

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ**

**Εργαστήριο Βιοανόργανης Χημείας**



**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΔΥΑΔΩΝ  
ΠΟΡΦΥΡΙΝΗΣ ΜΕ ΝΙΤΡΙΛΟΤΡΙΟΞΙΚΟ ΟΞΥ (ΝΤΑ) ΓΙΑ  
ΠΙΘΑΝΕΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ**

**ΓΛΥΜΕΝΑΚΗ ΕΛΕΝΗ**

**Υπεύθυνος Καθηγητής: Αθανάσιος Γ. Κουτσολέλος**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2018**

**UNIVERSITY OF CRETE  
DEPARTMENT OF CHEMISTRY**

**GENERAL POSTGRADUATE PROGRAM**

**Laboratory of Bioinorganic Chemistry**



**Master Thesis**

**SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF  
PORPHYRIN DYADS WITH NITRILOTRIACETIC ACID  
(NTA) FOR POTENTIAL BIOLOGICAL APPLICATIONS**

**GLYMENAKI ELENI**

**Master Thesis Supervisor: Athanassios G.  
Coutsolelos**

**HERAKLION DECEMBER 2018**

Σα βγεις στον πηγαιμό για την Ιθάκη,  
να εύχεται νά'ναι μακρύς ο δρόμος,  
γεμάτος περιπέτειες, γεμάτος γνώσεις.  
(...)

Πάντα στον νου σου νάχεις την Ιθάκη.  
Το φθάσιμον εκεί είν' ο προορισμός σου.  
Αλλά μη βιάζεις το ταξίδι διόλου.  
Καλλίτερα χρόνια πολλά να διαρκέσει·  
και γέρος πια ν' αράξεις στο νησί,  
πλούσιος με όσα κέρδισες στον δρόμο,  
μη προσδοκώντας πλούτη να σε δώσει η Ιθάκη.

Η Ιθάκη σ' έδωσε τ' ωραίο ταξίδι.  
Χωρίς αυτήν δεν θάβγαινες στον δρόμο.  
Αλλά δεν έχει να σε δώσει πια.

Κι αν πτωχική την βρεις, η Ιθάκη δεν σε γέλασε.  
Έτσι σοφός που έγινες, με τόση πείρα,  
**ήδη θα το κατάλαβες η Ιθάκες τι σημαίνουν.**

Στην οικογένειά μου και σε  
όσους μου δίνουν κίνητρο για  
να συνεχίζω μπροστά,

## **Εξεταστική Επιτροπή**

**Κουτσολέλος Αθανάσιος**  
*Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, (Επιβλέπων)*

**Μητράκη Άννα**  
*Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης και τεχνολογίας υλικών, Πανεπιστήμιο Κρήτης*

**Βασιλικογιαννάκης Γεώργιος**  
*Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης*



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρώτα από όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κύριο Αθανάσιο Κουτσολέλο για τη δυνατότητα που μου προσέφερε να διεξάγω την μεταπτυχιακή μου διατριβή στο εργαστήριο βιοανόργανης χημείας προσπαθώντας να με μυήσει στο μαγικό κόσμο της χημείας αλλά και για την αμέριστη στήριξη, τις παρεναίσεις και τις συμβουλές καθ'όλη τη διάρκεια. Αισθάνομαι ευγνωμοσύνη για όλα όσα μου δίδαξε αλλά και χαρά που είχα τη δυνατότητα να εργαστώ σε αυτό το κομμάτι της χημείας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης όλα τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής (κο Βασιλικογιαννάκη Γεώργιο, κα Μητράκη Άννα) που δέχτηκαν να αξιολογήσουν τη μεταπτυχιακή μου διατριβή.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την οικογένειά μου, τις φίλες μου καθώς και όλη την "οικογένεια" του εργαστηρίου τόσο για τη βοήθεια και τη συμπαράστασή τους όσο και για το φιλικό κλίμα μέσα και έξω από το εργαστήριο.

## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Όνομα: Ελένη  
Επίθετο: Γλυμενάκη  
Διεύθυνση: Πανεπιστημιούπολη Βουτών, 70013 Ηράκλειο, Κρήτη  
e-mail: elenhglym@gmail.com  
κιν.: 0030 6949415512

### Σπουδές

**2016-σήμερα:** M.Sc. στην Ανόργανη Χημεία, τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.  
**2010-2015:** B.Sc στη Χημεία, τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης (Βαθμός πτυχίου 8.77/10 (άριστα)).  
**2007-2010:** 3ο Γενικό Λύκειο Χανίων, Χανιά, Κρήτη (Βαθμός απολυτηρίου 19.3/20 (άριστα)).

### Ερευνητική δραστηριότητα

#### **Μεταπτυχιακή Διατριβή**

**2016-σήμερα:** “Σύνθεση και χαρακτηρισμός δυάδων πορφυρίνης-NTA για πιθανές βιολογικές εφαρμογές”. Επιβλέπων καθηγητής: Α. Κουτσολέλος, Εργαστήριο Βιοανόργανης Χημείας, τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

#### **Διπλωματική Διατριβή**

**2014-2015:** “Σύνθεση και χαρακτηρισμός της πορφυρίνης HOOC-DMP(Zn)-NH-CO-Me-bipy-Ru(bipy)<sub>2</sub> για πιθανή εφαρμογή σε ηλιακά κελιά ευαισθητοποιημένης χρωστικής”. Επιβλέπων καθηγητής: Α. Κουτσολέλος, Εργαστήριο Βιοανόργανης Χημείας, τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

### Πρακτική κατάρτιση και μαθήματα κατάρτισης

**Μάρτιος 2018:** 5<sup>ο</sup> Σεμινάριο με θέμα την ασφάλεια στο εργαστήριο, την ασφαλή χρήση χημικών και θέματα ασφάλειας σε πειράματα με ζωντανούς οργανισμούς, Ίδρυμα Τεχνολογίας & Έρευνας (ΙΤΕ), Ηράκλειο, Κρήτη.

**Μάρτιος 2018:** Scientific writing workshop, τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης. The seminar session included courses about writing the methods section of an article in a Chemistry journal.

**Οκτ. 2017-... :** Πρόγραμμα οινολογικής κατάρτισης, τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης. Το σεμινάριο περιελάμβανε πρακτική κατάρτιση και μαθήματα σχετικά με οινολογία.

**Ιούλιος 2014:** Θερινό σχολείο με θέμα: ‘Bioinspired Materials for Solar Energy Utilization’, 7-17 Ιουλίου 2014, Ηράκλειο, Κρήτη.

**Φεβ.-Μαΐ. 2014:** Σεμινάρια διδακτικής της χημείας σε σχολεία, που διοργανώθηκαν από την Ένωση Ελλήνων Χημικών, Ηράκλειο, Κρήτη.

## Απασχόληση

**Σεπ 2016-Μάη 2017** Βοηθός στα προπτυχιακά εργαστήρια Ανόργανης Χημείας, τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

**Φεβ.- Μάϊ. 2012** Βοηθός στα προπτυχιακά εργαστήρια Οργανικής Χημείας Ι, τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

## Δημοσιεύσεις

1. Glymenaki, E., Charalambidis, G., Nikolaou, V., Farre, Y., Odobel, F., Coutsolelos, A.G., (2018) "Synthesis and properties of porphyrin-ruthenium bipy dyads as sensitizers for NiO based dye sensitized solar cells", in preparation.
2. Glymenaki, E., Charalambidis G., Mitraki A., Coutsolelos, A.G., (2018) "Design and synthesis of new dyads porphyrin and nitrioltriacetic moieties for a metallochelate coupling with peptide derivatives, in preparation.

## Συνέδρια

**1-6 Ιουλ. 2018** 10<sup>th</sup> International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-10), Μόναχο, Γερμανία.

\*Poster presentation: 'Synthesis and photophysical studies of porphyrin-ruthenium(II)polypyridine complexes for potential application at dye sensitized solar cells.' Eleni Glymenaki, Yann Pellegrin, Sofia Mariola, Georgios Charalambidis, Asterios Charisiadis, Vassilis Nikolaou, Fabrice Odobel, Athanassios G. Coutsolelos.

**25-27 Ιουν. 2018** 20<sup>o</sup> Συνέδριο Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

\*Poster presentation: 'Synthesis and photophysical studies of porphyrin-ruthenium(II)polypyridine complexes for potential application at dye sensitized solar cells.' Eleni Glymenaki, Yann Pellegrin, Sofia Mariola, Georgios Charalambidis, Asterios Charisiadis, Vassilis Nikolaou, Fabrice Odobel, Athanassios G. Coutsolelos.

**13 Δεκ. 2017** Εκπαιδευτική ημερίδα με θέμα: 'Φαρμακευτικά φυτά: Από τη φύση στη λαϊκή παράδοση', Ηράκλειο, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Μουσείο Ιατρικής.

**18 Νοεμ. 2017** 6<sup>o</sup> Σεμινάριο Διδακτικής στις Φυσικές επιστήμες που διοργανώθηκε από τον ΟΕΦΕ, Ξενοδοχείο Aquila Atlantis Ηράκλειο, Κρήτη.

**8 Νοεμ. 2017** Εκπαιδευτική ημερίδα με θέμα: 'Νεότερες Εξελίξεις στη Νευρολογία', Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ιατρική σχολή.

**2-4 Μάϊος 2017** 19<sup>th</sup> Chemistry Postgraduates' Conference, τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

**2-4 Δεκ. 2016** 22<sup>o</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Χημείας, Κέντρο Διάδοσης Ερευνητικών Αποτελεσμάτων (ΚΕ.Δ.Ε.Α), Θεσσαλονίκη.

**25-28 Οκτ. 2016** 2<sup>nd</sup> Israel-Greece Joint Meeting on Nanotechnology & BioNanoscience, Ξενοδοχείο Aquila Atlantis Ηράκλειο, Κρήτη.

- 19-20 Οκτ.2016** Organic & Perovskite Solar Cells Conference, Ξενοδοχείο Aquila Atlantis Ηράκλειο, Κρήτη.  
\*Poster presentation: ‘Synthesis and photophysical studies of a porphyrin-ruthenium(II) tris(bipyridine) complex for potential application at dye sensitized solar cells.’ E. Glymenaki, G. Charalambidis, A.G. Coutsolelos.
- 23-26 Σεπτ. 2016** International Symposium: “Chemistry at the Interface of Biology and Medicine”, τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
- 4-6 Σεπτ. 2016** COST Action CM1202-PERSPECT-H2O-Supramolecular photocatalytic water splitting which was held in Sicily.  
\*Poster presentation: ‘Synthesis and photophysical studies of a porphyrin-ruthenium(II) tris(bipyridine) complex for potential application at dye sensitized solar cells.’ E. Glymenaki, G. Charalambidis, A.G. Coutsolelos.
- 26-28 Μάρτ. 2016** 18<sup>ο</sup> Συνέδριο Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας, τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης. \*Poster presentation: ‘Synthesis and photophysical studies of a porphyrin-ruthenium(II) tris(bipyridine) complex for potential application at dye sensitized solar cells.’ E. Glymenaki, G. Charalambidis, A.G. Coutsolelos.
- 8-10 Μάϊος 2015** 12<sup>ο</sup> Συνέδριο Χημείας Ελλάδας & Κύπρου, Κέντρο Διάδοσης Ερευνητικών Αποτελεσμάτων (ΚΕ.Δ.Ε.Α), Θεσσαλονίκη.
- 8 Οκτ. 2013** Seminar in the fundamentals, applications and instrumentation of Ion Chromatography, High Pressure Ion Chromatography and Capillary Ion Chromatography which was held at the Chemistry Department of the University of Crete.
- 23-25 Ιούλιος 2013** DARECLIMED Conference: “Sharing data information in the Eastern Mediterranean and the Middle East” which was held at the Orthodox Academy of Crete in Chania.
- 9-11 Νοεμ. 2013** 63<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Ίδρυμα Τεχνολογίας & Έρευνας (ΙΤΕ), Ηράκλειο, Κρήτη.

### **Δεξιότητες & Ικανότητες**

Αναλυτικές και Φασματοσκοπικές Τεχνικές

- Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)
- Φασματομετρία μάζας (MALDI-TOF)
- Thin layer chromatography (TLC)
- Column chromatography
- Φασματοσκοπία UV/Vis
- Φασματοσκοπία φθορισμού

### **Ξένες γλώσσες**

- Ελληνικά: μητρική γλώσσα

- Αγγλικά: άριστη γραφή και ομιλία (Επίπεδο C2)
- Γερμανικά: καλή γραφή και ομιλία (Επίπεδο B1)

#### **Ικανότητα χρήσης Η/Υ**

- Microsoft Office
- OriginPro
- Chemdraw
- TopSpin

#### **Εθελοντική δράση**

**2018** Εθελοντική συμμετοχή στην οργάνωση του First Lego League (FLL) of Crete για παιδιά στο ενυδρείο της Κρήτης.

#### **Καθήκοντα/Άλλες ικανότητες**

**2018** Μέλος της οργανωτικής επιτροπής του 20ου Συνεδρίου Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας, τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

**2014-2015** Αντιπρόεδρος των προπτυχιακών φοιτητών Χημείας, τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

#### **Επιπλέον πληροφορίες**

Μέλος της Ένωσης Ελλήνων Χημικών από το 2016.

## CURICULUM VITAE

Name: Eleni  
Surname: Glymenaki  
Address: Voutes University Campus, 70013 Heraklion Crete  
e-mail: elenhglym@gmail.com  
tel.: 0030 6949415512

### Education

- 2016-present:** Master student in the Graduate Program of "Bioinorganic Chemistry" at the Department of Chemistry, University of Crete, Greece.
- 2010-2015:** Undergraduate student at the Department of Chemistry, University of Crete, Greece. Graduated first in class and with Honors (Grade 8.77/10).
- 2007-2010:** 3rd General High School, Chania, Crete. Graduated first in class and with Honors (Grade 19.3/20).

### Research experience

#### **Master Thesis**

- 2016-present:** "Synthesis and characterization of porphyrin-NTA dyads for biological applications". Supervisor: Professor A. Coutsolelos, Laboratory of Bioinorganic Chemistry, Department of Chemistry, University of Crete.

#### **Bachelor Thesis**

- 2014-2015:** "Synthesis and characterization of porphyrin HOOC-DMP(Zn)-NH-CO-Me-bipy-Ru(bipy)<sub>2</sub> for potential application at dye sensitized solar cells". Supervisor: Professor A. Coutsolelos, Laboratory of Bioinorganic Chemistry, Department of Chemistry, University of Crete.

