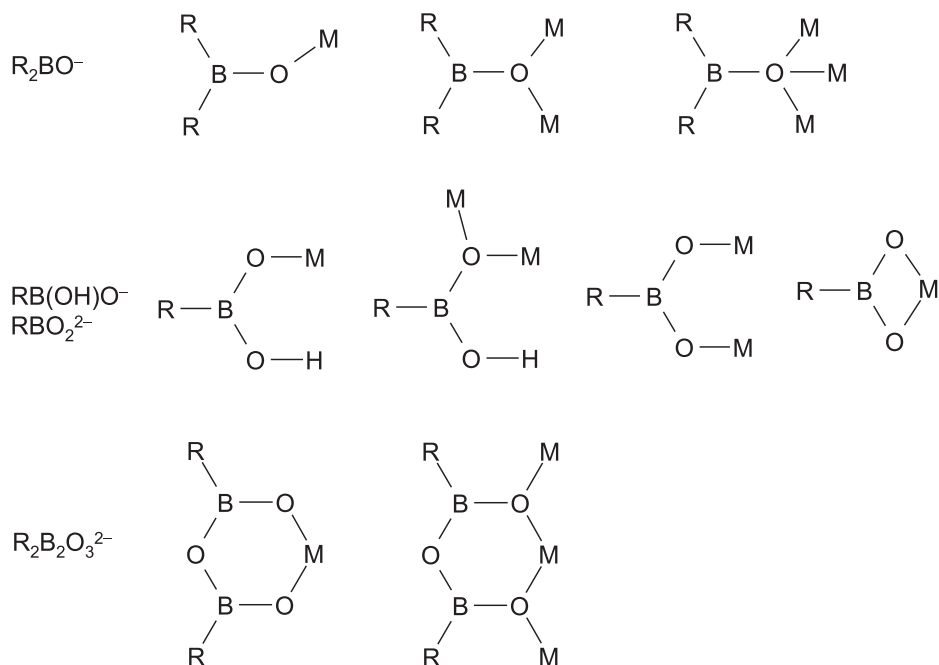


Krystaliczny związek $[(\mu_3\text{-9-BBN-9-O)Na(THF)}]_4$ otrzymano także przez rozkład soli $Na[1,5-C_8H_{14}B(OH)Et]$ [16] w obecności katalizatora $Na[BEt_3H]$ i w reakcji 9-(OH)-9-BBN z wodorkiem sodu. W wyniku pirolizy soli $M[Et_3B(OH)]$ ($M = Na, K$) przebiegającej z wydzielaniem etanu otrzymano trudno rozpuszczalne połączenia o ogólnym wzorze $[Et_2BOM]_n$. Rozkład analogicznych soli $M[R_2EtBOH]$, $R_2 =$ cyklooktan-1,5-diyl, może także przebiegać z wydzielaniem etanu i utworzeniem soli $[R_2BOM]_n$, bądź następuje dehydroborowanie układu bicyklicznego 9-BBN połączone z wydzielaniem wodoru, w rezultacie powstają połączenia typu $[R'EtBOM]_n$, $R' =$ cyklookten-4-yl. Należy w tym miejscu wspomnieć także o związkach typu $M[OB(Et_2)C(R)=C(R')B(Et)]$ ($M = Na, K$) [17]. Związki te powstają na drodze rozkładu termicznego soli otrzymanych z *cis*-diboryloalkenów $Et_2BC(R)=C(R')BEt_2$ i wodorotlenków sodu lub potasu:



2. STRUKTURA BORYLOKSYLOWYCH KOMPLEKSÓW METALI

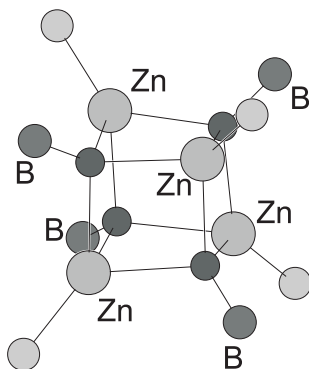
2.1. BADANIA RENTGENOSTRUKTURALNE



Rysunek 1. Typy kompleksów boryloksylowych metali sklasyfikowane ze względu na rodzaj liganda i sposób jego koordynacji

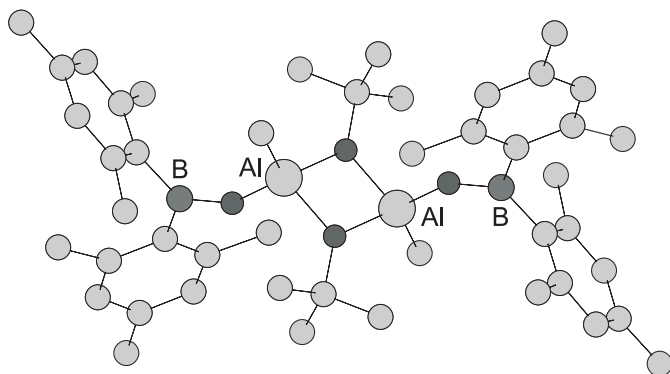
Zainteresowanie ligandami boryloksylowymi jako elektronodeficytowymi odpowiednikami ligandów alkoksylowych stało się przyczyną, dla której opisano kilkadziesiąt struktur krystalicznych (metaloksy)organoboranów. Na ogół są one stabilizowane przez dodatkowe ligandy, ale znane są także proste połączenia typu $[M(OBR_2)_n]$. Związki te są monomeryczne ($n=1$) lub tworzą układy zasocjowane, w których grupa OBR_2 najczęściej jest ligandem mostkowym (μ_2 lub μ_3). Spośród połączeń monomerycznych należy wymienić $[((Me_3Si)_2CH)_2BOLi(TMEDA)]$ [6], $Al(OBMes_2)_3 \cdot MeCN$ [18], $ScL(OBPh^F)_2$ ($L = (Et_2NCH_2CH_2NCMe)_2CH$, $Ph^F = C_6F_5$) [19], $PhCH_2Ti(OBMes_2)_3$, $Ti(NBu^i)(OBMes_2)_2(py)_2$ [20], $Hf(OBMes_2)_4$ [21], $Mo(NBu^i)_2(OBMes_2)_2$ [20], $Mo(NDip)_2(OBMes_2)_2$ ($Dip = 2,6-Pr^iC_6H_3$) [20], $[(Me_3P)_2(CO)(MeCO)Fe(\mu-3-mpz)(\mu-9-BBN-9-O)]$ ($3-mpz = 3$ -metylopirazolil) [22], $Zn[Me_2NC(NPr^i)_2(OBMes_2)] \cdot Me_2NC(NPr^i)(NHPr^i)$ [23]. Pierwszy z tych związków otrzymano z dimeru $[(\mu-((Me_3Si)_2CH)_2BO)Li]_2$ działając TMEDA a zatem wprowadzenie donora spowodowało rozpad dimeru. Charakterystyczne dla niego są bardzo krótkie wiązania B–O (1,308(8) Å) i Li–O (1,677(15) Å) oraz prawie liniowy układ wiązań B–O–Li (173,9(7)°).

Mimo oczekiwanych słabszych właściwości π -donorowych ligandów boryloksylowych, częściej spotykane są związki, w których pełnią one rolę mostków. W kompleksach dimerycznych centralnym fragmentem cząsteczki jest zatem czteroczłonowy pierścień M_2O_2 . Przykładem jest wspomniany już związek litu $[(\mu\text{-}(\text{Me}_3\text{Si})_2\text{CH})_2\text{BO})\text{Li}]_2$ [6]. Występująca w tym związku rzadko spotykana liczba koordynacyjna 2 litu jest niewątpliwie stabilizowana przez objętościowe podstawniki na atomie boru. W analogicznych związkach $[(\mu\text{-}\text{Mes}_2\text{BO})\text{Li}(\text{S})]_2$ (S = THF [1], Et_2O [24], py [24]) i $[(\mu\text{-}\text{Mes}_2\text{BO})\text{Li}(\text{MeCN})_2]_2$ [24] atom litu jest dodatkowo donorowany przez cząsteczki rozpuszczalnika, co, jak stwierdzono, ma istotny wpływ na strukturę centralnego rdzenia obejmującego pierścień Li_2O_2 i sąsiadujące z nim atomy. W kompleksie $[(\mu\text{-}\text{Mes}_2^{\text{F}}\text{BO})\text{Li}(\text{THF})]_2$ ($\text{Mes}^{\text{F}} = 2,4,6\text{-}(\text{CF}_3)_3\text{C}_6\text{H}_2$) wzrost charakteru elektroakceptorowego liganda boryloksylowego oznacza występowanie bardzo krótkiego wiązania bor–tlen (1,298(3) Å) z jednoczesnym wydłużeniem wiązania lit–tlen (1,874(5) Å) [25]. Spośród pochodnych innych elektrododatnich metali znana jest struktura molekularna tetramerycznego układu $[(\mu_3\text{-}9\text{-BBN-}9\text{-O})\text{Na}(\text{THF})]_4$ [15]. Jej centralnym elementem jest rdzeń Na_4O_4 o kształcie zdeformowanego sześciangu. Niedawno scharakteryzowano także dimeryczne kompleksy $[(\mu\text{-}\text{Mes}_2\text{BO})\text{MgR}(\text{THF})]_2$ (R = Me, Bu) oraz kompleks litowo-magnezowy $[(\mu\text{-}\text{Mes}_2\text{BO})\text{Mg}(\mu\text{-}\text{Br})_2\text{Li}(\text{Et}_2\text{O})_2]_2$ [24]. Nawiązują do nich zbliżone połączenia cynku $[(\mu\text{-}\text{Mes}_2\text{BO})\text{ZnR}]_2$ (R = Me [24], Et [26]). Liczba koordynacyjna cynku w tych związkach wynosi 3 jednak wzrasta do 4 w związku $[(\mu_3\text{-}9\text{-BBN-}9\text{-O})\text{ZnEt}]_4$ [27], co można wyjaśnić mniejszymi wymaganiami sterycznymi liganda 9-BBN-9-O⁻ w porównaniu z Mes_2BO^- . Podobną strukturę ma związek kadmu $[(\mu_3\text{-}9\text{-BBN-}9\text{-O})\text{CdMe}]_4$ [27]. Ostatnio otrzymano także trójrdzeniowy kompleks cynku (L. K. 4) z bicyklicznym ligandem guanidynowym i terminalnym ligandem boryloksylowym o wzorze $\text{Zn}_3(\text{hpp})_4(\text{OBMes}_2)_2$ (hppH = 1,3,4,6,7,8-heksahydro-2H-piryrido[1,2-a]-pirymidyna) [23].



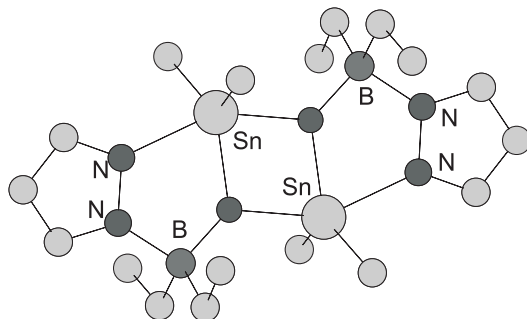
Rysunek 2. Struktura molekularna centralnego rdzenia kompleksu $[(\mu_3\text{-}9\text{-BBN-}9\text{-O})\text{ZnEt}]_4$ [27]

Związki metali grupy 13 były dość intensywnie badane ze względu na potencjalne cenne właściwości katalityczne. Dotyczy to zwłaszcza kompleksów glinu. Pierwsze doniesienia na ich temat dotyczą struktury połączeń zawierających ligandy halogenkowe. Stwierdzono występowanie dimerycznych układów z mostkami boryloksyłowymi $[(\mu\text{-Et}_2\text{BO})\text{AlCl}_2]_2$ i $[(\mu\text{-9-BBN-9-O})\text{AlBr}_2]_2$ [11]. Później scharakteryzowano analogiczne związki glino-, galo- i indoorganiczne $[(\mu\text{-9-BBN-9-O})\text{MMe}_2]_2$ (M = Al, Ga, In) [5], $[(\mu\text{-Mes}_2\text{BO})\text{AlMe}_2]_2$ [18, 28], $[(\mu\text{-Mes}_2\text{BO})\text{AlCl-Me}]_2$ [18]. W innym związku *trans*- $[\mu\text{-(Bu' O)}(\text{Mes}_2\text{BO})\text{AlMe}_2]$ grupa Mes_2BO pełni rolę liganda terminalnego, a nie jak wcześniej mostkowego [28].



Rysunek 3. Struktura molekularna *trans*- $[\mu\text{-(Bu' O)}(\text{Mes}_2\text{BO})\text{AlMe}_2]$ [28]

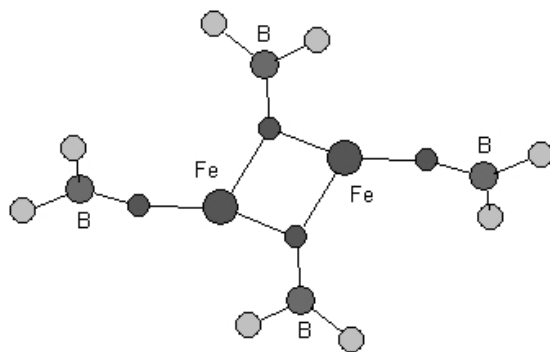
W dimerycznej strukturze związku cyny o wzorze $[(\mu\text{-Et}_2\text{BO})(\mu\text{-pz})\text{SnMe}_2]_2$ ligand pirazoliowy (pz) jest skoordynowany zarówno do cyny (L. K. 5) jak i boru (L. K. 4). Strukturę cząsteczki można zatem zdefiniować jako liniowy układ pięciu skondensowanych pierścieni cztero- i pięciocłonowych [29].



Rysunek 4. Struktura molekularna $[(\mu\text{-Et}_2\text{BO})(\mu\text{-pz})\text{SnMe}_2]_2$ [29]

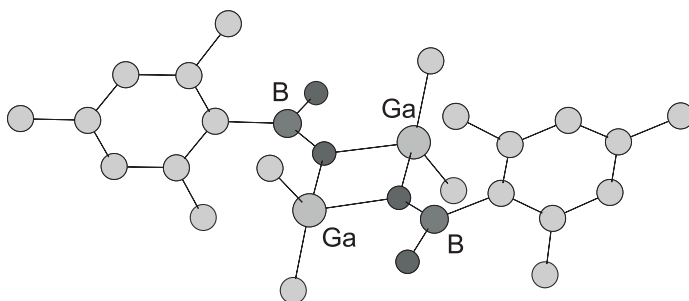
Oprócz wymienionych wyżej monomerycznych połączeń metali przejściowych (tytanu, hafnu, molibdenu) otrzymano układy dimeryczne w przypadku manganu

i żelaza: $[\text{Mn}(\text{OBTrip})_2(\mu\text{-OBTrip})_2]$ (Trip = 2,4,6-Pr^tC₆H₂) i $[\text{Fe}(\text{OBMes})_2(\mu\text{-OBMes})_2]$ [8]. W związkach tych jest stabilizowana niska liczba koordynacyjna 3 atomu metalu. Znane są także kompleksy molibdenu $[\text{Mo}(\text{NMe})_2(\text{OBMes})_2]$ [25] i wolframu $[\text{W}(\text{NMe})_2(\text{OBMes})_2]$ [30], ale ich dimeryczna struktura wynika wyłącznie z obecności wiązania potrójnego metal–metal.



Rysunek 5. Struktura molekularna centralnego rdzenia $[\text{Fe}(\text{OBMes})_2(\mu\text{-OBMes})_2]$ [8]

Oprócz kompleksów z ligandami typu R_2BO^- otrzymano szereg połączeń z ligandami $\text{RB}(\text{OH})\text{O}^-$ lub RBO_2^{2-} pochodzącymi od kwasów boronowych $\text{RB}(\text{OH})_2$. Prosta strukturę posiada związek $[(\mu\text{-MesB}(\text{OH})\text{O})\text{GaMe}_2]_2$ [26]. Reszta $\text{MesB}(\text{OH})\text{O}^-$ jest monodentnym ligandem mostkowym, a więc pełni rolę analogiczną jak ligand R_2BO^- . Ponadto nie występują w tym przypadku wiązania wodorowe stabilizujące dodatkowo strukturę.

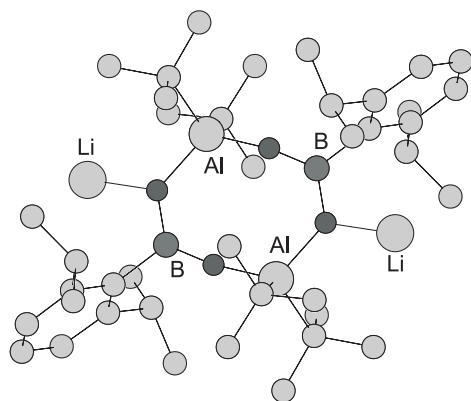


Rysunek 6. Struktura molekularna $[(\mu\text{-MesB}(\text{OH})\text{O})\text{GaMe}_2]_2$ [26]

Podobny typ struktury zaobserwowano dla związku miedzi $[(\mu\text{-PhB}(\text{OH})\text{O})\text{-CuL}]_2$, L = anion 6-(2-hydroksyfenylo)-2,2'-bipirydyny [31]. W pochodnej kwasu mezytyloboronowego o wzorze $\text{Bu}_2\text{Sn}[\text{OB}(\text{OH})\text{Mes}]_2$ [10] atom cyny jest pięciokoordynacyjny, ponieważ reszty kwasu mezytylowego są związane z atomem cyny w różny sposób. Jedna z reszt jest ligandem monodentnym natomiast druga anizobi-

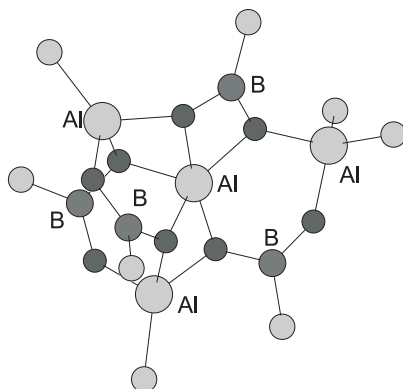
dentnym tzn. drugi atom tlenu tego liganda donoruje atom cyny, jednak w różnym stopniu, ponieważ wiązania Sn–O są różnej długości (1,97 Å i 2,75 Å).

Nie udało się określić struktury pochodnej glikoorganicznej $[\text{DipB}(\text{OH})\text{OAl}(\text{Bu}^t)_2]_2$, ale została ona zaproponowana na podstawie struktury analogicznego związku o wzorze $[(\mu\text{-DipB}(\text{OLi})\text{O})\text{Al}(\text{Bu}^t)_2]_2 \cdot 2\text{C}_6\text{H}_6$ [7]. Występuje tutaj ośmioczłonowy, centrosymetryczny pierścień $[\text{BO}_2\text{Al}]_2$, a zatem oba atomy tlenu liganda DipBO_2^{2-} biorą udział w tworzeniu wiązań z atomami glinu.



Rysunek 7. Struktura molekularna $[(\mu\text{-DipB}(\text{OLi})\text{O})\text{Al}(\text{Bu}^t)_2]_2$ [7]

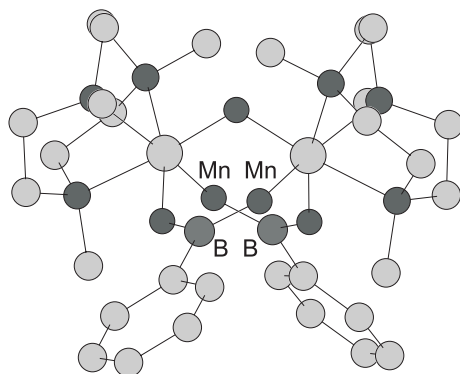
Otrzymano szereg innych struktur, w których ligand RBO_2^{2-} jest zawsze donorem dla dwóch centrów metalicznych. Ważnym przykładem jest pochodna będąca przykładem tzw. boralumoksanu $(\mu\text{-DipBO}_2)_4\text{Al}(\text{Bu}^t\text{Al})(\text{Bu}^t\text{Al})_2$ [7]. Szkielet cząsteczki stanowi asymetryczny, trójwymiarowy układ skondensowanych pierścieni cztero-, pięcio- i sześcioczłonowych. Liczba koordynacyjna atomów glinu wynosi 4, z wyjątkiem centralnie położonego, gdzie wzrasta do 5.



Rysunek 8. Struktura centralnego rdzenia boralumoksanu $(\mu\text{-DipBO}_2)_4\text{Al}(\text{Bu}^t\text{Al})(\text{Bu}^t\text{Al})_2$ [7]

Scharakteryzowano także różne połączenia pierwiastków grupy 14, w których strukturze występuje ligand RBO_2^{2-} . Określono strukturę prostych układów $\text{PhB}(\text{OSiPh}_3)_2$ i $\text{PhB}(\text{OGePh}_3)_2$ [32], a także związków o budowie cyklicznej. W przypadku boracyklotrisiloksanu $[(\text{PhBO})(\text{Ph}_2\text{SiO})_2]$ występuje sześcioczłonowy, prawie płaski pierścień $[\text{O}-\text{B}-\text{O}-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}]$. Wyraźny wzrost wartości kątów walencyjnych w boracyklotetrasiloksanie $[(\text{PhBO})(\text{Ph}_2\text{SiO})_3]$, zawierającym pierścień ośmioczłonowy, świadczy o znacznym zmniejszeniu naprężeń pierścienia w porównaniu z $[(\text{PhBO})(\text{Ph}_2\text{SiO})_2]$ [9]. W cząsteczce związku $[(\text{MesBO}_2)(\text{Bu}_2^t\text{Sn})_2-(\mu_3-\text{O})\text{SnBu}_2^t(\mu-\text{OH})_2]$ [10] występuje sześcioczłonowy pierścień $[\text{B}-\text{O}-\text{Sn}-\text{O}-\text{Sn}-\text{O}]$, dodatkowo chelatowany przez cząsteczkę $\text{SnBu}_2^t(\text{OH})_2$ na atomach ugrupowania $\text{Sn}-\text{O}-\text{Sn}$. Interesujący jest także związek $[\text{PhBOSiPh}_2\text{OSnR}_2\text{O}]$ ($\text{R} = (\text{CH}_2)_3\text{NMe}_2$), w którego strukturze zawarty jest sześcioczłonowy pierścień zawierający atomy boru, krzemu i cyny połączone poprzez atomy tlenu [33].

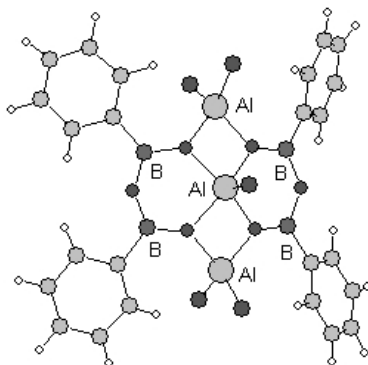
Analiza rentgenostrukturalna wykazała, że w dimerycznych cyklopentadienylowych kompleksach cyrkonu $[(\mu-\text{RBO}_2)\text{Zr}(\text{C}_5\text{H}_5)_2]_2$ ($\text{R} = \text{Ph}, \text{Mes}, \text{C}_6\text{F}_5$) występuje ośmioczłonowy, centrosymetryczny pierścień $[\text{BO}_2\text{Zr}]_2$ o konformacji krzesłowej [3]. W strukturze soli manganu (IV) $[(\mu-\text{MesBO}_2)_2\text{Mn}_2(\mu-\text{O})\text{L}_2][\text{ClO}_4]_2 \cdot 2\text{Me}_2\text{CO}$ ($\text{L} = 1,4,7$ -trimetylo-1,4,7-triazacyklononan) także można wyróżnić ośmioczłonowy pierścień $[\text{BO}_2\text{Mn}]_2$ (o konformacji łódkowej), a atomy manganu są połączone dodatkowo mostkiem tlenowym [34].



Rysunek 9. Struktura molekularna kationu kompleksowego $[(\mu-\text{MesBO}_2)_2\text{Mn}_2^{\text{IV}}(\mu-\text{O})\text{L}_2]^{2+}$ ($\text{L} = 1,4,7$ -trimetylo-1,4,7-triazacyklononan) [33]

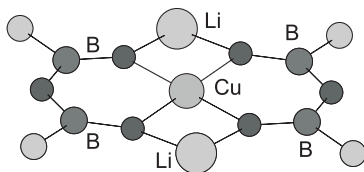
Usunięcie z pierścienia boroksynu jednego z atomów boru wraz z połączoną z nim grupą R prowadzi do liganda o wzorze sumarycznym $\text{R}_2\text{B}_2\text{O}_3^{2-}$. Ma on charakter liganda dwukleszczowego i w sensie strukturalnym nawiązuje do liganda acetyloacetonianowego acac^- . W strukturze cząsteczki najwcześniej otrzymanej pochodnej glinowej $\{[(\text{Ph}_2\text{B}_2\text{O}_3)_2\text{AlCl}][\text{AlCl}_2]_2\}$ [13] występują dwa sześcioczłonowe pierścienie $[\text{Al}-\text{O}-\text{B}-\text{O}-\text{B}-\text{O}]$ połączone przez atom glinu. Wszystkie atomy obu pierśc-

cieni leżą w jednej płaszczyźnie z wyjątkiem atomu glinu, który znajduje się nieco powyżej. Sfera koordynacyjna atomu glinu ma postać piramidy tetragonalnej z czterema atomami tlenu w podstawie i atomem chloru w wierzchołku. Wspomniane atomy tlenu są dodatkowo związane z dwoma atomami glinu (a ściślej grupami AlCl_2). Długości wiązań B–O różnią się wyraźnie: wiązanie „boroksynowe” jest krótsze (średnio około 1,36 Å) aniżeli wiązanie w ugrupowaniu B–O–Al (około 1,40 Å).



Rysunek 10. Struktura molekularna kompleksu $\{[(\text{Ph}_2\text{B}_2\text{O}_3)_2\text{AlCl}][\text{AlCl}_2]_2\}$ [13]

W późniejszych latach udało się otrzymać inne kompleksy z ligandem $\text{R}_2\text{B}_2\text{O}_3^{2-}$. W pochodnej manganu(III) $[(\text{Ph}_2\text{B}_2\text{O}_3)\text{MnL}]\text{ClO}_4$ ($\text{L} = 1,4,7$ -trimetylo-1,4,7-triaza-cyklononan) [34] jak i mieszanym kompleksie litowo-miedziowym $\{[(\text{Mes}_2\text{B}_2\text{O}_3)_2\text{-Cu}][\text{Li}(\text{py})(\text{MeCN})]_2\}$ [25] istnieje odmienna relacja długości wiązań: w pierwszym przypadku wiązania B–O „wewnątrz” liganda są wyraźnie dłuższe (1,384(6) Å) niż wiązania w ugrupowaniu B–O–Mn (1,348(4) Å). W kompleksie miedziowo litowym oba wiązania są krótsze i mają podobną długość (około 1,32 Å).



Rysunek 11. Struktura molekularna centralnego rdzenia kompleksu $\{[(\text{Mes}_2\text{B}_2\text{O}_3)_2\text{Cu}][\text{Li}(\text{py})(\text{MeCN})]_2\}$ [25]

2.2. OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA WIĄZANIA BOR–TLEN

Długość wiązania bor–tlen zmienia się w szerokim przedziale 1,29–1,42 Å. Można to wyjaśnić istotnymi różnicami w charakterze wiązań metal tlen, co wpły-

wa w zauważalnym stopniu na gęstość i rozkład ładunku w ligandzie boryloksylo-
wym. Przykładowo, silnemu wiązaniu glin–tlen ze znacznym udziałem wiązania
kowalencyjnego, wzmocnionym przez oddziaływanie $pp(\pi)$ [35], towarzyszy osła-
bienie, a więc także wydłużenie sąsiadującego wiązania bor–tlen. Inna sytuacja
występuje w przypadku bogatszych elektronowo centrów metalicznych. Ogólnie wią-
zanie to jest tym krótsze im mniejsza jest elektroujemność metalu. Jest to zrozu-
miałe, ponieważ wzrost jonowego charakteru wiązania metal–tlen powinien prowa-
dzić do wzmocnienia oddziaływania między borem a tlenem. Jednakże obserwuje
się dużą zmienność także dla pochodnych tego samego metalu. W przypadku związ-
ków zawierających ugrupowanie B–O–Li donorowanie atomu litu zwiększa cha-
rakter jonowy wiązania lit–tlen, co z kolei tłumaczy skrócenie wiązania bor–tlen
[6]. W przypadku związku manganu $[\text{Mn}(\text{OBTrip}_2)(\mu\text{-OBTrip}_2)]_2$ obserwuje się
wyraźnie krótsze wiązanie dla liganda terminalnego natomiast dla analogicznej
pochodnej żelazowej długości wiązań w grupie mostkowej i terminalnej są podobne
[8]. Wyjaśniono to różną elektroujemnością tych metali. Żelazo jest bardziej elek-
troujemne i dlatego w wiązaniu Fe–O istotną rolę odgrywa oddziaływanie π . Dlatego
nawet przy zmianie koordynacji liganda na terminalną efekt skrócenia wiązania
B–O jest nieznaczny. Kąt walencyjny B–O–M w układach z terminalnym ligandem
 R_2BO^- wykazuje dużą zmienność. W związku $[(\text{Me}_3\text{Si})_2\text{CH}_2\text{BOLi}(\text{TMEDA})]$
z dużym udziałem wiązania jonowego kąt B–O–Li sięga 180° ($173,9^\circ$) [6] nato-
miast w pochodnej $[\text{Fe}(\text{OBMe}_2)(\mu\text{-OBMe}_2)]_2$ odpowiedni kąt $\text{B}_{\text{term}}\text{-O-Fe}$ wynosi
 $143,9^\circ$. Obserwuje się także duże różnice w przypadku obecności dwóch terminal-
nych ligandów R_2BO^- w cząsteczce określonego związku, co stwierdzono na przy-
kładzie $\text{Mo}(\text{NBu}^t)_2(\text{OBMe}_2)_2$. W kompleksie tym kąty walencyjne B–O–Mo
w dwóch niezależnych krystalograficznie cząsteczkach wynoszą $174,5(6)^\circ$ i $158,4(6)^\circ$
i odpowiednio $170,4(6)^\circ$ i $158,0(6)^\circ$ [20] Duże różnice stwierdzono także w geometrii
ugrupowań B–O–Al w kompleksie $\text{Al}(\text{OBMe}_2)_3 \cdot \text{MeCN}$ [18].

2.3. CHARAKTERYSTYKA SPEKTROSKOPOWA NMR

Spektroskopia NMR jest (obok metod rentgenostrukturalnych) podstawowym
narzędziem stosowanym w badaniu struktury boryloksylowych kompleksów metali.
Obok rutynowo stosowanej spektroskopii ^1H i ^{13}C NMR, najbardziej ogólne znacze-
nie ma tutaj spektroskopia ^{11}B oraz ^{17}O NMR, ponieważ umożliwia ocenę charak-
teru wiązań w ugrupowaniu B–O–M. Spektroskopia ^{11}B NMR była stosowana sz-
erzej niż ^{17}O NMR, której czułość jest znacznie niższa, m.in. ze względu na małą
naturalną zawartość izotopu ^{17}O . W poszczególnych przypadkach stosowano także
spektroskopię NMR jąder metali: ^7Li [6], ^{27}Al [28], ^{113}Cd [27], ^{119}Sn [10, 29]. Ogra-
niczeniem spektroskopii NMR jest niemożność rejestracji widm pochodnych metali
przejściowych, zawierających niesparowane elektrony ze względu zbyt duże posze-
rzenie odpowiednich sygnałów rezonansowych.

Spektroskopia ^{11}B NMR. Przesunięcia chemiczne ^{11}B NMR kompleksów z ligandami R_2BO^- leżą na ogół w zakresie około 50–60 ppm, a tym samym nie różnią się radykalnie od wartości charakterystycznych dla odpowiednich hydroksydorganoboranów. W przypadku układów, w których atom boru związany jest dwoma atomami tlenu przesunięcia chemiczne ^{11}B NMR wynoszą około 30 ppm i są podobne jak w wyjściowych dihydroksyorganoboranach. Jednakże w szczególnych przypadkach efekt spowodowany wprowadzeniem atomu metalu jest wyraźny. Porównując wartości $\delta^{11}\text{B}$ NMR hydroksydorganoboranów lub tetraorganodiboroksanów i ich metalowanych pochodnych, stwierdzono w pewnych przypadkach różnice sięgające około 10 ppm. Przykładowo, dla kilka pochodnych hydroksydorganoboranu R_2BOH , $\text{R} = \text{CH}(\text{SiMe}_3)_2$ o wzorach $\text{R}_2\text{BOLi}(\text{TMEDA})$, $[\text{R}_2\text{BOLi}]_2$, $\text{R}_2\text{BOTi}(\text{Cl})(\text{C}_5\text{H}_5)_2$ przesunięcia chemiczne ^{11}B NMR wynoszą odpowiednio 42,5, 49,0, 53,4 ppm [6]. Zmiany te są wyraźne i niewątpliwie w dużym stopniu spowodowane osłabieniem charakteru jonowego wiązania metal–tlen w szeregu analogicznych związków. Im silniejszy jest kowalencyjny charakter wiązania metal–tlen, tym mniejszy powinien być rząd wiązania bor–tlen, a zatem przy braku dodatkowych efektów można oczekiwać, że atom boru będzie słabiej przesłaniany. W przypadku $[(\mu\text{-9-BBN-9-O})\text{AlX}_2]_2$ wartości $\delta^{11}\text{B}$ NMR wynoszą około 60 ppm. Charakterystyczny jest spadek przesłaniania jądra atomu boru w porównaniu z odpowiednimi tetraalkilodiboroksanami, w szczególności różnica pomiędzy kompleksami z ligandem Et_2BO^- a $\text{Et}_4\text{B}_2\text{O}$ sięga 8–9 ppm. Można to wyjaśnić osłabieniem oddziaływania typu $(\text{pp})\pi$ między borem a tlenem, a to z kolei wynika ze wzrostu liczby koordynacyjnej atomu tlenu z 2 do 3. W związkach metali grupy 13 o wzorze $[(\mu\text{-9-BBN-9-O})\text{MMe}_2]_2$ ($\text{M} = \text{Al}, \text{Ga}, \text{In}$) obserwuje się natomiast wyraźny wzrost przesłaniania przy przejściu od pochodnej glinowej ($\delta^{11}\text{B}$ 60,9 ppm) do indowej ($\delta^{11}\text{B}$ 56,3 ppm) [5]. Podobna różnica występuje dla tetramerycznych związków metali grupy 12 $[(\mu_3\text{-9-BBN-9-O})\text{MR}]_2$ ($\text{MR} = \text{ZnEt}, \text{CdMe}$) [27].

Spektroskopia ^{17}O NMR. Jedyne dane, jakie uzyskano do tej pory dotyczą związków posiadających ugrupowanie B–O–Al [11, 13], B–O–Ga, B–O–Zn i B–O–Cd [27]. Porównując przesunięcia chemiczne ^{17}O NMR tych związków i odpowiednich tetraalkilodiboroksanów (por. dane w Tabeli 1) można stwierdzić wzrost przesłaniania atomu tlenu, co można w dużej mierze wyjaśnić wzrostem liczby koordynacyjnej z 2 do 3 lub 4. Charakterystyczne jest jednak, że wartości $\delta^{17}\text{O}$ w związkach galu (L. K. 3) [36] i kadmu (L. K. 4) [27] są bardzo podobne mimo różnej liczby koordynacyjnej atomu tlenu.

Tabela 1. Porównanie przesunięć chemicznych ^{11}B i ^{17}O NMR, δ , ppm wybranych tetraalkilodiboroksanów i kompleksów metali z ligandami boryloksyłowymi

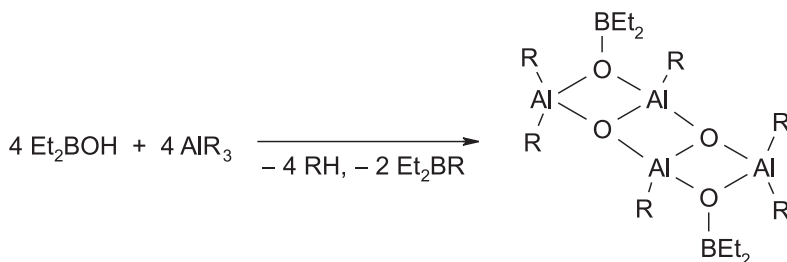
Związek	$\delta^{11}\text{B}$	$\delta^{17}\text{O}$	Lit.	Związek	$\delta^{11}\text{B}$	Lit.
$[(\mu\text{-}((\text{Me}_3\text{Si})_2\text{CH})_2\text{BO})\text{Li}]_2$	49,0		[6]	$[(\mu\text{-}9\text{-BBN-9-O})\text{AlMe}_2]_2$	60,9	[5]
$((\text{Me}_3\text{Si})_2\text{CH})_2\text{BOLi}(\text{TMEDA})$	42,5		[6]	$[(\mu\text{-}9\text{-BBN-9-O})\text{GaMe}_2]_2$	57,4	[5]
$\text{Et}_3\text{B}_2\text{O}$	52,8	223	[11]	$[(\mu\text{-}9\text{-BBN-9-O})\text{InMe}_2]_2$	56,3	[5]
$[(\mu\text{-Et}_2\text{BO})\text{AlCl}_2]_2$	60,6	128	[11]	$[(\mu_3\text{-}9\text{-BBN-9-O})\text{ZnEt}]_4$	62,6	[27]
$[(\mu\text{-Et}_2\text{BO})\text{AlBr}_2]_2$	61,7	136	[11]	$[(\mu_3\text{-}9\text{-BBN-9-O})\text{CdMe}]_4$	60,7	[27]
$[(\mu\text{-Et}_2\text{BO})\text{GaMe}_2]_2$	54,8	150,9	[36]	Me_2BOH	28,0	[10]
$[(\mu_3\text{-Et}_2\text{BO})\text{ZnEt}]_4$	60,2	135,9	[27]	$[(\mu\text{-Me}_2\text{BO})\text{AlMe}_2]_2$	57,3	[28]
$[(\mu_3\text{-Et}_2\text{BO})\text{CdMe}]_4$	58,4	154,5	[27]	$[(\mu\text{-Me}_2\text{BO})\text{GaMe}_2]_2$	50,0	[28]
$(9\text{-BBN})_2\text{O}$	58,2	207	[11]	$[(\mu\text{-Me}_2\text{BO})\text{ZnEt}]_2$	51,0	[26]
$[(\mu_3\text{-}9\text{-BBN-9-O})\text{Na}(\text{THF})]_4$	48,0		[15]	$[(\mu_3\text{-Me}_2\text{BO})\text{CdMe}]_4$	49,0	[26]
$[(\mu\text{-}9\text{-BBN-9-O})\text{AlCl}_2]_2$	62,6	121	[11]	$[(\mu\text{-Bu}'\text{O})(\text{Me}_2\text{BO})\text{AlMe}_2]_2$	49,0	[28]
$[(\mu\text{-}9\text{-BBN-9-O})\text{AlBr}_2]_2$	59,5	129	[11]	$[(\mu\text{-Me}_2\text{B}(\text{OH})\text{O})\text{GaMe}_2]_2$	31,0	[26]

3. REAKCJE BORYLOKSYLOWYCH KOMPLEKSÓW METALI

Kompleksy metali z ligandami boryloksyłowymi są w ogólności wrażliwe na wilgoć ze względu na możliwość hydrolizy ugrupowania M-O-B , podobnie jak kompleksy z ligandami alkoksyłowymi. Związki zawierające wiązanie bor alkil są podatne na utlenianie, bardziej odporne są połączenia, w których z borem są związane duże grupy np. mezytylowe. Trwałość termiczna kompleksów boryloksylowych nie była jak dotąd systematycznie badana. Piroлиза $[(\mu\text{-Et}_2\text{BO})\text{AlCl}_2]_2$ prowadzi do wydzielania lotnych związków alkiloborowych takich jak Et_3B , $\text{Et}_2\text{BO-BEt}_2$, Et_2BCl , natomiast pozostałość zawiera bliżej niezdefiniowane związki glinu. Kompleksy glinu o wzorze $[(\mu\text{-R}_2\text{BO})\text{AlX}_2]_2$ ($\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}$) są na ogół trwałe w niezbyt wysokich temperaturach ($150\text{--}300^\circ\text{C}$) [11, 13]. Związki te a także bora-cyklosiloksany [9] były oczyszczane przez destylację lub sublimację pod zmniejszonym ciśnieniem bez rozkładu.