### Practical training and training courses

- March 2018:** 5<sup>th</sup> Seminar on lab security, utilization of chemicals and laboratory animals' safety, performed at the Foundation of Research and Technology (FORTH), Heraklion, Crete.
- March 2018:** Scientific writing workshop performed at the Department of Chemistry, University of Crete. The seminar session included courses about writing the methods section of an article in a Chemistry journal.
- Oct. 2017-....:** Oenological training session seminar, performed in the analytical domain of the Department of Chemistry, University of Crete. The seminar session included practical classes and courses related to oenology.
- July 2014:** Participation in the summer school 'Bioinspired Materials for Solar Energy Utilization', 7-17 July 2014, Heraklion, Crete.

**Feb.- May 2014:** Participation in the educational seminars for approaching and teaching chemistry to students in High Schools, organized by the Association of Greek Chemists.

### Working experience

**Sep. 2016-May 2017** Lab assistant in the Inorganic Chemistry undergraduate lab at the University of Crete.

**Feb.- May 2012** Lab assistant in the Organic Chemistry undergraduate lab at the University of Crete.

### Publications

1. Glymenaki, E., Charalambidis, G., Nikolaou, V., Farre, Y., Odobel, F., Coutsolelos, A.G., (2018) "Synthesis and properties of porphyrin-ruthenium bipy dyads as sensitizers for NiO based dye sensitized solar cells", in preparation.
2. Glymenaki, E., Charalambidis G., Mitraki A., Coutsolelos, A.G., (2018) "Design and synthesis of new dyads porphyrin and nitrilotriacetic moieties for a metallochelate coupling with peptide derivatives in preparation.

### Conferences-seminars

**1-6 July 2018** 10<sup>th</sup> International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-10) which was held at Munich, Germany.

\*Poster presentation: 'Synthesis and photophysical studies of porphyrin-ruthenium(II)polypyridine complexes for potential application at dye sensitized solar cells.' Eleni Glymenaki, Yann Pellegrin, Sofia Mariola, Georgios Charalambidis, Asterios Charisiadis, Vassilis Nikolaou, Fabrice Odobel, Athanassios G. Coutsolelos.

**25-27 June 2018** 20<sup>th</sup> Chemistry Postgraduates' Conference which was held at the Chemistry Department of the University of Crete.

\*Poster presentation: 'Synthesis and photophysical studies of porphyrin-ruthenium(II)polypyridine complexes for potential application at dye sensitized solar cells.' Eleni Glymenaki, Yann Pellegrin, Sofia Mariola, Georgios Charalambidis, Asterios Charisiadis, Vassilis Nikolaou, Fabrice Odobel, Athanassios G. Coutsolelos.

**13th Dec. 2017** Educational Workshop: 'Medicinal Plants: From Nature to Tradition' which was held at the Museum of Medicine of the University of Crete.

**18th Nov. 2017** 6<sup>th</sup> Seminar for teaching physical sciences organized by OEFE which was held at the Aquila Atlantis Hotel in Heraklion.

**8th Nov. 2017** Educational Workshop: 'Recent Developments in Neurology' which was held at the School of Medicine of the University of Crete.

**2-4 May 2017** 19<sup>th</sup> Chemistry Postgraduates' Conference which was held at the Chemistry Department of the University of Crete.

**2-4 Dec. 2016** 22<sup>nd</sup> Panhellenic Chemistry Conference which was held at the Aristotle University's Research Dissemination Center (KEDEA) in Thessaloniki.

- 25-28 Oct. 2016** 2<sup>nd</sup> Israel-Greece Joint Meeting on Nanotechnology & BioNanoscience which was held at the Aquila Atlantis Hotel in Heraklion.
- 19-20 Oct. 2016** Organic & Perovskite Solar Cells Conference which was held at the Agapi Hotel in Heraklion.  
\*Poster presentation: ‘Synthesis and photophysical studies of a porphyrin-ruthenium(II) tris(bipyridine) complex for potential application at dye sensitized solar cells.’ E. Glymenaki, G. Charalambidis, A.G. Coutsolelos.
- 23-26 Sep. 2016** International Symposium: “Chemistry at the Interface of Biology and Medicine” which was held at the Chemistry Department of the University of Crete.
- 4-6 Sep. 2016** COST Action CM1202-PERSPECT-H2O-Supramolecular photocatalytic water splitting which was held in Sicily.  
\*Poster presentation: ‘Synthesis and photophysical studies of a porphyrin-ruthenium(II) tris(bipyridine) complex for potential application at dye sensitized solar cells.’ E. Glymenaki, G. Charalambidis, A.G. Coutsolelos.
- 26-28 Mar 2016** 18<sup>th</sup> Chemistry Postgraduates’ Conference which was held at the Chemistry Department of the University of Crete.  
\*Poster presentation: ‘Synthesis and photophysical studies of a porphyrin-ruthenium(II) tris(bipyridine) complex for potential application at dye sensitized solar cells.’ E. Glymenaki, G. Charalambidis, A.G. Coutsolelos.
- 8-10 May 2015** 12<sup>th</sup> Chemistry Conference of Greece & Cyprus which was held at the Aristotle University’s Research Dissemination Center (KEDEA) in Thessaloniki.
- 8th Oct. 2013** Seminar in the fundamentals, applications and instrumentation of Ion Chromatography, High Pressure Ion Chromatography and Capillary Ion Chromatography which was held at the Chemistry Department of the University of Crete.
- 23-25 July 2013** DARECLIMED Conference : “Sharing data information in the Eastern Mediterranean and the Middle East” which was held at the Orthodox Academy of Crete in Chania.
- 9-11 Nov. 2013** 63<sup>th</sup> Panhellenic Congress of the Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology which was held at the Foundation for Research and Technology (FORTH) in Heraklion.

### **Skills and competence**

#### Analytical and Spectroscopy Techniques

- Nuclear magnetic resonance (NMR)
- Mass spectrometry [Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)]
- Thin layer chromatography (TLC)
- Column chromatography
- UV/VIS Spectrophotometer



- Fluorescence Spectrophotometer

#### **Foreign languages**

- Greek: native speaker
- English: excellent spoken and written level (Level C2)
- German: good spoken and written level (Level B1)

#### **Computer skills**

- Microsoft Office
- OriginPro
- Chemdraw
- TopSpin

#### **Public engagement**

**2018** Participated voluntarily in the organisation of the First Lego League (FLL) of Crete for children at the CRETAquarium.

#### **Other positions of responsibility**

**2018** Assisted with the organisation of the 20th Chemistry Postgraduates' Conference at the University of Crete.

**2014-2015** Vice president of the association of undergraduate students of chemistry at the University of Crete.

#### **Additional information**

Member of the Association of Greek Chemists since 2016.

## Περίληψη

Η ανάγκη για τον εντοπισμό, την παρακολούθηση αλλά και την κατανόηση της δομής, των αλληλεπιδράσεων και των διεργασιών που λαμβάνουν χώρα σε βιομόρια όπως πρωτεΐνες, πεπτιδία, αμινοξέα, αντισώματα, mRNA, κλπ οδήγησε στην ανάπτυξη πληθώρας μεθόδων ανίχνευσής τους.

Μεταξύ των διαφόρων μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την παρακολούθηση τέτοιων ενώσεων περιλαμβάνεται η φθορίζουσα σήμανση, δηλαδή η σήμανση με φθορίζοντες ανιχνευτές (fluorescent probes ή tags ή labels) η οποία λόγω της ευαισθησίας της και της μη επεμβατικής της δράσης, κατέχει εξέχουσα θέση.

Για την ανίχνευση βιομορίων όπως οι πρωτεΐνες και τα πεπτιδία, μπορούν να χρησιμοποιηθούν φθορίζουσες πρωτεΐνες ή φθορίζοντα χρωμοφόρα τα οποία δεσμεύονται χημικά ή μη σε μια περιοχή/λειτουργική ομάδα του βιομορίου-στόχου. Οι τρόποι σύνδεσης μεταξύ χρωμοφόρου και βιομορίου ποικίλουν, και γι' αυτό προκύπτουν ποικίλες στρατηγικές σήμανσης.

Από τις πλέον χρησιμοποιούμενες μεθόδους σήμανσης είναι αυτή που χρησιμοποιούνται φθορίζοντα χρωμοφόρα (φθοροφόρα, fluorophores) ενωμένα μέσω μεταλλοχηλικής σύζευξης (π.χ  $Ni^{2+}$ -νιτριλοτριοξικό οξύ, nitrilotriacetic acid, NTA) με το αμινοξύ (π.χ ιστιδίνη, His) της προς ανάλυσης αλληλουχίας του πεπτιδίου/πρωτεΐνης.

Η πλειονότητα των χρωμοφόρων που χρησιμοποιούνται κατά αυτό τον τρόπο είναι κυρίως μικρά οργανικά μόρια. Ελάχιστες όμως είναι οι αναφορές για τη χρήση πορφυρινικών παραγώγων ως φθοροφόρα σε μεθόδους σήμανσης μέσω μεταλλοχηλικής σύζευξης. Προκειμένου να διευρυνθεί η έρευνα πάνω στη χρήση φθοροφόρων για σήμανση (labeling) μέσω μεταλλοχηλικής σύζευξης ( $Ni^{2+}$ -NTA) προτείνουμε τη σύνθεση δυο νέων πορφυρινικών μορίων τα οποία φέρουν ένα χηλικό υποκαταστάτη (ligand) νιτριλοτριοξικού οξέος (NTA) για σύζευξη μέσω του  $Ni^{2+}$  με πεπτιδίο που στο C-τερματικό άκρο φέρει ιστιδίνη (His).

Η πρώτη δυάδα αποτελείται από μια τετραφαίνυλο πορφυρίνη η οποία σε *meso* θέση είναι ενωμένη με αμιδικό δεσμό με NTA. Η δεύτερη δυάδα περιλαμβάνει μια τετραφαίνυλο πορφυρίνη η οποία σε μέσο θέση φέρει  $-NH_2$  ομάδα και συνδέεται με το NTA μέσω μιας γέφυρας cyanuric chloride. Η ταυτοποίηση των μη υδρολυμένων μορφών των ενώσεων που συνθέσαμε πραγματοποιήθηκε με φασματομετρία μάζας (MALDI-TOF), με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) καθώς και με φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-Vis).

Τα αποτελέσματα από την αντίδραση σύζευξης με το πεπτιδίο, τα οποία αναμένονται, ελπίζουμε να ανοίξουν το δρόμο για τη χρήση νέων πορφυρινικών δυάδων ως ανιχνευτές (probes) για σήμανση πεπτιδίων και κατ' επέκταση πρωτεϊνών τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*.

Λέξεις κλειδιά: σήμανση (labeling), μεταλλοχηλική σύζευξη ( $Ni^{2+}$ -NTA), φθοροφόρο, πορφυρίνη.

## Abstract

The need to trace, monitor and understand the structure, interactions and processes occurring in biomolecules such as proteins, peptides, amino acids, antibodies, mRNA, etc has led to the development of a variety of methods for detecting them.

Among the methods used to monitor such compounds, fluorescent probes (or tags) are very promising ones, due to their sensitivity and non-invasive character.

The detection of biomolecules such as proteins and peptides can be performed mostly with fluorescent proteins and fluorescent chromophores. Fluorescent chromophores (fluorophores) can be chemically or non-chemically binding to the target region of the biomolecule. Various labeling strategies are emerging depending on the coupling between the chromophore and the biomolecule.

One of the most commonly used labeling methods is the metallochelate binding between chromophores and the amino acids in the sequence of a peptide/protein. The most commonly used metallochelate motif for this purpose is chromophore-nitrilotriacetic acid (NTA)-Ni<sup>2+</sup>-His tag.

The majority of chromophores that are used with the metallochelate motif consist of small and organic molecules. Few references from literature refer to the use of chromophores such as porphyrin derivatives for metallochelate labeling of peptides/proteins. In order to broaden the research on the use of porphyrins with a metallochelate coupling moiety (Ni<sup>2+</sup>-NTA) for peptide/protein labeling, we decided to synthesize two new porphyrin dyads bearing a nitrilo triacetic acid chelating ligand (NTA) for possible coupling via Ni<sup>2+</sup> with a peptide containing histidine (His) at the C-terminal end.

The first dyad consists of a tetraphenyl porphyrin which is linked via an amide bond with NTA at the *meso* position of the porphyrin. The second dyad consists of a tetraphenyl porphyrin with an -NH<sub>2</sub> group at the *meso* position. The coupling with the NTA moiety is accomplished via a cyanuric chloride bridge. The characterization of the non-hydrolyzed forms of the new dyads was performed by mass spectrometry (MALDI-TOF), nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and ultraviolet-visible (UV-Vis) absorption spectroscopy.

The results from the coupling reaction with the peptide which are expected to be accomplished, may broaden the use of porphyrin dyads as potential probes for peptide and protein labeling both *in vitro* and *in vivo*.