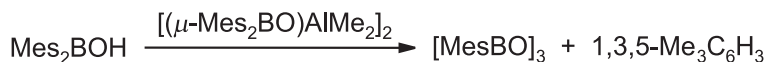
Związki glinoorganiczne z ligandami boryloksyłowymi są szczególnie interesujące, ponieważ można je traktować jako prekursorzy alkiloaluminoksanów $[\text{RAIO}]_n$, będących kluczowymi składnikami nowoczesnych układów katalitycznych typu Zieglera–Natta do polimeryzacji alkenów. Rozkład ten często przebiega w znacznym stopniu w trakcie syntezy prekursora nawet w obniżonej temperaturze, co może znacznie utrudnić jego wydzielenie z mieszaniny poreaekcyjnej zawierającej głów-

nie alumoksany [5]. Podczas badań nad otrzymywaniem alumoksanów w wyniku działania hydroksydietyloboranem na związki glinoorganiczne wyodrębniono przejściowy produkt rozkładu nietrwałego dimeru $[(\mu\text{-Et}_2\text{BO})\text{AlR}_2]_2$. Produkt ten także zawiera wiązanie B–O–Al; na podstawie danych spektroskopowych zaproponowano dla niego następującą budowę [37]:



Przedmiotem badań były reakcje kompleksów boryloksylowych glinu $[(\mu\text{-R}_2\text{BO})\text{AlX}_2]_2$ ($\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}$) z donorami elektronów: tetrahydrofuranem, pirydyną, benzonitrylem. Zaobserwowano rozkład dimerycznego układu $[\text{B-O-Al}]_2$ z utworzeniem bliżej niezdefiniowanych związków zawierających skompleksowany atom glinu. W mieszaninie z $\text{Et}_2\text{BOBET}_2$ obserwuje się szybką wymianę tlenu [11]. Związki chelatowe $\{[(\text{R}_2\text{B}_2\text{O}_3)_2\text{AlCl}][\text{AlCl}_2]_2\}$ tworzą kompleksy w stosunku 1:1 z acetonem, octanem etylu i benzonitrylem, natomiast nadmiar donora powoduje ich rozkład [13]. Związek $[(\mu\text{-Mes}_2\text{BO})\text{AlMe}_2]_2$ tworzy kompleks o składzie stechiometrycznym $(\text{Mes}_2\text{BO})\text{AlMe}_2 \cdot \text{THF}$ [36]. W reakcjach związków cynku i kadmu $[(\mu_3\text{-R}_2\text{BO})\text{MR}]_4$ ($\text{R} = \text{Et}, \text{R}_2 = 1,5\text{-C}_8\text{H}_{14}$) z 2,2'-bipirydylem obserwuje się nieselektywne reakcje tworzenia barwnych kompleksów z jednoczesnym częściowym odszczepieniem ligandów boryloksylowych i kompleksowaniem atomu boru, co wywnioskowano na podstawie danych spektroskopowych ^{11}B NMR. Otrzymano jednak dobrze zdefiniowany kompleks o składzie $(\text{Mes}_2\text{BO})\text{ZnEt} \cdot 2,2'\text{-bipy}$ [26].

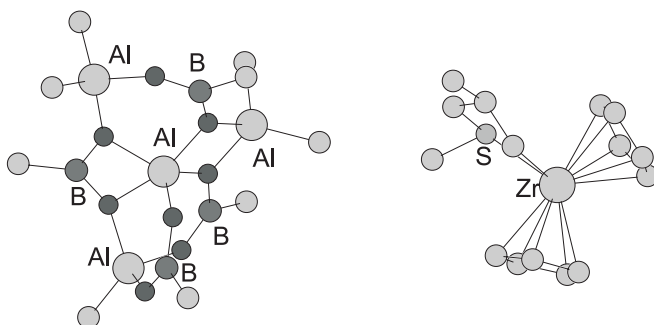
Reakcje kompleksów boryloksylowych ze związkami posiadającymi aktywny wodór były badane w niewielkim stopniu. W wyniku działania prostymi alkoholami na związek $[(\mu\text{-Mes}_2\text{BO})\text{AlMe}_2]_2$ następuje wydzielenie metanu na skutek protolizy wiązania Al–C. Jednocześnie, jak stwierdzono na przykładzie reakcji z *t*-butanolem, ulega przegrupowaniu rdzeń $[\text{BOAl}]_2$ ze względu na zmianę pozycji liganda Mes_2BO z mostkowej na terminalną w otrzymanej pochodnej [28]. Działanie kwasem borinowym 9-(OH)-9-BBN na wymieniony wyżej związek prowadzi do wymiany liganda boryloksylowego [28]. Interesującym efektem działania kwasu dimezytyloborinowego było z kolei powstanie trimezytyloboroksynu i mezytylenu. Zamiast oczekiwanego ataku na wiązanie Al–C, następuje więc katalityczne rozszczepienie wiązania B–C [18, 28]:



Analogiczne związki galu i cynku nie wykazały podobnej aktywności. Jednak ogrzewanie związku $[(\mu\text{-Mes}_2\text{BO})\text{ZnEt}]_2$ z Mes_2BOH w toluenie doprowadziło do powstania dimezytylocynku w wyniku migracji grupy mezytylowej z boru do cynku [38]:



Związki typu B–O–Al wykazują analogię strukturalną do alumoksanów, polegającą na zastąpieniu jednego atomu glinu w mostku Al–O–Al atomem boru – pierwiastka także należącego do grupy 13 układu okresowego. Dało to asumpt do badań nad potencjalnymi właściwościami katalitycznymi tej grupy związków pod kątem zastosowania w polimeryzacji alkenów. W przypadku boralumoksanu $(\mu\text{-DipBO}_2)_4\text{-Al}(\text{Bu}'_2\text{Al})(\text{Bu}'\text{Al})_2$ obserwuje się zachowanie określane terminem *latent Lewis acidity* [39, 40], jak stwierdzono na podstawie badań nad jego kompleksowaniem przez pirydynę [41]. W wyniku związania cząsteczki donora następują przegrupowania prowadzące do zmiany struktury szkieletu boralumoksanu. Wykazuje on zdolność do aktywowania cząsteczki $(\text{C}_5\text{H}_5)_2\text{ZrMe}_2$ w procesie polimeryzacji etenu. W analogicznej reakcji z $(\text{C}_5\text{Me}_5)_2\text{ZrMe}_2$ w obecności tioteru allilometylowego otrzymano krystaliczny kompleks $(\text{C}_5\text{Me}_5)_2\text{Zr}(\text{CH}_2\text{CH}(\text{Me})\text{CH}_2\text{SMe})^+[\text{MeBu}'_4\text{Al}_4\text{Dip}_4\text{B}_4\text{O}_8]$ [41]. Powstaje on poprzez oderwanie grupy metylowej i insercję alkenu do wiązania Zr–Me w utworzonym kationie $(\text{C}_5\text{Me}_5)_2\text{ZrMe}^+$.



Rysunek 12. Struktura centralnych rdzeni anionu i kationu w kompleksie $(\text{C}_5\text{Me}_5)_2\text{Zr}(\text{CH}_2\text{CH}(\text{Me})\text{CH}_2\text{SMe})^+[\text{MeBu}'_4\text{Al}_4\text{Dip}_4\text{B}_4\text{O}_8]$

Próba otrzymania układu typu Zn–O–BR₂ aktywnego w polimeryzacji ϵ -kapolaktonu i *rac*-laktydu dała wynik negatywny [24].

Boracyklotri- i tetrasiloksany ulegają reakcjom ekspansji pierścienia i polikondensacji z utworzeniem polisiloksanów i boroksynu w obecności inicjatorów takich jak KOSiMe_3 i *n*-butylolit [9].

PODSUMOWANIE

Kompleksy boryloksylowe metali budzą zainteresowanie badaczy dopiero od niedawna. Większość doniesień literaturowych pochodzi z ostatnich 10 lat. Ostatnie wyniki świadczą, że niezależnie od interesujących wartości poznawczych, szczególnie w aspekcie chemii strukturalnej, niektóre nowe układy wykazują aktywność katalityczną. Stwarza to potencjał dla kontynuowania badań nad tą grupą związków i stwarza nadzieję na ich przyszłe wykorzystanie w praktyce technologicznej, zwłaszcza zaś w procesach polimeryzacji.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] K.J. Weese, R.A. Bartlett, B.D. Murray, M.M. Olmstead, P.P. Power, *Inorg. Chem.*, 1987, **26**, 2409.
- [2] R.F. Galiulina, E.W. Sazonowa, W.A. Dodonow, *Khim. Elementoorg. Soedin.*, 1982, 33; *Chem. Abstr.*, 1983, 99, 195137.
- [3] J.E. Balkwill, S.C. Cole, M.P. Coles, P.B. Hitchcock, *Inorg. Chem.*, 2002, **41**, 3548.
- [4] R. Köster, *Houben-Weyl Methoden der Organischen Chemie*, Borverbindungen, Bd. XIII/3a, Thieme Verlag: Stuttgart, 1982, s. 603.
- [5] R. Anulewicz-Ostrowska, S. Luliński, J. Serwatowski, *Inorg. Chem.*, 1999, **38**, 3796.
- [6] G. Beck, P.B. Hitchcock, M.F. Lappert, I.A. McKinnon, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1989, 1312.
- [7] B. Richter, A. Meetsma, B. Hessen, J.H. Teuben, *Chem. Commun.*, 2001, 1286.
- [8] H. Chen, P.P. Power, S.S. Shoner, *Inorg. Chem.*, 1991, **30**, 2884.
- [9] D.A. Foucher, A.J. Lough, I. Manners, *Inorg. Chem.*, 1992, **31**, 3034.
- [10] P. Brown, M.F. Mahon, K.C. Molloy, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1992, 3503.
- [11] R. Köster, H.-Y. Tsay, C. Krüger, J. Serwatowski, *Chem. Ber.*, 1986, **119**, 1174.
- [12] J. Serwatowski, *Otrzymywanie i niektóre reakcje chemiczne tetraalkilodiboroksanów*, Prace naukowe Chemia, z. 47, Wydawnictwa Politechniki Warszawskiej, Warszawa, 1989.
- [13] R. Köster, K. Angermund, J. Serwatowski, A. Sporzyński, *Chem. Ber.*, 1986, **119**, 1301.
- [14] R. Köster, *Houben-Weyl Methoden der Organischen Chemie*, Borverbindungen, Bd. XIII/3a, Thieme Verlag: Stuttgart, 1982, s. 602.
- [15] R. Köster, G. Seidel, D. Bläser, R. Boese, *Z. Naturforsch. B*, 1994, **49**, 370.
- [16] R. Köster, G. Seidel, B. Wrackmeyer, *Chem. Ber.*, 1992, **125**, 617.
- [17] R. Köster, G. Seidel, *Chem. Ber.*, 1992, **125**, 627.
- [18] V.C. Gibson, S. Mastroianni, A.J.P. White, D.J. Williams, *Inorg. Chem.*, 2001, **40**, 826.
- [19] A.-M. Neculai, C.C. Cummins, D. Neculai, H.W. Roesky, G. Bunkoczi, B. Walfort, D. Stalke, *Inorg. Chem.*, 2003, **42**, 8803.
- [20] S.C. Cole, M.P. Coles, P.B. Hitchcock, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2002, 4168.
- [21] S.C. Cole, M.P. Coles, P.B. Hitchcock, *Dalton Trans.*, 2004, 3428.
- [22] G. Bellachioni, G. Cardaci, V. Gramlich, A. Macchioni, F. Pieroni, L.M. Venanzi, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1998, 947.
- [23] S.J. Birch, S.R. Boss, S.C. Cole, M.P. Coles, R. Haigh, P.B. Hitchcock, A.E.H. Wheatley, *Dalton Trans.*, 2004, 3568.
- [24] S.C. Cole, M.P. Coles, P.B. Hitchcock, *Organometallics*, 2004, **23**, 5159.
- [25] V.C. Gibson, C. Redshaw, W. Clegg, M.R.J. Elsegood, *Polyhedron*, 1997, **16**, 2019.
- [26] R. Anulewicz-Ostrowska, S. Luliński, E. Pindelska, J. Serwatowski, *Inorg. Chem.*, 2002, **41**, 2525.

- [27] S. Luliński, I. Madura, J. Serwatowski, J. Zachara, *Inorg. Chem.*, 1999, **38**, 4937.
- [28] R. Anulewicz-Ostrowska, S. Luliński, J. Serwatowski, K. Suwińska, *Inorg. Chem.*, 2000, **39**, 5763.
- [29] K. Niedenzu, H. Nöth, J. Serwatowska, J. Serwatowski, *Inorg. Chem.*, 1991, **30**, 3249.
- [30] M.H. Chisholm, K. Folting, S.T. Haubrich, J.D. Martin, *Inorg. Chim. Acta*, 1993, **213**, 17.
- [31] D.A. Bardwell, J.C. Jeffery, M.D. Ward, *Polyhedron*, 1996, **15**, 2019.
- [32] D. Murphy, J.P. Sheehan, T.R. Spalding, G. Ferguson, A.J. Lough, J.F. Gallagher, *J. Mat. Chem.*, 1993, **3**, 1275.
- [33] J. Beckmann, K. Jurkschat, N. Pieper, M. Schurman, *Chem. Commun.*, 1999, 1095.
- [34] U. Bossek, H. Hummel, T. Weyhermüller, K. Wieghardt, S. Russell, L. van der Wolf, U. Kolb, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1996, **35**, 1552.
- [35] A.R. Barron, K.D. Dobbs, M.M. Francl, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 3943.
- [36] S. Luliński, *Otrzymywanie, struktura i właściwości (metaloksy)diorganoboranów*, Rozprawa doktorska, Wydawnictwa Politechniki Warszawskiej, Warszawa, 2001.
- [37] L. Synoradzki, M. Bolesławski, J. Lewiński, *J. Organomet. Chem.*, 1985, **284**, 1.
- [38] S.C. Cole, M.P. Coles, P.B. Hitchcock, *Dalton Trans.*, 2003, 3663.
- [39] M.R. Mason, J.M. Smith, S.G. Bott, A.R. Barron, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 4971.
- [40] C.J. Harlan, S.G. Bott, A.R. Barron, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 6465.
- [41] B. Richter, A. Meetsma, B. Hessen, J.H. Teuben, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, **41**, 2166.

Praca wpłynęła do Redakcji 27 czerwca 2006

ZASTOSOWANIE GLIKALI W SYNTEZIE GLIKOPIRANOZ I GLIKOPIRANOZYDÓW

APPLICATION OF GLYCALS IN THE SYNTHESIS OF GLYCOPYRANOSES AND GLYCOPYRANOSIDES

Beata Liberek

*Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański,
ul. J. Sobieskiego 18, 80-952 Gdańsk
e-mail: beatal@chem.univ.gda.pl*

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Przyłączenie wody do glikali
2. Synteza 2-deoksyglikozydów, 2.1. Aktywowana kwasem addycja alkoholi, 2.2. Alkoksyrtycowanie połączone z odrtycowaniem, 2.3. Halogenoglikozydowanie, 2.3.1. Jodoglikozydowanie, 2.3.1.1. Bezpośrednie jodoglikozydowanie, 2.3.1.2. Pośrednie jodoglikozydowanie, 2.3.2. Fluoroglikozydowanie, 2.4. Tio- oraz selenoglikozydowanie, 2.5. Inne metody syntezy 2-deoksyglikozydów
3. Synteza 2-amino-2-deoksyglikozydów, 3.1. Nitrozochlorowanie, 3.2. Azydoazotanowanie, 3.3. Azydofenyloselenylowanie, 3.4. Jodosulfonamidowanie, 3.5. Inne metody syntezy 2-amino-2-deoksyglikozydów
4. Synteza glikozydów z grupą 2-hydroksylową, 4.1. Epoksydowanie, 4.2. Utleniające glikozydowanie glukozy
5. Przegrupowanie Ferrera
6. Hydroksyrtycowanie prowadzące do α,β -nienasyconych aldehydów
7. Cyklopropanowanie, 7.1. Reakcja Simmonsa-Smitha, 7.2. Addycja dihalogenokarbenu, 7.3. Addycja diazoocetanu etylu
8. Cykloaddycja

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Dr Beata Liberek ukończyła studia chemiczne na Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Pracę doktorską pt.: „Synteza *O*-, *N*- i *S*-glikozydów o strukturze 2-deoksy-2-hydroksyimino i 2,3-dideokso-2-eno reszty cukrowej oraz ich chemiczna modyfikacja” obroniła w roku 1998. W latach 1996–1998 asystent, a od roku 1998 adiunkt w Zakładzie Chemii Cukrów, Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego.

Jest współautorką 12 prac z dziedziny chemii cukrów.

ABSTRACT

Glycals, systematically named 1,5-(or 1,4-)anhydro-2-deoxy-hex-(or -pent-)1-enitols [1], possess a double bond between C-1 and C-2 carbon atoms of a pyranose or furanose ring and are one of the most useful substrates in carbohydrate chemistry. Presence of the double bond in glycals makes them possible to undergo variety of the reactions, including different additions, hydroxylation, epoxydation, cycloadditions, allylic rearrangement and many others. The majority of these reactions were described in 1960s and 1980s by Ferrier [5, 6]. However, applications of glycals, especially as glycosyl donors, have been systematically developed and new methodologies have been employed in the last decade. This paper presents useful procedures, mainly resulting in the stereoselective synthesis of a glycoside bond.

The presented applications of glycals are divided into following groups: addition of water [7–11], synthesis of 2-deoxyglycosides [12–77], synthesis of 2-amino-2-deoxyglycosides [78–107], synthesis of glycosides possessing 2-hydroxy group [108–120], Ferrier rearrangement [121–146], formation of the α,β -unsaturated aldehydes [147–158], cyclopropanation [159–168] and cycloaddition [169–181].

Keywords: glycal, electrophilic addition, 2-deoxyglycoside, 2-amino-2-deoxyglycoside, epoxydation, Ferrier rearrangement, α,β -unsaturated aldehyde, cyclopropanation, cycloaddition

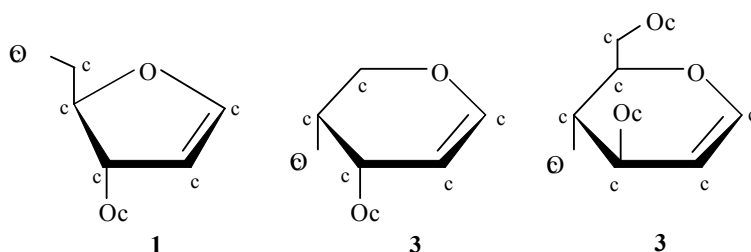
Słowa kluczowe: glikal, elektrofilowa addycja, 2-deoksyglikozyd, 2-amino-2-deoksyglikozyd, epoksydowanie, przegrupowanie Ferriera, α,β -nienasycony aldehyd, cyklopropanowanie, cykloaddycja

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

Ac	acetyl
AIBN	2,2'-azobis(izobutanonitryl)
Bn	benzyl
BTI	bistrifluorooctan fenylojodu
CAN	azotan(V) cerowo(IV)amonowy
DBTO	5-tlenek dibenzotiofenu
DMDBTO	5-tlenek 2,8-dimetylodibenzotiofenu
DMDO	2,2-dimetylodioksiran
DTBMP	2,6-di- <i>t</i> -butylo-4-metylopirydyna
EDA	diazooctan etylu
IDCP	kompleks nadchloranu(VII) jodu(I) z dwoma cząsteczkami <i>s</i> -kolidyny
LHMDS	heksametylodisililoazydek litu
NIS	<i>N</i> -jodosukcynimid
TBDMS	<i>t</i> -butyloдимetylosilil
TBDPS	<i>t</i> -butyloдифенylosilil
TBSOTf	triflan tributylosililu
Tf ₂ O	bezwodnik triflanowy
TIPS	triizopropylosilil
TMSNHAc	<i>N</i> -(trimetylosililo)acetamid
TMSOTf	triflan trimetylosililu
TPHB	addukt trifenylofosfiny i bromowodoru
TSO	5-tlenek tioantrenu
UDP	urydynodifosforan

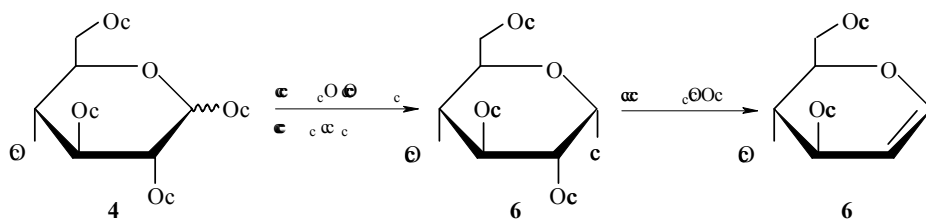
WPROWADZENIE

Glikale to pochodne cukrów zawierające podwójne wiązanie między atomami węgla C-1 i C-2 pierścienia piranozowego bądź furanozowego (Rys. 1). Systematyczna nazwa tej grupy związków wywodzi się od 1,4- lub 1,5-anhydroalditolu i np. dla pochodnej *D*-arabinozy o pierścieniu furanozowym brzmi: 1,4-anhydro-2-deoksy-*D*-erytro-pent-1-enitol (**1**), dla pochodnej *D*-arabinozy o pierścieniu piranozowym: 1,5-anhydro-2-deoksy-*D*-erytro-pent-1-enitol (**2**), a dla pochodnej *D*-glukozy: 1,5-anhydro-2-deoksy-*D*-arabino-heks-1-enitol (**3**) [1]. Zwyczajowo związki te nazywa się tak jak cukier, od którego pochodzą, zmieniając końcówkę -oza na -al, np. arabinal (**1,2**) i glukal (**3**). Ten uproszczony sposób nazewnictwa będą stosowała dalej. W niniejszej pracy swoje rozważania ograniczę do glikali o pierścieniu piranozowym.



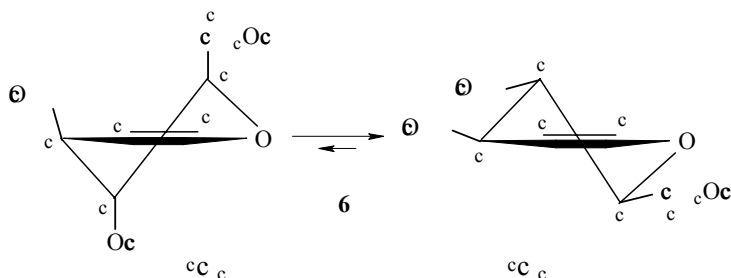
Rysunek 1

Procedurę otrzymywania 3,4,6-tri-*O*-acetylo-*D*-glukalu (**6**) opracował Fischer w roku 1913 i po dzień dzisiejszy jest to najefektywniejsza metoda pozyskiwania per-*O*-acetyloglikali o pierścieniu piranozowym [2]. Metoda Fischera polega na przekształceniu *D*-glukozy (**4**) w bromek tetra-*O*-acetylo- α -*D*-glukopiranozylu (**5**) i poddaniu go redukcyjnej eliminacji za pomocą cynku w kwasie octowym (Rys. 2). Różne modyfikacje procedury Fischera oraz inne metody otrzymywania glikali zostały opisane przez Priebe i Gryniewiczza [3].



Rysunek 2

Obecność podwójnego wiązania w pierścieniu piranozowym sprawia, że glikale występują w dwóch konformacjach półkrzesłowych: 4H_5 i 5H_4 , które wzajemnie się w siebie przekształcają (Rys. 3). Przesunięcie stanu równowagi konformacyjnej na korzyść jednego z konformerów glikalu zależy od czynników trwałości, które występują w danej konformacji [4].



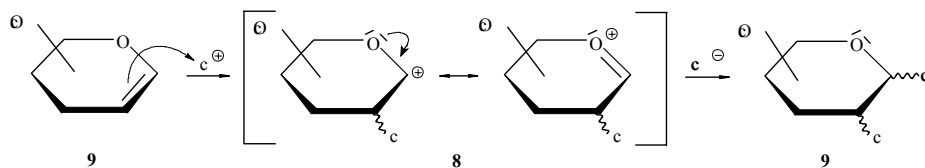
Rysunek 3

Podwójne wiązanie występujące między atomami węgla C-1 i C-2 pierścienia piranozowego, tym bardziej interesujące, że dotyczące węgla anomerycznego, powoduje iż glikale są bardzo powszechnie stosowanymi substratami cukrowymi. Jako związki nienasycone ulegają one wszelkiego rodzaju reakcjom addycji, typowym dla alkenów, np. addycji wodoru, halogenu, halogenowodoru, alkoholi i fenoli, kwasu octowego. Charakter nienasycony tych związków umożliwia także utlenianie do oksiranów, hydroksylowanie, hydroksy- i alkoksyrtycowanie, halogenoalkoksylowanie, cykloaddycję oraz przegrupowanie allilowe, znane w chemii cukrów jako przegrupowanie Ferriera. Znaczna część wymienionych reakcji glikali została opisana w latach 60. i 80. XX wieku przez Ferriera [5, 6]. Jednakże, od tamtego czasu możliwości aplikacyjne glikali w syntezie cukrów tylko rosły. Spośród licznych zastosowań tej grupy związków chciałam przedstawić powszechnie stosowane procedury, koncentrując się przede wszystkim na możliwości stereoselektywnego tworzenia wiązania glikozydowego.

1. PRZYŁĄCZENIE WODY DO GLIKALI

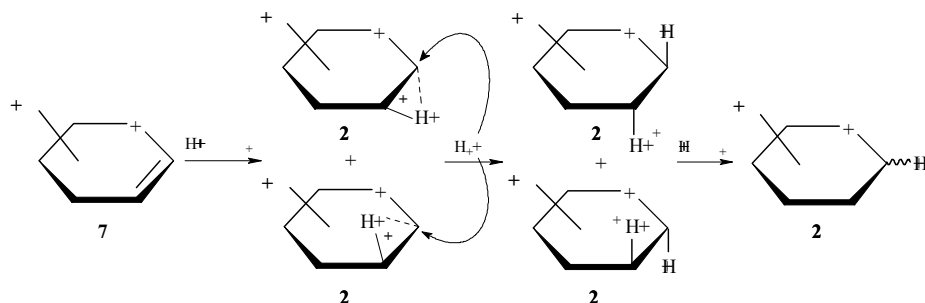
Przyłączenie wody do glikali jest przykładem addycji elektrofilowej, w wyniku której powstają 2-deoksycukry. Addycja elektrofilowa do glikali jest reakcją regioselektywną, co bierze się z faktu, iż każdy elektrofil przyłącza się do podwójnego wiązania glikalu tak, żeby wytworzyć trwalszy produkt pośredni reakcji. Tym trwałszym produktem pośrednim jest kation karboksoniowy (**8**, Rys. 4), powstały po dołączeniu elektrofila do atomu węgla C-2 pierścienia piranozowego (**7**). Większa trwałość tego kationu wynika z możliwości rozmycia ładunku dodatniego na pierście-

niowy atom tlenu, co jest rezultatem efektu mezomerycznego. Dlatego, wszystkie reakcje addycji elektrofilowej do glikali przebiegają tak, że część elektrofilowa przyłącza się do atomu węgla C-2 pierścienia cukru, a część nukleofilowa do anomearycznego atomu węgla (9).



Rysunek 4

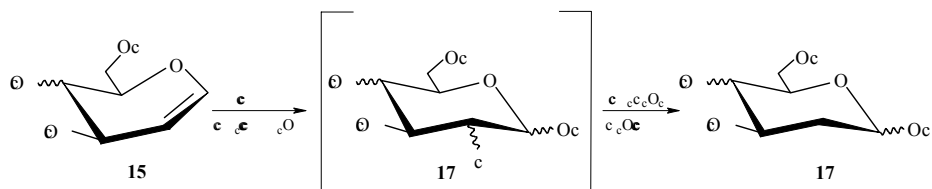
Bezpośrednia addycja wody do podwójnego wiązania glikalu wymaga zastosowania protonodonorowego kwasu i w zależności od warunków reakcji prowadzi do pożądanego 2-deoksycukru, ale też do różnych produktów ubocznych [5, 6]. Ponieważ 2-deoksycukry są ważnymi elementami strukturalnymi szeregu bioaktywnych substancji, wciąż są poszukiwane skuteczne i proste metody pośredniej addycji wody do glikali. Taką klasyczną procedurą jest hydroksyręćciowanie, połączone z odręćciowaniem, które biegnie przez cykliczny kation rtęciowy (10 i 11) regioselektywnie i ze stereochemią *anti* (Rys. 5).



Rysunek 5

Reakcję hydroksyręćciowania połączonego z odręćciowaniem zastosowali Bettelli i wsp. [7], którzy mono-, di- oraz trisacharydowe glikale, zabezpieczone grupami funkcyjnymi takimi jak Bn, Ac i TIPS, przekształcali w odpowiednie 2-deoksycukry, stosując octan rtęci(II) i borowodorek sodu. Ta sama grupa badaczy wykorzystwała strategię hydroksyręćciowania i odręćciowania do pozyskiwania 2-deoksydisacharydów, które następnie przekształcali w glikozylofitosfingozyny [8].

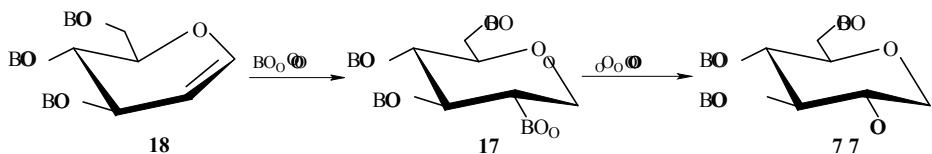
Odmianą metodę pośredniej addycji wody do glikali opracowali Costantino i wsp. [9]. Podziałali oni na glikal 15 *N*-jodosukcynimidem, a następnie usunęli atom jodu za pomocą ditionianu sodu (Rys. 6).



Rysunek 6

Z kolei De Corso i wsp. [10] przeprowadzili addycję kwasu jodowego(I) do glikali, uzyskując odpowiednią 2-jodopiranozę. Kwas HOI był generowany *in situ* w mieszaninie reakcyjnej, składającej się z odpowiedniego związku nienasyconego, jodu oraz bistrifluoroctanu fenyljodu(III) w roztworze $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$.

Pośrednia addycja wody do glikali, przeprowadzona poprzez borowodorowanie połączone z utlenianiem jest metodą otrzymywania 1,5-anhydroalditoli (**20**, Rys. 7) [11]. Stwierdzono, że borowodorowanie podwójnego wiązania glikalu biegnie od strony płaszczyzny pierścienia przeciwnej do grupy 3-OBn.



Rysunek 7

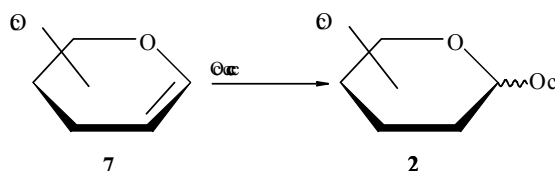
2. SYNTEZA 2-DEOKSYGLIKOZYDÓW

2-Deoksyglikozydy są ważną grupą związków w chemii węglowodanów, gdyż stanowią elementy strukturalne szeregu biologicznie aktywnych substancji. Choć co roku ukazują się wiele prac dotyczących ich otrzymywania to synteza 2-deoksyglikozydu dla każdego związku stanowi nowe wyzwanie. Najbardziej użytecznymi substratami w preparatyce 2-deoksyglikozydów są glikale.

2.1. AKTYWOWANA KWASEM ADDYCJA ALKOHOLI

Addycja związku o charakterze alkoholu (np. alkohol, fenol, cukier) do podwójnego wiązania glikalu wymaga zastosowania protonodonorowego kwasu, który inicjuje reakcję elektrofilowego przyłączenia [5]. Niestety użycie kwasu, tak jak w przypadku bezpośredniej addycji wody, powoduje tworzenie się produktów ubocznych, będących najczęściej rezultatem przegrupowania Ferriera (pkt 5).

W roku 1990 Falck i Mioskowski [12] wykazali, że zastosowanie adduktu trifenylfosfiny i bromowodoru (TPHB) aktywuje glikale w reakcji addycji związków o charakterze alkoholu, a jednocześnie zapobiega powstawaniu produktów reakcji Ferriera (Rys. 8). Reakcja glikozydowania z udziałem TPHB jest wysoce stereoselektywna i prowadzi głównie do 2-deoksyglikozydów o konfiguracji α anomerycznego atomu węgla (pochodne D-glukalu, 6-deoksy-D-glukalu, D-galaktału i L-fukalu) [13, 14]. W przypadku pochodnych D-allalu w produktach reakcji dominują anometry β [13, 15]. Kaila i wsp. badali stereochemię reakcji przyłączania alkoholi do glikali katalizowanej TPHB i wykazali, że jest to addycja typu *cis* [16]. Metodę Falcka-Mioskowskiego stosowano m.in. w wieloetapowych syntezach, prowadzących do biologicznie aktywnych, opartych o szkielet cukrowy, mimetyków [17, 18].



Rysunek 8

Sebesan i wsp. [19] zaproponowali użycie specjalnie przygotowanej żywicy jako protonodonorowego katalizatora w reakcji addycji wody oraz związków o charakterze alkoholu do glikali. Reakcję glikozydowania prowadzono na takiej żywicy w roztworze acetonitrylu w obecności bromku litu. Jako substraty przetestowano *per-O*-acetylo-D-glukal, -D-galaktał, L-fukal, -L-ramnal i -D-laktal, a akceptorami glikozydu były m.in. woda, alkohol metylowy i alilowy oraz diizopropylidenogalaktopiranoza. Analogiczną do Sebesana procedurę zastosowali rosyjscy badacze, którzy α -stereoselektywnie glikozylowali pierwszo- i drugorzędowe grupy hydroksylowe w triterpenach, cholesterolu i deoksyholonianie metylu [20, 21].

Curran i wsp. użyli kwasu *p*-toluenosulfonowego jako katalizatora reakcji addycji diizopropylidenogalaktopiranozy do pochodnej benzylo-D-glukalu, zawierającej w pozycjach *para* grup ochronnych fluorowane podstawniki [22]. Kwas kamforosulfonowy był najlepszym katalizatorem dla reakcji addycji do glikalu, pochodzącego od wankozaminy [23], a triflan trimetylosililu dla reakcji addycji do glikalu, pochodzącego od akozaminy [24]. W przypadku reakcji tri-*O*-acetylo-D-galaktału z podstawionymi w pozycji *para* pochodnymi fenolu, w obecności kwasu octowego, powstawały z dużą wydajnością wyłącznie odpowiednie 2-deoksy- α -D-glikozydy [25]. Te same warunki reakcji zastosowane dla tri-*O*-acetylo-D-glukalu powodowały powstawanie 2,3-nienasyconych glikozydów, produktów przegrupowania Ferriera.

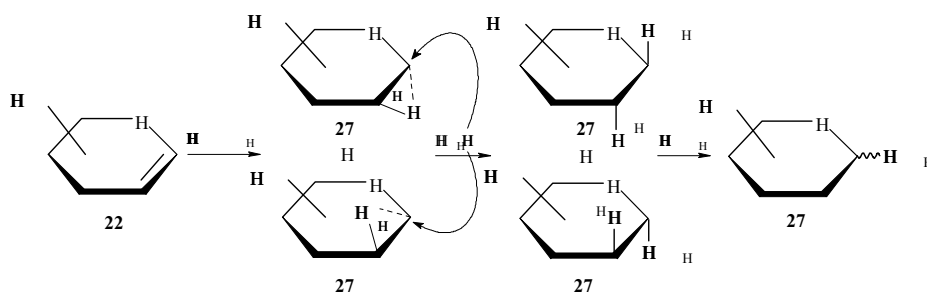
Jeżeli grupy hydroksylowe glikalu zabezpieczone są osłoną *t*-butylodimetylosililową (TBDMS) to reakcję addycji alkoholu można prowadzić z zastosowaniem trichlorku lub tribromku boru jako katalizatora w roztworze dichlorometanu [26].

Autorzy tej procedury zakładają, że w początkowym jej etapie trihalogenek boru reaguje z alkoholem wytwarzając w ten sposób katalityczne ilości halogenowodoru.

Yadav i wsp. [27] zaproponowali użycie siedmiowodzianu chlorku ceru(III) połączonego z jodkiem sodu jako łagodnego reagenta, który w wysoce stereoselektywny sposób wspomaga reakcję D-glikali z alkoholami, prowadzącą do 2-deoksy- α -D-glikozydów. W nieobecności jodku sodu zastosowanie tego samego reagenta prowadzi wyłącznie do produktów przegrupowania Ferriera. Zakłada się, że w metodzie tej glikale są aktywowane jodowodorem, tworzącym się *in situ* w reakcji alkoholu i jodku sodu w obecności chlorku ceru(III).