Key words: labeling, metallochelate coupling (Ni<sup>2+</sup>-NTA), fluorophore, porphyrin.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελίδα

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγή-Θεωρία

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 1.1    | Πορφυρίνες.....   | 1  |
| 1.1.1. | Γενικά χαρακτηριστικά πορφυρινών .....  | 1  |
| 1.1.2. | Πορφυρινικά συστήματα στη φύση και τον ανθρώπινο οργανισμό.....                                       | 4  |
| 1.1.3. | Βιοσύνθεση της αίμης.....   | 7  |
| 1.1.4. | Σύνθεση τεχνητών πορφυρινών.....  | 8  |
| 1.1.5. | Εφαρμογές πορφυρινών.....   | 12 |
| 1.2    | Φθορίζουσα σήμανση.....   | 14 |
| 1.2.1. | Φθορίζουσα σήμανση .....  | 14 |
| 1.2.2. | Φθορίζουσες πρωτεΐνες.....  | 15 |
| 1.2.3. | Οργανικά φθοροφόρα.....   | 16 |
| 1.2.4. | Μέθοδοι φθορίζουσας σήμανσης.....   | 17 |
| 1.2.5. | Μεταλλοχηλική σύζευξη φθοροφόρων με αμινοξέα πεπτιδίου (peptide tags) για site-specific labeling..... | 18 |
| 1.2.6. | Χρήση πορφυρινικών παραγώγων για labeling πρωτεϊνών/πεπτιδίων μέσω μεταλλοχηλικής σύζευξης .....      | 24 |
|        | Σκοπός εργασίας.....  | 27 |

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Συνθετικές προσεγγίσεις

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 2.1 | Σύνθεση της δυάδας TPP-lysine tricarboxy.....                | 29 |
| 2.2 | Σύνθεση της δυάδας TPP-CC-lysine tricarboxy-piperidine ..... | 33 |
| 2.3 | Σύνθεση NH <sub>2</sub> -lysine trimethyl ester .....        | 34 |

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Ανάλυση αποτελεσμάτων

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 3.1 | Φασματομετρία μάζας Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight (MALDI-TOF) ..... | 37 |
| 3.2 | Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR).....            | 39 |

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 3.3 | Φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-Vis).....                           | 45 |
| 3.4 | Φασματοσκοπία φθορισμού (Fluorescence).....   | 49 |
| 3.5 | Θεωρία συναρτησιακού ηλεκτρονιακής πυκνότητας (Density Functional Theory, DFT)..... | 52 |

|                                      |           |
|--------------------------------------|-----------|
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Συμπεράσματα.....</b> | <b>54</b> |
|--------------------------------------|-----------|

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. Πειραματικό μέρος**

|      |  |    |
|------|--|----|
| 5.1  | Σύνθεση της Cbz-lysine methyl ester (1).....                                 | 56 |
| 5.2  | Σύνθεση της Cbz-lysine trimethyl ester (2).....                              | 56 |
| 5.3  | Σύνθεση της NH <sub>2</sub> -lysine trimethyl ester (3). .....               | 57 |
| 5.4  | Σύνθεση της NH <sub>2</sub> -lysine trimethyl ester (3). .....               | 58 |
| 5.5  | Σύνθεση της πορφυρίνης TPP-COOMe (4).....                                    | 58 |
| 5.6  | Σύνθεση της πορφυρίνης TPP-COOH (5).....                                     | 59 |
| 5.7  | Σύνθεση της πορφυρίνης TPP-NH <sub>2</sub> (6).....                          | 60 |
| 5.8  | Σύνθεση της πορφυρίνης TPP-CC (7).....                                       | 61 |
| 5.9  | Σύνθεση της δυάδας TPP-CC-lysine trimethyl ester-piperidine (8)....<br>..... | 61 |
| 5.10 | Σύνθεση της δυάδας TPP-CC-lysine tricarboxy-piperidine (9).....              | 62 |
| 5.11 | Σύνθεση της δυάδας TPP-lysine trimethyl ester (12).....                      | 63 |
| 5.12 | Σύνθεση της δυάδας TPP-lysine tricarboxy (13).....                           | 64 |

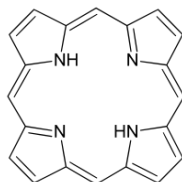
|                                   |           |
|-----------------------------------|-----------|
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. Παράρτημα.....</b> | <b>65</b> |
|-----------------------------------|-----------|

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

|                     |   |
|---------------------|---|
| Cbz-lysine          | N $\alpha$ -(Carbobenzyloxy)-L-lysine                       |
| CC                  | Cyanuric chloride   |
| DCC                 | N,N'-dicyclohexylcarbodiimide                               |
| DCM                 | Dichloromethane   |
| DIPEA               | Diisopropyl ethyl amine                                     |
| DMF                 | Dimethyl formamide  |
| DMSO                | Dimethyl sulfoxide  |
| Et <sub>3</sub> N   | Triethylamine   |
| EtOH                | Ethanol   |
| HOBt                | 1-hydroxybenzotriazole hydrate                              |
| hrs                 | hours   |
| MALDI-TOF           | Matrix Assisted Laser Desorption Ionization –Time of Flight |
| MeOH                | Methanol  |
| MeCN                | Acetonitrile  |
| mins                | minutes   |
| MS                  | Mass spectrometry   |
| NHS or HOSu         | N-hydroxy succinimide                                       |
| NMR                 | Nuclear Magnetic Resonance                                  |
| NTA                 | Nitrilotriacetic acid                                       |
| rt                  | room temperature  |
| SOCl <sub>2</sub>   | thionyl chloride  |
| THF                 | Tetrahydrofuran   |
| TLC                 | Thin liquid chromatography                                  |
| TPP                 | 5-10,15,20-tetra(phenyl) porphyrin                          |
| TPP-CC              | 5-(4-cyanuric chloride)-10,15,20-tris(phenyl) porphyrin     |
| TPP-COOMe           | 5-(4-Methoxycarbonylphenyl)-10,15,20-tris(phenyl) porphyrin |
| TPP-COOH            | 5-(4-carboxylphenyl)-10,15,20-tris(phenyl) porphyrin        |
| TPP-NHS             | 5-(4-N-hydroxy succinimide)-10,15,20-tris(phenyl) porphyrin |
| TPP-NH <sub>2</sub> | 5-(4-amino)-10,15,20-tris(phenyl) porphyrin                 |

### 1.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά πορφυρινών

Η λέξη πορφυρίνη προέρχεται από την ελληνική λέξη πορφύρα, δηλαδή βαθύ κόκκινο/μωβ χρώμα, και όλες οι πορφυρίνες έχουν έντονο χρώμα. Οι πορφυρίνες περιλαμβάνουν μια σημαντική κατηγορία μορίων που απαντώνται στη φύση με ποικίλους τρόπους (Σχήμα 1.1), γι'αυτό αποκαλούνται και "χρωμοφόρα της ζωής".



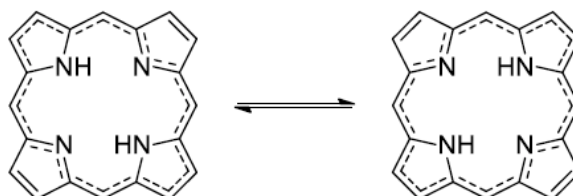
**Σχήμα 1.1** Δομή του απλούστερου μορίου πορφυρίνης (πορφίνης).

Ο δακτύλιος της πορφυρίνης απαντάται σε ποικιλία σημαντικών βιολογικών συστημάτων, όπου είναι το δραστικό συστατικό τους ή συνδέεται σε αυτά με συγκεκριμένους τρόπους και είναι άρρηκτα συνδεδεμένος με τη δραστηριότητα του συστήματος. Πολλές από αυτές τις πορφυρίνες που έχουν συντεθεί διαθέτουν την βασική δομή των φυσικών πορφυρινών, οι οποίες είναι το δραστικό συστατικό πολλών πρωτεϊνών. Οι λειτουργίες τους ποικίλουν ξεκινώντας από τη μεταφορά και αποθήκευση οξυγόνου (αιμοσφαιρίνη και μυοσφαιρίνη), μεταφορά ηλεκτρονίων (κυτόχρωμα c, κυτόχρωμα P-450, οξειδάση κυτοχρώματος) έως και μεταφορά ενέργειας (χλωροφύλλη) (Σχήματα 1.5 και 1.8). Η ποικιλομορφία των λειτουργιών τους οφείλεται μεταξύ των άλλων στην ποικιλία των μετάλλων που δεσμεύονται στο "κέντρο" του δακτυλίου της πορφυρίνης.<sup>1,2</sup>

### Ο πορφυρινικός δακτύλιος

Τα πορφυρινικά παράγωγα έχουν ως βάση τον κυκλικό τετραπυρρολικό δακτύλιο, ο οποίος αποτελεί την "καρδιά" των πορφυρινών. Στην απλούστερη μορφή του, ο πορφυρινικός δακτύλιος είναι ένα άκαμπτο, επίπεδο τετραγωνικό ( $C:sp^2, N:sp^2$ ), μακροκυκλικό τετραπυρρολικό σύστημα με εκτεταμένους συζυγείς διπλούς δεσμούς (τέσσερα πυρρόλια διασυνδεδεμένα με μεθυνικές γέφυρες) και διάφορους περιφερειακούς υποκαταστάτες. Το απλούστερο αντιπροσωπευτικό μόριο πορφυρίνης είναι ο δακτύλιος της πορφίνης (Σχήμα 1.1).

Ο πορφυρινικός δακτύλιος υπακούει στον κανόνα του Hückel για την αρωματικότητα, διαθέτοντας  $(4n+2)$  π ηλεκτρόνια ( $n=4$  για τη μικρότερη κυκλική διαδρομή) απεντοπισμένα πάνω και κάτω από το δακτύλιο. Η πορφίνη διαθέτει 26 π ηλεκτρόνια, από τα οποία 18 συμμετέχουν στη συζυγία (Σχήμα 1.2).<sup>2</sup>

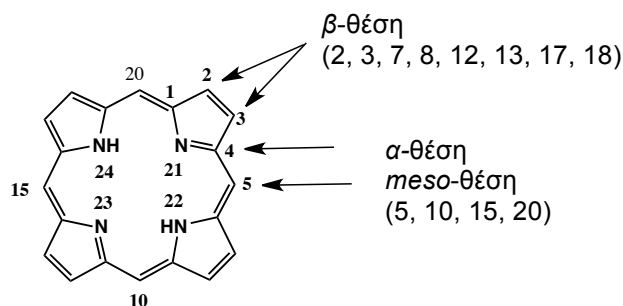


**Σχήμα 1.2** Ταυτομερίωση πορφίνης.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Battersby, A.R. *Nat. Prod. Rep.* **2000**, *17*, 507-526.

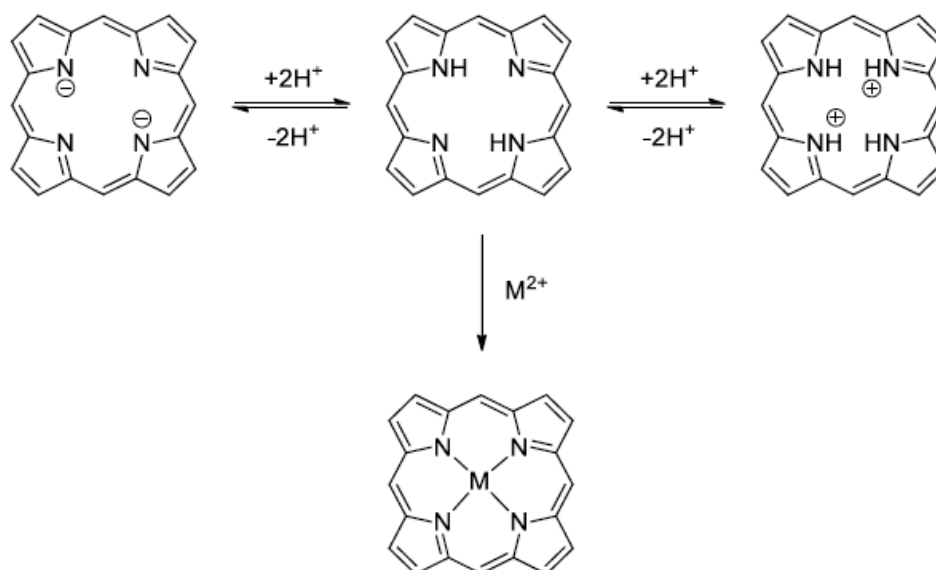
<sup>2</sup> (a) Smith, K.M. *Porphyrins and Metalloporphyrins*, Ed. Elsevier, Amsterdam, **1975**. (b) Becker, D. C.; Bradely, B. R.; Waston, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 3743.

Ο δακτύλιος μπορεί να υποστεί τροποποιήσεις (π.χ ηλεκτρονιόφιλη υποκατάσταση) με κατάλληλες λειτουργικές ομάδες στις  $\beta$  και *meso* θέσεις (Σχήμα 1.3) για την απόκτηση επιθυμητών ιδιοτήτων.<sup>3</sup>



**Σχήμα 1.3**  $\alpha$ ,  $\beta$  και *meso* θέσεις στο δακτύλιο της πορφίνης.<sup>3</sup>

Ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν στο διάλυμα μπορεί να απαντάται σε διάφορες μορφές. Σε όξινες συνθήκες μπορεί να αποκτήσει 2 εσωτερικά πυρρολικά πρωτόνια, NH (δικατιόν), ενώ παρουσία ισχυρών βάσεων να αποπρωτονιωθεί (διανιόν, Σχήμα 1.4).<sup>3</sup>



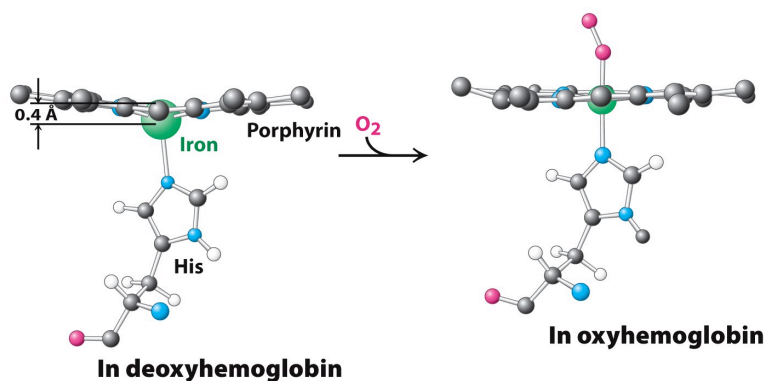
**Σχήμα 1.4** Πρωτονίωση, αποπρωτονίωση και μετάλλωση του δακτυλίου της πορφίνης.

Το διανιόν μπορεί να δράσει ως χηλικός υποκαταστάτης (ligand) για συναρμογή με πληθώρα μετάλλων (το σύνολο σχεδόν του περιοδικού πίνακα). Χαρακτηριστικό του πορφυρινικού δακτυλίου είναι ότι έχει ιδανικό μέγεθος (οπή, διάμετρος 4.2 Å) για να δεσμεύσει ένα δισθενές μέταλλο της πρώτης σειράς μετάπτωσης. Το μεταλλικό σύμπλοκο που προκύπτει δύναται να συναρμόσει και επιπλέον υποκαταστάτες πάνω και κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου, αποκτώντας οκταεδρική γεωμετρία (Σχήμα 1.5).<sup>3,4</sup>

<sup>3</sup> Ishihara et al. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 9713-9746.

<sup>4</sup> Senge, M.O.; Davis, M. J. *Porphy. Phthalocyanines*. **2010**, *14*, 557-56.