2.2. ALKOKSYRĘCĄCOWANIE POŁĄCZONE Z ODRĘCĄCOWANIEM

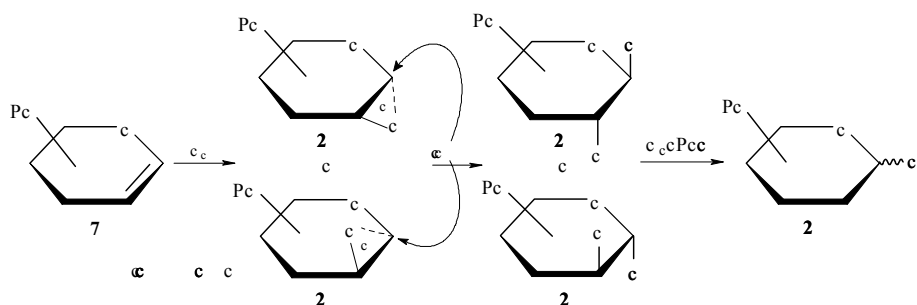
Glikale w reakcji z octanem rtęci(II) w roztworze metanolu ulegają reakcji metoksyrtęciowania [5, 6, 28]. Jest to analogiczna do hydroksyręciowania addycja elektrofilowa o stereochemii *anti*, która biegnie przez cykliczny kation rtęciowy (**23** i **24**, Rys. 9). Reakcja ta nie znalazła szerszego zastosowania w syntezie 2-deoksyglikozydów.



Rysunek 9

2.3. HALOGENOGLIKOZYDOWANIE

Glikal w reakcji z halogenem (Cl_2 , Br_2 , I_2) w roztworze alkoholowym ulega halogenoalkoksylovaniu (Rys. 10), które jest addycją o stereochemii *anti* i prowadzi do 1,2-*trans*-2-halogenoglikozydów (**30** i **31**) [5, 13]. Diastereoselektywność tej reakcji zależy od trwałości poszczególnych cyklicznych kationów. Ogólnie selektywność reakcji halogenoalkoksylovania rośnie w szeregu: $\text{Cl}_2 < \text{Br}_2 < \text{I}_2$ [13]. Redukcyjne usunięcie grupy halogenowej z 2-halogenoglikozydu zachodzi łatwo i prowadzi do 2-deoksyglikozydów (**32**).



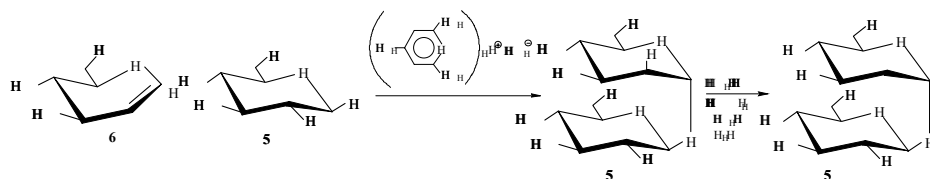
Rysunek 10

Najpowszechniej stosowaną reakcją halogenoalkoksyłowania w celu uzyskania 2-deoksyglikozydów jest jodoalkoksyłowanie. Charakteryzuje się ono stereochemią *anti* i wysoką diastereoselektywnością, polegającą na powstawaniu głównie 2-deoksy-2-jodoglikozydów o konfiguracji α anomerycznego atomu węgla. Atom jodu usuwa się łatwo w wyniku redukcji.

2.3.1. Jodoglikozydowanie

2.3.1.1. Bezpośrednie jodoglikozydowanie

Elektrofilowy jod, niezbędny do utworzenia kationu jodoniowego, jest najczęściej generowany nie z jodu, ale z kompleksu chloranu(VII) jodu(I) z dwoma cząsteczkami *s*-kolidyny (IDCP) bądź z *N*-jodosukcynimidu (NIS). Pionierem prac z zastosowaniem IDCP był Lemieux [29], który w oparciu o ten odczynnik zsyntezował m.in. β -D-glukopiranozylo-2-deoksy-2-jodo- α -D-mannopiranozyd (**34**), a następnie 2-deoksydisacharyd (**35**, Rys. 11).



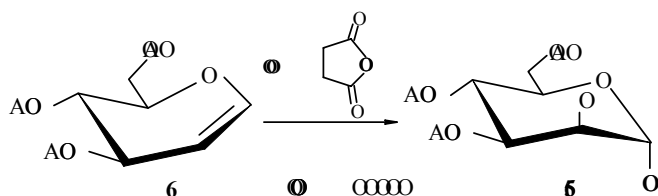
Rysunek 11

Kompleks *s*-kolidyny i nadchloranu(VII) jodu(I) znalazł szerokie zastosowanie w syntezie 2-deoksy-2-jodoglikozydów z glikali. Na przykład, Paulsen wykorzystał procedurę z IDCP do otrzymania tetrasacharydu, będącego analogiem akceptora *N*-acetyloglukozaminylo transferazy I i II o potencjalnych właściwościach inhibitu-

jących [30]. Ogawa i wsp. [31] przeprowadzili polimeryzację dwucukrowych glikali, wykorzystując do tego jodoglikozydowanie za pomocą IDCP i otrzymali oligocukry, składające się nawet z 24 jednostek cukrowych. Do usuwania jodu stosowali wodorek tributylcyny w obecności AIBN. Z kolei, Izumi i Ichikawa, przeprowadzając addycję jonu I^{\oplus} , generowanego z IDCP, do glikalu pochodzącego od 6-deoksy-L-cukru, stworzyli dwie biblioteki kombinatoryczne, składające się z trisacharydów 2,6-dideoksy-L-cukrów [32].

Liczne syntezy oparte o jodoglikozydowanie różnych glikali za pomocą kompleksu *s*-kolidyny i nadchloranu(VII) jodu(I) przeprowadzili Danishefsky i wsp., którzy procedurę z IDCP wykorzystali m.in. do otrzymania cyklamycyny 0 [33]. Ponadto, Danishefsky przeniósł koncepcję Fraser-Reida o wpływie grup ochronnych na właściwości donorowo-akceptorowe cukrów na glikale, co umożliwiło mu zastosowanie jodoglikozydowania do syntezy różnych, biologicznie ważnych oligocukrów [34–37].

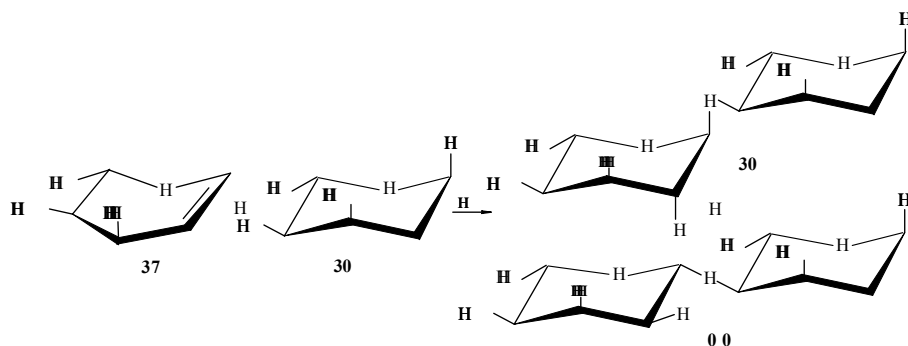
Wykorzystanie *N*-jodosukcynimidu jako reagenta generującego kation I^{\oplus} w reakcji z glikalami zainicjowali i szeroko stosowali Thiem i wsp. [38], którzy w reakcji tri-*O*-acetylo-*D*-glukalu z różnymi akceptorami glikozylu w obecności NIS otrzymywali 2-deoksy-2-jododisacharydy wyłącznie o stereochemii *trans* i konfiguracji α anomerycznego atomu węgla (36, Rys. 12). Procedurę z użyciem NIS Thiem zastosował również do syntezy 2,2',6,6'-tetradeoksydisacharydu: 3-*O*-(α -*D*-oliwozylo)- α -*D*-oliwozydu metylu, dejodując cukier za pomocą borku niklu [39]. Jodoalkoksylowanie za pomocą NIS Thiem wykorzystał także do otrzymania syntetycznych antracyklin z jednostką cukrową w postaci deoksyfukozylowego disacharydu [40]. Thiem do pracy nad jodoglikozydowaniem 3,4-di-*O*-acetylo-*L*-fukalu obok NIS wprowadził tlenek bis(tri-*n*-butylcyny), który zwiększał właściwości nukleofilowe fukozylowego akceptora glikozylu. Do usuwania atomu jodu zastosował wodorek tributylcyny.



Rysunek 12

Pracując nad syntezą oligocukrów, wchodzących w skład kijanimycyny, antybiotyku o działaniu m.in. przeciwnowotworowym, Thiem i wsp. uzyskali szereg α -połączonych 2,6-dideoksy-L-rybo-di, tri- oraz tetrasacharydów [41, 42]. Syntezę tych oligosacharydów oparto o jodoglikozylowanie za pomocą NIS *L*-digitoksalu (37, Rys. 13). Jednocześnie stwierdzono, że w przypadku *L*-digitoksalu stereoselektywność reakcji jodoglikozylowania zależy od wielkości podstawnika na atomie węgla

C-3. Zawada steryczna dużej *t*-butylofenylosililowej grupy (TBDPS, Rys. 13) powoduje, że obok, z reguły jedyne go produktu jodoglikozydowania jakim jest anomer α o diaksjalnej orientacji podstawników na atomach węgla C-1 i C-2 (**39**), powstaje również diekwatorialny produkt 1,2-*trans*-addycji o konfiguracji β anomerycznego atomu węgla (**40**) [43]. Stosunek powstających diastereoizomerów wynosił $\alpha:\beta \sim 3:1$. Analogiczna reakcja L-ramnalalu, glikalu różniącego się od L-digitoksalu konfiguracją atomu węgla C-3, przy zastosowaniu nieco mniejszej osłony *t*-butylo-dimetylosililowej (TBDMS) prowadziła wyłącznie do α disacharydu z diaksjalnie zorientowanymi podstawnikami na atomach węgla C-1 i C-2.



Rysunek 13

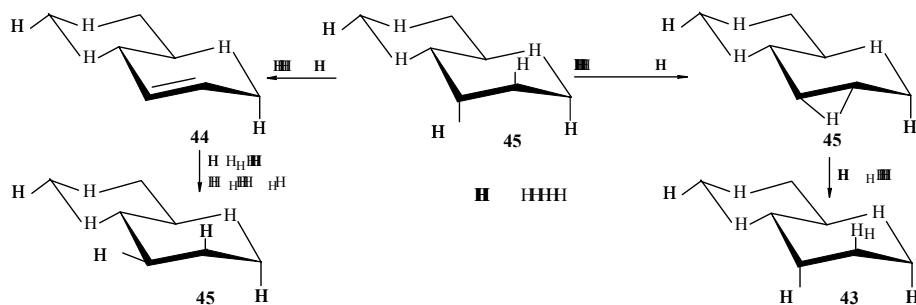
Horton i wsp. w oparciu o jodoalkoksylowanie za pomocą NIS odpowiednich glikali przeprowadzili syntezę aktywnych przeciwnowotworowo 2-jodo analogów antybiotyków antracyklinowych [44, 45]. Brak pełnej stereoselektywności prowadzonych reakcji zachęcił Hortona do przebadania jodoalkoksylowania różnych glikali za pomocą NIS i oceny wpływu czynników takich jak rodzaj nukleofilu, rozpuszczalnika oraz struktury glikalu na proporcję powstających α i β 1,2-*trans*-glikozydów [46].

Oprócz Thiema i Hortona również inni badacze wykorzystywali reakcję glikali z NIS w obecności akceptora glikozyłu do różnych syntez. I tak, Oscarson i Tedebark w oparciu o jodoglikozydowanie tri-*O*-acetylo-D-glukalu zsyntezowali 2-deoksy analogi 3,6-di-*O*- α -D-mannopiranozylo- α -D-mannopiranozydu metylu, trisacharydu będącego składnikiem strukturalnym *N*-glikoprotein, w celu przebadania miejsc wiązania się cukru z lektyną Concanavalin A [47].

Reakcja tri-*O*-acetylo-D-glukalu z mieszaniną racemiczną 6-metylo-1-trimetylosililo-hept-5-en-1-yn-4-olu w obecności NIS posłużyła Hoffmannowi i wsp. do asymetrycznej syntezy 6·5·6 dioksatricykli [48].

Jodoglikozylowanie *O*-podstawionego (acetyl, benzyl) glukalu za pomocą NIS wykorzystali Choe i Jung na jednym z etapów syntezy różnych, rozgałęzionych na atomie węgla C-2, cukrów [49].

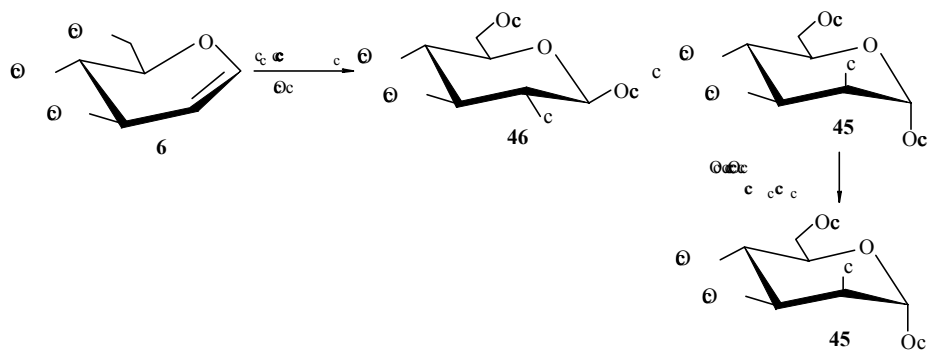
Jodoglikozydowanie glikali ma ogromne znaczenie w syntezie 2-deoksysacharydów. Niestety, 2-jodo podstawnika w pierścieniu cukrowym nie da się w wydajny sposób wykorzystać w reakcji substytucji nukleofilowej, co znacznie poszerzałoby możliwości aplikacyjne tego typu pochodnych. Friesen i Danishefsky zaproponowali przejście od 2-deoksy-2-jodo glikozydów (**41**) do 2,3-oksiranów (**42**) lub 2,3-nienasyconych glikozydów (**44**), które następnie modyfikowali w sposób przedstawiony na Rys. 14 [50].



Rysunek 14

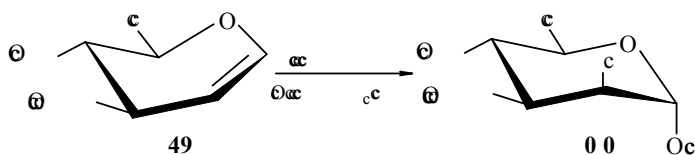
2.3.1.2. Pośrednie jodoglikozydowanie

Bezpośrednie jodoglikozydowanie glikali, czy to za pomocą IDCP czy przy użyciu NIS, nie zawsze jest wystarczająco stereoselektywne. Z tego względu zaproponowano dwuetapowe jodoglikozydowanie, polegające na utworzeniu w pierwszej kolejności 2-deoksy-2-jodo octanu z glikalu, który to octan w drugim etapie jest donorem glikozydu w reakcji glikozydowania. Pierwsze prace dotyczące zastosowania jodoacetoksyloowania w procesie pozyskiwania 2-deoksy-2-jodoglikozydów pochodzą od Lafonta i wsp., którzy w reakcji zacetylowanego D-laktalu [51], D-glukalu (**6**) i L-ramnalu [52] z jodem i octanem miedzi(II) w obecności kwasu octowego otrzymali odpowiednie 2-jodo octany (**46** i **47**, Rys. 15), głównie o konfiguracji α anomerycznego atomu węgla (**47**). Nawet jeżeli w reakcji jodoacetoksyloowania tworzą się niewielkie ilości produktu β -1,2-*trans* to na tym etapie syntezy anomer α i β można łatwo rozdzielić. W reakcji 2-jodo octanu o konfiguracji α (**47**) z akceptorem glikozydu, w obecności katalitycznych ilości TMSOTf, Lafont i wsp. uzyskali wyłącznie 2-jodo- α -glikozydy (**48**) [52].



Rysunek 15

Odmianą metodę jodoacetoksylowania zaproponowali Roush i wsp. [53]. Metoda ta polega na reakcji glikali z azotanem(V) cerowo(IV)amonowym (CAN) i jodkiem sodu w obecności kwasu octowego i prowadzi głównie do 2-jodoocetanów o konfiguracji α (Rys. 16).



Rysunek 16

Roush i wsp., wychodząc z octanów 2-deoksy-2-jodo- α -D-mannopiranozyli oraz - α -D-talopiranozyli i stosując jako promotor reakcji TMSOTf lub TBSOTf, zsyntezowali różne 2-deoksy-2-jodo di- i trisacharydy wyłącznie o konfiguracji α [54]. Kiedy donorem glikozyli był octan 2-deoksy-2-jodo- β -D-glukopiranozyli to powstawały tylko disacharydy o konfiguracji β -D-gluko [55]. Octany 2-bromo- oraz 2-jodoglikopiranozyli można przekształcić w odpowiednie trichloroacetoimidany [56, 57].

Roush i wsp. zastosowali jodoacetoksylowanie na jednym z etapów syntezy oliwomycyny A, antybiotyku z grupy kwasów aureolowych o działaniu antynowotworowym [58]. Również Arai i wsp. wykorzystali jodoacetoksylowanie glikali w swojej pracy nad syntezą inhibitora wzrostu grzybów [59].

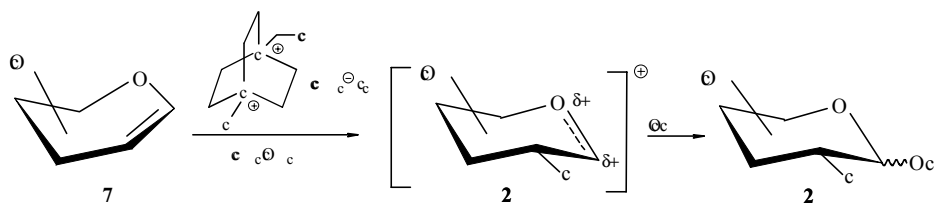
Ostatnio, Gammon i wsp. zaproponowali nową metodę haloacetoksylowania glikali, polegającą na reakcji odpowiednio chronionych glikali z jodkiem lub bromkiem amonu w obecności 50% wody utlenionej, bezwodnika octowego i kwasu octowego w acetonitrylu [60].

1,2-Funkcjonalizowanie glikali, zmierzające do 2-jodo octanów lub 2-jodo azydów może być przeprowadzone na nośniku stałym [61].

2.3.2. Fluoroglikozydowanie

Glikale odgrywają znaczącą rolę w syntezie 2-deoksy-2-fluorocukrów [62]. Zarówno sam fluor jak i podfluoryn acetylu były stosowane do fluorowania zacetylowanych glikali, pochodzących od cellobiozy, maltozy i maltotriozy [63]. W wyniku tych reakcji powstawały 2-deoksy-2-fluorocukry o konfiguracji α -D-gluko i β -D-manno w stosunku od 1:1 do 2:1, co świadczy o tym, że w przypadku tych odczynników mamy do czynienia z *syn* addycją do podwójnego wiązania glikalu. Geilen i wsp. do fluorownia tri-*O*-acetylo-D-galaktalu użyli difluorek ksenonu i otrzymali również mieszaninę anomerów, ale wyłącznie 2-deoksy-2-fluoro-D-galaktozy [64].

Spośród różnych komercyjnie dostępnych fluorujących reagentów typu N-F dopiero zaproponowany przez Wonga i wsp. tetrafluoroboran 1-chlorometylo-4-fluoro-1,4-diazoniabicyklo[2.2.2]oktanu, zwany Selectfluorem, okazał się skutecznym donorem elektrofilowego fluoru w reakcji z glikalami w obecności akceptora glikozyli (Rys. 17) [65]. Niestety, fluoroglikozydowanie zaproponowane przez Wonga nie było stereoselektywne.



Rysunek 17

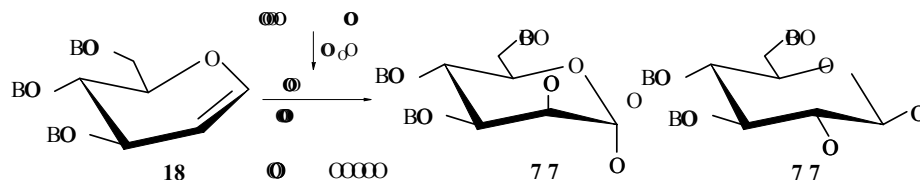
W celu poprawienia stereoselektywności fluoroglikozydowania za pomocą Selectfluoru ta sama grupa badaczy przeprowadziła badania mechanistyczne oraz eksperymentalne pozwalające ocenić wpływ warunków reakcji, grup ochronnych oraz rodzaju nukleofila na proporcję powstających anomerów [66]. Wyciągnięte z tych prac wnioski wykorzystano w syntezie zmodyfikowanych, biologicznie aktywnych molekuł, w tym 2-fluorowanych analogów daunomycyny oraz oleandryny.

Wyniki dotyczące zastosowania Selectfluoru, pochodzące z grupy Wonga różnią się nieco od doniesień Daxa i wsp., którzy badali fluorowanie m.in. tri-*O*-acetylo-D-galaktalu w różnych układach rozpuszczalników [67].

2.4. TIO- ORAZ SELENOGLIKOZYDOWANIE

W poszukiwaniu metod otrzymywania 2-deoksyglikozydów o konfiguracji β , sięgnięto po elektrofile siarkowe, które, w przeciwieństwie do elektrofilowego jodu, przyłączają się raczej od dołu płaszczyzny pierścienia glikali (D). Siarkę, wprowadzoną na atom węgla C-2 sacharydu, można łatwo zastąpić wodorem. Na przykład

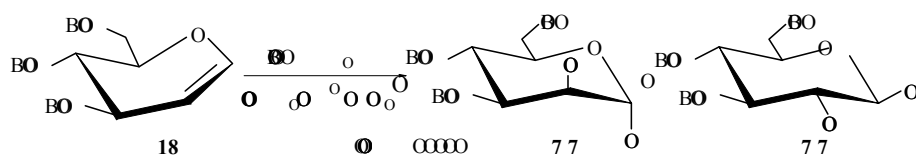
Ito i Ogawa w bezpośredniej addycji do glikali zastosowali, wytworzone wcześniej, estry fenylsulfenowe odpowiednich alkoholi (Rys. 18) [68]. Reakcja glikozydowania była aktywowana przez TMSTf i prowadziła do mieszaniny α -D-manno (**53**) oraz β -D-gluko (**54**) glikozydów w stosunku 19:81.



Rysunek 18

Przebadano najróżniejsze glikale w reakcji z estrami sulfenowymi szeregu alkoholi [13]. Warunki reakcji optymalizowano ze względu na rozpuszczalnik, katalizator, temperaturę, czas reakcji i stosunki molowe. Stereoselektywność reakcji wahała się w granicach od 52:48 do 81:19 (β : α) i wyraźnie zależała od stosowanych grup ochronnych glikalu.

Franck i wsp. zaproponowali użycie soli arylobis(arylotio) sulfoniowych do aktywowania glikali w reakcji z pochodnymi cynowymi cukru (Rys. 19) [69]. Glikozydowanie za pomocą soli sulfoniowych prowadziło głównie do anomerów β (**56**) (α : β = 10:53). Franck, podobnie jak Ogawa, przebadał wpływ różnych czynników na diastereoselektywność reakcji addycji soli sulfoniowych w obecności różnych alkoholi. Otrzymane 2-deoksy-2-fenylotio- β -D-glikozydy poddawano działaniu niklu Raney' a i otrzymywano odpowiednie 2-deoksyglikozydy o konfiguracji β anomerycznego atomu węgla.

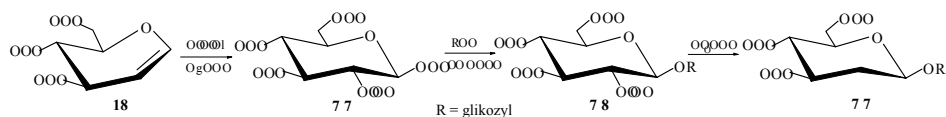


Rysunek 19

Do syntezy 2-deoksyglikozydów o konfiguracji β wykorzystywano również przygotowane wcześniej 2-deoksy-2-fenylotiolowe donory glikozyłu. Glikozyłowe donory pozyskiwano z chlorków 2-deoksy-2-fenylotioglikozyłowych, które powstają w reakcji addycji chlorku fenylotiolowego do odpowiedniego glikalu. Na przykład, Hashimoto i wsp. w reakcji 2-deoksy-2-fenylotiofosforoamidatów z różnymi akceptorami w obecności TMSOTf otrzymywali β -glikozydy z wysoką stereoselektywnością [70]. Z kolei, Roush i wsp. przebadali różnie podstawione octany 2-deoksy-2-fenylotio- β -D-glukopiranozyłu oraz acetoimidany 2-deoksy-2-fenylotio- α -D-

-glukopiranozyłu jako donory glikozyłu [71]. Procedurę z użyciem acetoimidanu 2-deoksy-2-fenylo- α -D-glukopiranozyłu zastosowano do stereoselektywnego β -glikozydowania w trakcie syntezy trisacharydowych prekursorów oliwomycyny A [72].

Elektrofile selenowe, w przeciwieństwie do siarkowych, przyłączają się głównie od góry płaszczyzny pierścienia glikalu (D) [13]. Powstające z ich zastosowaniem 2-deoksy-2-fenylo-selenoglikozydy mają więc przede wszystkim konfigurację α -D-manno. Deselenowanie prowadzi się za pomocą pochodnych wodorku cyny(IV). 2-Deoksydisacharydy połączone wiązaniem β (**59**) (β : α = 9:1) uzyskano wychodząc z octanu 2-deoksy-2-fenylo-seleno- β -D-glukopiranozyłu (**57**), który otrzymano w reakcji tri-*O*-benzylo-D-glukalu (**18**) z chlorkiem fenylo-selenylowym w obecności octanu srebra (Rys. 20) [73]. Reakcja octanów 2-deoksy-2-fenylo-seleno- β -D-glikopiranozyłu, uzyskanych z innych glikali okazała się mało wydajna i mniej stereoselektywna. Ponadto stwierdzono, że niektóre octany 2-deoksy-2-fenylo-seleno- β -D-glikopiranozyłu są konfiguracyjnie niestabilne i łatwo anomeryzują do niepożądanych analogów α [71].

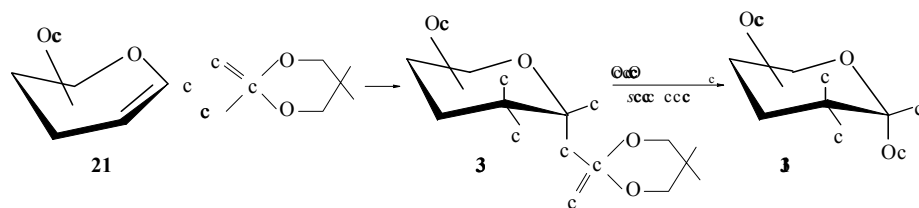


Rysunek 20

Nicolaou i wsp. wprowadzili selenowe reagenty do syntezy 2-deoksyglikozydów na nośniku stałym [74]. Polistyrenowy nośnik połączony z bromkiem selenyłu reagował z tri-*O*-benzylo-D-glukalem a następnie cukrowym akceptorem i powstawały disacharydy, głównie o konfiguracji α . Wprowadzenie na nośnik reszty ftalimidosenylowej spowodowało zmianę stereochemii reakcji i powstawanie glikozydów β w znacznej przewadze. Związaną z nośnikiem grupę selenową usuwano za pomocą wodorku tributylolcyny i AIBN.

2.5. INNE METODY SYNTEZY 2-DEOKSYGLIKOZYDÓW

Przyłączenie kwasu *O,O*-dialkilditiofosforowego do per-*O*-acetyloglikalu (**21**) prowadzi do *O,O*-dialkilditiofosforanu 2-deoksyglikozyłu (**60**, Rys. 21). Jest to addycja typu *cis*, w wyniku której w znacznej przewadze powstają anomery α [75]. Taki *O,O*-dialkilditiofosforan był stosowany jako donor glikozyłu, który w obecności AgClO_4 , *s*-kolidyny i akceptora o charakterze alkoholu ulega reakcji, prowadzącej do 2-deoksy- α -glikozydów lub - α -disacharydów [76].



Rysunek 21

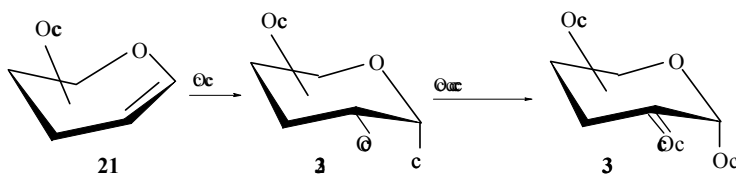
Addycja tioetanolu do glikali, katalizowana azotanem cerowo-amonowym, prowadzi do mieszaniny anomerów 2-deoksy-1-tioglikozydów. Uzyskany w tej reakcji 3,4,6-tri-*O*-acetylo- α -D-likso-1-tioheksopiranozyd etylu okazał się skutecznym donorem w syntezie 2-deoksy- α -D-glikozydów i - α -disacharydów [77].

3. SYNTEZA 2-AMINO-2-DEOKSYGLIKOZYDÓW

Glikale są użytecznymi substratami w syntezie 2-amino-2-deoksyglikopiranozydów, związków ważnych, bo będących elementami strukturalnymi licznych oligocukrów i glikokoniugatów [78, 79].

3.1. NITROZOCHLOROWANIE

Pierwszą metodą wprowadzenia azotu na atom węgla C-2 syntezowanego glikozydu, zaproponowaną przez Lemieux, było nitrozochlorowanie glikali [80]. W wyniku *cis* addycji chlorku nitrozylu do per-*O*-acetylo-D-glikali (21) Lemieux otrzymywał acetylowane chlorki 2-deoksy-2-nitrozoglikozydowe (62, Rys. 22). Reakcje 2-nitroso chlorków z prostymi alkoholami i fenolami były wysoce stereoselektywne i prowadziły do α glikozydów z grupą hydroksyiminową przy drugim atomie węgla (63).



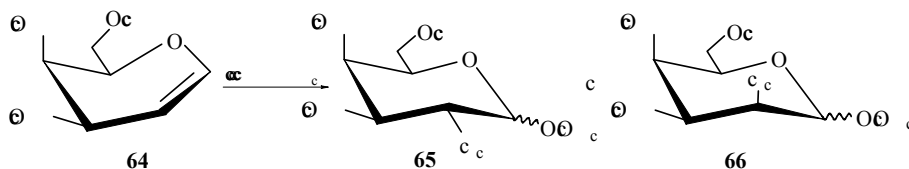
Rysunek 22

Powyzsza metoda glikozydowania została zastosowana do syntezy szeregu 2-hydroksyiminowych glikozydów i disacharydów [81]. Niestety, redukcja grupy 2-hydroksyiminowej do 2-aminowej zachodzi w sposób nie zawsze wydajny i nie

zawsze stereoselektywny. Banaszek i Karpiesiuk skutecznie redukowali 2-hydroksyiminowe heksopiranozydy za pomocą kompleksu borowodorku litu i trimetylochlorosilanu [82]. Inne doniesienia o użyciu tego odczynnika redukującego świadczą, że redukcja grupy 2-hydroksyiminowej może się zatrzymać na etapie utworzenia grupy 2-hydroksyaminowej [83].

3.2. AZYDOAZOTANOWANIE

Pionierami prac w zakresie azydoazotanowania glikali był Lemieux i Ratcliffe, którzy wykazali, że tri-*O*-acetylo-*D*-galaktal (**64**) w reakcji z azydkiem sodu i azotanem(V) cerowo(IV)amonywym tworzy azotany 2-azydo-2-deoksyglikozyłu z wysoką wydajnością i stereoselektywnością (**65:66** ~ 9:1) (Rys. 23) [84]. Niestety, analogiczne azydoazotanowanie *D*-glukalu charakteryzowało się brakiem stereoselektywności (*D*-gluko:*D*-manno ~ 1:1), co tłumaczy się zmianą konfiguracji atomu węgla C-4 [85]. Seeberger i wsp. dopracowali warunki azydoazotanowania *D*-glukalu osiągając znaczną poprawę stereoselektywności na korzyść stereoisomeru o konfiguracji *D*-gluko, co czyni tę reakcję użyteczną w syntezie biologicznie ważnych fragmentów *D*-glukozaminy [86].



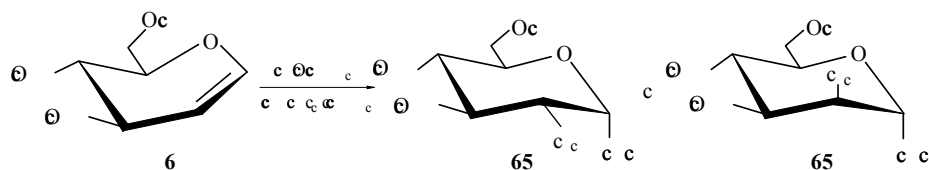
Rysunek 23

Azotany 2-azydoglikozyłu najczęściej przekształca się w odpowiednie donory glikozyłu: halogenki lub trichloroacetoimidany [78]. Powyższa metodologia była szeroko stosowana, na przykład do otrzymywania *N*-acetylogalaktozamin, połączonych wiązaniem α z grupą hydroksylową łańcucha bocznego seryny i treoniny w *O*-glikoproteinach [87, 88].

Svarovsky i Barchi produkt azydoazotanowania per-*O*-acetylo-*D*-galaktalu przekształcili w pent-4-enylowe β -*O*-glikozydy w wyniku bezpośredniej reakcji azotanu 2-azydogalaktozyłu z pent-4-enolanem sodu. Uzyskane pentenyłowe glikozydy zastosowano jako donory glikozyłu w reakcji glikozyłowania aminokwasów. Ponadto, przebadano możliwości reagowania azotanu 2-azydogalaktozyłu z różnymi nukleofilami w celu syntezy innych użytecznych donorów glikozyłu [89].

3.3. AZYDOFENYLOSELENYLOWANIE

Różnego rodzaju olefiny w reakcji z diacetoksyjodobenzenem, diselenidem difenyloyowym oraz azydkiem sodu ulegają regioselektywnemu azydofenyloseleenyłowaniu, w wyniku którego powstają produkty addycji niezgodne z regułą Markownikowa [90]. Czernecki i wsp. przenieśli metodę azydofenyloseleenyłowania alkenów na pochodne D-glukalu i D-galaktalu [91]. W przypadku azydofenyloseleenyłowania tri-*O*-acetylo-D-glukalu (**6**) uzyskano z wysoką wydajnością (91%) mieszaninę 2-azydo-1-fenyloseleenyloglikopiranozydów o konfiguracji α -D-gluko (**67**) i α -D-manno (**68**, Rys. 24). Analogiczna reakcja tri-*O*-acetylo-D-galaktalu prowadziła wyłącznie do 2-azydo-1-fenyloseleenylo- α -D-galaktopiranozydu. Zamiana osłon *O*-acetylowych na *O*-benzylowe znacznie pogorszyła przebieg reakcji azydofenyloseleenyłowania tych dwóch glikali. Podobne wyniki, poszerzone o inne glikale, uzyskali Santoyo-Gonzalez i wsp. [92].



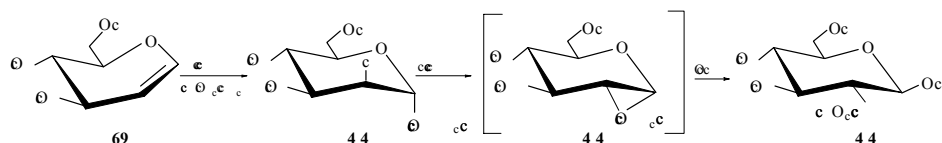
Rysunek 24

Jak wykazano, fenyloseleenyloglikozydy mogą być użytecznymi donorami bądź akceptorami glikozyłu [93, 94]. Tę właściwość fenyloseleenyloglikozydu, uzyskanego w wyniku azydofenyloseleenyłowania tri-*O*-acetylo-D-galaktalu, wykorzystali Jiaang i wsp. do syntezy *O*-glikozyłowanych aminokwasów [95].

Mironov i wsp. zaproponowali nieco odmienne warunki azydofenyloseleenyłowania glikali, w których azydek sodu został zastąpiony azydkiem trimetylosililu [96]. Zamiana ta pozwoliła na skrócenie czasu reakcji oraz zwiększenie jej skali.

3.4. JODOSULFONAMIDOWANIE

Zaproponowane przez Danishefskiego i Griffitha jodosulfonamidowanie polega na stereoselektywnym jodoglikozydowaniu glikali za pomocą IDCP w obecności benzenosulfonamidu (Rys. 25) [97]. Produktem zachodzącej w tych warunkach *trans* diaksjalnej addycji jest 2-deoksy-2-jodo- α -benzenosulfonamidopiranozyd (**70**). Działanie na ten glikozyd heksametylodisililoazydkiem litu (LHMDS) powoduje utworzenie przejściowej sulfonyloazyrydiny (**71**), która w reakcji z akceptorem glikozyłu przekształca się w 2-benzenosulfonamidoglikozyd o konfiguracji β anomerycznego atomu węgla (**72**). Często stosowanym przez Danishefskiego akceptorem glikozyłu był odpowiednio przygotowany glikal.



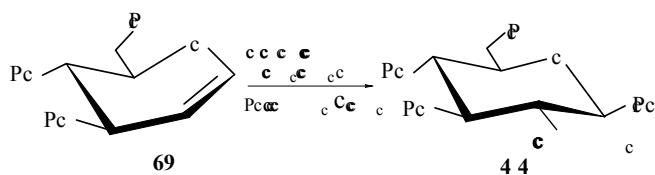
Rysunek 25

Uwalnianie grupy 2-aminowej z jej 2-sulfonamidowego prekursora zachodzi pod wpływem sodu w ciekłym amoniaku [98]. 2-Deoksy-2-jodo- α -benzenosulfonamidopiranozyd (**70**) można również przekształcić w tioglikozyłowy donor glikozyłu z grupą 2-benzenosulfonamidową bądź w 2-benzenosulfonamidoglikopiranozę z wolną anomeryczną grupą hydroksylową [97].

Danishesky i wsp. zastosowali metodę jodosulfonamidowania glikali m.in. do syntezy allozamidyny, naturalnego inhibitora chitynazy [99, 100] oraz do syntezy *N*-połączonych glikopeptydów [101, 102].

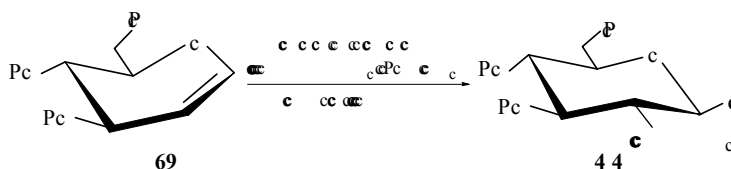
3.5. INNE METODY SYNTEZY 2-AMINO-2-DEOKSYGLIKOZYDÓW

Du Bois i wsp. zaproponowali reakcję glikalu z kompleksem azotkowomanganowym(V) oraz bezwodnikiem trifluoroctowym i późniejszą kwaśną hydrolizę, w wyniku czego powstaje *N*-trifluoroacetylo-2-aminocukier [103]. Ta sama reakcja, w której zamiast kwaśnej hydrolizy wprowadzi się tiofenol i kwas Lewisa, prowadzi do *N*-trifluoroacetylo-2-amino- β -tioglikozydu (**73**, Rys. 26). Powstawanie produktu addycji o geometrii *trans* może świadczyć o tym, że produktem pośrednim tej reakcji jest azirydyna bądź oksazolina. Procedurę Du Boisa zastosowano do wprowadzenia znakowanego izotopowo azotu (^{15}N) na atom węgla C-2 glukozy [104].



Rysunek 26

Acetamidoglikozydowanie glikali w jednym etapie reakcji opisali Gin i wsp. Procedura Gina polega na działaniu 5-tlenkiem tioantrenu (TSO) na glikal w obecności bezwodnika triflanowego, *N*-(trimetylosililo)acetamidu, *N,N*-dietyloaniliny, kwasowego promotora oraz akceptora glikozyłu i prowadzi do 2-acetamido-2-deoksy- β -*O*-glikozydu (**74**, Rys. 27) [105]. Powyższa metoda jest skuteczna dla glikali o różnej konfiguracji, z różnymi grupami ochronnymi oraz dla różnych akceptorów glikozyłu, w tym 1° i 2° alkoholi, 1° i 2° grup hydroksylowych cukrów, grupy hydroksylowej selektywnie chronionych aminokwasów [106].



Rysunek 27

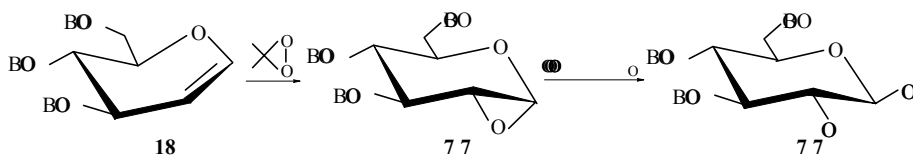
Użycie zamiast TSO 5-tlenku 2,8-dimetylodibenzotiofenu (DMDBTO) zmienia stereochemię reakcji i jest skuteczną metodą pozyskiwania 2-acetamido-2-deoksy- α -D-mannopiranozydów z D-glukalu [107].

4. SYNTEZA GLIKOZYDÓW Z GRUPĄ 2-HYDROKSYLOWĄ

Opisane powyżej zastosowania glikali charakteryzują się tym, że prowadzą do glikozydów pozbawionych grupy wodorotlenowej na drugim atomie węgla pierścienia piranowego (2-deoksyglikozydy). Przekształcenie glikali w oksirany stwarza możliwość pozyskiwania glikozydów, w których grupa 2-OH będzie obecna.

4.1. EPOKSYDOWANIE

Skutecznym i wydajnym czynnikiem epoksydującym glikale jest wprowadzony przez Halcomba i Danishefskiego 2,2-dimetylodioksiran (DMDO) [108]. Reakcja tri-*O*-benzylo-D-glukalu (**18**) z DMDO, z wydajnością bliską 100%, prowadzi stereoselektywnie do α epoksydu (**75**), który w obecności akceptora glikozyłu i promotora reakcji (często ZnCl_2) przekształca się w odpowiedni β -glikozyd (**76**, Rys. 28).



Rysunek 28

Stereoselektywność reakcji epoksydowania za pomocą DMDO zależy od rodzaju grup osłaniających reszty hydroksylowe [37]. Reakcja glikozydowania jest raczej stereospecyficzna, niemniej czasami obok β glikozydów powstają w niewielkiej ilości izomery α . Reakcję oksiranu uzyskanego z glukalu można ukierunkować na α glikozyd, wprowadzając akceptor glikozyłu w postaci eteru tributylcyonowego i stosując jako promotor AgBF_4 [109].

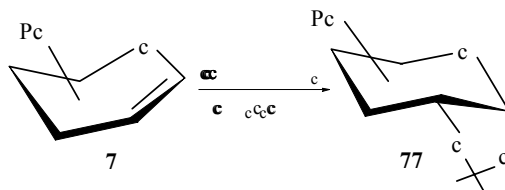
Danishefsky i wsp. w oparciu o glikalowe epoksydy zsyntezowali szereg oligocukrów i innych związków biologicznie aktywnych [37, 110].

1,2-Anhydrocukry, uzyskiwane z glikali w reakcji z DMDO, znalazły swoje zastosowanie w syntezie C-glikozydów. I tak, w reakcji epoksydu **75** z anionem dietylomalonianowym w obecności $ZnCl_2$ powstawał odpowiedni β -C-glikozyd, będący produktem pośrednim na drodze syntezy analogu stanu przejściowego reakcji katalizowanych przez transferazy UDP glukuronozylowe [111]. C-Glikozydy o konfiguracji β były również głównymi produktami reakcji oksiranów uzyskanych z glukalu ze związkami allilowocynowymi w obecności kwasu Lewisa [112]. Natomiast, pochodne 1,2-anhydroglukozy w reakcji ze związkami glino- oraz boroorganicznymi dają głównie C-glikozydy o konfiguracji α [113].

Ernst i Klaffke wykorzystali reakcję epoksydowania glikali za pomocą DMDO do syntezy difosforanowych, nukleozydowych cukrów [114]. Ta sama grupa badaczy zajmowała się stereochemią reakcji 3-C-rozgałęzionych-L-glikali z DMDO, stwierdzając, że zależy ona od orientacji allilowej grupy hydroksylowej [115].

Oksiranowe pochodne glikali znalazły zastosowanie w syntezie oligocukrów na nośniku stałym [37, 116].

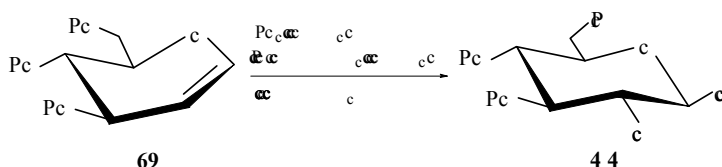
Lohman i Seeberger przekształcili glikale w *cis*-1,2-izopropylideno- α -glikozydy (**77**) w wyniku ich epoksydowania przy użyciu DMDO, w obecności $ZnCl_2$ i acetonu (Rys. 29) [117]. Metodę tę wykorzystali do syntezy odpowiednio chronionych akceptorów glikozyłu.



Rysunek 29

4.2. UTLENIAJĄCE GLIKOZYDOWANIE GLUKALU

Metodę utleniającego glikozydowania glukalu, prowadzącą do glikozydów posiadających grupę hydroksylową na drugim atomie węgla, zaproponowali Gin i wsp. Polega ona na reakcji chronionego D-glukalu (**69**) z bezwodnikiem trifluorometanosulfonowym i difenylosulfotlenkiem w obecności 2,6-di-*t*-butylo-4-metylopirydyny (DTBMP) i trietyloaminy w metanolu i późniejszym dodaniu akceptora glikozyłu (Nu-H) oraz kwasu Lewisa ($ZnCl_2$), a prowadzi do odpowiednich piranozydów o konfiguracji β -D-gluko (**78**, Rys. 30) [118]. Przebadano różne akceptory glikozyłu w tej reakcji, w tym 1° i 2° alkohole, cukry oraz aminy. Badania nad mechanizmem utleniania glikali za pomocą difenylosulfotlenku wskazują na przejściowe tworzenie się epoksydu w mieszaninie reakcyjnej.

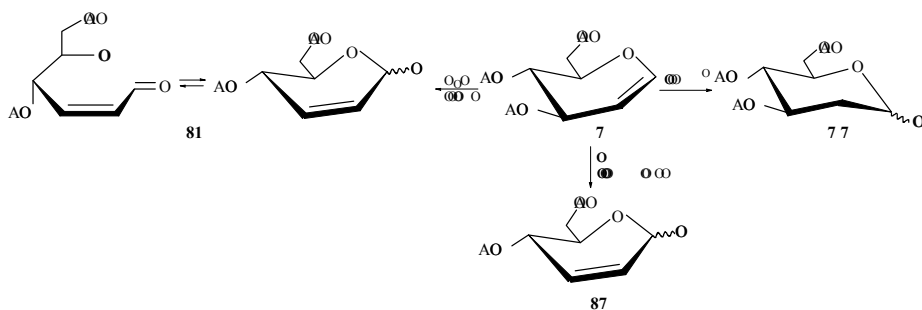


Rysunek 30

Zastosowanie 5-tlenku dibenzotiofenu (DBTO) w miejsce difenylosulfotlenku pozwoliło odwrócić stereochemię tej reakcji, a tym samym otrzymać glikozydy o konfiguracji α -D-manno [119]. Metodę utleniającego glikozydowania glukozy Gin i wsp. wykorzystali w syntezie trisacharydowego fragmentu specyficznego adjuwanta immunologicznego, substancji wzmacniającej odpowiedź immunologiczną [120].

5. PRZEGRUPOWANIE FERRIERA

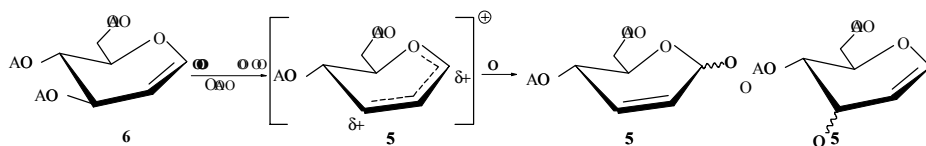
O-Acetylowane glikale (np. glukoza **6**) w obecności kwasu protonowego ulegają zwykle elektrofilowemu przyłączeniu, w wyniku którego tworzą się 2-deoksyglikozydy (**79**, Rys. 31). Te same glikale w reakcji z nukleofilowym reagentem w obecności kwasu Lewisa ulegają reakcji, nazwanej od nazwiska jej odkrywcy przegrupowaniem Ferriera, a prowadzącej do 2,3-nienasyconych glikozydów (**80**, Rys. 31) [5, 6]. Jeśli nukleofilowym reagentem jest woda to produktem przegrupowania Ferriera jest odpowiedni 2,3-nienasycony cukier, zwyczajowo zwany pseudoglikalem (**81**, Rys. 31).



Rysunek 31

Przegrupowanie Ferriera jest reakcją substytucji nukleofilowej typu S_N1' . Kwas Lewisa, w przeciwieństwie do kwasu protonowego, nie może zapoczątkować addycji elektrofilowej, ale powoduje odszczepienie grupy 3-OAc i wytworzenie zdekalizowanego kationu (**82**, Rys. 32). Atak nukleofilu następuje w miejscu gdzie częst-

kowy ładunek dodatni utworzonego kationu jest największy, tj. na anomeryczny atom węgla (produkt **80**). Reakcja jest więc regioselektywna. Rzadkie przypadki podstawienia na atomie węgla C-3 (produkt **83**) tłumaczy się miękkością i twardością odpowiednich centrów nukleofilowych i elektrofilowych [121]. Sporadycznie obserwowano też tworzenie się nasyconych produktów 1,3-dipodstawienia, co prawdopodobnie jest wynikiem obecności katalitycznych ilości wody i powstawaniem przejściowego enalu (**81**, Rys. 31) [122]. Z reguły, przegrupowanie Ferriera w przypadku *O*-, *N*- i *S*-nukleofilu jest reakcją stereoselektywną, z preferencją tworzenia α -glikozydów. W przypadku C-nukleofilu α -selektywność jest mniejsza ze względu na brak anomerycznej stabilizacji [123].



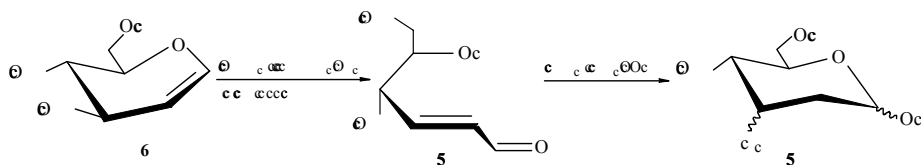
Rysunek 32

Najpowszechniej stosowanym w tej reakcji kwasem Lewisa jest wprowadzony przez Ferriera eterowy roztwór trifluorku boru [124–126]. Jednakże, ogromne możliwości aplikacyjne przegrupowania Ferriera sprawiły, że wypróbowano szereg innych katalizatorów, w tym SnCl_4 [127], TiCl_4 [128], InCl_3 [129], $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ [130]. Tylko w ostatnim roku zaproponowano przynajmniej trzy nowe reagenty katalizujące tworzenie 2,3-nienasyconych *O*- [131] i C-glikozydów [132, 133].

Przegrupowanie Ferriera posłużyło do syntezy ogromnej ilości 2,3-nienasyconych pochodnych cukrów, w tym także *S*-glikozydów [134], oligosacharydów [135], C-disacharydów [136], nukleozydów [137], sulfonamidów i karbaminianów [138], azydków [139] i cyjanów [140], 1-fosfonylocukrów [141] oraz glikozyloaminokwasów [142]. Modyfikacje uzyskanych 2,3-nienasyconych związków prowadzono głównie w kierunku oksyaminowania [143, 144], epoksydowania i hydroksylowania [126, 142, 145, 146] oraz uwodornienia [125, 135].

6. HYDROKSYRTĘCIOWANIE PROWADZĄCE DO α,β -NIENASYCONYCH ALDEHYDÓW

Jeżeli zacytylowany glikal poddamy reakcji z jonami rtęci (HgSO_4) w roztworze 1,4-dioksanu i rozcieńczonego kwasu siarkowego(VI), to tworzący się produkt hydroksyrteciowania przekształci się w α,β -nienasycony aldehyd o konfiguracji *2E* (**84**, Rys. 33) [147]. Addycja kwasu azotowodorowego do sprzężonego układu wiązań podwójnych takiego enalu, pozyskanego z per-*O*-acetylo-*D*-glukalu [148–153], -*D*-galaktalu [153], -*L*-ramnalu [154–156] oraz -*L*-arabinalu [157] jest użyteczną metodą otrzymywania 3-azydo-2,3-dideoksycukrów (**85**).



Rysunek 33

Powyższe przekształcenie glikali w α,β -nienasycone aldehydy może być również przeprowadzone dla glikali z eterowymi grupami ochronnymi (benzyl, metyl) [158].

7. CYKLOPROPANOWANIE

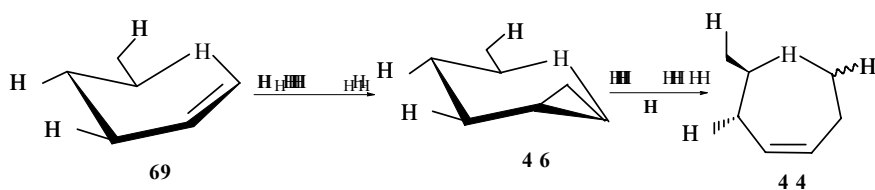
Glikale, związki z endocyklicznym wiązaniem podwójnym, ulegają reakcji addycji karbenów, w wyniku której następuje cyklopropanowanie i tworzy się unikalna, bicykliczna struktura, łącząca wysoką reaktywność cyklopropanu z wyjątkową stereoselektywnością, wynikającą z budowy cukru.

Metody cyklopropanowania glikali można podzielić na trzy grupy: reakcję Simmonsa-Smitha (pkt 7.1), addycję dihalogenokarbenów (pkt 7.2) oraz addycję diazoestru (pkt 7.3) [159].

7.1. REAKCJA SIMMONSA-SMITHA

Warunki reakcji Simmonsa-Smitha w chemii glikali zastosowali Nagarajan i wsp. [160], którzy poddali cyklopropanowaniu per-*O*-benzyloglikale za pomocą karbenoidu $I\text{ZnCH}_2\text{I}$, powstałego w mieszaninie reakcyjnej z diiodometanu, cynku i chlorku miedzi(I). Tak prowadzona addycja metylenu jest stereoselektywna w stosunku do płaszczyzny pierścienia i zachodzi na sposób *syn* w stosunku do podstawnika w pozycji allilowej (3-OP). Furukawa i wsp. wprowadzili do reakcji Simmonsa-Smitha modyfikację polegającą na zastąpieniu układu $\text{Zn}(\text{Cu})$ dietylocynkiem [161]. Taka kombinacja reagentów okazała się możliwa do pogodzenia z różnymi grupami ochronnymi glikali i charakteryzowała się tą samą stereoselektywnością (Rys. 34). Hoberg i Bozell warunki Furukawy zastosowali do cyklopropanowania glikali, które następnie przekształcali w siedmioczłonowe oksacykle (**87**) [162, 163].

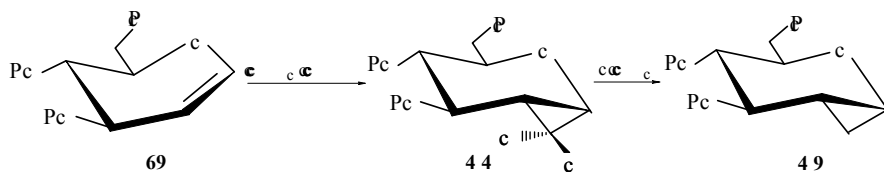
Z kolei, Scott i Heathcock produkt cyklopropanowania tri-*O*-benzylo-D-glukalu poddali reakcji otwarcia pierścienia cyklopropanowego, uzyskując 3,4,6-tri-*O*-benzylo-2-C-metylo-D-glukozę, którą przekształcono w 3,4,6-tri-*O*-benzylo-2-C-metylo-D-glukal [164].



Rysunek 34

7.2. ADDYCJA DIHALOGENOKARBENU

Addycje dichloro i dibromokarbenów do glikali prowadzone były przez Nagarajana i wsp., którzy na różne glikale działali chloroformem lub bromoformem oraz 50% wodnym roztworem NaOH w obecności katalitycznych ilości chlorku trietylobenzylamoniowego [165]. Istotny dla tej reakcji jest fakt, że biegnie ona ze stereochemią *anti* w stosunku podstawnika w pozycji allilowej (3-OP) (Rys. 35). Redukcyjne dehalogenowanie produktów takiego cyklopropanowania dostarcza więc 1,2-cyklopropanocukry (**89**) o stereochemii komplementarnej do tych, otrzymywanych metodą Simmons-Smitha. Nagarajan i wsp. przekształcali 1,2-cyklopropanocukry w siedmioczłonowe halogenoglikozydy bądź w 2-deoksy-2-C-rozgałęzione glikozydy.



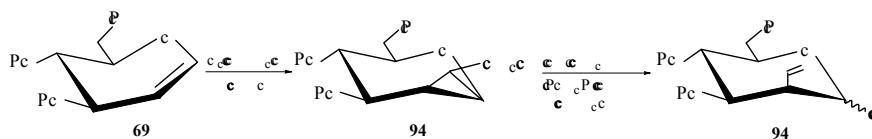
Rysunek 35

7.3. ADDYCJA DIAZOCTANU ETYLU

Reakcja Simmons-Smitha oraz addycja dihalogenokarbenu są metodami cyklopropanowania związków nienasyconych o ograniczonych możliwościach modyfikowania uzyskanych trójczłonowych pierścieni. W tym sensie, produkty katalizowanej metalami przejściowymi addycji diazoctanu etylu są bardziej funkcjonalne, bo wprowadzają dobrze usytuowaną grupę estrową, którą można na różne sposoby przekształcać.

Henry i Fraser-Reid stwierdzili, że cyklopropanowanie tri-*O*-*t*-butylo-dimetylosililo-D-glukalu za pomocą diazoctanu etylu (EDA) w obecności miedzi(0) przebiega β -stereoselektywnie w stosunku do płaszczyzny pierścienia i prowadzi do odpowiedniego 1,2-cyklopropanocukru (**90**) z wydajnością 92% (Rys. 36) [166].

W tych samych warunkach cyklopropanowanie pochodnej D-galaktału i L-ramnału przebiegało od strony α płaszczyzny pierścienia. Uzyskane 1,2-cyklopropanocukry przekształcono w 2-deoksy-2-winylo mannozydy (**91**) i galaktozydy.



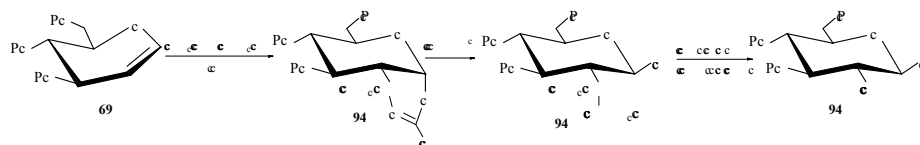
Rysunek 36

Niezależnie od powyższych wyników, Hoberg i Claffey przebadali addycję diazoocetanu etylu do różnie podstawionego D-glukalu oraz do per-*O*-acetylo-D-galaktału i L-ramnału w obecności różnych katalizatorów, w szczególności octanu rodu(II) [167]. W przeciwieństwie do rezultatów Fraser-Reida, w reakcjach prowadzonych przez Holberga dominowały produkty cyklopropanowania o stereochemii α .

Również van Boom i wsp. zastosowali octan rodu(II) jako katalizator addycji diazoocetanu etylu do różnych glikali i uzyskali tę samą co Holberg α -stereoselektywność [168]. Oznacza to, że użycie octanu rodu(II) i miedzi(0) jako katalizatorów pozwala na uzyskiwanie 1,2-cyklopropanocukrów o komplementarnej stereochemii.

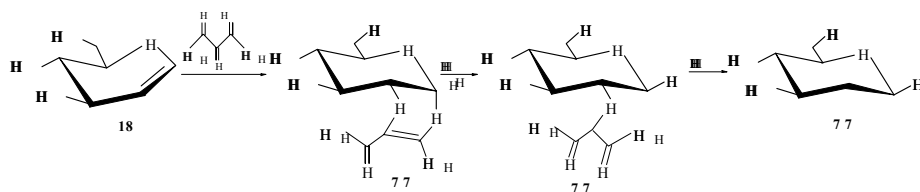
8. CYKLOADDYCJA

W poszukiwaniu nowych reagentów, które w sposób stereoselektywny prowadziłyby do glikozydowania, sięgnięto po reakcje cykloaddykcji glikali. Jedne z pierwszych prac z tej dziedziny pochodzą od Leblanca i wsp., którzy w indukowanej światłem cykloaddykcji dibenzylowych azodikarboksylanów do glikali otrzymywali bicykliczne produkty z atomem azotu połączonym z węglem C-2 pierścienia piranozy (**92**, Rys. 37) [169, 170]. Produkt takiej addycji w warunkach kwaśnej katalizy może być skutecznym donorem glikozydu. Wiązanie hydrazodikarboksylowe w powstałym glikozydzie (**93**) ulega łatwo redukcyjnemu rozerwaniu (Ra-Ni) z utworzeniem grupy aminowej (**94**). Danishefsky i wsp. zastosowali powyższą procedurę w syntezie tunikaminyouracylu [171].



Rysunek 37

Capozzi i Franck pracując nad syntezą 2-deoksyglikozydów wprowadzili siarkowo-tlenowe układy dienowe, ulegające reakcji [4+2]cykloaddycji z dienofilowym glikalem. Początkowo zastosowali do tego celu *orto*-tiochinony, które w reakcji z glikalem tworzyły cykloaddukty, łatwo przekształcane w 2-deoksy- α -*O*-arylowe glukozydy [172]. Później wprowadzili heterodienowy reagent w postaci 3-tiono-2,4-pentanodionu [173]. W reakcji per-*O*-benzylo-D-glukalu (**18**) z 3-tio-2,4-pentanodionem powstawał bicykliczny donor glikozylowy, głównie o konfiguracji α -D-gluko (**95**), który w obecności elektrofilowego katalizatora (E^{\oplus}) oraz akceptora glikozyłu ulegał β -glikozydowaniu (Rys. 38) [174]. 2-Tioacylowy podstawnik z utworzonego glikozydu (**96**) usuwano za pomocą niklu Raney'a, otrzymując 2-deoksyglikozyd (**97**). Capozzi i wsp. poddali modyfikacji, wytworzony w sposób opisany powyżej, bicykliczny donor glikozyłu (**95**) co pozwoliło na niezależne ukierunkowanie reakcji glikozydowania na α bądź β -anomery [175].



Rysunek 38

Cykloaddukty powstałe w reakcji *O*-benzylowanego (w różnym stopniu) D-glukalu i pochodnych α, α' -dioksonu mogą być niepeptydowymi ligandami receptora tachikiny w ludzkich komórkach NK-2 [176].

W reakcji cykloaddycji glikali z pochodnymi kwasu 5-tioksobarbiturowego, powstają analogi nukleozydów, z których niektóre wykazują pewną aktywność przeciwko HIV-1 w limfocytach człowieka [177].

Ostatnio, grupa Francka zaproponowała cykloaddycję 2-tio-3-ketolaktonów do glikali jako metodę pozyskiwania 2-deoksyglikozydów [178].

Cardona i wsp. prowadzili reakcję cykloaddycji *N*-tlenków piroliny do glikali, uzyskując pseudoaza-C-disacharydy, potencjalne inhibitory glikozydazy [179].

[2+2]Cykloaddycja dichloroketenu do glikalu prowadziła do otrzymania cyklicznego C-glikozydu, który został przekształcony w bicykliczne nukleozydy [180].

Pochodne D-glukalu ulegają reakcji cykloaddycji z *o*-hydroksybenzaldehydami w obecności ortomrówczanu trimetylu i katalitycznych ilości triflanu skandiu(III), w wyniku której powstają z dobrą wydajnością trójcykliczne piranobenzopirany [181].

PODSUMOWANIE

Glikale są grupą związków o ogromnych możliwościach aplikacyjnych. Zebrany w tej pracy materiał pokazuje część najbardziej znamiennych reakcji tej grupy związków, mających na celu przede wszystkim stereoselektywne tworzenie wiązania glikozydowego. Cytowane prace proponują nowe rozwiązania bądź modyfikacje znanych metod.

Praca finansowana w ramach grantu DS/8361-4-0134-6 oraz BW/8000-5-0297-6.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] T. Sokołowska, A. Wiśniewski, *Nomenklatura Węglowodanów, Zalecenia 1996*, Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław 2000, 66.
- [2] E. Fischer, K. Zach, Sitzber. Kgl. Preuss Akad. Wiss., 1913, **16**, 311.
- [3] W. Priebe, G. Gryniewicz, [w:] *Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology*, B. Fraser-Reid, K. Tatsuta, J. Thiem, Eds., Springer, Heidelberg, 2001, 749.
- [4] J. Thiem, P. Ossowski, J. Carbohydr. Chem., 1984, **3**, 287.
- [5] R.J. Ferrier, Adv. in Carbohydr. Chem., 1965, **20**, 68.
- [6] R.J. Ferrier, [w:] *The Carbohydrates, Chemistry and Biochemistry*, W. Pigman, D. Horton, J.D. Wander, Eds., Academic Press: New York, 1980, Vol. IB, 843.
- [7] E. Bettelli, P. Cherubini, P. D'Andrea, P. Passacantilli, G. Piancatelli, Tetrahedron, 1998, **54**, 6011.
- [8] A. Graziani, P. Passacantilli, G. Piancatelli, S. Tani, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2000, **11**, 3921.
- [9] V. Costantino, C. Imperatore, E. Fattorusso, A. Mangoni, Tetrahedron Lett., 2000, **41**, 9177.
- [10] A.R. De Corso, B. Panunzi, M. Tingoli, Tetrahedron Lett., 2001, **42**, 7245.
- [11] R. Murali, M. Nagarajan, Carbohydr. Res., 1996, **280**, 351.
- [12] V. Bolitt, C. Mioskowski, S.-G. Lee, J.R. Falck, J. Org. Chem., 1990, **55**, 5812.
- [13] C.H. Marzabadi, R.W. Franck, Tetrahedron, 2000, **56**, 8385.
- [14] D.J. Wardrop, W. Zhang, Tetrahedron Lett., 2002, **43**, 5389.
- [15] S.J. Danishefsky, R.L. Halcomb, J. Am. Chem. Soc., 1991, **113**, 5080.
- [16] N. Kaila, M. Blumenstein, H. Bielawska, R.W. Franck, J. Org. Chem., 1992, **57**, 4576.
- [17] N. Kaila, H.-A. Yu, Y.B. Xiang, Tetrahedron Lett., 1995, **36**, 5503.
- [18] K.C. Nicolaou, J.I. Trujillo, K. Chibale, Tetrahedron, 1997, **53**, 8751.
- [19] S. Sebesan, S. Neira, J. Org. Chem., 1991, **56**, 5468.
- [20] O.B. Flekhter, L.A. Baltina, G.A. Tllstikov, Russ. Chem. Bull., 1997, **46**, 1335.
- [21] O.B. Flekhter, L.A. Baltina, L.V. Spirikhin, I.P. Baikhova, G.A. Tolstikov, Russ. Chem. Bull., 1998, **47**, 513.
- [22] D.P. Curran, R. Ferritto, Y. Hua, Tetrahedron Lett., 1998, **39**, 4937.
- [23] R.G. Dushin, S.J. Danishefsky, J. Am. Chem. Soc., 1992, **114**, 3471.
- [24] C. Mouton, F. Tillequin, E. Seguin, C. Monneret, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1998, 2055.
- [25] C. Booma, K.K. Balasubramanian, Tetrahedron Lett., 1995, **36**, 5807.
- [26] K. Toshima, H. Nagai, Y. Ushiki, S. Matsumara, Synlett, 1998, 1007.
- [27] J.S. Yadav, B.V.S. Reddy, K. Bhaskar Reddy, M. Satyanarayana, Tetrahedron. Lett., 2002, **43**, 7009.
- [28] K. Takiura, S. Honda, Carbohydr. Res., 1972, **21**, 379.
- [29] R.U. Lemieux, A.R. Morgan, Can. J. Chem., 1965, **43**, 2190.
- [30] H. Paulsen, M. Springer, F. Reck, I. Brockhausen, H. Schachter, Carbohydr. Res., 1995, **275**, 403.
- [31] Y. Ogawa, H. Hinou, K. Matsuoka, D. Terunuma, H. Juzuhara, Tetrahedron Lett., 1998, **39**, 5789.

- [32] M. Izumi, Y. Ichikawa, *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 2079.
- [33] K. Suzuki, G.A. Sulikowski, R.W. Friesen, S.J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 8895.
- [34] R.W. Friesen, S.J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 6656.
- [35] R.W. Friesen, S.J. Danishefsky, *Tetrahedron*, 1990, **46**, 103.
- [36] D.B. Berkowitz, S.J. Danishefsky, G.K. Schulte, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 4518.
- [37] S.J. Danishefsky, M.T. Bilodeau, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1996, **35**, 1380.
- [38] J. Thiem, H. Karl, J. Schwentner, *Synthesis*, 1978, 696.
- [39] J. Thiem, H. Karl, *Tetrahedron Lett.*, 1978, **50**, 4999.
- [40] J. Thiem, W. Klaffke, *J. Org. Chem.*, 1989, **54**, 2006.
- [41] J. Thiem, S. Köpper, *Tetrahedron*, 1990, **46**, 113.
- [42] S. Köpper, J. Thiem, *Carbohydrate Res.*, 1994, **260**, 219.
- [43] S. Köpper, D. Springer, J. Thiem, *J. Carbohydr. Chem.*, 1994, **13**, 1065.
- [44] D. Horton, W. Priebe, *Carbohydr. Res.*, 1985, **136**, 391.
- [45] D. Horton, W. Priebe, O. Varela, *Carbohydr. Res.*, 1984, **130**, C1.
- [46] D. Horton, W. Priebe, M. Sznajdman, *Carbohydr. Res.*, 1990, **205**, 71.
- [47] S. Oscarson, U. Tedebark, *Carbohydr. Res.*, 1995, **278**, 271.
- [48] H.M.R. Hoffmann, U. Herden, M. Breithor, O. Rhode, *Tetrahedron*, 1997, **53**, 8383.
- [49] S.W.T. Choe, M.E. Jung, *Carbohydr. Res.*, 2000, **329**, 731.
- [50] R.W. Friesen, S.J. Danishefsky, *Tetrahedron*, 1990, **46**, 103.
- [51] D. Lafont, P. Boullanger, F. Carvalho, P. Vottero, *Carbohydr. Res.*, 1997, **297**, 117.
- [52] D. Lafont, P. Boullanger, M. Rosenzweig, *J. Carbohydr. Chem.*, 1998, **17**, 1377.
- [53] W.R. Roush, S. Narayan, C.E. Bennett, K. Briner, *Org. Lett.*, 1999, **1**, 895.
- [54] W.R. Roush, S. Narayan, *Org. Lett.*, 1999, **1**, 899.
- [55] W.R. Roush, C.E. Bennett, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 3541.
- [56] P.Y. Chong, W.R. Roush, *Org. Lett.*, 2002, **4**, 4523.
- [57] T.B. Durham, W.R. Roush, *Org. Lett.*, 2003, **5**, 1871.
- [58] W.R. Roush, R.A. Hartz, D.J. Gustin, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 1990.
- [59] M. Arai, S. Kaneko, T. Konosu, *Tetrahedron Lett.*, 2002, **43**, 6705.
- [60] D.G. Gammon, H.H. Kinfe, D.E. De Vos, P.A. Jacobs, B.F. Sels, *Tetrahedron Lett.*, 2004, **45**, 9533.
- [61] A. Kirschning, M. Jesberger, H. Monenschein, *Tetrahedron Lett.*, 1999, **40**, 8999.
- [62] K. Dax, M. Albert, J. Ortner, B.J. Paul, *Carbohydr. Res.*, 2000, **327**, 47.
- [63] J.D. McCarter, M.J. Adam, C. Braun, M. Namchuk, D. Tull, S.G. Withers, *Carbohydr. Res.*, 1993, **249**, 77.
- [64] C.C. Geilen, N. Loch, W. Reutter, K. Seppelt, F. Oberdorfer, *Tetrahedron Lett.*, 1992, **33**, 2435.
- [65] M.D. Burkart, Z. Zhang, S.-C. Hung, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 11743.
- [66] S.P. Vincent, M.D. Burkart, C.-Y. Tsai, Z. Zhang, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.*, 1999, **64**, 5264.
- [67] M. Albert, K. Dax, J. Ortner, *Tetrahedron*, 1998, **54**, 4839.
- [68] Y. Ito, T. Ogawa, *Tetrahedron Lett.*, 1987, **28**, 2723.
- [69] G. Grewal, N. Kaila, R.W. Franck *J. Org. Chem.*, 1992, **57**, 2084.
- [70] S. Hashimoto, Y. Yanagiya, T. Honda, S. Ikegami, *Chem. Lett.*, 1992, 1511.
- [71] W.R. Roush, D.P. Sebesta, R.A. James, *Tetrahedron*, 1997, **53**, 8837.
- [72] D.P. Sebesta, W.R. Roush, *J. Org. Chem.*, 1992, **57**, 4799.
- [73] M. Perez, J.-M. Beau, *Tetrahedron Lett.*, 1989, **30**, 75.
- [74] K.C. Nicolaou, J. Pastor, S. Barluenga, N. Winssinger, *Chem. Commun.*, 1998, 1947.
- [75] J. Borowiecka, P. Lipka, M. Michalska *Tetrahedron*, 1988, **44**, 2067.
- [76] H. Bielawska, M. Michalska *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 9761.
- [77] P. Somak, J. Narayanaswamy *Carbohydr. Res.*, 2004, **339**, 2197.
- [78] J. Banoub, P. Boullanger, D. Lafont, *Chem. Rev.*, 1992, **92**, 1167.

- [79] P.M. Collins, R.J. Ferrier, *Monosaccharides, Their Chemistry and Their Roles in Natural Products*, J. Wiley & Sons, Chichester, 1995, 217.
- [80] R.U. Lemieux, T.L. Nagabhushan, S.W. Gunner, *Can. J. Chem.*, 1968, **46**, 405.
- [81] B. Liberek, Z. Smiatacz, *Wiad. Chem.*, 1999, **53**, 461.
- [82] A. Banaszek, W. Karpiesiuk, *Carbohydr. Res.*, 1994, **251**, 233.
- [83] B. Liberek, R. Frankowski, Z. Smiatacz, *Polish J. Chem.*, 1999, **73**, 1153.
- [84] R.U. Lemieux, R.M. Ratcliffe, *Can. J. Chem.*, 1979, **57**, 1244.
- [85] W. Kinzy, R.R. Schmidt, *Tetrahedron Lett.*, 1987, **28**, 1981.
- [86] P.H. Seeberger, S. Roehring, P. Schell, Y. Wang, W.J. Christ, *Carbohydr. Res.*, 2000, **328**, 61.
- [87] J.B. Schwarz, S.D. Kuduk, X.-T. Chen, D. Sames, P.W. Glunz, S.J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 2662.
- [88] H. Herzner, T. Reipen, M. Schultz, H. Kunz, *Chem. Rev.*, 2000, **100**, 4495.
- [89] S.A. Svarovsky, J.J. Barchi, Jr., *Carbohydr. Res.*, 2003, **338**, 1925.
- [90] M. Tingoli, M. Tiecco, D. Chianelli, R. Balducci, A. Temperini, *J. Org. Chem.*, 1991, **56**, 6809.
- [91] S. Czernecki, E. Ayadi, D. Randriamandimby, *J. Org. Chem.*, 1994, **59**, 8256.
- [92] F. Santoyo-González, F.G. Calvo-Flores, P. Garcia-Mendoza, F. Hernández-Mateo, J. Isac-Garcia, R. Robles-Diaz, *J. Org. Chem.*, 1993, **58**, 6122.
- [93] S. Mehta, B.M. Pinto, *J. Org. Chem.*, 1993, **58**, 3269.
- [94] S. Yamago, T. Yamada, O. Hara, H. Ito, Y. Mino, J. Yoshida, *Org. Lett.*, 2001, **3**, 3867.
- [95] W.-T. Jiaang, M.-Y. Chang, P.-H. Tseng, S.-T. Chen, *Tetrahedron Lett.*, 2000, **41**, 3127.
- [96] Y.V. Mironov, A.A. Sherman, N.E. Nifantiev, *Tetrahedron Lett.*, 2004, **45**, 9107.
- [97] D.A. Griffith, S.J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 5811.
- [98] U. Iserloh, V. Dudkin, Z.-G. Wang, S.J. Danishefsky, *Tetrahedron Lett.*, 2002, **43**, 7027.
- [99] D.A. Griffith, S.A. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 5863.
- [100] D.A. Griffith, S.A. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 9526.
- [101] Z.-G. Wang, X. Zhang, M. Visser, D. Live, A. Zatorski, U. Iserloh, K.O. Lloyd, S.J. Danishefsky, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, **40**, 1728.
- [102] V.Y. Dudkin, J.S. Miller, S.J. Danishefsky, *Tetrahedron Lett.*, 2003, **44**, 1791.
- [103] J. Du Bois, C.S. Tomooka, J. Hong, E.M. Carreira, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 3179.
- [104] F.P. Boulineau, A. Wei, *Carbohydr. Res.*, 2001, **334**, 271.
- [105] V.D. Bussolo, J. Liu, L. Huffman, D.Y. Gin, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2000, **39**, 204.
- [106] J. Liu, D.Y. Gin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 9789.
- [107] J. Liu, V. Di Bussolo, D.Y. Gin, *Tetrahedron Lett.*, 2003, **44**, 4015.
- [108] R.L. Halcomb, S.J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 6661.
- [109] K. K.-C. Liu, S.J. Danishefsky, *J. Org. Chem.*, 1994, **59**, 1895.
- [110] T.K. Park, I.J. Kim, S.J. Danishefsky, *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 9089.
- [111] C.M. Timmers, M. Dekker, R.C. Buijsman, G.A. van der Marel, B. Ethell, G. Anderson, B. Burchell, G.J. Mulder, J.H. van Boom, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1997, **7**, 1501.
- [112] D.A. Evans, B.W. Trotter, B. Côté, *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 1709.
- [113] J.D. Rainier, J.M. Cox, *Org. Lett.*, 2000, **2**, 2707.
- [114] Ch. Ernst, W. Klaffke, *Tetrahedron Lett.*, 2001, **42**, 2973.
- [115] Ch. Ernst, M. Piacenza, S. Grimme, W. Klaffke, *Carbohydr. Res.*, 2003, **338**, 231.
- [116] H.M.I. Osborn, T.H. Khan, *Tetrahedron*, 1999, **55**, 1807.
- [117] G.J.S. Lohman, P.H. Seeberger, *J. Org. Chem.*, 2003, **68**, 7541.
- [118] V. Di Bussolo, Y.-J. Kim, D.Y. Gin, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 13515.
- [119] J.-Y. Kim, V. Di Bussolo, D.Y. Gin, *Org. Lett.*, 2001, **3**, 303.
- [120] Y.-J. Kim, D.Y. Gin, *Org. Lett.*, 2001, **3**, 1801.
- [121] W. Priebe, A. Zamojski, *Tetrahedron*, 1980, **36**, 287.