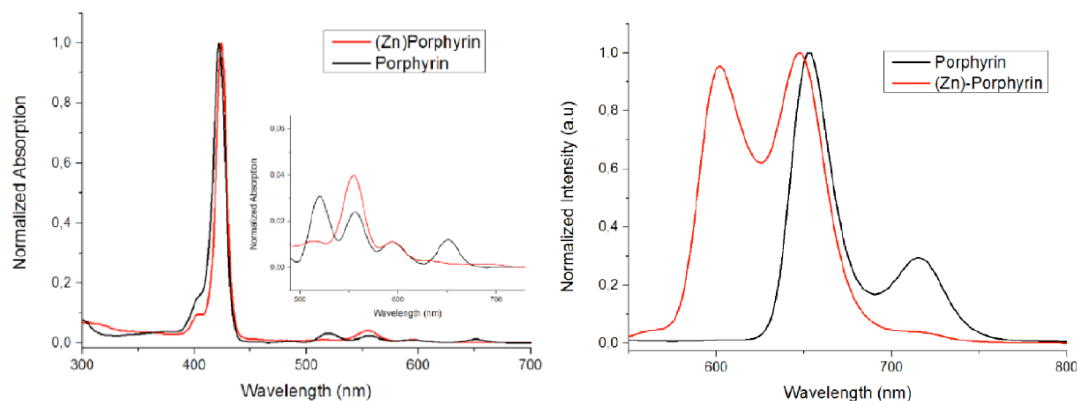




**Σχήμα 1.5** Δεοξυαιμοσφαιρίνη (αριστερά) και Οξυαιμοσφαιρίνη (δεξιά).

Οι πορφυρινικοί δακτύλιοι είναι αρωματικές ενώσεις με εκτεταμένη συζυγία. Ο αρωματικός χαρακτήρας, ο οποίος σταθεροποιεί το μόριο, εκτείνεται σε όλη τη δομή του και είναι υπεύθυνος για τη μαγνητική ανισοτροπία (ρεύμα του δακτυλίου) στα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Χαρακτηριστικές είναι οι απορροφήσεις των εσωτερικών NH πρωτονίων σε περιοχή υψηλού πεδίου (περίπου -2 ppm) έναντι των απορροφήσεων των περιφερειακών πρωτονίων ( $\beta$  και *meso* θέσεων) του δακτυλίου στην περιοχή αποπροστασίας (περίπου 6-9 ppm).<sup>2</sup>

Η εκτεταμένη συζυγία είναι υπεύθυνη για τις έντονες ταινίες απορρόφησης στην περιοχή υπεριώδους-ορατού (UV-Vis), λόγω  $\pi \rightarrow \pi^*$  μεταπτώσεων. Οι ελεύθερες πορφυρίνες διακρίνονται από μία πολύ έντονη ταινία απορρόφησης στην περιοχή των 400 nm περίπου, η οποία καλείται Soret<sup>5</sup> ή B ταινία, και από 4 ασθενέστερες ταινίες απορρόφησης στην περιοχή 450-700 nm περίπου, ονομαζόμενες Q ταινίες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για τα έντονα χρώματα που εμφανίζουν. Οι ταινίες αυτές παρουσιάζονται και στα φάσματα μεταλλωμένων πορφυρινών με μόνη διαφορά στον αριθμό των Q ταινιών (1 ή 2) λόγω μεγαλύτερης συμμετρίας ( $D_{4h}$ , Σχήμα 1.6).<sup>2,6</sup> Έντονος είναι επίσης και ο φθορισμός των πορφυρινών στην περιοχή 600-800 nm.



**Σχήμα 1.6** Τυπικά φάσματα απορρόφησης (αριστερά) και φθορισμού (δεξιά) ελεύθερης (μαύρη γραμμή) και μεταλλωμένης πορφυρίνης (κόκκινη γραμμή).

<sup>5</sup> Soret, J. L. *Compt. Rend.* **1883**, 97, 1267.

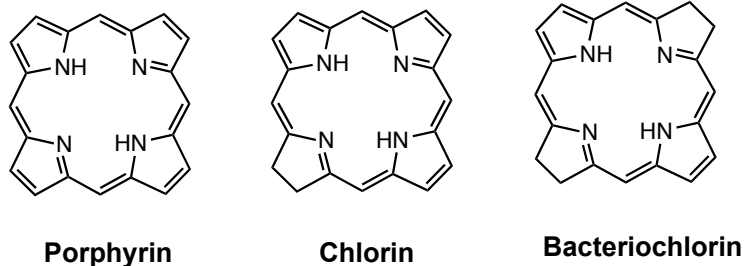
<sup>6</sup> Giovannetti, R. The Use of Spectrophotometry UV-Vis for the Study of Porphyrins. INTECH Open Access Publisher, **2012**.

Παρά την επιπεδότητα του μορίου της πορφυρίνης στην ελεύθερη μορφή της ( $D_{2h}$ ), τροποποιήσεις όπως υποκαταστάσεις στις  $\beta$  ή *meso* θέσεις, το κεντρικό μεταλλικό ιόν, η φύση και αριθμός αξονικών υποκαταστατών μπορεί να τη διαταράξουν. Οι διαφοροποιήσεις αυτές απαντώνται και στα φάσματα απορρόφησης των πορφυρινών.<sup>3,4</sup>

Άλλα χαρακτηριστικά του πορφυρινικού δακτυλίου είναι η μεγάλη θερμική και ενεργειακή σταθερότητα καθώς και φυσικές, χημικές και βιολογικές ιδιότητες οι οποίες δεν απαντώνται σε άλλα μη αρωματικά ή μη κυκλικά συστήματα. Οι ιδιότητες που αναφέρθηκαν καθιστούν τις πορφυρίνες ελκυστικά μόρια για πληθώρα εφαρμογών.

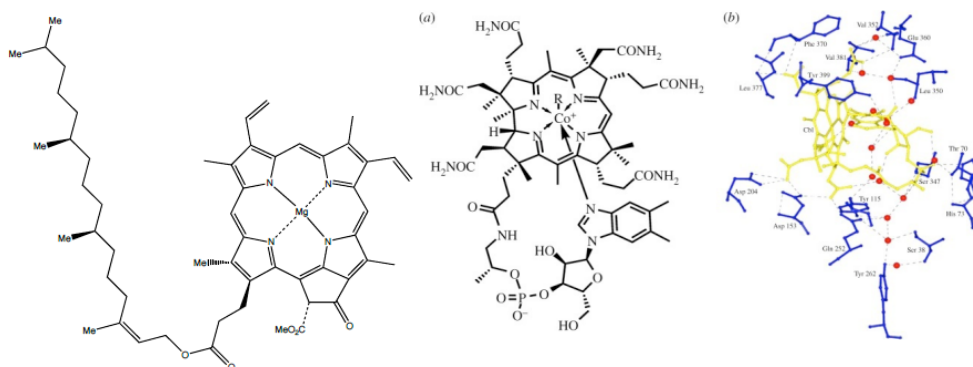
### 1.1.2 Πορφυρινικά συστήματα στη φύση και τον ανθρώπινο οργανισμό

Όλες οι πορφυρίνες θεωρείται ότι προέρχονται από τη δομή του κλειστού τετραπυρρολίου. Τα κλειστά τετραπυρρολικά παράγωγα περιλαμβάνουν τις πορφυρίνες, τις χλωρίνες και τις κορρίνες οι δομές των οποίων παρουσιάζονται παρακάτω.



**Σχήμα 1.7** Δομές πορφυρίνης, χλωρίνης και βακτηριοχλωρίνης.

Οι πορφυρίνες ή σιδηροπορφυρίνες (αίμες) σε συνδυασμό με πρωτεΐνες μας δίνουν τις αιμοπρωτεΐνες (αιμοσφαιρίνη, μυοσφαιρίνη, κυτοχρώματα, υπεροξειδάσες, καταλάσες κλπ). Στις χλωρίνες, που έχουν ως μεταλλικό κέντρο ιόν μαγνησίου ανήκουν οι χλωροφύλλες και οι βακτηριοχλωροφύλλες. Στις κορρίνες, με μεταλλικό κέντρο κοβάλτιο ανήκουν οι κοβαλαμίνες όπως η βιταμίνη B<sub>12</sub> (Σχήμα 1.8).



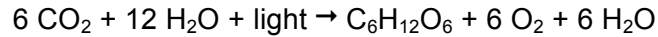
**Σχήμα 1.8** i) Αριστερά: δομή χλωροφύλλης α. ii) Δεξιά: δομή βιταμίνης B<sub>12</sub> (κοβαλαμίνη).<sup>7</sup>

<sup>7</sup> Chellan, P.; Sadler, P.J. *Philos. Trans. A Math. Phys. Eng. Sci.* **2015**, *13*, 1-56.

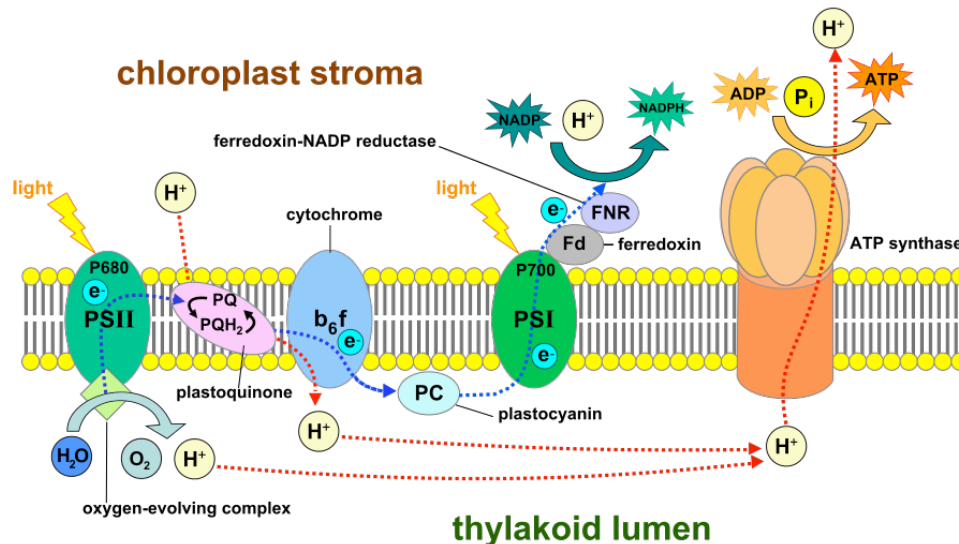
<sup>3</sup> [https://en.wikipedia.org/wiki/Photosynthesis#/media/File:Thylakoid\\_membrane\\_3.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Photosynthesis#/media/File:Thylakoid_membrane_3.svg)

## Χλωροφύλλη και φωτοσύνθεση

Χλωροφύλλη και παράγωγά της υπάρχουν στα θηλακοειδή των χλωροπλαστών αρκετών φυτών αλλά και σε ορισμένα φωτοσυνθετικά βακτήρια (κυανοβακτήρια ως βακτηριοχλωροφύλλη) και φύκη. Οι χλωροφύλλες των φυτών μαζί με καροτένια, ξανθοφύλλες κλπ, είναι υπεύθυνες για τη συλλογή και μετατροπή της ηλιακής ενέργειας σε χημική (συστατικά θρέψης) με βάση την παρακάτω χημική αντίδραση.



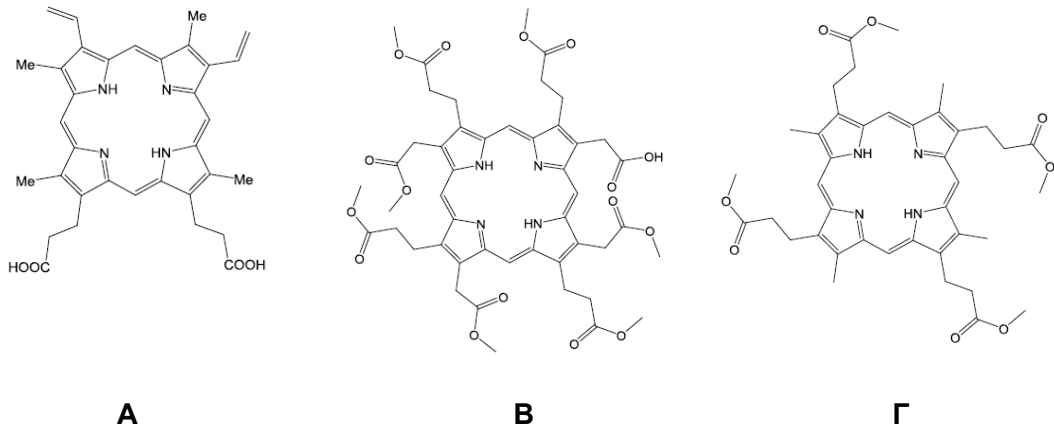
Η ηλιακή ενέργεια απορροφάται από μόρια χλωροφύλλης μαζί με άλλες χρωστικές (light-harvesting antenna complex, φωτοσύστημα II). Μόρια χλωροφύλλης διεγείρονται και ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας μεταφέρονται σε γειτονικά μόρια (δέκτες), ενώ μέρος της ενέργειας μεταφέρεται στο  $\text{H}_2\text{O}$  προς παραγωγή  $\text{H}^+$ ,  $\text{e}^-$  και  $\text{O}_2$ . Τα  $\text{e}^-$  από τη διέγερση μορίων χλωροφύλλης μεταφέρονται μέσω αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων από το φωτοσύστημα II στο φωτοσύστημα I και τέλος στο  $\text{NADP}^+$ , το οποίο ανάγεται σε  $\text{NADPH}$ . Τα  $\text{H}^+$  που προκύπτουν λόγω διαβάθμισης της συγκέντρωσης, χρησιμοποιούνται από την ATP συνθάση για παραγωγή ATP από ADP (φωτεινές αντιδράσεις, Σχήμα 1.9). Τα  $\text{NADPH}$  και ATP που παράγονται χρησιμοποιούνται περαιτέρω για παραγωγή γλυκόζης από το  $\text{CO}_2$ , με τη βοήθεια ενζύμων (σκοτεινές αντιδράσεις).<sup>5</sup>



**Σχήμα 1.9** Φωτεινές αντιδράσεις που συμβαίνουν κατά τη φωτοσύνθεση στη μεμβράνη των θηλακοειδών.<sup>8</sup>

Στον ανθρώπινο οργανισμό υπάρχουν τρεις μορφές της πορφυρίνης: η Πρωτοπορφυρίνη (Protoerythrin, PROTO), η Ουροπορφυρίνη (Uroporphyrin, URO) και η Κοπροπορφυρίνη (Coproerythrin, COPRO). Η αίμη (Σχήμα 1.2), το χρωμοφόρο της ζωής αποτελεί προσθετική ομάδα πολλών πρωτεϊνών όπως είναι η αιμοσφαιρίνη και η μυοσφαιρίνη.