- [122] R. Blattner, R.J. Ferrier, R.H. Furneaux, *Tetrahedron Asymm.*, 2000, **11**, 379.
- [123] B. Doboszewski, N. Blaton, P. Herdewijn, *J. Org. Chem.*, 1995, **60**, 7909.
- [124] R.J. Ferrier, N. Prasad, *J. Chem. Soc. (C)*, 1969, 570.
- [125] E. Wieczorek, J. Thiem, *Carbohydr. Res.*, 1998, **307**, 263.
- [126] Z.J. Liu, M. Zhou, J.M. Min, L.H. Zhang, *Tetrahedron Asymm.*, 1999, 2119.
- [127] G. Gryniewicz, W. Priebe, A. Zamojski, *Carbohydr. Res.*, 1979, **68**, 33.
- [128] S. Danishefsky, J.F. Kerwin, Jr., *J. Org. Chem.*, 1982, **47**, 3803.
- [129] J.S. Yadav, B.V.S. Reddy, J.V. Raman, N. Niranjana, S. Kiran Kumar, A.C. Kunwar, *Tetrahedron Lett.*, 2002, **43**, 2095.
- [130] M. Takhi, A.A.-H. Abdel Rahman, R.R. Schmidt, *Tetrahedron Lett.*, 2001, **42**, 4053.
- [131] S. Hotha, A. Tripathi, *Tetrahedron Lett.*, 2005, 4555.
- [132] P. Tiwari, G. Agnihotri, A.K. Misra, *Carbohydr. Res.*, 2005, **340**, 749.
- [133] S. Xue, L. He, K.-Z. Han, X.Q. Zheng, Q.-X. Guo, *Carbohydr. Res.*, 2005, **340**, 303.
- [134] B.S. Babu, K.K. Balasubramanian, *Tetrahedron Lett.*, 1999, **40**, 5777.
- [135] E. Wieczorek, J. Thiem, *Polish J. Chem.*, 1999, **73**, 1111.
- [136] A.L.J. Byerley, A.M. Kenwright, P.G. Steel, *Tetrahedron Lett.*, 1996, **37**, 9093.
- [137] B. Doboszewski, N. Blaton, P. Herdewijn, *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 1321.
- [138] S. Chandrasekar, Ch.R. Reddy, G. Chandrashekar, *Tetrahedron Lett.*, 2004, **45**, 6481.
- [139] H. Kawabata, S. Kubo, M. Hayashi, *Carbohydr. Res.*, 2001, **333**, 153.
- [140] J.S. Yadav, B.V. S. Reddy, P.K. Chand, *Tetrahedron Lett.*, 2001, **42**, 4057.
- [141] A. Takano, H. Fukuhara, T. Ohno, M. Kutsuma, T. Fujimoto, H. Shirai, R. Iriye, A. Kakehi, I. Yamamoto, *J. Carbohydr. Chem.*, 2003, **22**, 443.
- [142] B. Liberek, Z. Smiatacz, *Polish J. Chem.*, 2000, **74**, 989.
- [143] A. Banaszek, A. Zamojski, *Polish J. Chem.*, 1979, **53**, 2029.
- [144] H.H. Baer, L. Siemsen, *Carbohydr. Res.*, 1986, **146**, 63.
- [145] R.J. Ferrier, N. Prasad, *J. Chem. Soc. (C)*, 1969, 575.
- [146] P.H. Gross, *Carbohydr. Polym.*, 1998, **37**, 215.
- [147] F. Gonzalez, S. Lesage, A. Perlin, *Carbohydr. Res.*, 1975, **42**, 267.
- [148] P. Hansen, J. Lau, E.B. Pedersen, C.M. Nielsen, *Liebigs Ann. Chem.*, 1990, 1079.
- [149] E.B. Pedersen, J. Wengel, *Synthesis*, 1991, 451.
- [150] L. Daley, P. Roger, C. Monneret, *J. Carbohydr. Chem.*, 1997, **16**, 25.
- [151] A. Dąbrowska, P. Dokurno, A. Konitz, Z. Smiatacz, *Carbohydr. Res.*, 2000, **323**, 230.
- [152] B. Liberek, A. Dąbrowska, R. Frankowski, Z. Smiatacz, *J. Carbohydr. Chem.*, 2004, **23**, 417.
- [153] B. Liberek, A. Dąbrowska, R. Frankowski, M. Matuszewska, Z. Smiatacz, *Carbohydr. Res.*, 2002, **337**, 1803.
- [154] J.-C. Florent, C. Monneret, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1987, 1171.
- [155] B. Abbaci, J.-C. Florent, C. Monneret, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1989, 1896.
- [156] B. Abbaci, J.-C. Florent, C. Monneret, *Carbohydr. Res.*, 1992, **228**, 171.
- [157] J. Wengel, J. Lau, E.B. Pedersen, C. M. Nielsen, *J. Org. Chem.*, 1991, **56**, 3591.
- [158] R. Sagar, R. Pathak, A.K. Shaw, *Carbohydr. Res.*, 2004, **339**, 2031.
- [159] M. Yu, B.L. Pagenkopf, *Tetrahedron*, 2005, **61**, 321.
- [160] R. Murali, C.V. Ramana, M. Nagarajan, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1995, 217.
- [161] J. Furukawa, N. Kawabata, J. Nishimura, *Tetrahedron*, 1968, **24**, 53.
- [162] J.O. Hoberg, J.J. Bozell, *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 6831.
- [163] J.O. Hoberg, *J. Org. Chem.*, 1997, **62**, 6615.
- [164] R.W. Scott, C.H. Heathcock, *Carbohydr. Res.*, 1996, **291**, 205.
- [165] C.V. Ramana, R. Murali, M. Nagarajan, *J. Org. Chem.*, 1997, **62**, 7694.
- [166] K.J. Henry Jr., B. Fraser-Reid, *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 8901.

- [167] J.O. Hoberg, D.J. Claffey, *Tetrahedron Lett.*, 1996, **37**, 2533.
- [168] C.M. Timmers, M.A. Leeuwenburgh, J.C. Verheijen, G.A. van der Marel, J.H. van Boom, *Tetrahedron Asymm.*, 1996, **7**, 49.
- [169] Y. Leblanc, B.J. Fitzsimmons, J.P. Springer, J. Rokach, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 2995.
- [170] Y. Leblanc, B.J. Fitzsimmons, *Tetrahedron Lett.*, 1989, **30**, 2889.
- [171] S.J. Danishefsky, S.L. DeNinno, S.-H. Chen, L. Boisvert, M. Barbachyn, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 5810.
- [172] G. Capozzi, Ch. Falciani, S. Menichetti, C. Nativi, R.W. Franck, *Tetrahedron Lett.*, 1995, **36**, 6755.
- [173] G. Capozzi, A. Dios, R.W. Franck, A. Geer, C. Marzabadi, S. Menichetti, Ch. Nativi, M. Tamarez, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1996, **35**, 777.
- [174] R.W. Franck, C.H. Marzabadi, *J. Org. Chem.*, 1998, **63**, 2197.
- [175] G. Capozzi, F. Mannocci, S. Menichetti, C. Nativi, S. Paoletti, *Chem. Commun.*, 1997, 2291.
- [176] G. Capozzi, S. Giannini, S. Manichetti, C. Nativi, A. Giolitti, R. Patacchini, E. Perrotta, M. Altamura, C.A. Maggi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2002, **12**, 2263.
- [177] C.H. Marzabadi, R.W. Franck, R.F. Schinazi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2002, **10**, 273.
- [178] M.M. Tamarez, R.W. Franck, A. Geer, *Tetrahedron*, 2003, **59**, 4249.
- [179] F. Cardona, S. Valenza, A. Goti, A. Brandi, *Tetrahedron Lett.*, 1997, **38**, 8097.
- [180] J. Oh, Ch. R. Lee, K.H. Chun, *Tetrahedron Lett.*, 2001, **42**, 4879.
- [181] J.S. Yadav, B.V.S. Reddy, L. Chandraiah, B. Jagannadh, S.K. Kumar, A.C. Kunwar, *Tetrahedron Lett.*, 2002, **43**, 4527.

Praca wpłynęła do Redakcji 16 grudnia 2005

PEPTYDOWE KONIUGATY ANTRACHINONÓW I ICH AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA

PEPTIDYL ANTHRAQUINONE CONJUGATES AND ITS BIOLOGICAL ACTIVITY

**Magdalena Kukowska¹, Krystyna Dzierzbicka²,
Zbigniew Maćkiewicz¹**

¹ *Zakład Chemii Polipeptydów, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański,
ul. J. Sobieskiego 18/19, 80-952 Gdańsk*

² *Katedra Chemii Organicznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Gdańska,
ul. G. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk*

Abstract

Wprowadzenie

1. Metody syntezy peptydowych koniugatów antrachinonów i ich aktywność biologiczna

1.1. Synteza w roztworze

1.2. Synteza na nośniku stałym

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



mgr inż. Magdalena Kukowska – urodziła się w 1981 roku w Gdańsku. W latach 2000–2005 studiowała Biotechnologię na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej. W 2005 roku uzyskała tytuł magistra inżyniera, na kierunku Biotechnologia Leków. Pracę dyplomową wykonała w Katedrze Chemii Organicznej na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej. Obecnie jest słuchaczką Studium Doktoranckiego na tym Wydziale, gdzie kontynuuje pracę nad syntezą związków o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej.



Dr hab. inż. Krystyna Dzierzbicka w roku 1985 ukończyła studia na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej o specjalności Chemia i Technologia Organiczna. W tym samym roku podjęła pracę w Katedrze Chemii Organicznej Politechniki Gdańskiej w zespole naukowym prof. Aleksandra Kołodziejczyka, gdzie pracuje do chwili obecnej. W 1994 roku obroniła pracę doktorską, a w 2005 r. otrzymała tytuł doktora habilitowanego nauk chemicznych.

Jest współautorem kilkunastu prac dotyczących syntezy i projektowania koniugatów muramylopeptydów i desmuramylopeptydów ze związkami o stwierdzonej lub domniemanej aktywności biologicznej, pochodnych akrydyny, akrydonu, batracyliny czy tuftsyny. Obecnie zajmuje się syntezą analogów atrachinonów i inhibitorów angiogenezy.

ABSTRACT

This article concerns methods of synthesis and biological activity of peptidyl anthraquinones. The group of these components have a big influence on a present medicine. Among components, that were presented in this paper, many number of them show antineoplastic activity. These peptidyl anthraquinones demonstrate special mechanism of action, stabilizing cleavable complex consisting of topoisomerase, covalently attached to DNA and stop correct replication and transcription. Using of topoisomerases inhibitors (**11a,c,d, 73l,m**) (Figure 2 and Scheme 9) in therapy of cancer have promising results [18, 26–28]. Anthraquinones analogues with peptidyl chain (**78a–h**) (Scheme 10) including KCR motif very important in AP-1 protein binding to DNA. This group of compounds can be used as potential transcription factor inhibitors, because they show DNA intercalative binding and recognize specific sequences of DNA binding domains [48–54]. Synthetic GnRH analogues including rings of anthraquinone (**69a,b**) (Scheme 8) present interesting drugs using in reproductive diseases, for instance prostate, ovarian and breast cancer. The mechanism of action of GnRH analogues count on binding to GnRH receptors, which we can find in cells of reproductive organs [45, 46]. MMP-9 activity can be exploited to activate prodrugs and be a target the tumour cells in BM. Cleavage of the prodrugs (**66, 67a,b**) (Figure 3) with MMP-9 results in the liberation of the active form of drug which can be an inhibitor of topoisomerase. Tripeptide derivatives of anthraquinone (**22, 33, 40**) (Scheme 2, Scheme 3) show the activity as histochemical reagents for detection of TTP I activity [38–44]. Peptidyl anthraquinones can be also used for protein purification and labeled peptides as biochemical probes for DNA detection [18].

Key words: peptidyl anthraquinone conjugates, synthesis, biological activity

Słowa kluczowe: peptydowe koniugaty antrachinonów, synteza, aktywność biologiczna

WPROWADZENIE

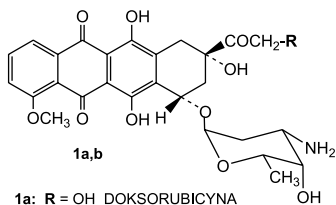
Antybiotyki antracyklinowe są szeroko stosowaną grupą leków w chemioterapii przeciwnowotworowej. Cząsteczka antracykliny złożona jest z fragmentu aglikonowego pochodnych antrachinonu połączonego z aminocukrem wiązaniem β -1,7-*O*-glikozydowym. W doksorubicynie (**1a**) i daunorubicynie (**1b**) (Rys. 1) aminocukrem jest daunozaмина. Wykazują one szerokie spektrum aktywności przeciwnowotworowej. Stosowane są w leczeniu m.in. ostrych białaczek i guzów litych. Niestety, związki te posiadają także niekorzystne właściwości, ograniczające w sposób istotny ich zastosowanie w klinice. Do głównych wad antybiotyków antracyklinowych należą: wysoka kardiotoxyczność oraz brak aktywności w stosunku do komórek o oporności wielolekowej.

Polepszenie farmakologicznych własności antybiotyków antracyklinowych było przyczyną rozpoczęcia poszukiwań syntetycznych analogów pozbawionych tych wad. Jedną z syntetycznych pochodnych antracyklin jest mitoksantron (**2**) (Rys. 1), lek klinicznie stosowany w ziarnicy złośliwej, białaczce limfatycznej i nowotworach narządowych (w tym nowotworu piersi) [1]. Obecność dwóch podstawników alkiloaminowych stwarza możliwość tworzenia wiązań poprzecznych między zasadami w łańcuchu DNA i umożliwia działanie interkalujące. Mitoksantron również wywołuje liczne niepożądane działania uboczne, głównie kardiotoxyczność, która wynika ze zdolności antrachinonów do generowania rodników tlenowych [2–4] oraz braku aktywności w stosunku do komórek o oporności wielolekowej. Jednak w porównaniu z doksorubicyną wywołuje mniej niepożądanych objawów w odniesieniu do mięśnia sercowego.

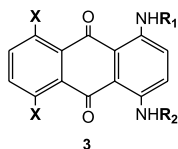
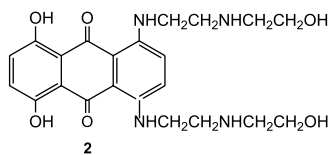
Do tej pory zsyntetyzowano kilkaset pochodnych antrachinonów [5]. Niektóre z nich wykazały bardzo interesujące i obiecujące właściwości przeciwnowotworowe. Godne uwagi są pochodne z niesymetrycznymi łańcuchami bocznymi **3** [6] i aza analogi zawierające pierścień pirydynowy **4** [7] lub pirydazynowy **5** [8] (Rys. 1). Okazało się, że większość modyfikacji antrachinonów, których celem było przeciwdziałanie oporności wielolekowej jest łączona z chromoforowym pięcio- lub sześcioczłonowym heterocyklicznym pierścieniem [9–11]. Rezultatem tych spostrzeżeń stało się zaprojektowanie antrapirazoli **6** [12, 13] i ich aza analogów **7** [14], antrapirydonów **8**, antrapirydazonów **9** [15] i benzo[*e*]piramidonów **10** [16, 17] (Rys. 1).

Zsyntetyzowano również peptydowe koniugaty antrachinonów nie tylko jako potencjalne chemoterapeutyki, ale także jako związki odgrywające rolę barwnych ligandów (chromoforów) w metodach oczyszczania białek, technikach histochemicznych i badaniu helikalnej struktury DNA z zastosowaniem spektroskopii w ultrafioletecie (UV) i świetle widzialnym (UV-Vis) [18, 19].

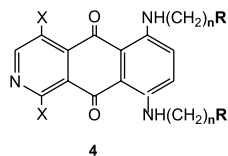
Mimo, iż do tej pory zsyntetyzowano cały szereg analogów antrachinonów, a niektóre z nich wykazały bardzo obiecujące właściwości przeciwnowotworowe, nadal trwa poszukiwanie nowych pochodnych, w tym zdolnych do działania w oparciu o inny mechanizm niż dotychczas poznany.



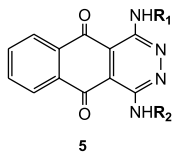
1a: R = OH DOKSORUBICZYNA
1b: R = H DAUNORUBICZYNA



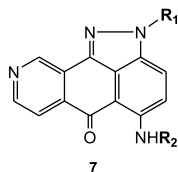
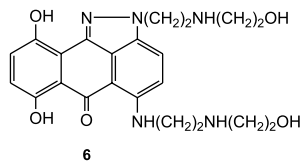
X = H; OH
 R₁ = aminoalkil
 R₂ = aminoalkil



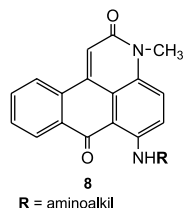
np. n = 2; R = N(CH₃)₂
 n = 2; R = NH₂
 n = 2; R = NHCOCH₃
 n = 3; R = NH₂
 n = 4; R = NH₂
 n = 2; R = NHCH₃



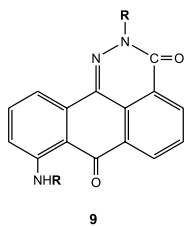
R₁ = aminoalkil; hydroksyalkil; benzyl
 R₂ = H; R₁



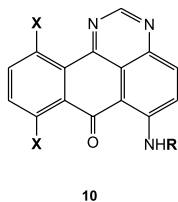
R₁ = aminoalkil
 R₂ = aminoalkil



R = aminoalkil



R = aminoalkil



X = H; OH
 R = aminoalkil

Rysunek 1

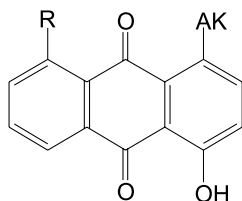
1. METODY SYNTEZ PEPTYDOWYCH KONIUGATÓW ANTRACHINONÓW I ICH AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA

1.1. SYNTEZA W ROZTWORZE

Coraz większego znaczenia we współczesnej onkologii nabierają cytostatyki będące inhibitorami topoizomerazy (topo). Topoizomerazy stanowią grupę enzymów uczestniczących w procesie prawidłowej replikacji DNA. Topoizomeraza I (topo I) katalizuje relaksację cząsteczki DNA poprzez powstawanie pęknięć w jednej nici, przyłączenie się do niej oraz w końcowym etapie odtworzenie struktury DNA [20]. Natomiast topoizomeraza II (topo II) jest odpowiedzialna za tworzenie nacięć na dwóch komplementarnych niciach DNA, które łagodzą tzw. stres torsyjny powstały w pewnych rejonach DNA na skutek transkrypcji, replikacji lub podziałów mitotycznych oraz za połączenie nici DNA w celu uzyskania dwuniciowej cząsteczki. [21]. Etapem przejściowym pomiędzy tworzeniem „przerw” w strukturze DNA, a ponownym jej łączeniem jest tzw. kompleks rozszczepialny (nić DNA + + topo), który stał się celem farmakologicznym w poszukiwaniu nowych chemoterapeutyków. Najwyższy poziom i aktywność topoizomerazy jest w jądrze komórkowym w fazie S cyklu komórkowego, jednakże większość środków farmakologicznych działa także poza tą fazą. Mechanizm działania inhibitorów topoizomerazy skierowany jest na aktywność enzymu w wyniku stabilizacji kompleksu rozszczepialnego. Stabilny trójskładnikowy kompleks (nić DNA + topo + inhibitor) zapobiega naturalnemu mechanizmowi naprawy nici DNA z użyciem topo [22–24]. Przyłączenie inhibitora topo I do utworzonego dwuskładnikowego kompleksu hamuje odtwarzanie wiązań DNA i prowadzi do przerywania procesu replikacji wskutek uszkodzenia helikalnej struktury DNA i zatrzymania widełek replikacyjnych. Takie działanie wpływa pośrednio na proces transkrypcji genu TP53 (kodującego białko p53), a także akumulację białka p53 (odpowiedzialnego za aktywność programowanej śmierci komórkowej), czego efektem jest zahamowanie wzrostu komórki i apoptoza [22, 23]. Związki stabilizujące kompleksy rozszczepialne z udziałem topo II uniemożliwiają odtworzenie dwóch nici DNA czego efektem są „przerwy” w strukturze DNA, w miejscu których wiązane są białka, co w rezultacie prowadzi do śmierci komórki lub uruchamia inne mechanizmy uszkodzające komórki [21].

Biologiczne właściwości inhibitorów topoizomerazy I stały się podstawą do poszukiwania nowych analogów naturalnego inhibitora kamptotecyny (CPT) oraz innych związków, których miejscem uchwytu będzie ten enzym [25]. Obecnie dużym zainteresowaniem cieszą się peptydowe analogi antrachinonów jako potencjalne związki hamujące aktywność topo I. Mechanizm ich działania polega nie tylko na inhibicji, ale także jako związki zawierające układ kilku pierścieni aromatycznych mają również zdolność interkalacji pomiędzy pary nukleozasady tworząc stały kompleks z helisą DNA.

Cummings i Mincher [26] zsyntetyzowali analogi antrachinonu z aminokwasami. Taka modyfikacja miała na celu zwiększenie zdolności wiązania związku z DNA i całkowite zredukowanie możliwości zniszczenia helikalnej struktury DNA, a także dawała nadzieję na przezwycięzenie problemu oporności wielolekowej (MDR). Synteza związków **11a–e** (Rys. 2) polegała na reakcji estrów α -aminokwasów z 1,4-dihydrokso-9,10-antrachinonem [27]. Spośród 13 zsyntetyzowanych analogów tylko pięć wykazało aktywność hamowania topo na pięciu liniach komórek jajników chińskich chomików (CHO) i dwóch liniach komórek ludzkiego raka jajnika. Dwa z nich, **11a,e** nie wykazały zdolności interkalacji do DNA bądź była ona bardzo słaba. W wyniku szeregu przeprowadzonych badań zaobserwowano, że związek **11b** był aktywny przeciwko komórkom ludzkiego raka jelita grubego (HT-29) i ludzkiego niedrobnokomórkowego raka płuc (NX002). W obu przypadkach nastąpiło ograniczenie wzrostu guza o 50%. Związek ten nie wykazywał zdolności interkalacji pomiędzy pary zasad DNA, ale stabilizował rozszczepialny kompleks (nie DNA + topo I) [27]. Ponadto dla trzech związków **11a,c,d** z tej grupy zaobserwowano zdolność do wiązania się z DNA i hamowania topoizomerazy. Stwierdzono, także silną korelację pomiędzy inhibicją a cytotoksycznością przeciw linii komórkowej ludzkiego raka jajnika (A2780), sugerując tym samym śmierć komórkową poprzez częściowe zahamowanie aktywności tego enzymu [28].

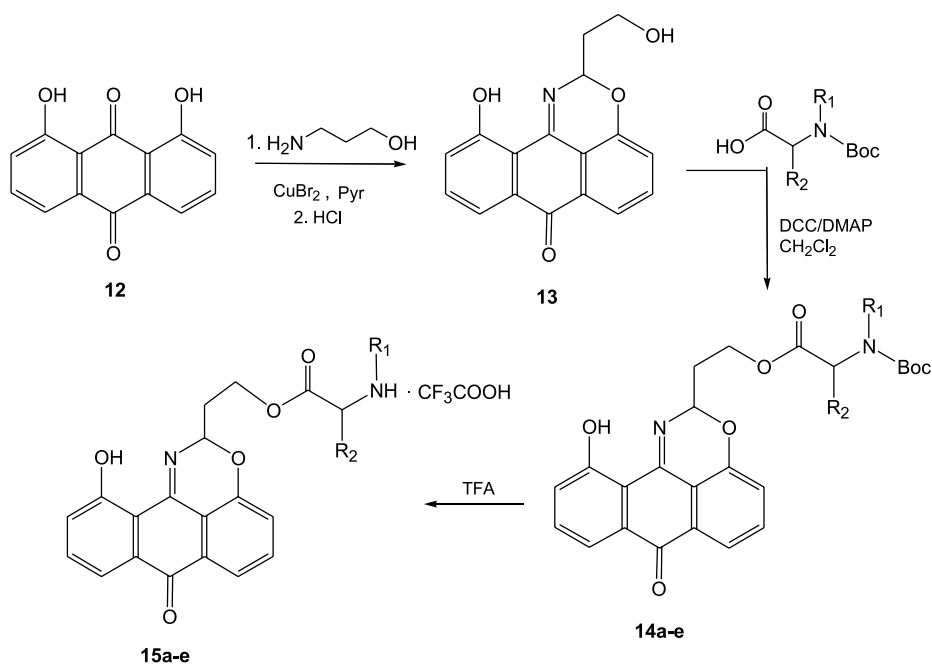
**11a-e**

Symbol	AK (Aminokwas)	Modyfikacje łańcucha na C-końcu	R
11a	Seryna	-NHNH ₂	-H
11b	Tyrozyna	-OC ₂ H ₅	-H
11c	Seryna	-NHNH ₂	-OH
11d	Arginina	-OCH ₃	-H
11e	Dihydroksyfenyloalanina	-OCH ₃	-H

Rysunek 2

Dias i wsp. [29] zsyntetyzowali serię pochodnych antrachinonów również połączonych z aminokwasami. W pierwszej kolejności uzyskali oksapirydazon **13** w reakcji 1,8-dihydrokso-9,10-antrachinonu z 3-amino-1-propanolem i bromkiem

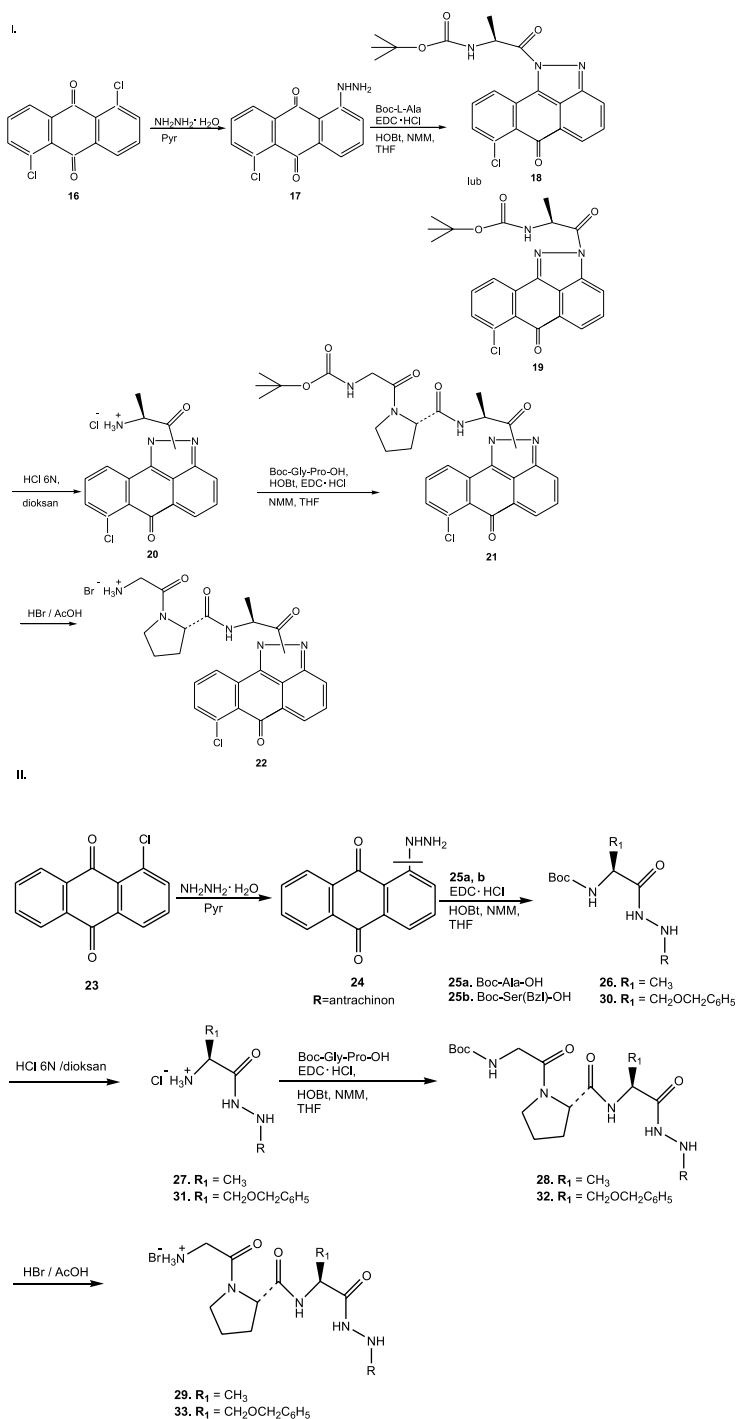
miedzi(II). Następnie stosując metodę karbodiimidową (DCC) otrzymali związki **14a–e**, a po usunięciu osłony *t*-butyloksykarbonylowej (Boc) kwasem trifluorooctowym (TFA) uzyskali związki **15a–e** (Schemat 1). Spośród zsyntetyzowanych azabenzooantracenowych pochodnych **15a–e** wszystkie wykazywały zdolność do interkalacji pomiędzy zasady DNA, ale jedynie związek **15d** zawierający lizynę był cytotoksyczny, posiadał aktywność proapoptyczną, silnie wiążąc się z DNA i rozpoznając określone sekwencje: 5'-CTAAAGG i 5'-ATGC (DNaza I footprinting). Na poziomie komórkowym związek ten wykazywał zdolność hamowania syntezy DNA stabilizując rozszczepialny kompleks (nić DNA + topo) w fazie S cyklu komórkowego. Ponadto wykazywał on aktywność w stosunku do linii komórkowej ludzkiej białaczki.



15	R1	R2	
a	H	CH ₃	Ala
b	H	CH ₂ Ph	Phe
c	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -		Pro
d	H	(CH ₂) ₄ NH ₂ -CF ₃ COOH	Lys
e	H	H	Gly

Schemat 1. Synteza pochodnych antrachinonów z aminokwasami [29]

Kim i wsp. [19] zaprojektowali kilka nowych koniugatów antrachinonów z peptydami jako potencjalnych związków służących do badania aktywności tripeptydylo-peptydazy (TPP I).

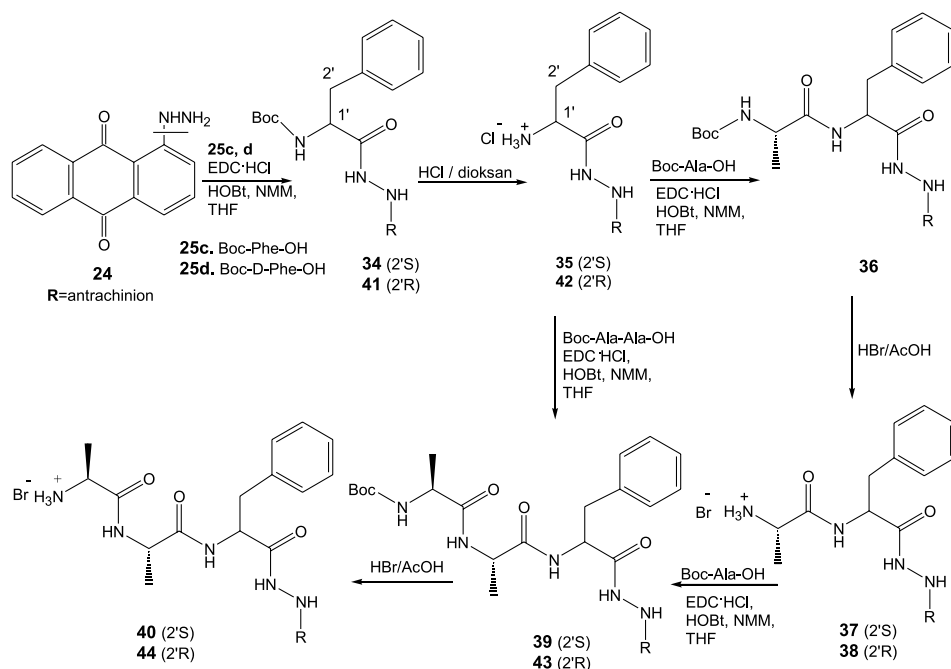


Schemat 2. Synteza peptydoantrapirazoli, alanyloglicyloproli- i seryloglicyloproli- antrachinonów [19]

Tripeptydylo-peptydaza I jest lizosomalną egzo-peptydazą odpowiedzialną za sekwencyjne odcinanie tripeptydów z *N*-końca polipeptydów zawierających wolną grupę aminową. Mutacje występujące w genie *CLN2*, kodującym TPP I, prowadzą do ciężkiego autosomalnego, recesywnie dziedziczonego schorzenia neurologicznego, tzw. klasycznej późnoniemowlęcej ceroidolipofuscynozy neuronalnej. Badania nad tą chorobą ograniczają się do śledzenia aktywności TPP I z zastosowaniem tripeptydowych pochodnych. Występowanie, biogeneza i mechanizmy aktywacji TPP I zostały opisane bardzo szeroko w literaturze [30–32].

Kim i wsp. rozpoczęli syntezę od przygotowania związków wyjściowych **16** i **23**, uzyskując w reakcji z hydroksyhydrazyną w pirydynie odpowiednio: 5-chloro-1-antrachinylohydrazyd (**17**) i 1-hydrazynoantrachinon (**24**). Etap łączenia związku **16** i **23** z odpowiednim Boc chronionym aminokwasem lub peptydem był prowadzony w obecności *N*-hydroksybenzotriazolu (HOBt) i chlorku 1,3-dimetyloaminypropylo-3-etylokarbodiimidu (EDC·HCl), jako odczynnika kondensującego w tetrahydrofuranie (THF). Po usunięciu osłony Boc bromowodorem (HBr) w kwasie octowym (AcOH) lub chlorowodorem (HCl) w dioksanie, uzyskano produkt **22** (Schemat 2). Zastosowanie EDC·HCl zamiast DCC pozwoliło na zwiększenie wydajności reakcji dla niektórych połączeń z 31% do 65%. W przypadku użycia EDC·HCl do syntezy 1,5-dichloro-9,10-antrachinonu z hydroksyhydrazyną i Boc-Ala-OH wystąpiła reakcja cyklizacji w pierścieniu antrachinonowym i uzyskano antrapirazole **18** lub **19**. Otrzymane produkty były izomerami i oba pozwalały na uzyskanie związku **22** niezależnie od siebie, stosując odpowiednie odczynniki.

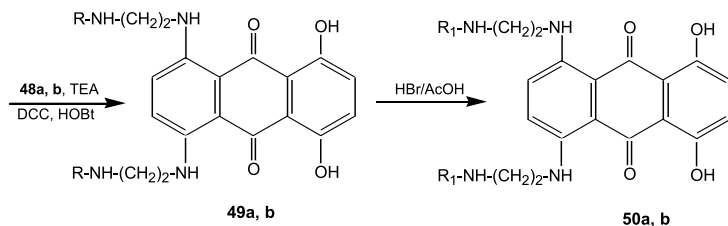
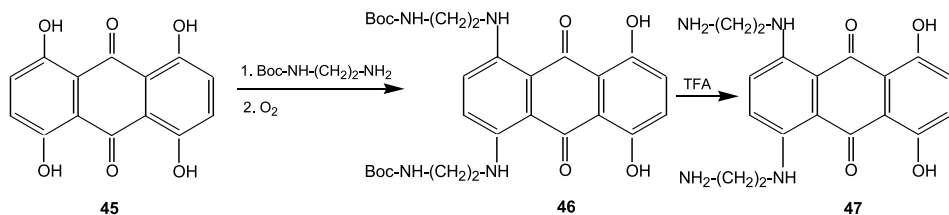
Schemat 3 przedstawia drogę syntezy, w której użycie HBr/AcOH spowodowało racemizację (3:1) i powstanie dwóch diastereoizomerów. Główny diastereoizomer **37** w reakcji z Boc-Ala-OH daje chroniony tripeptydyloantrachinon **39**, a po deprotekcji produkt **40**. Stosując Boc-Ala-Ala-OH otrzymano związek **43**, z którego selektywnie zdjęto osłonę Boc uzyskując produkt **44**. Otrzymane pochodne antrachinonów poddano badaniom histochemicznym, mającym na celu zbadanie aktywności tripeptydylo-peptydazy poprzez wprowadzenie związków **22**, **33** i **40** do mysich tkanek. Tam zostały one łatwo zhydrolizowane przez endogenną TPP I, co potwierdziła akumulacja osadu w lizosomach. Nie znaleziono jednak, żadnych dowodów na potwierdzenie hydrolizy pochodnych tripeptydów **29** i **44**. Ponadto produkty hydrolizy związków **22**, **33** i **40**, w połączeniu odpowiednio z aldehydem anyżowym lub *p*-nitrobenzaldehydem dawały w obrazie mikroskopowym znacznie gęstsze i bardziej kolorowe produkty niż dla benzaldehydu. Te same połączenia wykorzystano do oszacowania ekspresji genu *CLN2* w mysich komórkach mózgu, śledząc wirusowy transfer genu. Rekombinowane białko było łatwe do wykrycia w obszarach o niskiej aktywności enzymu. Autorzy sugerują, że tego typu związki mogą znaleźć zastosowanie w histochemicznym badaniu chorób wywołanych niedoborem TPP I [19].



Schemat 3. Synteza fenylalanyloalanyloalanylo-antrachinonów [19]

Molier-Teissier i wsp. [33] zaproponowali metodę syntezy peptydylo-antrachinonów zawierających odpowiednio łańcuch glicyloglicylohistydyny- **50a** i glicylohistydynylizyny- **50b** (Schemat 4). Do syntezy tego typu połączeń zastosowano DCC w obecności trietyloaminy (TEA) oraz HOBt jako odczynnika zmniejszającego stopień racemizacji. Otrzymane związki poddano badaniom i stwierdzono, że wykazują one właściwości przeciwnowotworowe zarówno w badaniach *in vitro* na komórkach białaczki (L1210) jak i ludzkich komórkach raka sutka (MCF7), ale ich aktywność była znacznie niższa w porównaniu z mitoksantronem.

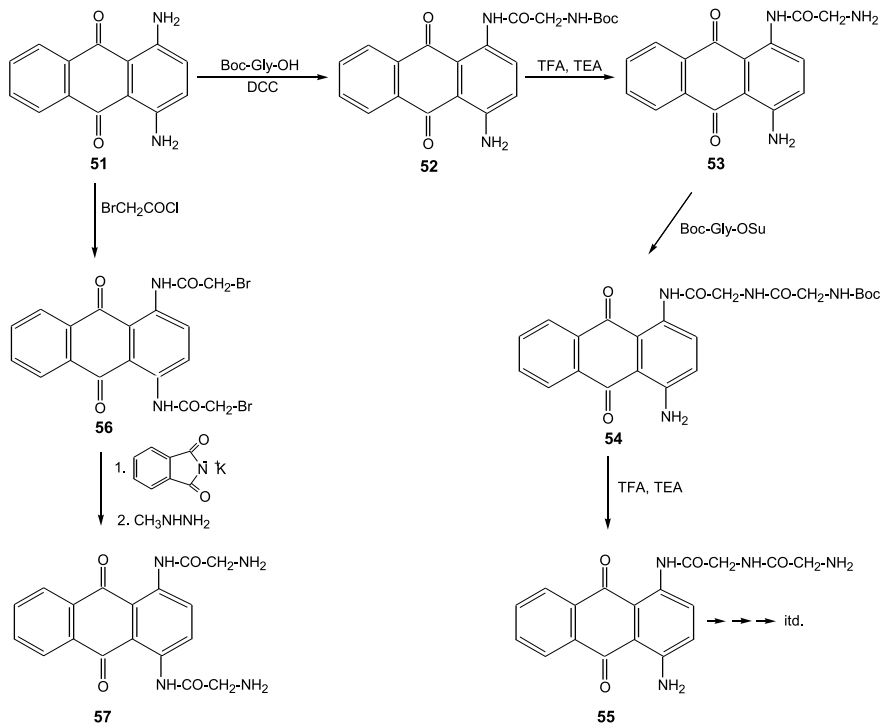
Gatto i wsp. [34] zaproponowali syntezę 1-glicyloamino-4-aminoantrachinonu (**53**) stosując metodę DCC i 1-glicyloglicyloamino-4-aminoantrachinonu (**55**) z użyciem estrów aktywnych (Schemat 5). Produkt **53** poddano reakcji z Boc-Gly-OSu i powtarzając usuwanie grupy ochronnej, otrzymano połączenia zawierające dłuższe łańcuchy glicylowe **55**. Chcąc zwiększyć wydajność otrzymywania tego typu połączenia zastosowano reakcję 1,4-diamino-antrachinonu z nadmiarem chlorku bromoacetylu w pirydynie (Pyr), uzyskując produkt **56**, na który podziałano ftalimidkiem potasu i poddano hydrazynolizie otrzymując 1,4-diglicyloaminoantrachinon (**57**).



48a. Z-Gly-Gly-His-OH
b. Z-Gly-His-Lys(Z)-OH

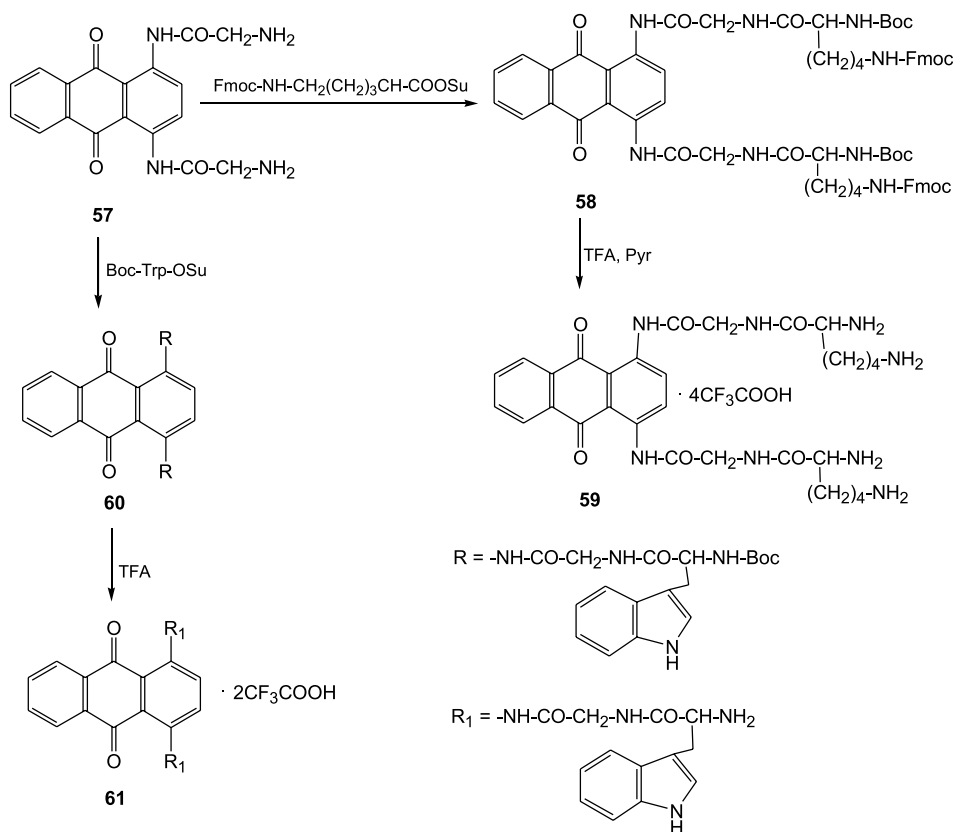
R: **a** = Z-Gly-Gly-His-
b = Z-Gly-His-Lys(Z)-
R₁: **a** = Gly-Gly-His-
b = Gly-His-Lys(Z)-

Schemat 4. Synteza glycyloglycylohistydylo- i glycylohistydylozilizo-antrachinonów [33]



Schemat 5. Synteza glycylo-antrachinonów [34]

Podobnie jak poprzednio, stosując metodę estrów aktywnych zsyntetyzowano jeszcze dwa analogi peptydyloantrachinonów **59** i **61** (Schemat 6), wychodząc ze związku **57** i odpowiednio chronionej lizyny (Boc-Lys(Fmoc)-OSu, Boc-Lys(Boc)-OSu) lub tryptofanu (Boc-Trp-OSu). Produkty **59** i **61** zostały przebadane na ludzkich komórkach nowotworowych i na mysich komórkach białaczki. Okazało się, że takie analogi wykazywały aktywność cytotoksyczną porównywalną z ametantronem, ale znacznie niższą niż mitoksantron. Ponadto stwierdzono, że glicyloantrachinony mają zdolność stymulowania topoizomerazy, podczas gdy jej hamowanie zachodzi w przypadku związków zawierających lizynę.

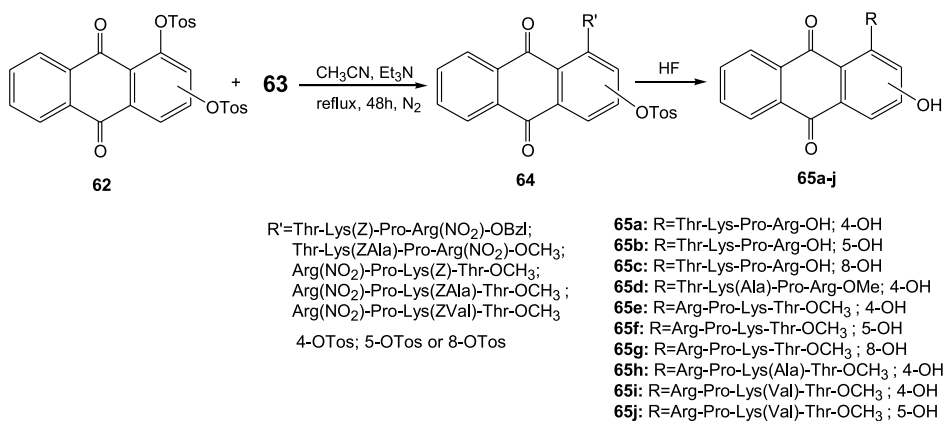


Schemat 6. Synteza glicylolizylo- i glicylotryptofanylo-antrachinonów [34]

Dzierzbicka i wsp. [35] zsyntetyzowali analogi antrachinonów z pochodnymi tuftsyny. Substratem wyjściowym do syntezy chronionych analogów były zsyntetyzowane 1,4-, 1,5- 1,8-bis(tosyloksy)-9,10-antrachinony **62** oraz odpowiednio chronione pochodne tuftsyny **63** (Schemat 7). Pochodne tuftsyny zostały zsyntetyzowane metodą mieszanych bezwodników z wykorzystaniem *N*-metylomorfoliny

(NMM) i chloromrówczanu izobutyłu lub metodą DPPA z wykorzystaniem azydofosforanu difenyłu [35–37]. Strukturę tych pochodnych ustalono w oparciu o analizę widm $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, COSY, TOCSY i ROESY) oraz jakościową analizę składu hydrolizatów na płytkach TLC.

Zdjęcie osłony Boc kwasem TFA z pochodnych tuftsyny pozwoliło na połączenie ich z pochodnymi antrachinonów. Po wielu doświadczeniach w zmienianych warunkach reakcji udało się tak dopracować warunki syntezy, aby otrzymać, po oczyszczeniu na preparatywnych płytkach TLC w układzie chloroform-metanol produkty z wydajnością 40–45%. Reakcje prowadzone były w acetonitrylu w atmosferze azotu w temperaturze wrzenia przez 48 godz. z dwu- do czterokrotnym nadmiarem pochodnej tuftsyny w stosunku do pochodnej antrachinonu. Struktura otrzymanych chronionych analogów **64** została potwierdzona jakościową analizą składu hydrolizatów produktów na płytkach TLC oraz za pomocą widm $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, COSY, TOCSY, ROESY i gHSQC) [36, 37]. Po zdjęciu osłon ciekłym fluorowodorem (HF) związki **65a–j** zostaną przekazane do badań biologicznych.

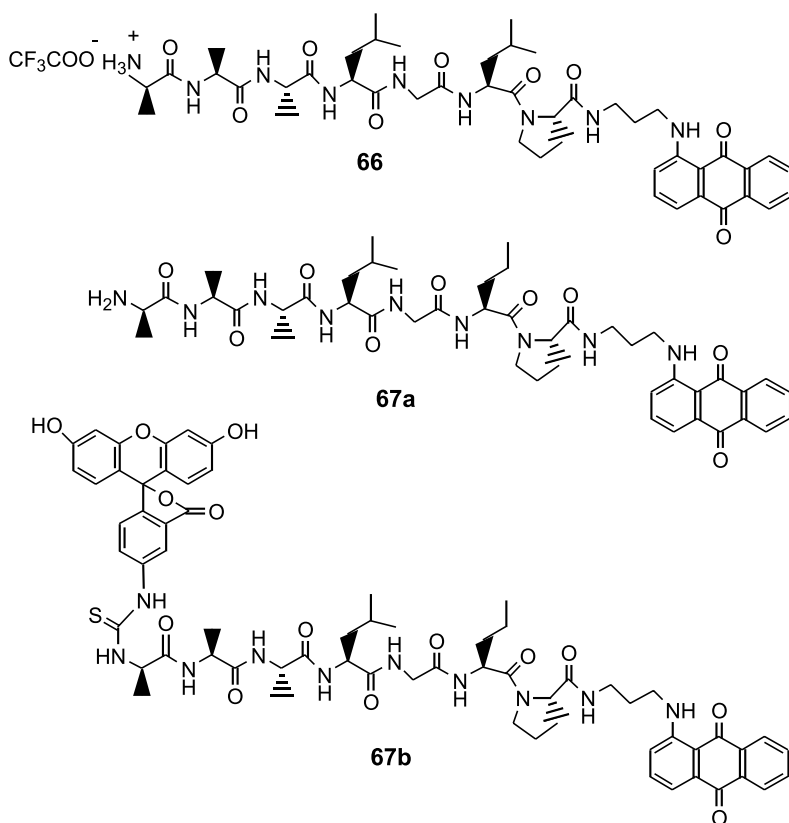


Schemat 7. Synteza analogów antrachinonów z pochodnymi tuftsyny

Zwiększone zainteresowanie metaloproteinazami (MMP) obecnymi w komórkach nowotworowych doprowadziło do poszukiwania związków o właściwościach terapeutycznych, których miejscem działania byłyby MMP, a w szczególności MMP-9 (żelatynaza B). Metaloproteinazy należą do grupy zależnych od cynku endopeptydaz, których główną funkcją jest przebudowa składników macierzy zewnątrzkomórkowej. Są one syntetyzowane w komórkach i uwalniane do przestrzeni zewnątrzkomórkowej w formie nieaktywnej, tzw. proMMP. Aktywacja tego enzymu następuje w wyniku proteolitycznego cięcia w rejonie propeptydu. Hamowanie aktywności MMP następuje przy udziale tkankowych inhibitorów metaloproteinaz (TIMP) [38–40]. Metaloproteinazy odgrywają znaczącą rolę w rozwoju nowotworu przez pobudzanie wzrostu komórek raka, migrację, inwazję, tworzenie nowych

naczyń krwionośnych (angiogeneza) i przerzutów. Ich aktywność jest znacznie zwiększona prawie we wszystkich typach nowotworów, a w szczególności w przypadku szpiczaka mnogiego (MM), który jest chorobą złośliwą, nieuleczalną, o charakterystycznym powolnym wzroście monoklonalnych plazmacytów lub plazmoblastów w szpiku kostnym [41].

Mincher i wsp. [42] otrzymali w reakcji 1-aminopropyloaminoantrachinonu z estrem pentafluorofenyly (OPfp) Boc chronionego aminokwasu lub z zastosowaniem estru hydroksysukcynoimidowego (OSu) dwa koniugaty **66** i **67a** (EV1) monopodstawionych antrachinonem peptydów. Aminokwasy były przyłączane kolejno, aż do uzyskania oczekiwanej sekwencji. Osłony grupy aminowej były usuwane za pomocą kwasu TFA. Celem tych badań stało się poszukiwanie proleków, które są przekształcane do formy aktywnej przez nadekspresję metaloproteiny w otoczeniu nowotworu. W wyniku inkubacji związku **66** w obecności rekombinowanego białka MM-9 następuje specyficzne rozszczepienie powodujące utworzenie połączenia 1-aminopropyloaminoprolilo-leucyloglicyny [43] (Rys. 3).

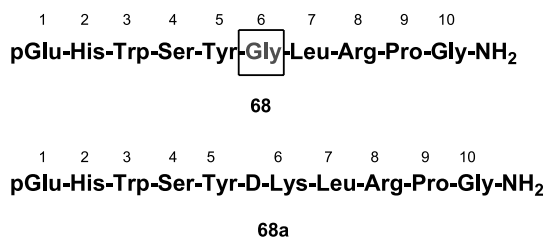


Rysunek 3

Związek **67a** został poddany w celu uzyskania połączenia **67b** (EV1-FITC), niezbędnego w detekcji rozszczepienia proleku przez MMP-9 (Rys. 3) działaniu izotiocyaninu fluoresceiny (FITC). Rozkład proleku EV1-FITC przez MMP-9 powoduje emisję wiązki światła (układ chromoforowy), która może być wykorzystana do pomiaru aktywności związku. Linia mysich komórek szpiczaka mnogiego (5T33MMvv) w reakcji z EV1-FITC powoduje wzrost luminescencji w porównaniu do komórek zdrowych, co świadczy o wzroście poziomu MMP-9 w komórkach nowotworowych. Rozszczepienie związku EV1-FITC następuje w łańcuchu peptydowym pomiędzy Gly i Nva, co zaobserwowano w komórkach ludzkiego włókniakomięsa (HT1080), bogatego w MMP-9 [44].

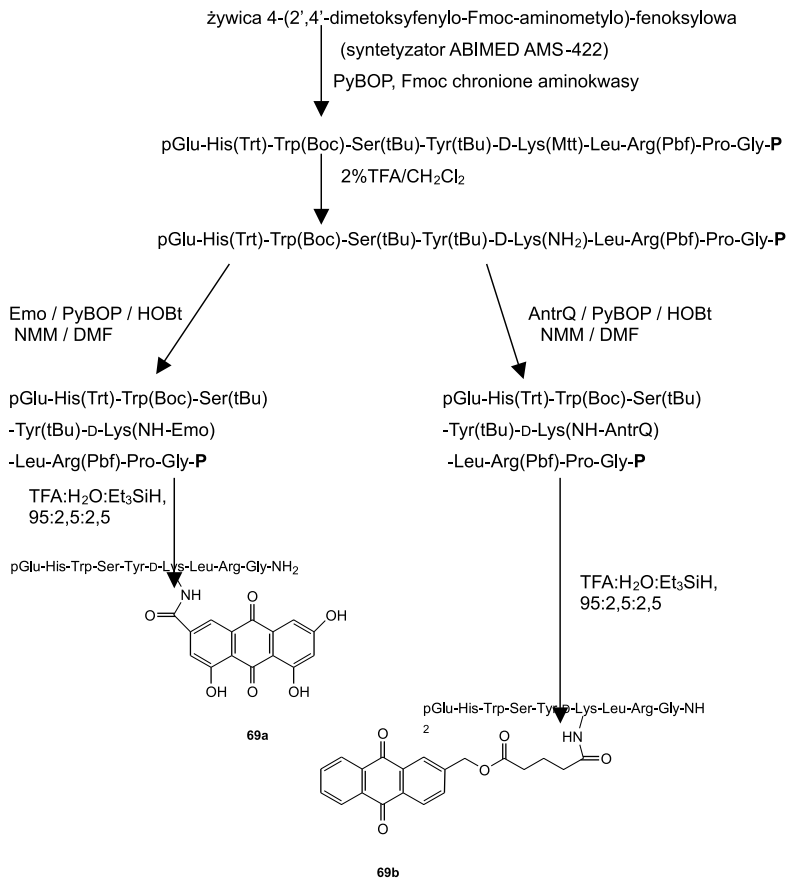
Poszukując nowej drogi walki z nowotworami znaleziono związki współdziałające z hormonem uwalniającym gonadotropinę, a także luteotropinę i foliotropinę – gonadoliberynę (GnRH) (**68**) (Rys. 4). GnRH jest amidem deka-peptydu, zawierającym na *N*-końcu kwas piroglutaminowy, działającym w podwzgórzu (przysadce), gdzie stymuluje uwalnianie obu gonadotropin: hormonu lutenizującego (LH) i foliotropiny (FSH). Pośrednio kontroluje on dojrzewanie płciowe, cykl menstruacyjny, spermatogenezę i klimakterium, dlatego też jest stosowany w diagnostyce i leczeniu zaburzeń płodności kobiet i mężczyzn. Zainteresowaniem naukowców różnych dziedzin cieszą się nowe analogi GnRH, zarówno o działaniu antagonistycznym jak i agonistycznym. Zainteresowanie jest tym większe, iż mogą one znaleźć zastosowanie nie tylko w antykoncepcji, ale także jako potencjalne leki w rozwiązywaniu problemów endokrynologicznych, w tym przedwczesnej dojrzałości płciowej, raku prostaty czy piersi [45].

Pierwsze analogi uzyskano w wyniku modyfikacji chemicznych na glicynie w pozycji 6 i 10, co zapewniło dłuższy czas półtrwania leku w organizmie. Z drugiej strony wiadomo, że kolejność aminokwasów i budowa łańcucha peptydowego warunkuje właściwości farmakodynamiczne sztucznych gonadoliberyn. Przypuszczano, że mechanizm działania analogów GnRH w chorobach związanych z utratą hormonów, które w rezultacie są związane z osłabieniem pracy przysadki, mogą generować zatrzymanie czynników wzrostowych komórek nowotworowych przez oddziaływanie z receptorem GnRH, który jest obecny w komórkach raka prostaty, jajnika czy piersi.



Rysunek 4

Rahimipour i wsp. [46] otrzymali związki: [D-Lys⁶(Emo)]GnRH (**69a**) i [D-Lys⁶(AntrQ)]GnRH (**69b**), będące połączeniami antrachinonów z modyfikowanym łańcuchem gonadoliberyny (GnRH) (Schemat 8). Syntezę przeprowadzono z wykorzystaniem heksafluorofosoranu tris(dimetyloamino)-1-benzotriazolilofosfoniowego (PyBOP), jako odczynnika sprzęgającego. Związek [D-Lys⁶(Emo)]GnRH (**69a**) pomimo małego powinowactwa do wiązania się z receptorem powoduje duży wzrost LH, co może być spowodowane właściwościami budowy nienaturalnego łańcucha peptydowego w układzie antrachinonowym.



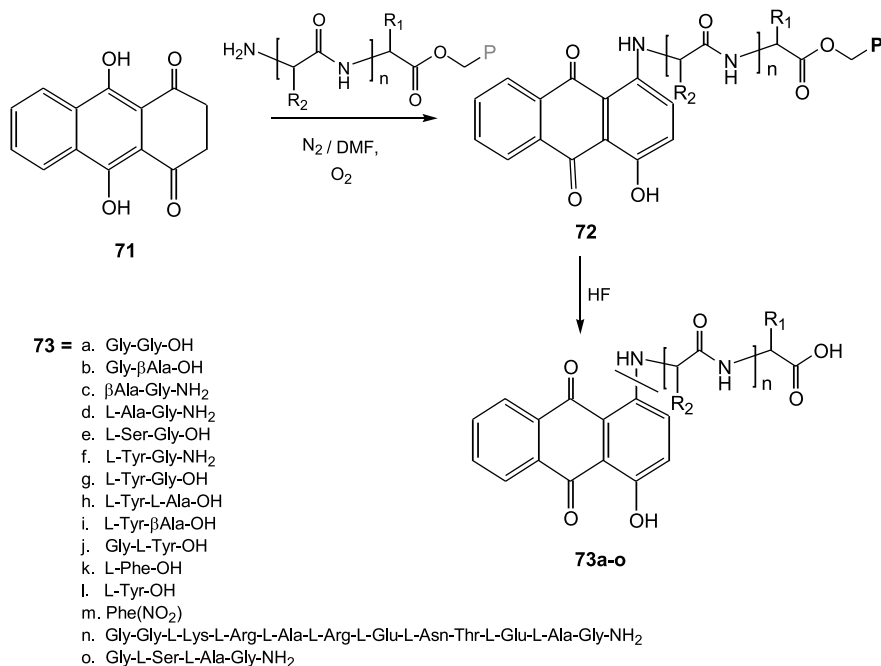
Schemat 8. Synteza połączeń [D-Lys⁶]GnRH z Emo i AntrQ [46]

Takie interkalatory mogą redukować powinowactwo do wiązania z receptorem, jednocześnie aktywując go. Związek **69a** wykazuje długotrwałą aktywność co może być spowodowane, zwiększoną zdolnością 1,6,8-trihydroksy-3-karboksyantochinonu

(Emo) (**70a**) do wiązania się z białkami surowicy, które prawdopodobnie zapobiegają proteolitycznej degradacji peptydu. Zarówno [D-Lys⁶(Emo)]GnRH (**69a**) jak i Emo (**70a**) nie wykazują toksyczności i w ciemności nie wywołują apoptozy komórek linii przysadki, podczas gdy sam **70a** w wyniku naświetlania posiada zdolności cytotoksyczne i indukuje programowaną śmierć komórkową. [D-Lys⁶(AntrQ)]GnRH (**69b**) w porównaniu do **69a**, wykazuje wysokie powinowactwo do wiązania receptora, a jego aktywność supresorowa *in vitro* zachęca do przeprowadzenia badań *in vivo*. Stwierdzono, że związek **69a** wykazuje zdolność hamowania wzrostu ludzkich komórek raka piersi i prostaty.

1.2. SYNTEZA NA NOŚNIKU STAŁYM

Poszukiwaniem nowych inhibitorów topoizomerazy zainteresowali się także Giles i wsp. [18], którzy zaprojektowali syntezę połączeń antrachinonu z *N*-terminalną grupą aminową peptydu na fazie stałej. W tym celu przeprowadzili reakcję leukochinizaryny (**71**) (otrzymanej z 1,4-dihydroksy-9,10-antrachinonu metodą Greenhalgha i Hughesa [47]) w atmosferze gazu obojętnego w suchym DMF z uprzednio zsyntetyzowanym peptydem osadzonym na żywicy. Końcowym etapem syntezy było oddzielenie surowego produktu od żywicy za pomocą ciekłego HF (Schemat 9).

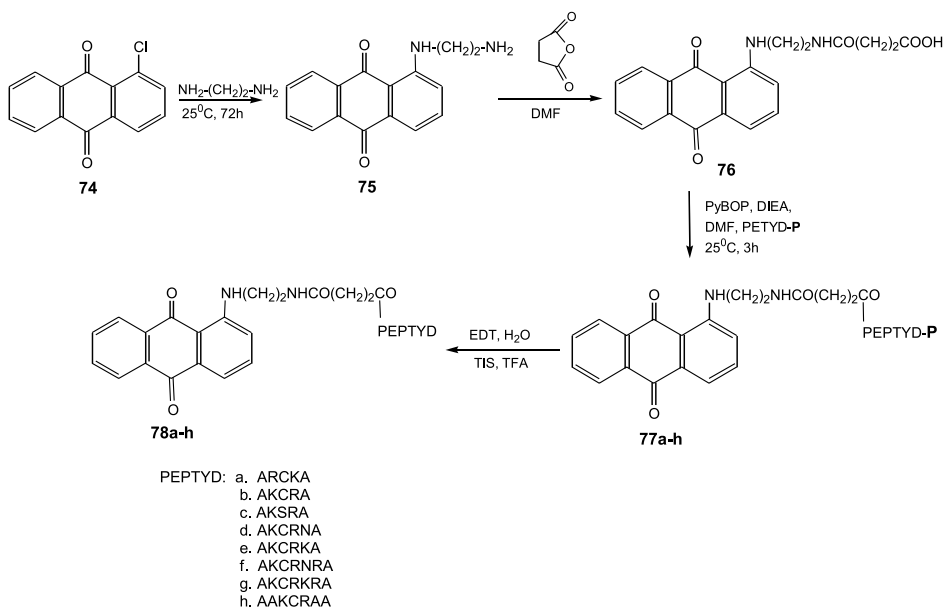


Schemat 9. Synteza peptydylo-antrachinonów na fazie stałej [18]

Zsyntetyzowane związki **73a–o** wykazują zdolność do hamowania topoizomerazy I. Najbardziej aktywne okazały się analogi zawierające L-Tyr **73l** i Phe(NO₂) **73m**. Ich aktywność jest porównywalna do kamptotecyny (CPT), ale w wyższym stężeniu. Związki te wykazują zdolność do stabilizowania rozszczepialnych kompleksów w analogiczny sposób jak CPT [25].

Czynnik transkrypcyjny AP-1, należący do rodziny białek Fos i Jun (białek transkrypcyjnych rozpoznających sekwencje Lys-Cys-Arg – KCR) kodowanych przez protoonkogeny *c-fos* i *c-jun*, odgrywa bardzo ważną rolę zarówno w procesie proliferacji, różnicowania, apoptozy, jak i w procesie złośliwienia nowotworów [48–50]. Białko AP-1 jest zdolne do oddziaływania ze swoistymi sekwencjami DNA, skutkiem czego jest powstanie kompleksu transkrypcyjnego [50, 51]. Na regulację aktywności wielu genów wpływają czynniki transkrypcyjne c-Fos i c-Jun, które rozpoznają motyw AP-1 DNA i dzięki budowie suwaka leucynowego tworzą homoi heterokompleksy. Kompleksy typu Jun-Fos mają zdolność hamowania transkrypcji, a Jun-Jun jej nasilania [49, 52, 53]. Redukcja cysteiny jest potrzebna do ułatwienia wiązania z DNA. Prawdopodobnie podwójna rola lizyny i argininy pozostaje pod wpływem właściwości redukcyjnych cysteiny i zdolności wiązania białek Fos i Jun do domeny DNA. Jednakże lizyna i arginina nie są obecne w takiej samej ilości w obszarze białka Fos i Jun i dlatego ich oddziaływanie z DNA jest tak różne [51, 52].

Ijaz i wsp. [54] zaproponowali syntezę kilku koniugatów peptydylo-antrachinonów, którą rozpoczęli od otrzymania 1-[N-(2-aminoetylo)amino]-antrachinonu (**76**) na drodze aminacji 1-chloroantrachinonu (**74**) w nadmiarze TEA, a następnie reakcji z bezwodnikiem bursztynowym. Uzyskany związek **76** poddano reakcji z ośmioma różnymi peptydami, chronionymi grupą fluorenylo-metoksykarbonylową (Fmoc), zawierającymi od pięciu do siedmiu aminokwasów z niezmienną sekwencją KCR, osadzonymi na żywicy, stosując heksafluoro-fosforan tris(dimetyloamino)-1-benzotriazoliloksyfosforan (BOP). Otrzymane produkty **78a–h** odszczepiono od żywicy za pomocą roztworu etanoditiolu (EDT)/H₂O i triizopropyllosilanu (TIS)/TFA (Schemat 10). Autorzy zsyntetyzowali związki **78a–h**, wiążące się z DNA, jako potencjalne inhibitory AP-1. Łańcuch peptydowy w strukturze związku rozpoznaje określone sekwencje oraz zapewnia utworzenie kompleksu: związek **78a–h** + DNA. Pierścień antrachinonowy pozwala na interkalację pomiędzy zasady DNA i w ten sposób może stabilizować słabe, lecz specyficzne wiązanie łańcucha peptydowego z domeną DNA. Ponadto powinowactwo AP-1 do swoistych sekwencji jest uzależnione od obecności produktu powstałego w wyniku redukcji cysteiny we fragmencie KCR, który jest charakterystyczny dla tej grupy białek. Dodatkowo stwierdzono, że bardziej efektywne w hamowaniu transkrypcji białka AP-1 są połączenia zawierające aminokwasy AKCRNA, AKCRKA, AKCRKRA, AKCRNRA, dzięki zdolności przemieszczania czynnika transkrypcyjnego ze swoistych sekwencji DNA.



Schemat 10. Synteza pochodnych alanylizylocysteinyloarginylo-antrachinonów na fazie stałej [54]

Opisane uprzednio koniugaty [D-Lys⁶]GnRH (**68a**) zostały również zsyntetyzowane na fazie stałej [46] (Schemat 8). Do utworzenia wiązania peptydowego zastosowano automatyczny syntetyzator z żywicą 4-(2',4'-dimetoksyfenilo-Fmoc-aminometylo)fenoksydową i Fmoc chroniony decapeptyd. Grupę Boc z ε-NH₂ lizyny zastąpiono grupą trimetylosililową (Mtt). Używając standardowej procedury sprzęgania z BOP, otrzymano połączenia ε-NH₂ lizyny z 1,6,8-trihydroksy-3-karboksyantrachinonem i 2-hydroksymetylo-antrachinonem (AntrQ) **70b**. Reakcja ta prowadziła do powstania [D-Lys⁶](Emo)GnRH (**69a**) i [D-Lys⁶](AntrQ)GnRH (**69b**), które z żywicy zostały usunięte mieszaniną TFA, wody i trisililu (Et₃SiH). Aktywność otrzymanych związków omówiono przy prezentowaniu ich syntezy w roztworze.

PODSUMOWANIE

Obecnie dużym zainteresowaniem cieszą się koniugaty antrachinonów, których aktywność skierowana jest na hamowanie topoizomerazy, enzymu uczestniczącego w prawidłowym procesie replikacji DNA. Należą do nich aminokwasowe i peptydowe analogi, np. **11a, c, d, 73l, m** (Rys. 2, Schemat 9). Ta grupa związków stanowi wyzwanie w walce z różnego typu nowotworami m.in. rakiem jajnika, płuc czy jelita grubego. Równie ważne są związki zawierające łańcuchy glicyloglicylohistydynowe **50a**, glicylohistydynylolizynowe **50b**, glicyloglicyloolizynowe **59** i glicyloglicylotryptofanowe **61** (Schemat 4, Schemat 6), które wykazują aktywność przeciwnowotwo-

rową, ale znacznie niższą niż mitoksantron. Drugim ważnym enzymem, który stał się docelowym miejscem uchwytu projektowanych związków jest żelatynaza B (MMP-9). Otrzymane proleki, w wyniku działania endopeptydazy obecnej w dużych ilościach w otoczeniu komórek nowotworowych, były przekształcane w aktywną formę leku **66**, **67a,b** (Rys. 3). Zsyntetyzowano również związki współdziałające z gonadoliberyną **69a,b** (Schemat 8), których mechanizm działania polega na hamowaniu czynników wzrostowych komórek nowotworowych przez oddziaływanie z receptorem GnRH, obecnym w komórkach narządów płciowych.

Natomiast peptydyloantrachinony **78a–h** (Schemat 10) mogą mieć zastosowanie jako potencjalne inhibitory czynnika transkrypcyjnego AP-1, odgrywającego znaczącą rolę w procesie proliferacji i złośliwienia nowotworu. Ostatnio wykazano, że peptydowe analogi antrachinonów mogą również odegrać znaczącą rolę w diagnostyce wielu chorób związanych z niedoborem TPP I – **22**, **33**, **40** (Schemat 2, Schemat 3), oraz jako barwne ligandy stosowane w metodach oczyszczania białek i badaniu helikalnej struktury DNA z wykorzystaniem spektroskopii w ultrafiolecie (UV) i świetle widzialnym (UV-Vis) – **73** (Schemat 9).

Podziękowanie: Praca powstała podczas realizacji projektu badawczego KBN 3 P05F 01425 we współpracy z Uniwersytetem Gdańskim (Grant BW 8000-5-0298-6).

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] K.C. Murdock, R.G. Child, P.F. Fabio, R.B. Anger, R.E. Wallach, F.E. Durr, R.V. Citarella, *J. Med. Chem.*, 1979, **22**, 1024.
- [2] F.M. Tumminello, G. Letto, N. Gebbia, V. Gebbia, A. Russo, L. Rausa, *Cancer Treat. Rep.*, 1987, **71**, 529.
- [3] W.E. Perkins, R.L. Schroeder, R.A. Carrano, A.R. Imondi, *Cancer Treat. Rep.*, 1984, **68**, 841.
- [4] J. Tarasiuk, K. Tkaczyk-Gobis, B. Stefańska, M. Dzieduszyńska, W. Priebe, S. Martelli, E. Borowski, *Anti-Cancer Drug Des.*, 1998, **13**, 923.
- [5] K. Dzierzbicka, A. M. Kołodziejczyk, *Polish J. Chem.*, 2005, **79**, 1.
- [6] A.P. Krapcho, Z. Getahun, K.L. Avery, K.J. Vargas, M.P. Hacker, S. Spinelli, G. Pezzoni, C. Manzotti, *J. Med. Chem.*, 1991, **34**, 2373.
- [7] A.P. Krapcho, M.E. Petry, Z. Gethan, J.J.Jr. Landi, J. Stallman, J.F. Polsenberg, C.E. Gallageher, M.J. Maresch, M.P. Hacker, F.C. Giuliani, G. Beggolin, G. Pezzoni, E. Menta, C. Manzotti, A. Oliva, S. Spinelli, S. Tognella, *J. Med. Chem.*, 1994, **37**, 828.
- [8] C.A. Gandolfi, G. Beggolin, E. Menta, M. Palumbo, C. Sissi, S. Spinelli, F. Johnson, *J. Med. Chem.*, 1995, **38**, 536.
- [9] C.D. Selassie, C. Hansch, T.A. Khwaja, *J. Med. Chem.*, 1990, **33**, 1914.
- [10] G. Bradley, P.F. Juranka, V. Ling, *Biochim. Biophys. Acta*, 1988, **948**, 87.
- [11] J.A. Endicott, V. Ling, *Annu. Rev. Biochem.*, 1989, **58**, 137.
- [12] H.D.H. Showalter, J.L. Johnson, J.M. Hoftiezer, W.R. Turner, L.M. Webel, W.R. Leopold, J.L. Shillis, R.C. Jackson, E.F. Elsalger, *J. Med. Chem.*, 1987, **30**, 121.
- [13] W.D. Klohs, R.W. Steinkampf, M.J. Havlick, R.C. Jackson, *Cancer Res.*, 1986, **46**, 4352.