<sup>8</sup> <https://en.wikipedia.org/wiki/Photosynthesis>

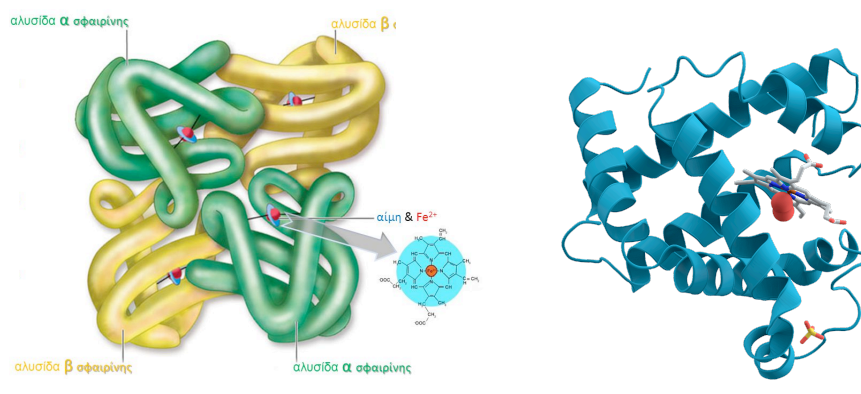


**Σχήμα 1.11** Δομές πρωτοπορφυρίνης (PROTO) (Α), Ουροπορφυρίνης (URO) (Β), και Κοπποπορφυρίνης (COPRO) (Γ).

### Αιμοσφαιρίνη και μυοσφαιρίνη

Δομικό συστατικό των πρωτεϊνών αυτών είναι η προσθετική ομάδα της αίμης. Η αιμοσφαιρίνη, η κόκκινη χρωστική του αίματος, αποτελεί το κύριο συστατικό των ερυθρών αιμοσφαιρίων, τα οποία παράγονται στο μυελό των οστών. Είναι μια πρωτεΐνη τεταρτοταγούς δομής, αποτελούμενη από τέσσερις πολυπεπτιδικές αλυσίδες ( $\alpha_2\beta_2$  τετραμερές,  $\approx 65$  kDa), κάθε μία από τις οποίες είναι ενωμένη με μια ομάδα αίμης. Λειτουργία της αιμοσφαιρίνης είναι η δέσμευση και η μεταφορά του  $O_2$  από τους πνεύμονες στους ιστούς, μέσω του  $Fe^{2+}$  της αίμης. Επιπλέον, συμβάλλει στη μεταφορά  $CO_2$  και  $H^+$  από τους ιστούς στους πνεύμονες.<sup>9,10,11</sup>

Η μυοσφαιρίνη αποτελείται από μία πολυπεπτιδική αλυσίδα ενωμένη με μια ομάδα αίμης (μονομερές,  $\approx 17.8$  kDa). Η δράση της είναι ανάλογη της αιμοσφαιρίνης, μεταφέροντας  $O_2$  στους μύες.<sup>2,3,4</sup>



**Σχήμα 1.12** Τρισδιάστατες δομές αιμοσφαιρίνης (αριστερά) και μυοσφαιρίνης (δεξιά).<sup>12</sup>

<sup>9</sup> Μανουσάκη Γ.; Κεσίσογλου, Δ. Βιοανόργανη Χημεία, Εκδοτικός οίκος Αδελφών Κυριακίδη α.ε., Θεσσαλονίκη, 2007.

<sup>10</sup> Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; Stryer, L. Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 2012.

<sup>11</sup> [http://195.134.76.37/chemicals/chem\\_carbonmonoxide.htm](http://195.134.76.37/chemicals/chem_carbonmonoxide.htm)

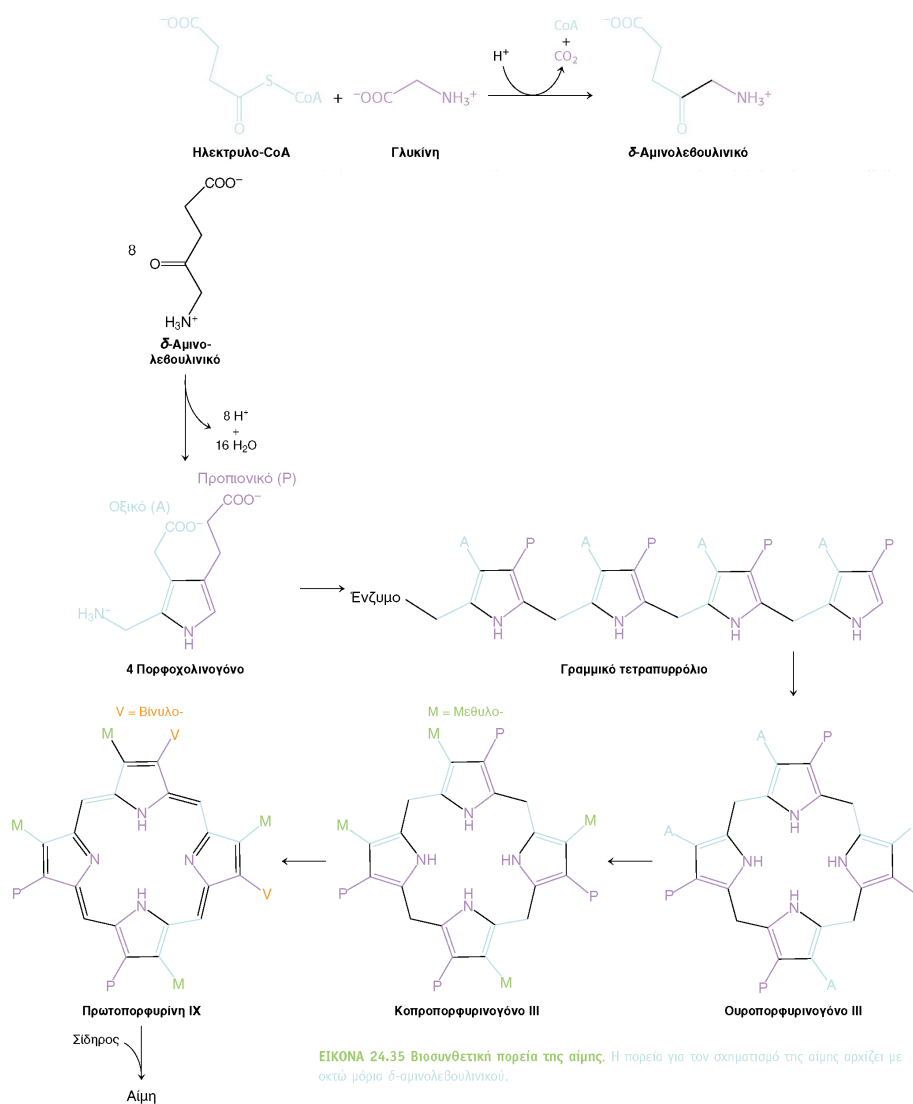
<sup>12</sup> <https://en.wikipedia.org/wiki/Myoglobin>

### 1.1.3 Βιοσύνθεση της αίμης

Η σύνθεση της αίμης γίνεται κυρίως στο ήπαρ και στους ερυθροβλάστες. Η βιοσύνθεση της αίμης, ονομάζεται πορφυρινική σύνθεση, αφού όλα τα ενδιάμεσα τετραπυρρόλια έχουν ταξινομηθεί χημικά ως πορφυρίνες.

Το πρώτο βήμα για την βιοσύνθεση της πορφυρίνης είναι ο σχηματισμός του δ-αμινολεβουλινικού οξέος, (δ-ALA, 5-ALA ή Dala) που προκύπτει από την αντίδραση συμπύκνωσης του αμινοξέος γλυκίνη με ηλεκτρυλο-CoA, από τον κύκλο του κιτρικού οξέος, καταλυόμενη από το ένζυμο συνθάση του δ-αμινολεβουλινικού.

Δύο μόρια δ-ALA έπειτα συμπυκνώνονται παρουσία του ενζύμου συνθάση του πορφοχολινογόνου, για να δώσουν πορφοχολινογόνο το οποίο περιέχει ένα δακτύλιο πυρρολίου. Στη συνέχεια, τέσσερα μόρια πορφοχολινογόνου συμπυκνώνονται με κατεύθυνση από την κεφαλή προς την ουρά για να σχηματίσουν ένα γραμμικό τετραπυρρόλιο σε μια αντίδραση που καταλύεται από την απαμινάση του πορφοχολινογόνου.<sup>3</sup>



**Σχήμα 1.13** Βιοσυνθετική πορεία της αίμης.<sup>3</sup>

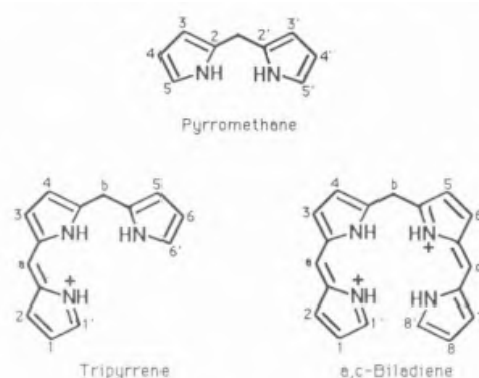
Το γραμμικό τετραπυρρόλιο κυκλοποιείται παρουσία της συνθάσης, για το σχηματισμό ουροπορφυρινογόνου III, το οποίο έχει μια ασύμμετρη διάταξη των πλευρικών αλυσίδων. Αυτό το μόριο υποβάλλεται σε μια σειρά από περαιτέρω τροποποιήσεις των πλευρικών αλυσίδων και του βαθμού κορεσμού του πορφυρινικού δακτυλίου.

Το κοπροπορφυρινογόνο III σχηματίζεται από ουροπορφυρινογόνο III με αποκαρβοξυλίωση των πλευρικών αλυσίδων του οξικού. Τέλος, η δημιουργία διπλών δεσμών στον πορφυρινικό δακτύλιο και η μετατροπή των δύο από τις πλευρικές αλυσίδες προπιονικού σε βινυλικές ομάδες αποδίδουν πρωτοπορφυρίνη IX. Η χηλική συμπλοκοποίηση με Fe, καταλυόμενη από το ένζυμο σιδηροχηλάση αποδίδει εν τέλει την αίμη. Η σύνθεση των ενδιάμεσων προϊόντων (πορφοχολινογόνο έως κοπροπορφυρινογόνο) πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα ενώ τα υπόλοιπα στάδια στα μιτοχόνδρια.<sup>3</sup>

Διαταραχές στο μεταβολικό μονοπάτι της αίμης έχουν ως αποτέλεσμα την παρουσία ασθενειών, (επίκτητες ή κληρονομικές) όπως είναι οι πορφυρίες. Οι πορφυρίες οφείλονται σε απουσία ενζύμων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση πρόδρομων ή και ενδιάμεσων προϊόντων του μεταβολισμού (π.χ. δ-ALA, πορφοχολινογόνο, ουροπορφυρινογόνο I, κοπροπορφυρινογόνο III κλπ).<sup>3,13</sup>

#### 1.1.4 Σύνθεση τεχνητών πορφυρινών

Η σύνθεση πορφυρινικών παραγώγων μέσω απλών, μη χρονοβόρων διεργασιών και σε μεγάλες αποδόσεις, απασχόλησε την ερευνητική κοινότητα για περισσότερο από 80 χρόνια. Από το 1926 που ο Fischer<sup>14</sup> κατάφερε να συνθέσει πορφίνη από pyrrrole-2-carboxaldehyde σε ζέον φορμικό οξύ, έχουν προταθεί ποικίλα συνθετικά πρωτόκολλα που αφορούν υποκατεστημένες πορφυρίνες. Δομικά συστατικά που χρησιμοποιούνται για αυτό το σκοπό περιλαμβάνουν αλδεΐδη(ες), πυρρόλια (pyrroles), διπυρρομεθάνια (dipyrromethanes ή pyrrromethanes), τριπυρρένια (tripyrrenes), πυρρόλια ανοιχτής αλυσίδας κ.ά. (Σχήμα 1.14), ενώ φυσικές πορφυρίνες (π.χ. χλωροφύλλη, αίμη) δύναται να χρησιμοποιηθούν επίσης ως πρόδρομες ενώσεις στη σύνθεση.<sup>15</sup>



**Σχήμα 1.14** Ενδεικτικές πρόδρομες ενώσεις για τη σύνθεση πορφυρινών.<sup>15</sup>

<sup>13</sup> Champe, P.C.; Harvey, R.A. *Biochemistry*, 4<sup>th</sup> Ed., Lippincott Williams & Wilkins, USA, **2008**.

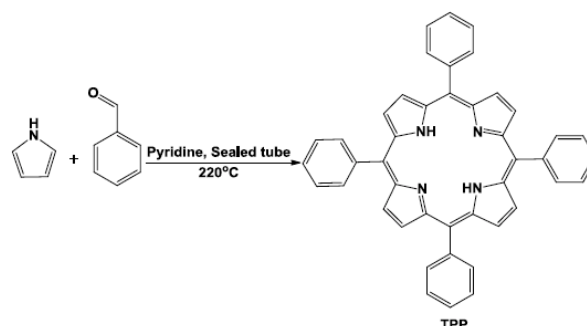
<sup>14</sup> Fischer, H.; Gleim, W. *Liebigs Ann.* **1936**, *521*, 157-160.

<sup>15</sup> Cavaleiro, J.A.S.; Smith, K.M. *Rev. Port. Quim.* **1989**, *31*, 29-41.

Σήμερα οι συνθετικές προσεγγίσεις που έχουν αναπτυχθεί μπορούν να καταστήσουν δυνατή τη σύνθεση υποκατεστημένων πορφυρινών σε  $\beta$  ή *meso* θέση αρκετά αποτελεσματικά και σε σχετικά καλές αποδόσεις. Τα πλέον χρησιμοποιούμενα συνθετικά πρωτόκολλα, τα οποία είναι γνωστά από τα ονόματα των ερευνητών που τα ανέπτυξαν: Rothemund, Adler & Longo και Lindsey, αναφέρονται παρακάτω.

### I. Σύνθεση Rothemund

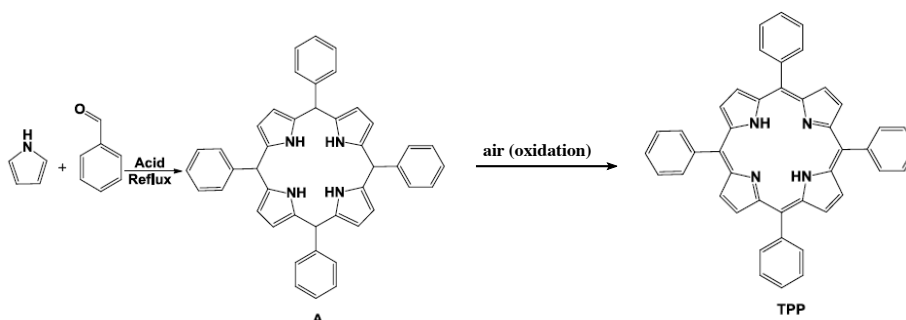
Ο πρώτος που προσπάθησε να συνθέσει εργαστηριακά πορφυρίνη ήταν ο Rothemund το 1936. Για το σκοπό αυτό πρότεινε τη σύνθεση τετραφαίνυλοπορφυρίνης (5,10,15,20-tetraphenylporphyrin, TPP) από πυρρόλιο και βενζαλδεΐδη, σε διάλυμα μεθανόλης/πυριδίνης, μέσα σε καλά κλεισμένη φιάλη στους 220 °C.<sup>16</sup> Η απόδοση σύνθεσης TPP ήταν περίπου 10% (Σχήμα 1.15).<sup>16,17</sup>



**Σχήμα 1.15** Σύνθεση 5,10,15,20-tetraphenylporphyrin (TPP) κατά Rothemund.<sup>17</sup>

### Σύνθεση κατά Adler & Longo

Το 1964 οι Adler, Longo και οι συνεργάτες τους προσπάθησαν να βελτιώσουν το πρωτόκολλο του Rothemund, προτείνοντας τη χρήση ενός οξέος (π.χ. proprionic acid, acetic acid, trifluoroacetic acid) ως καταλύτη και διαλύτη στο μίγμα της αντίδρασης και έπειτα οξειδωση του ενδιάμεσου πορφυρινογόνου A (Σχήμα 1.16). Η προσέγγισή τους είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της απόδοσης στο 20-30% σε πειράματα με διάφορες αλδεΐδες.<sup>18</sup>



**Σχήμα 1.16** Σύνθεση 5,10,15,20-tetraphenylporphyrin (TPP) κατά Adler & Longo.<sup>19</sup>

<sup>16</sup> Rothemund, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1935**, *57*, 2010-2011. (b) Rothemund, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1936**, *57*, 625-627.

<sup>17</sup> Rothemund, P.; Menotti, A.R. *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, *63*, 267-270.

<sup>18</sup> (a) Adler, A.D.; Longo, F.R.; Shergalis, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 3145-3149. (b) Adler, A.D.; Sklar, L.; Longo, F.R.; Finarelli, J.D.; Finarelli, M.G. *J. Heterocycl. Chem.* **1968**, *5*, 669-678.

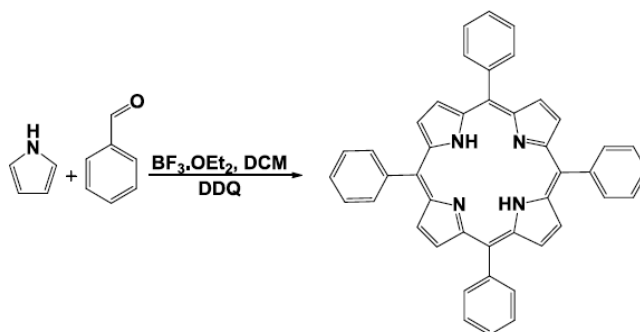
<sup>19</sup> (a) Adler, A.D.; Longo, F.R.; Finarelli, J.D.; Goldmacher, J.; Assour, J.; Korsakoff, L. *J. Org. Chem.* **1967**, *32* (2), 476. (b) Longo, F.R.; Thorne, E.J.; Adler, A.D.; Dyn, S. *J. Heterocycl. Chem.* **1975**, *12*, 1305-1309.



Το πρωτόκολλο αυτό μπορεί να εφαρμοστεί για τη σύνθεση απλών συμμετρικών πορφυρινών αλλά και μη συμμετρικών, μέσω μικτής αντίδρασης συμπύκνωσης ανάμεσα στο πυρρόλιο και σε δυο διαφορετικές αλδεΐδες. Αποτέλεσμα της αντίδρασης είναι ένα στατιστικό μίγμα 6-*meso* υποκατεστημένων προϊόντων, τα οποία διαχωρίζονται μέσω χρωματογραφίας στήλης.

### Σύνθεση κατά Lindsey

Το πρωτόκολλο των Adler & Longo απαιτούσε αρκετά βίαιες συνθήκες αντίδρασης (refluxing) και δεν μπορούσε να εφαρμοστεί σε αλδεΐδες με ευαίσθητες λειτουργικές ομάδες. Τη δεκαετία του 1980 ο Lindsey<sup>20</sup> και οι συνεργάτες του πρότειναν την πραγματοποίηση της αντίδρασης συμπύκνωσης (Σχήμα 1.17) σε οργανικό διαλύτη (chloroform, CHCl<sub>3</sub> ή dichloromethane, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), σε δυο στάδια, υπό ήπιες συνθήκες (θερμοκρασία δωματίου), με χρήση ενός οξέος κατά Lewis ως καταλύτη στο πρώτο στάδιο, (π.χ Boron trifluoride diethyl etherate, BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O) και ενός οξειδωτικού μέσου στο δεύτερο στάδιο (2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone, DDQ ή *p*-chloranil). Οι αποδόσεις αυξήθηκαν σημαντικά (α=40-50%).<sup>20, 21</sup>



**Σχήμα 1.17** Σύνθεση 5,10,15,20-tetraphenylporphyrin (TPP) κατά Lindsey.<sup>20</sup>

### Διπυρρομεθάνια (dipyrromethanes)

Η χρήση υποκατεστημένων διπυρρομεθάνιων αποτελεί μια εναλλακτική προσέγγιση για τη σύνθεση συμμετρικών αλλά και μη συμμετρικών, πολύπλοκων πορφυρινών<sup>22</sup> και ειδικότερα *trans-meso*-υποκατεστημένων. Ο Lindsey και οι συνεργάτες του πρότειναν τη σύνθεση *trans-meso*-υποκατεστημένων πορφυρινών<sup>23</sup> με βάση το διμερισμό του πυρρολίου\* χρησιμοποίησαν υποκατεστημένα διπυρρομεθάνια, (αντίδραση [2+2] κατά MacDonald, 1960)<sup>24</sup> ενώ εφάρμοσαν και μικτές αντιδράσεις συμπύκνωσης μεταξύ υποκατεστημένων διπυρρομεθάνιων και αλδεϋδών.<sup>23,25, 26</sup>

Το διπυρρομεθάνιο είναι αποτέλεσμα συμπύκνωσης δύο μονάδων πυρρολίου τα οποία ενώνονται μεταξύ τους μέσω μιας μεθυλενικής γέφυρας. Η σύνθεση των διπυρρομεθάνιων (Σχήμα 1.18) γίνεται σε ήπιες συνθήκες παρουσία αλδεΐδας, περίσσειας πυρρολίου ως διαλύτη, και καταλυτικής ποσότητας οξέος (οξύ κατά Brønsted ή οξύ κατά Lewis, π.χ. InCl<sub>3</sub>, MgBr<sub>2</sub> κλπ).<sup>23,27</sup>

<sup>20</sup> (a) Lindsey, J.S.; Hsu, H.C.; Schreiman, I.C. *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27 (41), 4969-4970. (b) Lindsey, J.S.; Schreiman, I.C.; Hsu, H.C.; Kearney, P.C.; Marguerettaz, A.M. *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 827-836.

<sup>21</sup> Cavaleiro, J.A.S.; Condeso, M.P.N.; Olmstead, M.M.; Oram, D.E.; Snow, K.M.; Smith, K.M. *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 5847-5849.

<sup>22</sup> Rao, P.D.; Dhanalekshmi, S.; Littler, B.J.; Lindsey, J.S. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 7323-7344.

<sup>23</sup> Lee, C.H.; Lindsey, J.S. *Tetrahedron.* **1994**, 50 (39), 11427-11440.

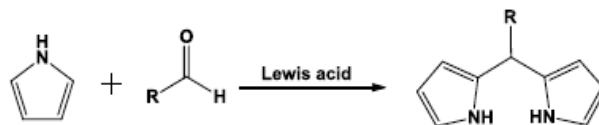
<sup>24</sup> Arsenault, G.P.; Bullock, E.; MacDonald, S.F. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 4384-4389.

<sup>25</sup> Littler, B.J.; Ciringh, Y.; Lindsey, J.S. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 2864-2872.

<sup>26</sup> Rao, P.D.; Littler, B.J.; Geuer III, G.R.; Lindsey, J.S. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 1084-1092.

<sup>27</sup> Laha, J. K.; Dhanalekshmi, S.; Taniguchi, M.; Ambroise, A.; Lindsey, J. S. *Org. Proc. Res. Dev.* **2003**, 7, 799-812.



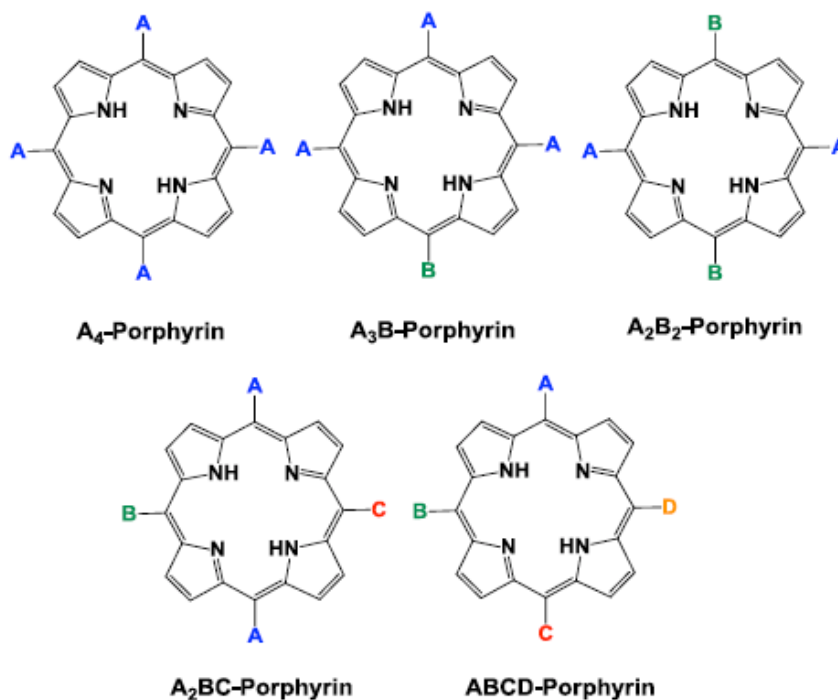


**Σχήμα 1.18** Σύνθεση διπυρρομεθανίου κατά Lindsey.<sup>27</sup>

Μεγάλες αποδόσεις έχουν αναφερθεί για τη σύνθεση άρυλο-διπυρρομεθανίων από αρωματικές αλδεΐδες και περίσσεια πυρρολίου σε σύστημα με διαλύτη νερό και καταλύτη υδροχλώριο ( $\alpha > 70\%$ ).<sup>28</sup>

Ανάλογα με την υποκατάσταση στη *meso*-θέση<sup>23</sup> του πορφυρινικού δακτυλίου και την πολυπλοκότητα της επιθυμητής πορφυρίνης (Σχήμα 1.19) χρησιμοποιούνται ως πρόδρομες ενώσεις πυρρόλια, αλδεΐδες, υποκατεστημένα διπυρρομεθάνια, τριπυρρά(ε)νια, biladienes κλπ.<sup>29</sup>

Η επιλογή του πρωτόκολλου που θα εφαρμοστεί εξαρτάται από τη συμμετρία και την πολυπλοκότητα της επιθυμητής πορφυρίνης.<sup>22</sup> Τα τελευταία χρόνια τα συνθετικά πρωτόκολλα έχουν εξελιχθεί σημαντικά καθιστώντας δυνατή τη σύνθεση ολοένα και πιο πολύπλοκων πορφυρινών η οποία μέχρι πρόσφατα φάνταζε αδύνατη.<sup>30</sup>



**Σχήμα 1.19** Κατηγορίες *meso*-υποκατεστημένων πορφυρινών.<sup>23</sup>

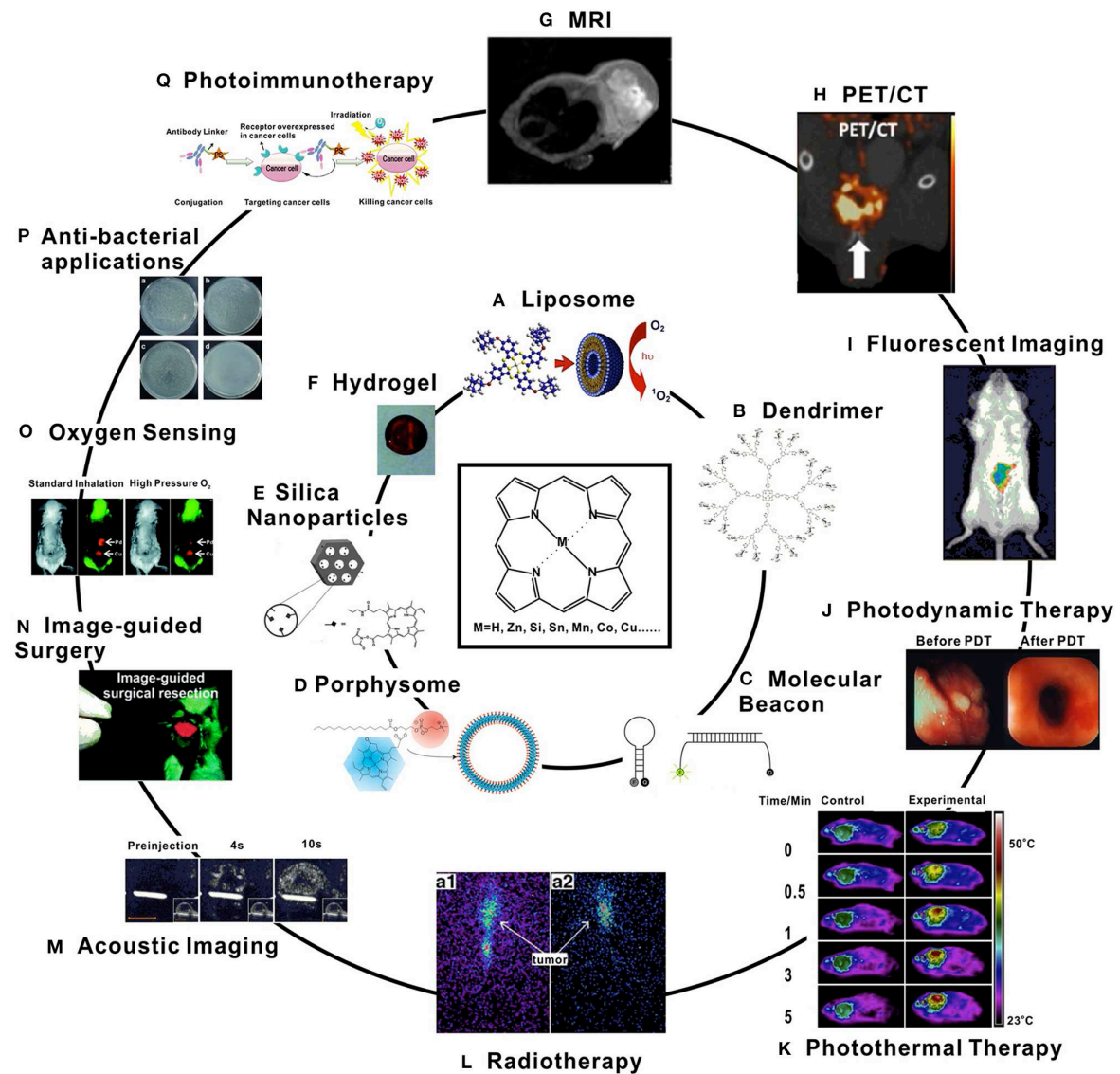
<sup>28</sup> Rohand, T.; Dolusic, E.; Ngo, T. H.; Maes, W.; Dehaen, W. *Arkivoc.* **2007**, 307-324.