- [14] A.P. Krapcho, E. Menta, A. Olivia, R. Di Domenico, L. Fiocchi, M.E. Maresch, C.E. Gallagher, M.P. Hacker, G. Beggiolin, F.C. Giuliani, G. Pezzoni, S. Spinelli, *J. Med. Chem.*, 1998, **41**, 5429.
- [15] M.M. Bontemps-Gracz, B. Stefańska, M. Dzieduszycka, E. Borowski, I. Antonini, S. Martelli, R. Supino, F. Zunino, *Multidisciplinary Conference of Medical Science*, March 3–5, 1999, Muszyna, Poland; *Abstract Book*, Abstract P-80.
- [16] B. Stefańska, M. Dzieduszycka, M.M. Bontemps-Gracz, E. Borowski, S. Martelli, R. Supino, G. Pratesi, M.A. De Cesare, F. Zunino, H. Kuścierczyk, Cz. Radzikowski, *J. Med. Chem.*, 1999, **42**, 3494.
- [17] X. Bu, L.W. Deady, G.J. Finaly, B.C. Bagguley, W.A. Denny, *J. Med. Chem.*, 2001, **44**, 2004.
- [18] G.I. Giles, R.P. Sharma, *J. Peptide Sci.*, 2005, **11**, 417.
- [19] M. Kim, Q. Mao, B.L. Davidson, D.F. Wiemer, *J. Med. Chem.*, 2003, **46**, 1603.
- [20] Y. Pommier, P. Pourquier, Y. Fan, D. Strumberg, *Biochim. Biophys. Acta*, 1998, **1400**, 83.
- [21] J. Szenajch, A. Cieślak, *Wsp. Onkol.*, 2005, **9**, 123.
- [22] A. Deptała, *Int. J. Oncol.*, 1999, **15**, 861.
- [23] V.H. Hsiang, *Can. Resp.*, 1989, **49**, 5077.
- [24] J.M.W. Scheltema, J.C. Romijn, G.J. von Steenbrugge, W.T. Beck, F.H. Schroder, G.H. Mickisch, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 1997, **123**, 546.
- [25] J. Omyła-Staszewska, A. Deptała, *Wsp. Onkol.*, 2003, **7**, 45.
- [26] Cummings and Mincher, UK patent GB 9205859,3, International Application Number PCT/GB93/00546, published 30.09.1993.
- [27] J. Cummings, J.S. Macpherson, I. Meikle, J.F. Smyth, *Biochem. Pharmacol.*, 1996, **52**, 979.
- [28] I. Meikle, J. Cummings, J.S. Macpherson, J.A. Hadfield, J.F. Smyth *Biochem. Pharmacol.*, 1995, **49**, 1747.
- [29] N. Dias, J. Goossens, B. Baldeyrou, A. Lansiaux, P. Colson, A. Salvo, J. Bernal, A. Turnbull, D.J. Mincher, Ch. Bailly, *Bioconjugate Chem.*, 2005, **16**, 949.
- [30] A.A. Gołąbek, M. Walus, K.E. Wisniewska, E. Kida, *J. Biol. Chem.*, 2005, **280**, 7550.
- [31] P. Wujek, E. Kida, M. Walus, K.E. Wisniewska, A.A. Gołąbek, *J. Biol. Chem.*, 2004, **279**, 12827.
- [32] A.A. Gołąbek, E. Kida, M. Walus, P. Wujek, P. Mehta, K.E. Wisniewska, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 7135.
- [33] E. Morier-Teissier, N. Boitte, N. Helbecque, J. Bernier, N. Pommery, J. Duvalet, Ch. Fournier, B. Hecquet, J. Catteau, J. Hčnichart, *J. Med. Chem.*, 1993, **36**, 2084.
- [34] B. Gatto, G. Zagotto, C. Sissi, C. Cera, E. Uriarte, G. Palu, G. Capranico, M. Palumbo, *J. Med. Chem.*, 1996, **39**, 3114.
- [35] K. Dzierzbicka, A.K. Kołodziejczyk, *The Fourth Multidisciplinary Conference on Drug, Research*, Gdańsk–Sobieszewo 2004, *Book of Abstracts*, P-19.
- [36] K. Dzierzbicka, *Pol. J. Chem.*, 2004, **78**, 409.
- [37] K. Dzierzbicka, A.K. Kołodziejczyk, *18th Polish Peptide Symposium*, 4–8 September 2005, Faculty of Chemistry, University of Wrocław, s. 104, P-21W.
- [38] K. Maskos, W. Bode, *Mol. Biotechnol.*, 2003, **25**, 241.
- [39] C. Medina, A. Santana, M.C. Paz, F. Diaz, E. Farre, A. Salas, M.W. Radomski, E. Quintero, *J. Leukoc. Biol.*, 2006, **14**, 1.
- [40] H. Nagase, J.F. Jr. Woessner, *J. Biol. Chem.*, 1999, **30**, 21491.
- [41] A. Jurczyszyn, T. Wolska - Smoleń, A.B. Skotnicki, *Przegl. Lek.*, 2003, **60**, 542.
- [42] D.J. Mincher, A. Turnbull, M.C. Bibby, P.M. Loadman, *Tumour targeting prodrugs activated by matrix metalloproteinases*, US Patent Application (2004), US 2004/0248765.
- [43] D.J. Mincher, P.M. Loadman, J. Lyle, A. Di Salvo, A. Turnbull, M.C. Bibby, J.A. Double, *Eur. J. Can.*, 2002, **38**, S121.

- [44] E. Van Valckenborgh, D. Mincher, A. Di Salvo, I. Van Riet, L. Young, B. Van Camp, K. Vanderkerken, *Leukemia*, 2005, **19**, 1628.
- [45] A. Chudecka-Głaz, I. Rzepka-Górska, *Endokrynol. Pol.*, 2004, **55**, 198.
- [46] S. Rahimipour, N. Ben-Aroya, M. Fridkin, Y. Koch, *J. Med. Chem.*, 2003, **44**, 3645.
- [47] C. Greenhalgh, N. Hughes, *J. Chem. Soc. (C)*, 1968, **14**, 1284.
- [48] G. Bossis, C.E. Malnou, R. Farras, E. Andermarcher, R. Hipskind, M. Rodriguez, D. Schmidt, S. Muller, I. Jariel-Encontre, M. Piechaczyk, *Mol. Cell. Biol.*, 2005, **25**, 6964.
- [49] N. Rajaram, T.K. Kerppola, *EMBO J.*, 1997, **16**, 2917.
- [50] T.K. Kerppola, T. Curran, *EMBO J.*, 1997, **16**, 2907.
- [51] K. Tsuchida, H. Chaki, T. Takakura, H. Kotsubo, T. Tanaka, Y. Aikawa, S. Shiozawa, S. Hirono, *J. Med. Chem.* 2006, **49**, 80.
- [52] H. Kwon, S. Park, S. Lee, D-K. Lee, C-H. Yang, *Eur. J. Biochem.*, 2001, **268**, 565.
- [53] L. Ng, D. Forrest, T. Curran, *Nucleic Acids Res.*, 1993, **21**, 5831.
- [54] T. Ijaz, P. Tran, K.C. Ruparelia, P.H. Teesdale-Spittle, S. Orr, L.H. Patterson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2001, **11**, 351.

Praca wpłynęła do Redakcji 4 kwietnia 2006

**PROCESY PRZENOSZENIA ENERGII (FRET)
W BADANIACH
CZTERONICIOWYCH FORM DNA**

**FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY TRANSFER
(FRET) IN THE STUDIES
OF TETRAPLEX DNA STRUCTURES**

**Bernard Juskowiak*, Elżbieta Gałęzowska,
Jan Paczesny**

*Wydział Chemii, Uniwersytet im. A. Mickiewicza,
ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań*

Abstract

Wstęp

1. Rezonansowy transfer energii (FRET)
2. FRET i tetrapleksowe struktury DNA
 - 2.1. Badanie budowy i trwałości kwadrupeksów za pomocą techniki FRET
 - 2.2. Ligandy oddziałujące z kwadrupeksami – nowe leki antynowotworowe
 - 2.3. Sondy molekularne do detekcji białek
 - 2.4. Sondy oligonukleotydowe do detekcji jonów potasu

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

Dr hab. Bernard Juskowiak (ur. 1951 w Piaskach Wlkp.) profesor nadzwyczajny na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu jest absolwentem Wydziału Matematyki, Fizyki i Chemii UAM (1975). Stopień naukowy doktora i doktora habilitowanego uzyskał odpowiednio w 1984 i 1995 r.

Początkowo zajmował się barwnymi układami analitycznymi zawierającymi ligandy makrocycliczne i kryptandy oraz ich zastosowaniem w analizie śladowej kationów metali. Późniejsze i obecne jego zainteresowania naukowe dotyczą zastosowań układów zorganizowanych w analizie chemicznej (micele, liposomy, monowarstwy, filmy typu Langmuira-Blodgett, biopolimery), badania procesów wygaszania fluorescencji, przenoszenia energii (FRET), transferu elektronu w aspekcie zastosowań sensorowych, syntezy i badania oddziaływań nowych ligandów fluorescencyjnych z dwu- i czteroniciową helisą DNA (procesy fotofizyczne, fotoizomeryzacja, zastosowania sensorowe).

Dwukrotnie przebywał na długoterminowych stażach naukowych w Japonii w Kyushu University, Fukuoka. W latach 1987–1988 jako stypendysta JSPS, oraz ponownie w latach 1996–1999, tym razem zatrudniony w charakterze profesora kontraktowego.

Jest autorem i współautorem ok. 70. artykułów naukowych i ok. 90. komunikatów i referatów na konferencjach naukowych, oraz kilku obszernych artykułów monograficznych.

Elżbieta Gałęzowska (ur. 1962 w Poznaniu) jest absolwentką Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Pracuje w Zakładzie Chemii Analitycznej UAM na etacie naukowo-technicznym. Jest współautorem 12 artykułów naukowych i kilkunastu komunikatów konferencyjnych.

Jan Paczesny (ur. 1985 r. w Żarach) Jest studentem III roku Chemii na Wydziale Chemii UAM w Poznaniu. Uczestniczy w pracach badawczych na zasadzie wolontariatu.

ABSTRACT

DNA sequences with stretches of multiple guanines can form four-stranded tetraplex DNA structures called guanine-quadruplexes or G4 DNA. They contain stacked arrays of planar guanine quartets linked by connecting loops (Fig. 1, Fig. 2). Evidence supports the occurrence of quadruplexes in the cell nucleus and a number of biological functions have been attributed to quadruplexes. In eukaryotic systems guanine-rich sequences are positioned at the ends of chromosomes and are called telomeric DNA. The study of telomeric DNA has acquired importance through the discovery of the relationship between telomerase activity in most cancer cells and telomere folding into tetraplex structure. Coordination of certain metal cations stabilizes G-quadruplex as do some promising small organic molecules, which are regarded as potential anticancer drugs. Among many techniques employed to explore properties of G-quadruplexes, fluorescence resonance energy transfer (FRET) has been recognized as a powerful tool to explore tetraplex formation due to extreme sensitivity and the distance dependency of the FRET process.

This review shows how FRET contributes to G-quadruplex research and focuses on the FRET application, describing briefly also the underlying principles. Information about molecular structure, binding events, and motion are considered to be potentially available from FRET measurements. In a typical FRET experiment a guanine-rich oligonucleotide labeled with proper fluorophores (FRET donor and acceptor) undergoes structural transformations (folding or unfolding), which are monitored by spectral changes in the fluorescence spectra of FRET partners. We tried to summarize the current developments in the field of the various applications of FRET measurements for the fundamental structural and kinetic investigations of G-quadruplexes and their complexes with metal cations and organic ligands. Fundamental applications include studies of quadruplex unfolding kinetics with the use of complementary DNA or PNA (Peptide Nucleic Acid) strands as a duplex trap or determination of thermodynamic parameters. Practical applications are illustrated by the FRET-based selection of quadruplex-binding ligands, construction of the quadruplex-based nanomotor, design of molecular probes for protein recognition, and development of sensors for the detection of potassium ions in aqueous media.

The presented examples of FRET studies showed that FRET is particularly useful in structural studies of oligonucleotides capable of folding into tetraplex structure.

Key words: Fluorescence; Fluorescence Energy Transfer (FRET); G-quadruplex; Proteins; Quadruplex-binding ligands; Telomeric DNA; Tetraplex DNA structure; Thrombin Binding Aptamer (TBA)

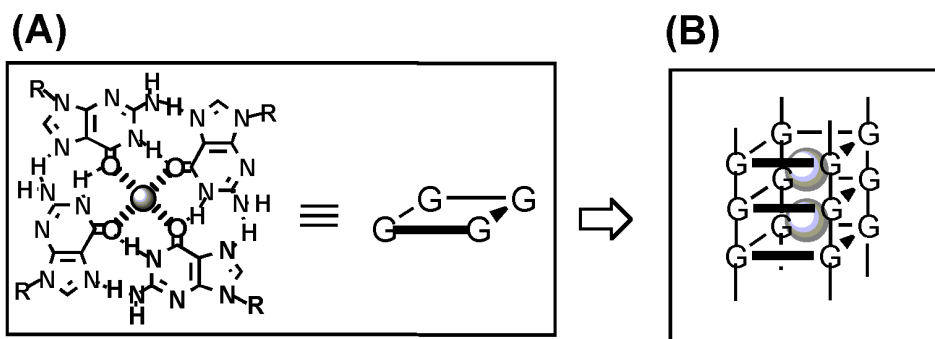
Słowa kluczowe: Czteroniciowe DNA, Fluorescencja; G-kwadrupeks; Białka; Ligandy oddziałujące z G-kwadrupeksami; Procesy przenoszenia energii (FRET); Telomerowe DNA; Tetrapeks; Trombinowy aptamer (TBA)

WSTĘP

Oligonukleotydy bogate w reszty guaniny mogą tworzyć zwinięte wieloniciowe struktury, zwane tetrapleksami lub G-kwadrupleksami (G4 DNA) [1, 2]. W stabilizacji takich struktur znaczenie mają zarówno oddziaływania typu Watsona-Cricka, jak i wiązania wodorowe typu Hoogsteena.

Czteroniciowe DNA, w formie G-kwadrupleksów, zaczęło przykuwać uwagę naukowców i onkologów już na początku lat dziewięćdziesiątych. Podejrzewano, że kwadrupleksy mogą uczestniczyć w reakcjach blokujących rozwój chorób nowotworowych, przeszkadzając telomerazie w wydłużaniu telomerowego DNA na końcach chromosomów [3–5]. Podwyższoną aktywność telomerazy wykryto w 80–90% wszystkich ludzkich komórek nowotworowych i nie obserwowano jej w sąsiednich komórkach somatycznych.

Analizowane dotychczas G-kwadrupleksy zbudowane są z jednej lub kilku nici kwasu nukleinowego, o orientacji równoległej lub antyrównoległej. Kanał, tworzący się wewnątrz takiej struktury może pomieścić kationy metalu [6]. Na Rys. 1A przedstawiono kwartet guaninowy (G-kwartet), utworzony przez cztery reszty guaniny, leżące w jednej płaszczyźnie i oddziałujące ze sobą za pomocą wiązań wodorowych typu Hoogsteena. Dwa, trzy lub cztery kwartety guaninowe, zasocjowane w obrębie danego kwadrupleksu (Rys. 1B), asocjują ze sobą dzięki oddziaływaniom warstwowym (ang. *stacking*). Najbardziej interesującą cechą strukturalną kwadrupleksu jest obecność centralnego kanału, który może kompleksować w sposób selektywny wybrane kationy metali. Precyzyjna koordynacja kationu metalu następuje w wyniku jego oddziaływania z ośmioma guaninowymi atomami tlenu (przy węglu C-6) z dwóch sąsiednich kwartetów (Rys. 1).

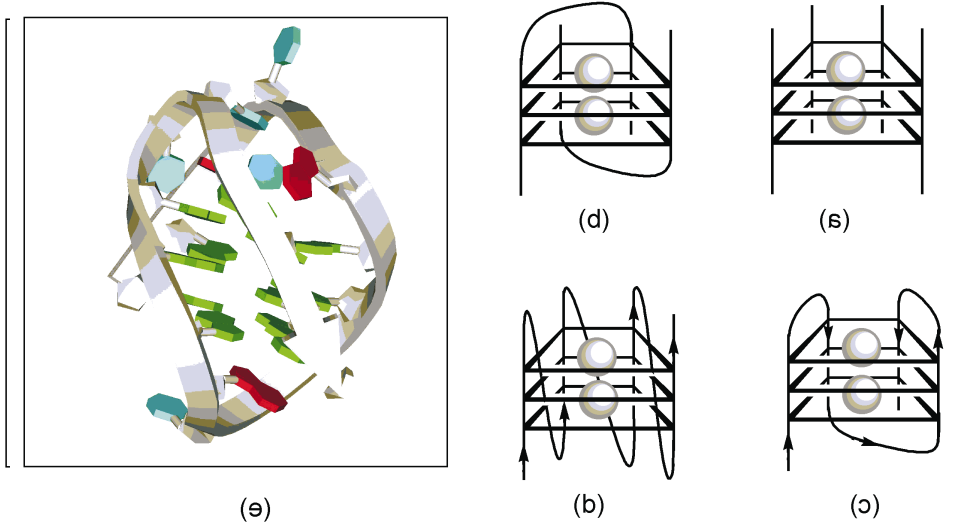


Rysunek 1. (A) Struktura kwartetu guaninowego z centralnie koordynowanym joniem metalu. (B) Schemat kwadrupleksu powstałego w wyniku warstwowej asocjacji trzech kwartetów guaninowych

G-kwadrupleksy powstają albo przez asocjację dwóch lub czterech oddzielnych nici DNA (tetrapleks intermolekularny lub międzycząsteczkowy), albo w wyniku zwinięcia się pojedynczej nici bogatej w guaniny (tetrapleks intramolekularny

lip wewnątrzcząsteczkowy) [7-9]. Wzrostkie G-kwabrdpleksy posiadają dwie grupy -rest nukleodowodnych: deoksygwanozynowy, tworzące płaskie struktury kwadratowe gna- ninowych oraz niesparowane reszty, wchodzące w skład tzw. bęli. Na Rys. 2a-b przedstawiono schematycznie przykłady inter- i intramolekularnych struktur G-kwa- rdpleksów oraz eksperymentalny model molekularny kwadratowego utworzonego przez ludzkie telomerowe DNA [7], zgodny ze strukturą zarejestrowaną w Banku protein pod nr 143D.

Przebadana budowa G-kwabrdpleksów zależy od liczby zassocjowanych nici oraz ich wzajemnej orientacji względem siebie [6]. I tak, dla G-kwabrdpleksów utworzonych z czterech oddzielnych nici DNA, istnieje cztery układy o różnej polarności nici (orientacja antywznowoległa \ równoległa). Jeden z takich układów zilustrowano na Rys. 2a. Natomiast Rys. 2b przedstawia budowę jednej z sześciu możliwych struktur dwucząsteczkowego G-kwabrdpleksu, powstałego w wyniku dimeryzacji dwóch oligonukleotydów w formie „spinki” (ang. hairpin). Jeszcze całą- kiem niedawanym wązawo, że intramolekularne G-kwabrdpleksy – utworzone z poje- dynczej nici – mogą przyjmować jedną z dwóch antywznowoległych form struktural- nych: krzeselkową lub koszykową. Budowę formy koszykowej przedstawiajs Rys. 2c i 2e. Ostatnio publikowane badania rentgenostrukturalne kompleksu potasu z ludzkim telomerowym DNA sugerują istnienie trzeciej formy struktury równole- głej (Rys. 2d) przydominującej smigło (ang. bow-tie structure) [10].



Rysunek 2. Schematycznie struktury tetraplekso: (a) międzycząsteczkowy równoległy kwadratpleks, utworzony z czterech nici DNA, (b) dwucząsteczkowy kwadratpleks z digonami bęliami, (c) wewnątrz- cząsteczkowy antywznowoległy kwadratpleks typu „krzeselko”, (d) wewnątrzcząsteczkowy równoległy kwadratpleks z bęliami leżącymi wzdłuż osi i innymi wzdłuż osi, (e) model molekularny kwadratpleksu utworzonego przez oligonukleotyd o sekwencji i i sekwencji ludzkiego telomerowego DNA, d(G₃)₃(TTAG₃)₃, (wstęga symbolizuje szkielet iostanawo-cukrowy, narysowane są następujące kolumny: guanina – zielony, cytozyna – czerwony i tymina – niebieski)

Kationy metalu stabilizują strukturę kwadrupleksową przez koordynację guaninowych atomów tlenu przy węglu C-6 w G-kwartecie. Optymalną stabilność zapewniają jony potasowe (efektywne na poziomie stężeń fizjologicznych). Jony różnych metali są w stanie wywoływać zmiany konformacyjne (przejście jednej formy w drugą), które w zależności od rodzaju kwadrupleksu, mogą być znaczące, jak to ma miejsce w przypadku oligonukleotydu o sekwencji d[AGGG(TTAGGG)₃] (zgodnej z sekwencją ludzkiego telomerowego DNA) [10–12]. Sodowy kwadrupleks posiada antyrównoległą strukturę (Rys. 2c i 2e) z dwiema bocznymi pętlami TTA w górnej części kwadrupleksu i jedną przekątną pętlą TTA w dolnej części. Kompleks potasowy może istnieć w postaci trzech struktur: krzeselkowej, koszykowej oraz równoległej struktury z czterema równoległymi niemi (Rys. 2d) [12]. Wszystkie trzy pętle TTA biegną wtedy na zewnątrz rdzenia G-kwartetowego (wzdłuż rowków). Powyższy przykład ilustruje potencjalną możliwość przejścia jednej formy w drugą pod wpływem kationów metali. Zupełnie inaczej wygląda sytuacja w przypadku intermolekularnego kwadrupleksu utworzonego przez dwie nici oligonukleotydu o sekwencji d(GGGG-TTTT-GGGG). Stwierdzono, że rodzaj jonu metalu nie wywołuje żadnych zmian konformacyjnych. Oba kompleksy (z jonami K⁺ i jonami Na⁺) to dimerowe struktury z naprzemianległą orientacją nici i przekątnymi pętlami na przeciwległych końcach kwadrupleksu (Rys. 2b) [10, 13, 14].

Fakt, że w obecności jonów metali alkalicznych, DNA o odpowiedniej sekwencji może przekształcać się w strukturę G-kwadrupleksu sugeruje, że również w komórce (*in vivo*) powinny zachodzić podobne mechanizmy.

Oprócz kationów metali, w selektywnym tworzeniu się lub stabilizacji guaninowych kwadrupleksów mogą również uczestniczyć cząsteczki związków organicznych, tzw. ligandy. Należy tu wymienić pochodne antrachinonowe, pochodne akrydynowe, porfiryny i inne ligandy posiadające płaskie układy aromatyczne [15–19]. Wspólną cechą wszystkich wymienionych ligandów jest płaski rozbudowany chromofor aromatyczny z deficytem elektronowym i kationowymi podstawnikami. Takie płaskie ligandy mogą oddziaływać warstwowo z płaszczyznami guanin a miejscem wiążącym ligand w kwadrupleksie są płaszczyzny zewnętrznych kwartetów guaninowych (ang. *end stacking*) [15–19].

Do badania G-tetrapleksów stosowane są różne techniki, m.in. dyfrakcja rentgenowska, spektroskopia NMR, spektroskopia dichroizmu kołowego (CD), spektrometria mas, fluorescencja oraz spektroskopia UV-Vis. Ważną metodą fluorescencyjną, stosowaną do badania procesu tworzenia się G-kwadrupleksów, jest technika oparta na fluorescencyjnym rezonansowym przeniesieniu energii (ang. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*, FRET). Celem niniejszego artykułu przeglądowego jest podsumowanie bieżących dokonań w dziedzinie rozmaitych zastosowań techniki FRET w badaniu kwadrupleksów G₄, obejmujących zarówno podstawowe badania strukturalne, jak i praktyczne aplikacje tej metody. Zastosowania obejmują poszukiwania ligandów skutecznie wiązanych przez kwadrupleksy w celu budowy nanomaszyn molekularnych lub projektowania „latarni molekularnych” (ang. *mole-*

cular aptamer beacon) do rozpoznawania białek. Opiszemy również metodę detekcji i wizualizacji jonów potasowych w roztworze wodnym, przy użyciu sensora PSO (ang. *Potassium Sensing Oligonucleotide*, PSO), tworzącego kwadrupleksy G4.

1. REZONANSOWY TRANSFER ENERGII – (FRET)

Fluorescencyjny rezonansowy transfer energii (FRET) to metoda spektroskopowa, dostarczająca informacji na temat odległości między fluoroforami (ich przestrzennego rozmieszczenia). Jest to metoda szczególnie przydatna w analizie zmian strukturalnych zachodzących w biopolimerach, np. w kwasach nukleinowych [20, 21]. W typowym eksperymencie FRET, kwas nukleinowy znakowany jest dwoma różnymi fluoroforami, donorem i akceptorem energii, związanymi kowalencyjnie w dwóch różnych miejscach cząsteczki. Energia stanu wzbudzonego fluorującego donora jest bezpromieniście przenoszona do niewzbudzonej cząsteczki akceptora w wyniku słabych oddziaływań typu dipol-dipol. Aby uzyskać analitycznie użyteczny sygnał FRET, oddalenie cząsteczki akceptora od cząsteczki donora powinno wynosić nie więcej niż ok. 80Å [21]. Proces FRET manifestowany jest zmianami spektralnymi układu: fluorescencja donora spada w wyniku procesów wygaszania, natomiast emisja akceptora wzrasta. A zatem, wydajność FRET (E) można śledzić mierząc albo spadek fluorescencji (skrócenie czasu życia) donora albo wzrost fluorescencji akceptora. Aby z danych eksperymentalnych otrzymać informacje dotyczące odległości między fluoroforami, konieczna jest znajomość relacji pomiędzy wydajnością FRET i odległością dzielącą donora i akceptor. Förster wykazał, że wydajność FRET jest odwrotnie proporcjonalna do szóstej potęgi odległości pomiędzy fluoroforami (równanie (1)):

$$E = (1 + R^6/R_0^6)^{-1} \quad (1)$$

gdzie R jest odległością pomiędzy fluoroforami. R_0 jest tzw. „odległością krytyczną”, tzn. charakterystycznym promieniem Förstera dla danej pary donora-akceptor, który można wyznaczyć z ich charakterystyk spektralnych:

$$R_0^6 = 8,8 \cdot 10^{-28} \Phi_D \kappa^2 n^{-4} J(\nu) \quad (2)$$

gdzie Φ_D jest fluorescencyjną wydajnością kwantową donora w nieobecności akceptora, κ^2 to parametr zależny od względnej orientacji momentów przejścia donora i akceptora, n to współczynnik załamania ośrodka a $J(\nu)$ to całka nakładania widma emisji donora i widma absorpcji akceptora. Z równania (1) wyraźnie widać, że gdy $R = R_0$, wydajność FRET wynosi 50%. Powyższe zależności stanowią podstawę do zastosowania FRET w celu otrzymania informacji strukturalnych [22].

Technikę FRET stosowano w wielu badaniach z udziałem kwasów nukleinowych. Udane zastosowania FRET obejmują śledzenie zmian konformacyjnych w kwasach nukleinowych [23, 24], badanie hybrydyzacji i profili topnienia DNA

[25], monitorowanie procesu tworzenia potrójnej helisy DNA [26], badanie geometrii kwadrupleksów G4 DNA [27], jak również konstrukcje sensorów typu „latarnia molekularna” nazywanych także „wyświetlaczami molekularnymi” (ang. *molecular beacon*) oraz opracowanie ilościowej analizy PCR (łańcuchowa reakcja polimerazy) [28, 29].

2. FRET I TETRAPLEKSOWE STRUKTURY DNA

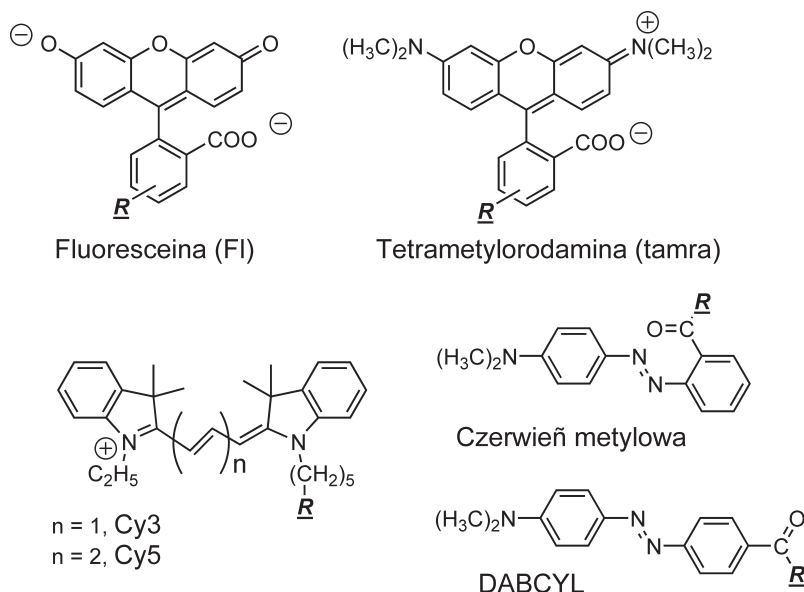
Wewnątrzcząsteczkowe zwińnięcie pojedynczej elastycznej nici cząsteczki DNA w formę G-kwadrupleksu o zwartej budowie, to proces strukturalnego przejścia prowadzący do znacznego zbliżenia się obu zakończeń nici. Technika FRET wydaje się być idealnym rozwiązaniem zapewniającym możliwość monitorowania tego procesu, pod warunkiem, że oba końce nici DNA będą znakowane odpowiednimi fluoroforami (donorem i akceptorem). Pierwszy przykład transferu energii zachodzący w guaninowych tetrapleksach opisali Simonsson i Sjöback [30]. Autorzy zademonstrowali występowanie procesu FRET w intramolekularnie zwińniętych oligonukleotydach, znakowanych na końcach 5' i 3' za pomocą fluoresceiny i tetrametylorodaminy (tamra) [30]. Te dwa fluorofory były również stosowane w większości doniesień innych autorów [17, 31–38].

Tabela 1. Przykłady układów FRET, wykorzystujących kwadrupleksowe struktury DNA

Donor ^{a)}	Akceptor ^{a)}	Sekwencja oligonukleotydu	Uwagi
fluoresceina-5'	3'- tamra	5'-d(G ₄ AG ₃ TG ₄ AG ₃ TG ₄)-3'	[30] protoonkogen c-myc
		5'-d(G ₃ TTAG ₃ TTAG ₃ TTAG ₃)-3'	[17,31-38] ludzkie telomerowe DNA
		5'-d(GGTTGGTGTGGTTGG)-3'	[15,39] aptamer antytrombinowy
		5'-d(G ₄ TTTT) ₃ G ₄ -3'	[37] <i>Oxytricha nova</i>
fluoresceina-5'	3'-czerwień metylowa	5'-d(G ₃ -X-G ₃ -X-G ₃ -X-G ₃)-3'	[40] X = łącznik
		5'-d(G ₃ TTAG ₃ TTAG ₃ TTAG ₃)-3'	[41] intramolekularny G4
		5'-d(GGGTTA GGG)-3'	[41] intermolekularny G4
fluoresceina-5'	3'-DABCYL	5'-d(TGGTTGGTGTGGTTGGT)-3'	[42,43] aptamer antytrombinowy
Cy5-5'	-	5'-d(G ₃ (TTAG ₃) ₃ AGAGGTA ₄ GGA TAATGGCCACGGTGC GGACGGC)-3'	[44] ludzkie telomerowe DNA połączone z odcinkiem dwuniciowym 35 par zasad
-	(*) tamra	5'-d(GCCGTCCGCACCGT GGC CATTACCCTT*TTA CCTCT)-3'	
fluoresceina-5'	3'-Cy5	5'-d(G ₃ TTAG ₃ TTAG ₃ TTAG ₃)-3'	[45] ludzkie telomerowe DNA
fluoresceina -	(3' lub 5') 3'-Cy3	5'-d(GGGG TTTT GGGG)-3' PNA (TTTT GGGG TTTT)	[46] <i>Oxytricha nova</i> , intramolekularny hybrydowy tetrapleks

^{a)} tamra: tetrametylorodamina; DABCYL: 4-(4-dimetyloamino fenylazo)benzoesan; Cy5, Cy3: *N,N*-dietylo-tetrametyloindodikarbocyaniny.

Tabela 1 zawiera przykłady ilustrujące wykorzystanie techniki FRET w układach kwadrupleksowych, niektóre z nich dyskutowane są w następnych fragmentach tego rozdziału. Na Rys. 3 przedstawiono budowę fluoro-roforów (donorów i akceptorów) używanych do modyfikacji kwadrupleksów.



Rysunek 3. Wzory strukturalne fluoroforów (donorów i akceptorów), używanych w pomiarach FRET do modyfikacji oligonukleotydów, tworzących formy kwadrupleksowe. Symbol R – oznacza miejsce przyłączenia oligonukleotydu

2.1. BADANIE BUDOWY I TRWAŁOŚCI KWADRUPLEKSÓW ZA POMOCĄ TECHNIKI FRET

Ilościowe pomiary FRET informują potencjalnie o przestrzennej orientacji donora i akceptora, a zatem winny poszerzyć wiedzę na temat strukturalnych parametrów poszczególnych topologicznych form kwadrupleksowych.

Wyniki prac Mergny'ego i wsp., dotyczące FRET dla 21-merowego oligonukleotydu o sekwencji ludzkiego telomerowego DNA sugerują, że eksperymentalna odległość donora od akceptora jest w granicach 4–5 nm, czyli znacznie przekracza odległość oczekiwaną dla zwiniętej struktury kwadrupleksu (ok. 1 nm). Kłopoty z ilościową interpretacją pomiarów FRET są generalnie powodowane występowaniem konkurencyjnych procesów (np. wygaszanie statyczne), ale są także przypisywane niewłaściwej parametryzacji równania (2). Jednym z takich parametrów jest współczynnik κ^2 . Parametr ten, opisujący względną orientację dipolowych momentów przejścia donora i akceptora, może przyjmować wartości od 0 do 4, w zależ-

ności od ich wzajemnej orientacji [20, 21]. Jeśli w czasie życia stanu wzbudzonego donor i akceptor ulegają swobodnej reorientacji, współczynnik κ^2 przyjmuje uśrednioną wartość 2/3. Choć cząsteczka fluoresceiny, połączona z końcem 5' DNA przez sześciowęglowy łącznik, jest relatywnie swobodna, to już zmiany spektralne wykazywane przez immobilizowaną tetrametylorodaminę wskazują na ograniczenie jej swobody rotacji w wyniku oddziaływań z DNA [31]. Na szczęście wyliczone odległości nie są aż tak czułe na dokładną wartość współczynnika κ^2 , ponieważ do obliczeń brana jest wartość pierwiastka szóstego stopnia z wydajności FRET (patrz równanie (1)). Z drugiej strony, proces tworzenia się kwadrupleksu z pojedynczej nici DNA prowadzi do dużego zbliżenia się obu końców nici, a więc cząsteczek donora i akceptora, co grozi wygaszaniem statycznym. Aby zapobiec wygaszaniu fluorescencji donora na skutek bezpośrednich „oddziaływań warstwowych” pomiędzy fluoroforami, Mergny i wsp. [31] wprowadzili dodatkowy łącznik (TTTTA), między fluoresceiną i zakończeniem 5' ludzkiego telomerowego DNA. Choć wprowadzenie łącznika spowodowało nominalny wzrost odległości między donorem i akceptorem, to zaobserwowano wzrost sensybilizowanej fluorescencji akceptora (tamra) dzięki udaremnieniu niepożądanych „oddziaływań warstwowych” między fluoroforami. Kowalencyjne unieruchomienie fluoroforów wpływa również na ich własności spektralne, co z kolei ma wpływ na wartość całki nakrywania widm donora i akceptora $J(\nu)$. Np. wartość molowego współczynnika absorpcji fluoresceiny po kowalencyjnym połączeniu z ludzkim telomerowym DNA ulega obniżeniu o 30% [31]. Co więcej, własności spektralne oligonukleotydów znakowanych fluoresceiną zależą w sposób istotny od pH, efekty protolityczne powodują znaczące wygaszanie fluorescencji w $\text{pH} < 6,8$ [30, 31]. Pomija się też możliwość, że promień krytyczny R_0 może być różny dla oligomerów w formie zwiniętej i rozwiniętej. Oto tylko kilka przykładów problemów, które należy rozwiązać w celu uzyskania informacji o prawdopodobnej konformacji makrocząsteczki. Na szczęście, wiele cennych informacji i użytecznych parametrów można uzyskać, przeprowadzając eksperymenty FRET w sposób porównawczy, bez konieczności rozwiązywania uprzywilejowanej konformacji cząsteczki.

Jednym z pierwszych przykładów takiego podejścia było monitorowanie w czasie rzeczywistym procesu tworzenia się kwadrupleksu przez serię oligonukleotydów o sekwencji odpowiadającej różnym fragmentom ludzkiego protoonkogeny c-myc [30]. Tak więc, przy użyciu techniki FRET, udało się zidentyfikować 22-merowy fragment, o sekwencji odpowiadającej onkogenowi c-myc, jako oligonukleotyd tworzący strukturę G-kwadrupleksową G4. Większość publikowanych prac dotyczyła badań poświęconych strukturalnym przejściom pomiędzy tetrapleksowym i jednociowym lub dwunociowym DNA [31, 39, 41, 45]. Do wywołania przejść strukturalnych generujących zmianę sygnału FRET stosowano gradient temperaturowy, dodatek kationów metali lub komplementarnej nici DNA. Z eksperymentów FRET uzyskiwano cenne dane, co do trwałości termodynamicznej i kinetyki procesu formowania/denaturacji struktur G-kwadrupleksowych. Profil topnienia (przejście od

kwadrupleksu do jednoniciowego DNA) rejestruje się jako zależność wydajności FRET od temperatury, a z kształtu otrzymanej krzywej topnienia wyznacza się zmianę entalpii ΔH i temperaturę topnienia T_m [31, 39]. Na przykład, Kumar i Maiti [39] wykazali, że klasyczny dupleks, utworzony przez syntetyczny oligonukleotyd $d(G_2T_2G_2TGTG_2T_2G_2)$ i jego komplementarną nici, jest formą termodynamicznie trwałą i dominującą w warunkach fizjologicznych. Intramolekularne zwijanie kwadrupleksu tworzonego przez ten oligonukleotyd może być w pewnych warunkach kontrolowane kinetycznie. Chociaż w fizjologicznym pH, kwadrupleksy nie mogą skutecznie konkurować z tworzącym się dupleksem, to jednak opóźniają łączenie się dwóch nici w dupleks.

Klenerman i wsp. [45] badali, przy użyciu techniki FRET, kinetykę rozplatania się kwadrupleksu, utworzonego z oligonukleotydu o sekwencji ludzkiego telomeroowego DNA, w obecności komplementarnego kwasu peptydonukleinowego (PNA). W obecności PNA istnieje możliwość powstania heterodupleksu DNA/PNA. Autorzy wykazali, że otwieranie się kwadrupleksu (dysocjacja) nie zależy od stężenia kwasu peptydonukleinowego, potwierdzając wcześniejsze doniesienia, że etapem limitującym szybkość dysocjacji jest wewnętrzne przegrupowanie kwadrupleksu, po którym następuje szybka hybrydyzacja z nicią komplementarną. Energia aktywacji wyznaczona w oparciu o równanie Arrheniusa wynosiła 98 kJ mol^{-1} .

Również Armitage i wsp. [46] wykorzystali kwas peptydonukleinowy (PNA) i technikę FRET, tym razem do monitorowania reakcji tworzenia się mieszanego kwadrupleksu intermolekularnego pomiędzy niemi DNA i PNA [46]. Telomerowe DNA *Oxytricha nova* o sekwencji $d(G_4T_4G_4)$ i próbka PNA o tej samej sekwencji były znakowane fluoroforami (fluoresceina albo Cy3). Strukturę obu fluoroforów przedstawiono na Rys. 3. Wykazano, że PNA i DNA tworzyły trwałe mieszane tetrapleksy, zawierający kwartety guaninowe. Za pomocą FRET udowodniono czteroniciowy charakter tej hybrydy, stechiometrię kwadrupleksu (PNA_2-DNA_2) oraz równoległą orientację dwóch nici DNA i dwóch nici PNA [46].

Drugorzędową strukturę DNA wykorzystano również do budowy nanomaszyny. Alberti i Mergny [47] przedstawili nanomaszynę, która potrafiła naśladować ruchy posuwisto-zwrotne silnika. Ruch powstawał w wyniku ustalania się odwracalnej równowagi pomiędzy intramolekularnym kwadrupleksem oraz intermolekularnym dupleksem. Do uwidocznienia ruchów silnika użyto 21-merowego oligonukleotydu, zawierającego cztery powtórzenia trójek guaninowych, zgodnie z sekwencją ludzkiego telomeroowego DNA. Oligonukleotyd był znakowany fluoresceiną i tamrą, jako partnerami FRET. Źródłem energii, dla wywołania przejścia między tymi dwoma stanami, był dodatek komplementarnej nici, pełniącej jakoby rolę „paliwa DNA”. Wprowadzenie pojedynczych nici DNA wywoływało wewnętrzną konwersję pomiędzy dwoma dobrze zdefiniowanymi stanami topologicznymi, generując jako produkt uboczny dupleks DNA.