<sup>29</sup> (a) Cavaleiro, J.A.S.; Smith, K.M. *Rev. Port. Quím.* **1989**, *31*, 29-41. (b) Smith, K.M. *New J. Chem.* **2016**, *40*, 5644-5649.

<sup>30</sup> Tanaka, T.; Osuka, A. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 2584-2640.

### 1.1.5 Εφαρμογές πορφυρινών

Τα χαρακτηριστικά του πορφυρινικού δακτυλίου επιτρέπουν τη χρήση συνθετικών πορφυρινών σε πολλούς τομείς μεταξύ των οποίων: ηλιακά κελιά,<sup>31</sup> κατάλυση,<sup>32</sup> ανιχνευτές,<sup>33</sup> στην ιατρική/βιολογία (φάρμακα για φωτοδυναμική και αντιμικροβιακή θεραπεία, sonodynamic therapy, SDT και boron neutron capture therapy, BNCT) και πολλές άλλες (Σχήμα 1.20).<sup>34, 35</sup> Ενδεικτικά, παρουσιάζονται μερικές βιολογικές εφαρμογές των πορφυρινικών μορίων.



**Σχήμα 1.20** Εφαρμογές πορφυρινικών μορίων στην ιατρική, θεραπεία και απεικόνιση.<sup>34</sup>

#### Πορφυρίνες ως μοριακοί ανιχνευτές

<sup>31</sup>Higashino, T.; Tlmahori, H. *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 448-463.

<sup>32</sup>Che, C.M.; Lo, V.K.Y.; Zhou, C.Y.; Huang, J.S. *Chem.Soc.Rev.* **2011**, *40*, 1950-1975.

<sup>33</sup>Stich, M.I.J.; Fischer, L.H.; Wolfbeis, O.S. *Chem. Soc.Rev.* **2010**, *39*, 3102-3114.

<sup>34</sup>Huang et al. *Front. Phys.* **2015**, *3*, 1-15.

<sup>35</sup>Jia et al. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2015**, 1-9.

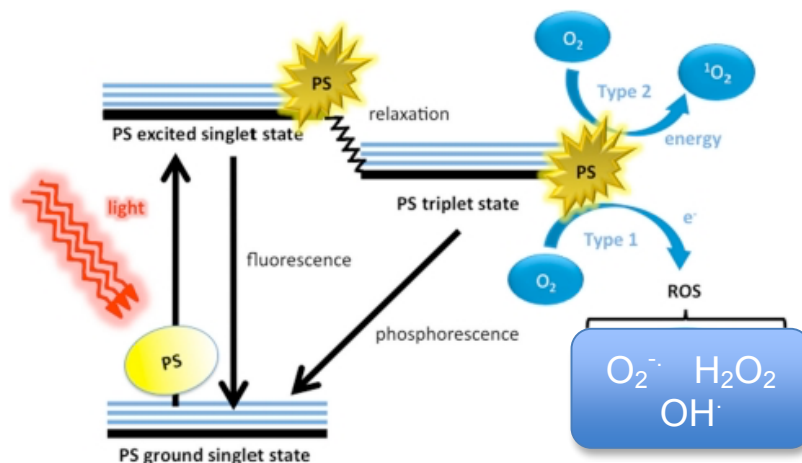
Παράγωγα μεταλλοπορφυρινών όπως Palladium (ή platinum)-5,10,15,20-tetrakis(2,3,4,5,6-pentafluorophenyl) porphyrin (PdTFPP ή PtTFPP) έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση οξυγόνου ( $O_2$ ) *in vitro* και *in vivo* μέσω της απόσβεσης του φωσφορισμού της μεταλλοπορφυρίνης από το  $O_2$  (Σχήμα 1.21).<sup>33</sup>



**Σχήμα 1.21** Δομή μεταλλοπορφυρίνης  $Me^{2+}$ -TFPP (Me= Pd ή Pt).<sup>33</sup>

### Πορφυρίνες στη φωτοδυναμική και αντιμικροβιακή θεραπεία

Στην PDT εισάγονται στον ασθενή φωτοευαισθητοποιούμενα φάρμακα (π.χ πορφυρίνες) με έγχυση ή τοπική εφαρμογή στο δέρμα. Τα φάρμακα αυτά ενεργοποιούνται στη συνέχεια, όταν απορροφήσουν φως κατάλληλου μήκους κύματος, και αντιδρούν με το οξυγόνο με αποτέλεσμα την παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου, (Reactive Oxygen Species, ROS), όπως οξυγόνο απλής κατάστασης (singlet oxygen,  $^1O_2$ ) και ελεύθερες ρίζες, που θανατώνουν τα στοχευόμενα κύτταρα.<sup>36</sup> Η διαδικασία αυτή περιγράφεται στο τροποποιημένο διάγραμμα Jablonski (Σχήμα 1.22).



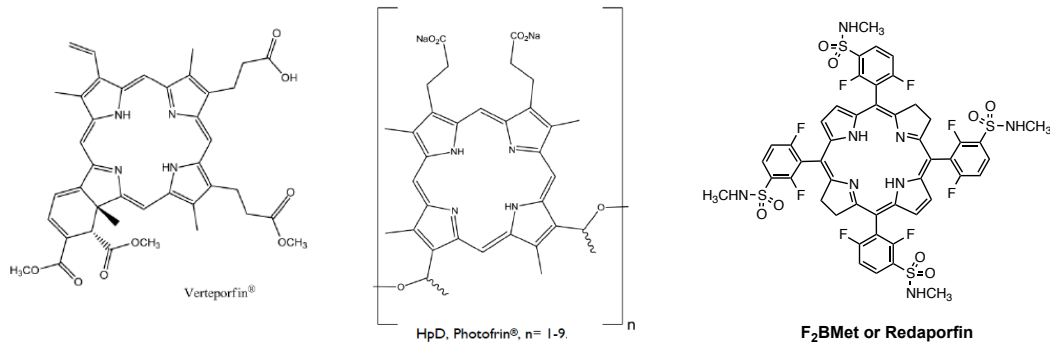
**Σχήμα 1.22** Μηχανισμός δράσης της φωτοδυναμικής θεραπείας.<sup>37</sup>

Τροποποιημένα πορφυρινικά παράγωγα συζευγμένα με πεπτιδία, νανοσωματίδια κλπ έχουν δοκιμαστεί για αυτό το σκοπό. Αντικαρκινικά φάρμακα που βασίζονται σε πορφυρίνες όπως: HpD (Photofrin), Verteporfin (Visudyne) και Redaporfin (LUZ11)

<sup>36</sup> Kadish K.M. et al , "The porphyrin handbook- Applications, past, present and future", Vol 6, Chapter 43, Academic Press, 2000, 179-368.

<sup>37</sup> Dai et al. *Front. Microbiol.* 2012, 3, 1-16.

έχουν εγκριθεί από τον οργανισμό υγείας της Αμερικής, FDA (Σχήμα 1.23).<sup>38,39</sup> Πορφυρινικά παράγωγα (π.χ chlorin(ε6)) έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* για καταστολή παθογόνων μικροοργανισμών.<sup>40</sup>



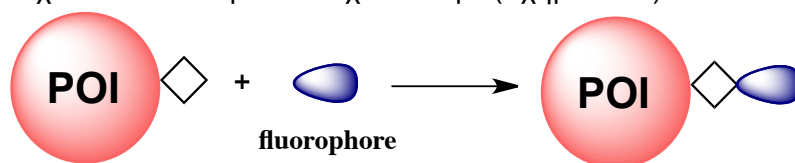
**Σχήμα 1.23** Δομές μερικών εγκεκριμένων κλινικών πορφυρινικών παραγώγων για PDT: HpD (Photofrin), Verteporfin (Visudyne) και Redaporfin (LUZ11).<sup>33,34</sup>

Όπως βλέπουμε οι χρήσεις των συνθετικών πορφυρινών είναι πολλές και οφείλονται στα χαρακτηριστικά του πορφυρινικού δακτυλίου, τη θερμοδυναμική σταθερότητα του μορίου και την απορρόφηση στο ορατό.

### 1.2.1 Φθορίζουσα σήμανση (fluorescent tag ή labeling)

Η παρακολούθηση-ανίχνευση βιομορίων (πεπτιδία, πρωτεΐνες, αμινοξέα, DNA, RNA μεταβολίτες, αντισώματα κλπ) πολλές φορές απαιτεί τη χρήση κάποιας ένωσης αναφοράς/ανιχνευτή (indicator) για τη διαλεύκανση των μοριακών δομών, των μοριακών αλληλεπιδράσεων, των λειτουργιών και διαφόρων διεργασιών. Μεταξύ των μεθόδων που έχουν αναπτυχθεί για τον εντοπισμό βιομορίων περιλαμβάνονται: ισοτοπικοί δείκτες (isotope markers)<sup>41</sup> ραδιοενεργοί ανιχνευτές (radioactive tracers/labels),<sup>42</sup> χρωματομετρικοί και ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες (colorimetric and electrochemical biosensors),<sup>43</sup> φθορίζοντες ανιχνευτές (fluorescent probes ή tags ή labels)<sup>44</sup> κ.ά. με τους τελευταίους να χρησιμοποιούνται κατά κόρον λόγω των πλεονεκτημάτων που προσφέρουν: μη καταστρεπτική δράση, υψηλή ευαισθησία, χαμηλή συγκέντρωση της φθορίζουσας ουσίας.

Το fluorescent tag περιλαμβάνει τη χρήση ενός φθοροφόρου μορίου, (δηλ. ενός χρωμοφόρου μορίου που φθορίζει έπειτα από ακτινοβολήση) το οποίο συνδέεται επιλεκτικά, (ομοιοπολικά ή μη ομοιοπολικά) σε μια περιοχή/λειτουργική ομάδα του βιομορίου-στόχου που θέλουμε να ανιχνεύσουμε (Σχήμα 1.24).



**Σχήμα 1.24** Σχηματική αναπαράσταση φθορίζουσας σήμανσης. Η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος (POI) συνδέεται (με κατάλληλο συνδέτη, λευκός ρόμβος) με το φθοροφόρο μόριο (μπλέ χρώμα).

<sup>38</sup> Josefsen, L.B.; Boyle, R.W. *Theranostics*. **2012**, 2 (9), 916-966.

<sup>39</sup> Luz, A.F.S.; Pucelik, B.; Pereira, M.M.; Dąbrowski, J.M.; Arnaut, L.G. *Lasers Surg. Med.* **2018**, 1-9.

<sup>40</sup> Hamblin, M.R. *Curr. Opin. Microbiol.* **2016**, 33, 67-73.

<sup>41</sup> Posch, A.; *Proteomic Profiling: Methods and Protocols*, Springer Science+Business Media, New York, **2015**.

<sup>42</sup> (a) Ong, S.E.; Mann, M. *Nat. Protoc.* **2007**, 1, 2650-2660. (b) Varki, A. *Faseb J.* **1991**, 5, 226-235.

<sup>43</sup> (a) Li, H.X.; Rothberg, L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, 101, 14036-14039. (b) Liu, G.; Lin, Y. *Talanta*. **2007**, 74 308-317.

<sup>44</sup> Wolfbeis, O. S. Editorial: Probes, Sensors, and Labels: Why is Real Progress Slow? *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 9864-9865.

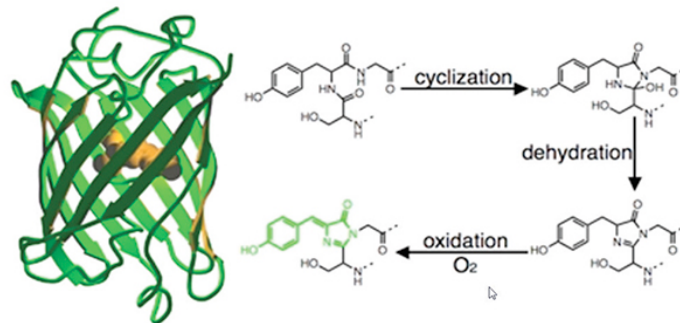
Χάρη στο φθορισμό του φθοροφόρου μπορεί να παρατηρηθεί το μόριο ενδιαφέροντος από μικροσκόπιο φθορισμού τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Επιπλέον, η χρήση των fluorescent tags μπορεί να επεκταθεί και σε άλλες εφαρμογές (βιοαπεικόνιση, μελέτη αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών κλπ).

Τα φθορίζοντα μόρια που χρησιμοποιούνται για τη σήμανση των βιομορίων και ειδικότερα για πρωτεΐνες/πεπτιδία περιλαμβάνουν: φθορίζουσες πρωτεΐνες (FPs, fluorescent proteins), οργανικά φθοροφόρα (fluorophores) ενώ δεν αποκλείεται και η χρήση αντισωμάτων με φθοροφόρα ή νανοσωματίδια όπως quantum dots (Qds). Ως επί το πλείστον χρησιμοποιούνται φθορίζουσες πρωτεΐνες (FPs, fluorescent proteins) και οργανικά φθοροφόρα.<sup>45</sup>

### 1.2.2 Φθορίζουσες πρωτεΐνες

Φθορίζουσες πρωτεΐνες προερχόμενες από ανθόζωα, κυανοβακτήρια (phycobiliproteins) και μέδουσες (Green Fluorescent Protein) έχουν χρησιμοποιηθεί για σήμανση βιομορίων.<sup>46</sup>

Η πιο γνωστή φθορίζουσα πρωτεΐνη που έχει χρησιμοποιηθεί για αυτό το σκοπό είναι η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP, Green Fluorescent Protein), η οποία απομονώθηκε από τη μέδουσα *Aequorea victoria*. Η GFP (Σχήμα 1.25) αποτελείται από 11 β-πτυχωτές επιφάνειες οι οποίες σχηματίζουν δομή βαρελιού. Το χρωμοφόρο μόριο ευρίσκεται εσωτερικά του βαρελιού και προστατεύεται από αλλαγές του pH. Έπειτα από ακτινοβόλησή της φθορίζει στην περιοχή του πράσινου χρώματος ( $\lambda=509$  nm). Πηγή του φθορισμού της είναι η *p*-hydroxybenzylideneimidazolinone, δηλαδή μια αλληλουχία τριών αμινοξέων Ser65, Tyr66 and Gly67 στο κέντρο της πρωτεΐνης. Η κυκλοποίηση και η οξειδωση της αλληλουχίας Ser-Tyr-Gly είναι υπεύθυνη για το πράσινο χρώμα ( $\lambda=509$  nm) που παρατηρείται κατά το φθορισμό.<sup>3,47</sup>



**Σχήμα 1.25** Δομή της GFP και πηγή φθορισμού της Ser65-Tyr66-Gly67.

Τόσο η GFP όσο και παράγωγά της (π.χ. Yellow Fluorescent Protein, YFP, Red Fluorescent Protein, RFP κλπ, Σχήμα 1.26), χρησιμοποιούνται ευρέως στη σήμανση πρωτεϊνών τόσο σε κύτταρα όσο και σε ζωντανούς οργανισμούς. Μεγάλο μειονέκτημα αποτελεί το μέγεθός τους (26.9 kDa).<sup>48</sup> Γι'αυτό το λόγο αναπτύχθηκαν άλλοι τρόποι σήμανσης χρησιμοποιώντας οργανικά φθοροφόρα τα οποία αλληλεπιδρούν ομοιοπολικά ή μη ομοιοπολικά με μικρά πεπτιδία, ένζυμα ή πρωτεϊνικά τμήματα (tags, δηλ. συγκεκριμένες αλληλουχίες αμινοξέων) τα οποία είναι ενωμένα με την πρωτεΐνη-στόχο.