Nowy pasjonujący obszar badań z zastosowaniem techniki FRET stanowi spektroskopia pojedynczej cząsteczki (ang. *Single Molecule Spectroscopy*, SMS), która

wykorzystuje dużą czułość zjawiska fluorescencji. Rejestracja sygnału FRET dla pojedynczych cząsteczek, przechodzących przez strefę oświetlenia wiązki wzbudzającej mikroskopu konfokalnego, umożliwia określenie liczby konformerów i rozkładu konformacyjnego cząsteczek w funkcji zmieniających się warunków. Można również obserwować rozkład statystyczny tych konformacji, w zależności od czasu monitorowania postępu reakcji, a stąd oszacować szybkość reakcji i jej mechanizm [48]. Klenerman i wsp. [44] rejestrowali sygnał FRET znakowanych kwadrupleksów techniką SMS, w celu zbadania strukturalnego polimorfizmu i kinetyki dysocjacji G-kwadrupleksów. Do konstrukcji układu FRET zastosowali dwa pojedynczo znakowane oligonukleotydy. Główny oligonukleotyd, 5'-Cy5-d(G₃(TTA G₃)₃AGA GGT AAA AGG ATAATG GCC ACG GTG CGG ACG GC)-3', znakowany fluoroforem Cy5 (akceptor energii) tworzył strukturę kwadrupleksową dzięki obecności sekwencji ludzkiego telomerowego DNA [(G₃(TTAG₃)₃]. Odcinek jednoniciowego DNA (35 zasad) zdolny był do hybrydyzacji z komplementarną nicią. Nić komplementarna (drugi oligonukleotyd) zawierała fluorofor tamra (donor energii) połączony z tyminą (T28) za pomocą sześciowęglowego łącznika. Tak zaprojektowany układ dawał w efekcie końcowym G-kwadrupleks połączony z dupleksem (o długości 35 par zasad) i umożliwiał lokalizację donora i akceptora w odległości ok. 4,7 nm od siebie ($R_0 = 5,3$ nm). Umieszczenie tamry w duplekse zapobiegało wygaszaniu fluorescencji tamry przez zasady guaninowe kwadrupleksu oraz redukowało statyczne wygaszanie między fluoroforami [31]. Cytowane badania wykazały współistnienie dwóch konformacji G-kwadrupleksowych, o niskiej i wysokiej wydajności FRET, którym autorzy przypisali strukturę, odpowiednio antyrównoległą i równoległą [11, 12]. Reakcja dysocjacji tych struktur była badana w szerokim zakresie temperatur, w obecności nieznakowanej nici komplementarnej (bogatej w reszty deoksycytydynowe), której obecność powodowała rozkładanie się kwadrupleksu (dysocjację) i prowadziła do znacznego obniżenia wydajności FRET. Autorzy obserwowali, że obie konformacje dysocjują pozornie z taką samą szybkością, a stała szybkości dysocjacji sugeruje, że etapem limitującym jest reakcja hybrydyzacji drugiego rzędu. Ten rezultat odbiega od wyników dla innych układów kwadrupleksowych z udziałem kwasu peptydonukleinowego jako odczynnika hybrydującego, w których otrzymywano wyniki sugerujące reakcję hybrydyzacji pierwszego rzędu [39, 45].

Przedstawione powyżej przykłady pokazują, że metoda FRET jest bardzo przydatna w badaniu drugorzędowej struktury oligonukleotydów i przejść strukturalnych. Chociaż istnieją ograniczenia w zastosowaniu FRET do wyznaczania absolutnych odległości donora i akceptora, gdyż immobilizacja sondy fluorescencyjnej może mieć znaczący wpływ na ładunek, giętkość, hydrofobowość oligonukleotydu i spektralne własności samych sond, to wiele cennych informacji i użytecznych parametrów można uzyskać przeprowadzając eksperymenty FRET w sposób porównawczy.

2.2. LIGANDY ODDZIAŁUJĄCE Z KWADRUPLEKSAMI. NOWE LEKI ANTYNOWOTWOROWE

Proces FRET był także wykorzystywany do poszukiwań i identyfikacji ligandów (potencjalnych leków), które stabilizują kwadrupleksowe struktury DNA. Mergny i wsp. [17, 31] zaproponowali metodę wstępnej selekcji (ang. *screening*) ligandów G4, polegającą na rejestrowaniu profili topnienia oligonukleotydów o sekwencjach telomerowego DNA, znakowanych fluoroforami umożliwiającymi FRET. Pomiar taki prowadzi się w obecności i nieobecności specyficznie oddziałujących ligandów. Monitorowana procesem FRET stabilizacja kwadrupleksu G4 (indukowana obecnością liganda), pozostawała w dobrej korelacji z wynikami uzyskanymi w oparciu o pomiary absorpcji w zakresie UV [17]. Selekcja ligandów G4 metodą FRET oferuje liczne korzyści w porównaniu z tradycyjnym podejściem wykorzystującym widma UV, m.in. wysoką czułość, umożliwiającą pracę na niskim poziomie stężeń DNA i liganda, liniową zależność sygnału FRET w szerokim zakresie stężeń, możliwość badania powinowactwa wiązania do G4 w obecności ligandów konkurujących, oraz możliwość wyznaczania stałych asocjacji kompleksu ligand/G4 DNA [17]. Powyższa strategia pomiarowa była wstępnie testowana z wykorzystaniem liganda cyjaninowego DODC (3,3'-dietylooksadikarbocyanina) o znanej preferencji do stabilizowania struktur G4 DNA, a następnie z użyciem pentacyklicznych pochodnych dibenzofenantroliny [17, 31]. Później, metodę tą zastosowano z powodzeniem do badania właściwości stabilizacyjnych dwóch ligandów akrydynowych (pochodnej dimerowej i monomerowej) [32], oraz do szacowania możliwości stabilizacji kwadrupleksu przez makrocycliczny związek, posiadający dwie chinakrydynowe podjednostki aromatyczne [49].

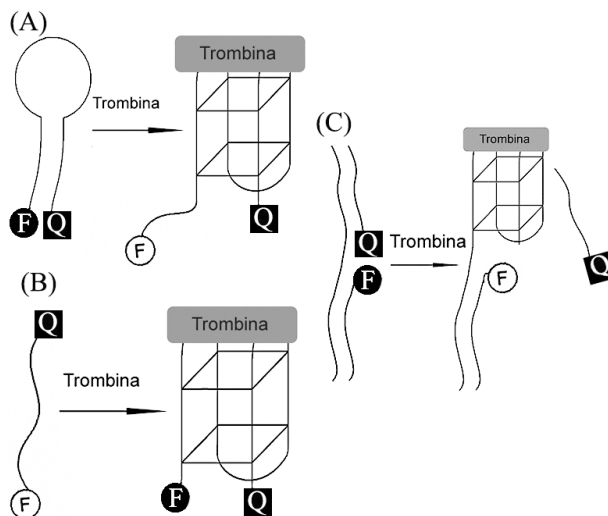
Wzrastające zainteresowanie projektowaniem i syntezą nowych ligandów stabilizujących struktury kwadrupleksowe [17–19, 32, 49] może spowodować, że powyższa technika selekcji w oparciu o proces FRET będzie się prężnie rozwijała.

2.3. SONDY MOLEKULARNE DO DETEKCJI BIAŁEK

Oligonukleotydy posiadające charakterystyczne sekwencje odpowiedzialne za oddziaływanie z białkami, mogą być wykorzystane do konstrukcji sensorów proteiновых, opartych na procesie FRET. Na przykład, sekwencja antytrombinowa, zbudowana z 15 nukleotydów (5'-d(GGTTGGTGTGGTTGG)-3'), tworzy z białkiem trombiną trwały kompleks, w którym nić DNA przyjmuje strukturę czteroniciową [50]. Powstały intramolekularny kwadrupleks o dwóch kwartetach guaninowych stanowi idealną platformę do konstrukcji sensora FRET, czułego na enzym trombinę.

Zaproponowano trzy różne strategie konstrukcji oligonukleotydowego sensora FRET do wykrywania trombiny [42, 43, 51]. Pierwszy sensor, latarnia molekularna, opracowany przez Hamaguchiego i wsp.[51], oparty jest na oligonukleotydzie o sekwencji charakterystycznej dla trombiny, poszerzonym o 5 reszt nukleotydowych,

dołączonych do końca 5' w celu umożliwienia oligonukleotydowi tworzenia struktury „spinki” (Rys. 4A). W nieobecności trombiny, donator i akceptor energii (odpowiednio fluoresceina i DABCYL na końcach 5' i 3'), znajdują się w utworzonej strukturze „spinki” blisko siebie i fluorescencja donora jest wygaszona. Dodatek trombiny powoduje zniszczenie dotychczasowej struktury z dwuniciowym rdzeniem i utworzenie kwadrupleksu G4. Taka zmiana konformacji skutkuje wzrostem dystansu między donorem i akceptorem, czego efektem jest 2,5-krotne wzmocnienie fluorescencji. W oznaczeniach ilościowych nie przeszkadzają czynniki krzepliwości IXa, Xa (struktury białkowe o 37% homologii z sekwencją trombiny) ani proteaza serynowa osocza, natomiast przeszkadzają białka wiążące niespecyficznie jednoniciowe DNA (ssDNA), np. dehydrogenaza mleczanowa (LDH-5).



Rysunek 4. Trzy strategie konstrukcji sensora FRET do oznaczania trombiny i zasada działania sensorów. (A) Nie fluoryzująca struktura „spinki” (latarnia molekularna), w obecności trombiny przechodzi w wewnątrzcząsteczkowy fluoryzujący kwadrupleks. (B) Fluoryzujący oligonukleotyd, o strukturze nie zorganizowanej, tworzy w obecności trombiny kwadrupleks z wygaszoną fluorescencją. (C) Trombina destabilizuje dwurdzeniowy dupleks z wygaszoną fluorescencją, a utworzony kwadrupleks uwalnia nić – Q i sygnał fluorescencyjny wzrasta

Konstrukcyjnie prostszy sensor trombinowy został opracowany przez Tana i wsp. [42]. Donor i akceptor zostały immobilizowane poprzez jednonukleotydowe łączniki, do końców 5' i 3' niemodyfikowanej sekwencji antytrombinowej (Rys. 4B). Zaproponowano dwa warianty sondy, jedną, opartą o proces wygaszania fluorescencji (dla układu fluoresceina – DABCYL) oraz drugą, wykorzystującą proces FRET (donorem była kumaryna a akceptorem fluoresceina). Oba sensory wykazywały dosyć niską czułość – 60% wygaszanie fluorescencji dla sondy pierwszej i 2-krotny wzrost emisji dla drugiego sensora w warunkach nasycenia. Sondy charakteryzo-

wały się dobrą selektywnością i krótkim czasem odpowiedzi molekularnej. W oznaczeniu nie przeszkadzał nawet 20-krotny nadmiar albuminy wołowej (BSA) lub γ -trombiny (nieaktywna forma trombiny). Nieoczekiwanie, również obecność enzymu LDH-5, który silnie oddziałuje z jednoniciowym DNA i ma zdolność rozplatania kwadrupleksów, nie przeszkadza w oznaczeniu trombiny. Nie jest to jednak sensor specyficzny – znaczący jest wpływ białka wiążącego do ssDNA (E. coli SSB), choć można go zmniejszyć przez maskowanie nadmiarem jednoniciowego oligonukleotydu o innej sekwencji.

Nutiu i Li [43] zaprezentowali trzecią strategię, konstruując sensor z trzech symetrycznych nici oligonukleotydowych, zdolnych do hybrydyzacji w strukturę dwuniciową (Rys. 4C). Do końca 5' jednej z nici dołączony jest donor energii (nić F), a do końca 3' drugiej akceptor (nić Q). Trzeci, niemodyfikowany oligonukleotyd, zawiera sekwencje komplementarne do nici F i Q, oraz sekwencję odpowiedzialną za oddziaływanie z trombiną. Nić Q jest komplementarna do sekwencji antytrombinowej. W nieobecności trombiny, trzy nici DNA tworzą dupleks, który charakteryzuje się wygaszoną fluorescencją (donor i akceptor w bliskiej odległości). Po dodaniu trombiny, zachodzi transformacja części podwójnej helisy w kwadrupleks, z jednoczesnym uwolnieniem nici Q i znacznym wzrostem fluorescencji. Jako parę donor–akceptor, autorzy zastosowali fluoresceinę i DABCYL. Metoda daje liniową zależność stężenia trombiny w przedziale od 10 do 1000 nM. Inne białka, np. BSA, oraz czynniki krzepliwości Xa i IXa nie wpływały na fluorescencję. Wadą tego układu jest długi czas odpowiedzi w temperaturze pokojowej. Wzrost temperatury do 37°C skraca czas oczekiwania z 5 min do 1,2 min. Autorzy zwrócili uwagę na ważną rolę warunków eksperymentalnych; np. rodzaj, stężenie i pH roztworu buforowego oraz obecność jonów metali znacząco wpływają na pracę sensora. Efekt ten związany jest z konkurującymi oddziaływaniami kwadrupleks–białko i ssDNA–białko. Stabilność dupleksu a także kwadrupleksu zależy zarówno od stężenia, jak i rodzaju jonów metali obecnych w roztworze. Kationy potasowe stabilizują formy czteroniciowe, natomiast jony magnezu wpływają korzystnie na tworzenie dupleksu DNA [43].

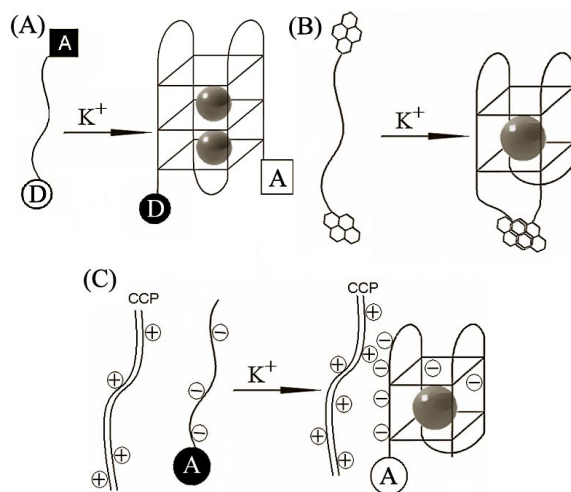
2.4. SONDY OLIGONUKLEOTYDOWE DO DETEKЦИИ JONÓW POTASU

W komórce istotną rolę odgrywają jony metali (K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}), dlatego doskonalenie metod detekcji potasu w komórkach i płynach ustrojowych organizmów żywych jest poważnym wyzwaniem. Istnieje tylko kilka układów analitycznych, umożliwiających fluorymetryczne oznaczanie jonów potasu w układzie homogenicznym [52–54]. Ich głównym mankamentem jest niska czułość i selektywność, nie pozwalająca na oznaczenia w warunkach odpowiadających składowi płynów ustrojowych.

Selektywne sensory potasu oparte na strukturze kwadrupleksu G4, ostatnio opracowane w kilku grupach badawczych, spełniają takie oczekiwania. Zapropono-

wano trzy różne strategie konstrukcji sensora kwadrupleksowego na jony potasu (Rys. 5A–C): (i) wykorzystanie procesu FRET, zachodzącego pomiędzy dwoma fluoroforami, które są przyłączone do końców telomerowego DNA [34–36], (ii) wykorzystanie emisji ekscymerowej pierścieni pirenowych, przyczepionych do końców kwadrupleksowego oligonukleotydu [55], (iii) zastosowanie FRET w układzie: kwadrupleks znakowany akceptorem energii i kationowy polimer, pełniący funkcję kolektywnego donora [56].

Podstawą działania wszystkich tych układów sensorowych jest selektywne kompleksowanie jonów potasu przez kwadrupleksy G4. Przyłączenie fluorofora do oligonukleotydu nie zmienia tych właściwości. Uważa się, że promień kationu potasu (około 1,3 Å) jest prawie taki sam jak wielkość luki pomiędzy kwartetami guaninowymi. Właśnie dopasowanie kationu do luki jest parametrem decydującym o stabilizacji kompleksu kwadrupleks/kation metalu. Dla metali alkalicznych można ułożyć następujący szereg powinowactwa do G4 DNA: $K^+ \gg Na^+ > Rb^+ > Cs^+ \gg Li^+$ (uważa się, że lit może nawet inhibować powstawanie kwadrupleksów), a dla metali ziem alkalicznych: $Sr^{2+} \gg Ba^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+}$ [2, 35, 36, 39]. W żywej komórce należy uwzględnić wpływ czterech kationów – potasu, sodu, wapnia i magnezu.



Rysunek 5. Zasada działania i budowa trzech sensorów kwadrupleksowych do detekcji jonów potasu. (A) sensor PSO typu FRET (fluoresceina i tamra jako donor i akceptor energii). (B) Sensor bazujący na ekscymerowej fluorescencji ugrupowania pirenowego. (C) Sensor FRET czuły na elektrostatyczne oddziaływanie między kationowym polimerem (CCP), pełniącym rolę donora, a G-kwadrupleksem znakowanym akceptorem (fluoresceina)

Sensor zbudowany według pierwszej strategii (Rys. 5A) został nazywany PSO (ang. *Potassium Sensing Oligonucleotide*) i zawiera bogaty w guaniny oligonukleotyd znakowany na końcach 5' i 3' fluoroforami (fluoresceina i tamra), między któ-

rymi może zachodzić FRET [34–36]. W zależności od użytej sekwencji oligodeoksynukleotydu, właściwości sondy (selektywność, czułość) mogą być zmieniane. Sensor PSO-1, opracowany w oparciu o sekwencje fragmentu ludzkiego telomerowego DNA, $d(G_3(TTA G_3)_3)$, posiada stałą trwałości (K_b) dla jonów potasu, około 43000 razy większą niż dla jonów sodu [35]. W przypadku PSO-2 (*Oxytricha nova* – $d(G_4(T_4G_4)_3)$), relacja ta wynosiła zaledwie 150 [36]. Jednakże na selektywność sensora PSO wpływa nie tylko konkurencja wiązania poszczególnych jonów przez PSO, ale również wydajność FRET, czyli odległość między fluoroforami w formie kwadrupleksowej. Porównując parametry sensorów PSO-1 i PSO-2 autorzy sformułowali następujące wnioski: (i) sensybilizowana fluorescencja akceptora (tamra) pojawia się jedynie dla kompleksów z jonami sodu i potasu, (ii) dużo niższe stężenie jonów potasu wystarcza do wygenerowania sygnału FRET, (iii) osiągnięta maksymalna intensywność fluorescencji tamry jest wyższa dla sodu oraz (iv) kationy wielowartościowe (np. Mg^{2+}) powodują jedynie wygaszenie fluorescencji donora (fluoresceina), ale nie generują sensybilizowanej fluorescencji akceptora (tamra). Ostatnio opublikowane wyniki pomiarów anizotropii fluorescencji i efektywności FRET [37] dowodzą, że istnieje ścisła korelacja między strukturą kwadrupleksu a możliwością występowania procesów statycznego wygaszania fluorescencji, które istotnie obniżają wydajność FRET.

Kolejnym sensorem jonów potasu był układ molekularny nazwany PSO-py (Rys. 5B), wykorzystujący fluorescencję pirenu (oba końce oligonukleotydu znakowane grupami pirenolowymi) do monitorowania tworzenia się kwadrupleksu [55]. W obecności kationów potasu, oligonukleotyd ulega transformacji do kwadrupleksu, w którym końce 3' i 5' znajdują się dostatecznie blisko, żeby obie cząsteczki pirenu mogły ustawić się równolegle (ang. *face-to-face*). W miejsce monomerowej emisji pirenu (bez jonów K^+), obserwuje się emisję ekscymerową. Oligonukleotyd odpowiedzialny za kompleksowanie potasu dobrany był w sposób zapewniający dobrą selektywność, a jest nim aptamer antytrombinowy (TBA), $d(GGTTGGTGTGGT-TGG)$ [55].

He i wsp. w swoim sensorze typu FRET użyli do modyfikacji oligonukleotydu tylko jednego fluorofora (Rys. 5C) [56]. Aptamer antytrombinowy (TBA) znakowali za pomocą fluoresceiny przyłączonej do końca 5' TBA (akceptor energii). Zewnętrznym donorem był polimer kationowy posiadający dużą liczbę jednostek fluoroforowych (CCP). W nieobecności jonów potasu, sygnał FRET był niski, gdyż kationowy polimer (donor) nie asocjował do oligonukleotydu, będącego w konformacji kłęбка (ang. *random coil*). Po dodaniu KCl, w wyniku formowania się kwadrupleksu, fluorescencja wzrosła około 16-krotnie, co autorzy przypisali procesowi FRET [56]. Mechanizm i przyczyny preferencyjnego asocjowania kationowego polimeru ze strukturą kwadrupleksową jest niejasny, niemniej, przykład ten wskazuje na duży potencjał drzemiący w strategii, wykorzystującej kolektywny donor o dużej liczbie jednostek fluoroforowych.

PODSUMOWANIE

Przedstawione przykłady jednoznacznie dowodzą, że FRET jest szczególnie użyteczną techniką w badaniach strukturalnych czteroniciowych form DNA w roztworach. Chociaż do chwili obecnej nie udało się uzyskać z wyników FRET informacji o preferowanej konformacji struktur kwadrupleksowych, to liczne przykłady badań porównawczych świadczą o dużym potencjale tej techniki. Wystarczy wymienić tutaj badania dotyczące kinetyki procesu tworzenia i dysocjacji kwadrupleksów, ich oddziaływań z ligandami, czy też konstrukcję nanomaszyny. Obserwuje się również wzrastające zainteresowanie analitycznym aspektem tego obszaru badawczego – czego dowodem są konstrukcje sensorów FRET, bazujące na strukturach kwadrupleksowych. Główne zalety techniki FRET w aplikacjach sensorowych są następujące: ekstremalnie wysoka czułość (można wykryć analit na poziomie stężeń 1×10^{-10} M), (ii) bardzo dobra selektywność (możliwość detekcji znakowanego oligonukleotydu w obecności dużego nadmiaru nici nie znakowanych), oraz (iii) szeroki zakres dynamiczny pomiarów fluorescencyjnych. Dalszy postęp w tej dziedzinie powinien być realizowany poprzez konstrukcję nowych sensorów fluorescencyjnych oraz rozszerzenie badania nad procesem FRET w układach kwadrupleksowych poprzez zaangażowanie fluorescencyjnych technik czasowo-rozdzielczych i spektroskopii pojedynczych cząsteczek.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] M. Gellert, M.N. Lipsett, D.R. Davies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1962, **48**, 2013.
- [2] W. Guschlbauer, J.F. Chantotand, D. Thiele, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 1990, **8**, 491.
- [3] A.M. Zahler, J.R. Williamson, T.R. Cech, D.M. Prescott, *Nature*, 1991, **350**, 718.
- [4] S. Neidle, G. Parkinson, *Nat. Rev. Drug Des.*, 2002, **1**, 383.
- [5] J.L. Mergny, J.F. Riou, P. Mailliet, M.P. Teulade-Fichou, E. Gilson, *Nucleic Acids Res.*, 2002, **30**, 839.
- [6] T. Simonsson, *Biol. Chem.*, 2001, **382**, 621.
- [7] Y. Wang, D.J. Patel, *J. Mol. Biol.*, 1995, **251**, 76.
- [8] M.A. Keniry, G.D. Strahan, E.A. Owen, R.H. Shafer, *Eur. J. Biochem.*, 1995, **233**, 631.
- [9] G. Laughlan, A.I. Murchie, D.G. Norman, M.H. Moore, P.C. Moody, D.M. Lilley, B. Luisi, *Science*, 1994, **265**, 520.
- [10] S. Neidle, G. Parkinson, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2003, **13**, 275.
- [11] Y. Wang, D.J. Patel, *Structure*, 1993, **1**, 263.
- [12] G.N. Parkinson, M.H.P. Lee, S. Neidle, *Nature*, 2002, **417**, 876.
- [13] P. Schultze, N.V. Hud, F.W. Smith, J. Feigon, *Nucleic Acids Res.*, 1999, **27**, 3018.
- [14] S.M. Haider, G.N. Parkinson, S. Neidle, *J. Mol. Biol.*, 2002, **320**, 189.
- [15] D. Sun, B. Thompson, B. E. Cathers, M. Salazar, S. M. Kerwin, J. O. Trent, T.C. Jenkins, S. Neidle, L.H. Hurley, *J. Med. Chem.*, 1997, **40**, 2113.
- [16] D. F. Shi, R. T. Wheelhouse, D. Sun, L. H. Hurley, *J. Med. Chem.*, 2001, **44**, 4509.
- [17] J.-L. Mergny, L. Lacroix, M.-P. Teulade-Fichou, C. Hounsou, L. Guittal, M. Hoarau, P.B. Arimondo, J.-P. Vigneron, J.-M. Lehn, J.-F. Riou, T. Garestier, C. Helene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, **98**, 3062.

- [18] S.M. Kerwin, *Curr. Pharm. Des.*, 2000, **6**, 441.
- [19] B. Juskowiak, E. Galezowska, N. Kaczorowska, T.W. Hermann, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004, **14**, 3627.
- [20] L. Stryer, R.P. Haugland, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1967, **58**, 719.
- [21] R.M. Clegg, *Methods Enzymol.*, 1992, **211**, 353.
- [22] T. Förster, *Ann. Phys.*, 1948, **2**, 55.
- [23] E.A. Jares-Erijman, T.M. Jovin, *J. Mol. Biol.*, 1996, **257**, 597.
- [24] R.M. Clegg, A.I.H. Murchie, A. Zechel, D.M.J. Lilley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, **90**, 2994.
- [25] R.A. Cardullo, S. Agrawal, C. Flores, P.C. Zamecnik, D.E. Wolf, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, **85**, 8790.
- [26] J.L. Mergny, T. Garestier, M. Rougee, A.V. Lebedev, M. Chassignol, N.T. Thuong, C. Helene, *Biochemistry*, 1994, **33**, 15321.
- [27] R.M. Clegg, A.I.H. Murchie, A. Zechel, C. Carlberg, S. Diekmann, D.M.J. Lilley, *Biochemistry*, 1992, **31**, 4846.
- [28] S. Tyagi, D.P. Bratu, F.R. Kramer, *Nat. Biotechnol.*, 1998, **16**, 49.
- [29] D.G. Ginzinger, *Exp. Hematol.*, 2002, **30**, 503.
- [30] Simonsson, R. Sjöback, *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**, 17379.
- [31] J.-L. Mergny, J.C. Maurizot, *ChemBioChem*, 2001, **2**, 124.
- [32] P. Alberti, J. Ren, M.P. Teulade-Fichou, L. Guittat, J.F. Riou, J.B. Chaires, C. Hélène, J.P. Vigneron, J.M. Lehn, J.L. Mergny, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2001, **19**, 505.
- [33] A. Yamauchi, T. Hayashita, A. Kato, S. Nishizawa, M. Watanabe, N. Teramae, *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 5841.
- [34] T. Nojima, H. Ueyama, M. Takagi, S. Takenaka, *Nucleic Acids Res. Suppl.*, 2002, **2**, 125.
- [35] H. Ueyama, M. Takagi, S. Takenaka, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 1428.
- [36] S. Takenaka, H. Ueyama, T. Nojima, M. Takagi, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, **375**, 1006.
- [37] B. Juskowiak, E. Galezowska, A. Zawadzka, A. Gluszyńska, S. Takenaka, *Spectrochim. Acta P.A.*, 2006, **64**, 835.
- [38] N. Kumar, S. Maiti, *Nucleic Acids Res.*, 2005, **33**, 6723.
- [39] N. Kumar, S. Maiti, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, **319**, 759.
- [40] A. Risitano, K.R. Fox, *Nucleic Acids Res.*, 2004, **32**, 2598.
- [41] R.A.J. Darby, M. Sollogoub, C. McKeen, L. Brown, A. Risitano, N. Brown, C. Barton, T. Brown, K.R. Fox, *Nucleic Acid Res.*, 2002, **30**, e39.
- [42] J.J. Li, X. Fang, W. Tan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, **292**, 31.
- [43] R. Nutiu, Y. Li, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 4771.
- [44] L. Ying, J.J. Green, H. Li, D. Klenerman, S. Balasubramanian, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, **100**, 14629.
- [45] J.J. Green, L. Ying, D. Klenerman, S. Balasubramanian, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 3763.
- [46] B. Datta, C. Schmitt, B.A. Armitage, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 4111.
- [47] P. Alberti, J.L. Mergny, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, **100**, 1569.
- [48] A.A. Deniz, M. Dahan, J.R. Grunwell, T. Ha, A.E. Faulhaber, D.S. Chemla, S. Weiss, P.G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, **96**, 3670.
- [49] M.P. Teulade-Fichou, C. Carrasco, L. Guittat, C. Bailly, P. Alberti, J.L. Mergny, A. David, J.M. Lehn, W.D. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 4732.
- [50] L.C. Bock, L.C. Griffin, J.A. Latham, E.H. Vermaas, J.J. Toole, *Nature*, 1992, **355**, 564.
- [51] N. Hamaguchi, A. Ellington, M. Stanton, *Anal. Biochem.*, 2001, **294**, 126.
- [52] A. Yamauchi, T. Hayashita, S. Nishizawa, M. Watanabe, N. Teramae, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 2319.
- [53] W. Xia, R. H. Schmechl, C. Li, *Eur. J. Org. Chem.*, 2000, **3**, 387.

- [54] C. Li, G. Law, W. Wong, *Org. Lett.*, 2004, **6**, 4841.
[55] S. Nagatoishi, T. Nojima, B. Juskowiak, S. Takenaka, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2005, **44**, 5067.
[56] F. He, Y. Tang, S. Wang, Y. Li, D. Zhu, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 12343.

Praca wpłynęła do Redakcji 14 czerwca 2006

Redakcja „Wiadomości Chemicznych” informuje, że są u nas do nabycia następujące pozycje „Biblioteki Wiadomości Chemicznych”:

Nomenklatura steroidów (Zalecenia 1989), tłum. J.W. Morzycki i W.J. Szczepek, cena 3 zł

Nomenklatura chemii nieorganicznej. Zalecenia 1990, red. Z. Stasicka, cena 25 zł

Podstawowa terminologia stereochemii oraz Słownik podstawowych terminów w nauce o polimerach. Zalecenia 1996, red. O. Achmatowicz, B. Szechner i P. Kubisa, cena 12 zł

Nomenklatura węglowodanów. Zalecenia 1996, tłum. i red. T. Sokołowska i A. Wiśniewski, cena 18 zł

I.Z. Siemion, *Bronisław Radziszewski i lwowska szkoła chemii organicznej*, cena 18 zł

K. Maruszewski, *Fizykochemia molekuł zamkniętych w zeolitach i zol-żelach*, cena 18 zł

Praca zbiorowa, *Uporządkowane materiały mezoporowate*, red. B. Burczyk, cena 18 zł

Skorygowana nomenklatura rodników, jonów, jonorodników i podobnych indywidualności chemicznych. Zalecenia 1993, red. T. Sokołowska i A. Wiśniewski, cena 15 zł

I.Z. Siemion, *Lutum sapientiae, czyli Notatek chaotycznych część pierwsza*, cena 18 zł

M. Zabłocka-Malicka, *Ruchliwość jonów w podwójnych układach stopionych soli*, cena 8 zł.

Praca zbiorowa, *Nanomateriały*, red. D. Hreniak, W. Łojkowski, W. Stręk, M. Suszyńska, cena 25 zł.

Praca zbiorowa, *Ogniwa paliwowe – nowe kierunki rozwoju*, red. H. Drulis, J. Hanuza, D. Hreniak, M. Miller, G. Paściak, W. Stręk, cena 20 zł

Bibliografia „Wiadomości Chemicznych” za lata 1988–1997, cena 3 zł.

Książki wysyłamy na koszt zamawiającego. Zamówienia prosimy kierować pod adresem: Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław. Opłaty należy wносить na konto: BPH SA I O/Wrocław, Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, NRB 83 1060 0076 0000 3200 0040 0597.

REGULAMIN DLA AUTORÓW

„Wiadomości Chemiczne” publikują artykuły referatowe, nie oryginalne prace doświadczalne, dotyczące wszystkich dziedzin chemii i nie drukowane przedtem w innych czasopismach. Artykuły publikowane w „Wiadomościach Chemicznych” nie mogą być bez zgody Redakcji drukowane w innych czasopismach. Treść artykułów powinna odpowiadać stanowi wiedzy w chwili pisania artykułu. Piśmiennictwo cytowane powinno uwzględniać najnowsze prace krajowe i zagraniczne z dziedziny, której dotyczy artykuł.

Maszynopisy (wydruki komputerowe) należy nadsyłać Redakcji w **dwóch egzemplarzach**: oryginał i kopia lub kserokopia pisana jednostronnie, z zachowaniem podwójnej interlinii i marginesu szerokości 5 cm z **prawej** strony; pierwszy wiersz akapitu należy zaznaczyć wcięciem na 5 uderzeń w klawisz.

Na pierwszej stronie pod tytułem polskim należy umieścić tytuł w języku angielskim, adres autora oraz spis rozdziałów. Praca powinna zawierać obszernie streszczenie w języku angielskim (do 1,5 strony maszynopisu z cytowaniem piśmiennictwa i odsyłaczami do tabel i rysunków w tekście). Na osobnej kartce prosimy o krótką (do 150 wyrazów) notkę z informacją o uprawianej przez Autora tematyce naukowej i przebiegu pracy. Prosimy o podanie tytułu naukowego i miejsca pracy oraz o dołączenie aktualnego zdjęcia. Przesłanie tych informacji będziemy traktować jako zgodę na ich publikację.

Artykuły należy opracowywać zwięźle i nie zamieszczać szczegółów, odsyłając czytelnika do piśmiennictwa oryginalnego. Maszynopis nie powinien przekraczać 25 stron wraz z tabelami i wykazem piśmiennictwa lub 100 stron, jeśli jest monografią przeznaczoną do druku w „Bibliotece Wiadomości Chemicznych”. Artykuły powinny być napisane za pomocą komputera. Redakcja prosi o dołączenie dyskietki z tekstem pracy i ilustracjami wraz z wyczerpującą informacją o użytym edytorze. Pożyczony edytor Word (co najmniej wersja 6).

Rysunki (mogą być kolorowe, ale za dopłatą do druku) należy nadsyłać w dwóch egzemplarzach (oryginały i kopie lub kserokopie). Oryginały rysunków muszą mieć taką formę graficzną, by nadawały się do reprodukcji. Na odwrotnej stronie należy podać ołówkiem nazwisko autora i numer rysunku i ten sam numer zaznaczyć w odpowiednim miejscu maszynopisu. Na osobnym arkuszu dołączyć podpisy pod rysunki. **Do pracy należy dołączyć jeden komplet wzorów i schematów narysowanych oddzielnie w formie nadającej się do reprodukcji.**

Tabele należy ponumerować cyframi arabskimi oraz podać ich tytuły.

Piśmiennictwo zestawia się w kolejności cytowania w tekście: powinno ono zawierać kolejno inicjały imion i nazwisko, skrót tytułu czasopisma zgodny z przyjętymi normami, rok wydania, tom podkreślony i numer pierwszej strony cytowanej pracy. Wykaz skrótów ważniejszych czasopism chemicznych jest podany w „Wiadomościach Chemicznych”, 1989, **43**, 979. Jeśli część piśmiennictwa zebrana jest w monografiach lub innych wydawnictwach, nie należy podawać szczegółowo wykazu tego piśmiennictwa, lecz cytować odnośne wydawnictwo.

O przyjęciu pracy do druku decyduje Komitet Redakcyjny. **Maszynopisy nie odpowiadające podanym warunkom nie będą przez Komitet rozpatrywane.** Artykuły nie zakwalifikowane do druku Redakcja zwraca, zachowując kopię maszynopisu. Autorzy przeprowadzają jedną korektę tekstu.

Honoraria za wydrukowane prace są wypłacane wyłącznie tym Autorom, których artykuły zostały zamówione przez Redakcję. Autorzy wydrukowanych prac otrzymują bezpłatnie 20 nadtę.

DO CZYTELNIKÓW
„WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH”

Redakcja miesięcznika PTCh „Wiadomości Chemiczne” zawiadamia, że wysokość prenumeraty rocznej „Wiadomości Chemicznych” za 2006 r. wynosi 120 zł dla instytucji i nie zrzeszonych prenumeratorów indywidualnych oraz 60 zł dla bibliotek szkół średnich i podstawowych. Należność za prenumeratę prosimy przekazywać na konto:

Bank Przemysłowo-Handlowy S.A.
Oddział we Wrocławiu
pl. Powstańców Śl. 9, 53-316 Wrocław
Redakcja „Wiadomości Chemicznych”
NRB 83 1060 0076 0000 3200 0040 0597

Prenumerata „Wiadomości Chemicznych” dla członków PTCh, połączona z opłatą składek członkowskich, jest znacznie niższa i przedstawia się następująco:

- prenumerata „Wiadomości Chemicznych” na rok 2006 wraz ze składką członkowską, w ramach której dostarczany jest „Orbital”, wynosi 60 zł (składka – 50 zł, prenumerata – 10 zł);

- emeryci, doktoranci oraz studenci płacą 25 zł (składka – 15 zł, prenumerata – 10 zł); a nauczyciele szkół średnich i podstawowych płacą 30 zł (składka – 20 zł, prenumerata – 10 zł).

Członkowie PTCh, którzy zechcą zaprenumerować „Wiadomości Chemiczne” na podanych tu warunkach, proszeni są o wnoszenie opłat na konto:

PTCh Warszawa, ul. Freta 16
Millennium BIG BG SA, Nr 57 1160 2202 0000 0000 2720 2458

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”

SPIS TREŚCI

Andrzej MOLSKI: Spektroskopia pojedynczych fluoroforów	449
Sergiusz LULIŃSKI, Janusz SERWATOWSKI: Kompleksy metali z ligandami borylo- ksylowymi	467
Beata LIBEREK: Zastosowanie glikali w syntezie glikopiranoz i glikopiranozydów	487
Magdalena KUKOWSKA, Krystyna DZIERBICKA, Zbigniew MAĆKIEWICZ: Peptydowe koniugaty antrachinonów i ich aktywność biologiczna	523
Bernard JUSKOWIAK, Elżbieta GAŁĘZOWSKA, Jan PACZESNY: Procesy przenoszenia energii (FRET) w badaniach czteroniciowych form DNA	547

W NASTĘPNYM ZESZYCIE UKAZĄ SIĘ:

- Michał BYSTRZEJEWSKI: Funkcjonalizacja chemiczna nanorurek węglowych
Jerzy GAJDUS, Renata GŁOŚNICKA, Janusz SZAFRANEK: Pierwszorzędowa struktura
antygenów O bakterii rodzaju *Salmonella*
Barbara GUZOWSKA-ŚWIDER: Internet źródłem informacji z chromatografii
Emilia GRODZKA, Krzysztof WINKLER, Zdzisław KOCZOROWSKI: Rola elektrochemii
w ochronie środowiska