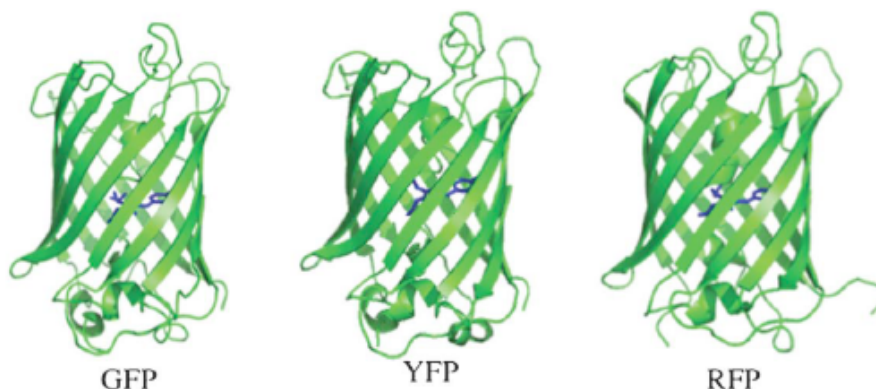
<sup>45</sup> Giepmans, B.N.G.; Adams, S.R.; Ellisman, M.H.; Tsien, R.Y. *Science*. **2006**, *312*, 217-224.

<sup>46</sup> Day, R.N.; Davidson, M.W. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 2887-2921.

<sup>47</sup> Richmond, T.A.; Takahashi, T.T.; Shimkhada, R.; Bernsdorf, J.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *268*, 462-465.

<sup>48</sup> Tsien, R.Y. *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 509-544.



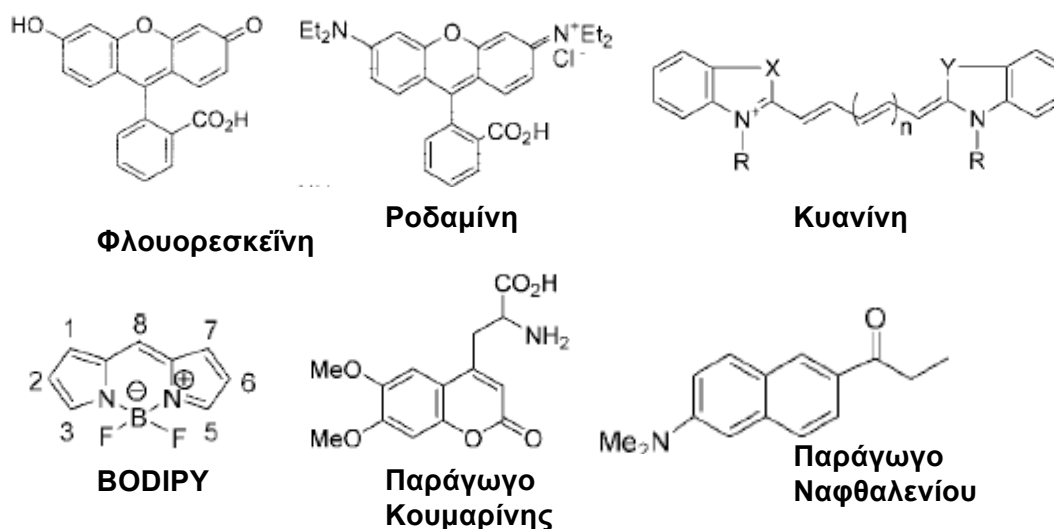


**Σχήμα 1.26** Green fluorescent protein και μερικά παράγωγά της, GFP ( $\lambda_{\text{διέγερσης}}=488$  nm και  $\lambda_{\text{εκπομπής}}=508$  nm), YFP ( $\lambda_{\text{διέγερσης}}=514$  nm και  $\lambda_{\text{εκπομπής}}=530$  nm) και RFP ( $\lambda_{\text{διέγερσης}}=554$  nm και  $\lambda_{\text{εκπομπής}}=585$  nm).

Κριτήρια επιλεξιμότητας οργανικού φθοροφόρου-ανιχνευτή αποτελούν το μικρό μέγεθος, η χημική σταθερότητα και η μη παρεμπόδιση της λειτουργίας του βιομορίου-στόχου. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας θα επικεντρωθούμε στη χρήση οργανικών φθοροφόρων για σήμανση πρωτεϊνών/πεπτιδίων.

### 1.2.3 Οργανικά φθοροφόρα (fluorophores)

Χημικά τροποποιημένοι οργανικοί φθορίζοντες ανιχνευτές χρησιμοποιούνται για σήμανση λόγω του μικρού τους μεγέθους, της μεγάλης ποικιλίας των μηκών κύματος ( $\lambda$ ) που εκπέμπουν, 400-800 nm (διάφορα χρώματα), της αυξημένης φωτοσταθερότητας και της υψηλής κβάντωσης φθορισμού ( $\Phi$ ). Τα οργανικά μόρια που χρησιμοποιούνται περιλαμβάνουν: ετεροκυκλικές ενώσεις με N, O ή S, (κουμαρίνη, φουράνια, ολιγοθειοφαίνια και παράγωγά τους), παράγωγα ναφθαλενίου, φλουορεσκεΐνη, ροδαμίνη, BODIPY, σκουαρένια (squaraines), κυανίνες (cyanines), κ.ά.<sup>49</sup>



**Σχήμα 1.27** Δομές ενδεικτικών φθοροφόρων για σήμανση.<sup>49</sup>

<sup>49</sup> Gonçalves, M.S. *Chem. Rev.* **2009**, 109 (1), 190-212.

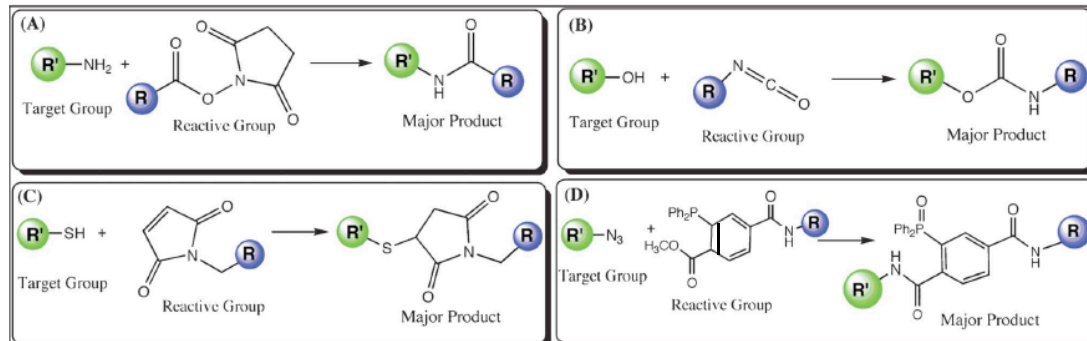
### 1.2.4 Μέθοδοι φθορίζουσας σήμανσης (labeling)

Ανάλογα με τον τρόπο σύνδεσης του φθοροφόρου στο βιομόριο-στόχο διακρίνονται διάφορες μέθοδοι σήμανσης (labeling): Χημικές, ενζυματικές, γενετικές, tag κλπ (Πίνακας 1.2).<sup>50,51</sup>

**Πίνακας 1.2** Μέθοδοι φθορίζουσας σήμανσης βιομορίων.<sup>50</sup>

| Ενδεικτικές Μέθοδοι φθορίζουσας σήμανσης |                         |               |                                |
|--|-------------------------|---------------|--------------------------------|
| Χημικές (Chemical)                       | Ενζυματικές (Enzymatic) | Tagging       | Γενετικές (Genetically tagged) |
| Maleimide-Thiol                          | Transglutaminase        | Tetracysteine | FPs                            |
| NHS ester-Amine                          | Sortase                 | Histidine     | SNAP                           |
| Isothiocyanate-Amine                     | Cutinase                | Aspartate     | CLIP                           |
| Alkyl Halide-Hydroxy                     | Intein                  |               | Halo                           |
| Isocyanate-Hydroxy                       | Lipoic Acid ligase      |               |                                |
| Tetrazine-Alkene/Alkyne                  | Biotin ligase           |               |                                |

**Χημική σήμανση (Chemical labeling):** Τα φθορίζοντα μόρια (Σχήμα 1.28) διαθέτουν κατάλληλη λειτουργική ομάδα (NHS ester, maleimide, isothiocyanate, isocyanate κλπ) με την οποία συνδέονται χημικά είτε απευθείας με το βιομόριο (π.χ αμινοξύ με ομάδα  $-NH_2$ ,  $-SH$ ,  $-N_3$ ,  $-OH$  κλπ) είτε μέσω ενός πεπτιδίου (tag) με αυτό. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται κυρίως για *in vitro* labeling.

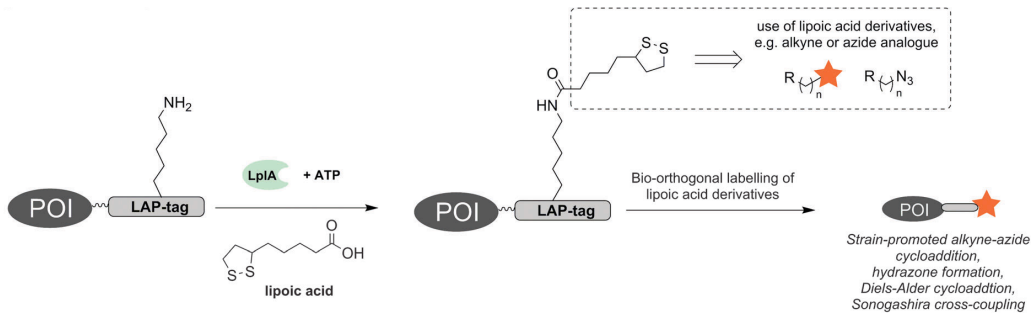


**Σχήμα 1.28** Ενδεικτικοί τρόποι χημικής σήμανσης. Το φθοροφόρο (μπλε χρώμα) συνδέεται μέσω κατάλληλης λειτουργικής ομάδας, με ομάδα  $NH_2$ ,  $-SH$ ,  $-N_3$ , ή  $-OH$  του αμινοξέος στο βιομόριο-στόχο (πράσινο χρώμα).<sup>50</sup>

**Ενζυματική σήμανση (Enzymatic labelling):** η σύνδεση του φθοροφόρου με το βιομόριο γίνεται παρουσία ενζύμου το οποίο μπορεί να δράσει ως καταλύτης ή μέσω τροποποίησής του να συμμετέχει και αυτό στη σύνδεση του φθοροφόρου με το βιομόριο (Σχήμα 1.29). Χρησιμοποιείται για *in vitro* και *in vivo* labeling.

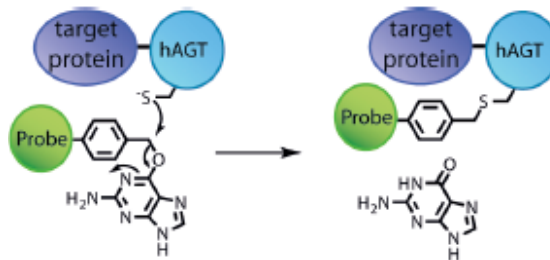
<sup>50</sup> Sahoo, H. *RSC Adv.* **2012**, 2, 7017-7029.

<sup>51</sup> Crivat, G.; Taraska, J.W. *Trends Biotechnol.* **2012**, 30 (1), 8-16.



**Σχήμα 1.29** Παραδείγμα ενζυματικής σήμανσης. Το ένζυμο Lipoic acid ligase (LplA) αναγνωρίζει μια συγκεκριμένη αλληλουχία αμινοξέων (LAP tag) τα οποία συνδέονται με την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος (POI) και καταλύει το σχηματισμό αμιδικού δεσμού μεταξύ -NH<sub>2</sub> πλευρικής ομάδας της λυσίνης που υπάρχει στο LAP tag και της ομάδας -COOH του τροποποιημένου lipoic acid. Σε δεύτερο στάδιο το τροποποιημένο lipoic acid συζεύγνεται με το φθοροφόρο (κόκκινο χρώμα).<sup>52</sup>

**Γενετικά μεσολαβούμενη σήμανση (Genetic labeling):** περιλαμβάνει τη χρήση πρωτεϊνικών τμημάτων, πεπτιδίων (SNAP, CLIP, Halo-tag) κ.ά που συνδέουν το φθοροφόρο με το βιομόριο-στόχο (Σχήμα 1.30).<sup>53</sup>



**Σχήμα 1.30** Στο SNAP-tag, το ένζυμο O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA-alkyltransferase (hAGT) είναι ενωμένο (fused) με την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος (target protein). Το ένζυμο hAGT χρησιμοποιεί ένα ετεροδιμερές υπόστρωμα γουανίνης-φθοροφόρου. Η σύνδεση του φθοροφόρου με το ένζυμο γίνεται μέσω θειοαιθερικού δεσμού.<sup>54</sup>

Στην παρούσα διατριβή θα ασχοληθούμε μόνο με τη χρήση της μεταλλοχηλικής σύζευξης φθοροφόρων με αλληλουχίες αμινοξέων πεπτιδίων (peptide tags) η οποία θα αναλυθεί ξεχωριστά στην επόμενη ενότητα.

### 1.2.5 Μεταλλοχηλική σύζευξη φθοροφόρων με αμινοξέα πεπτιδίου (peptide tags) για site-specific labeling

Η χρήση των tags, δηλαδή μικρών πεπτιδίων αποτελούμενα από συγκεκριμένες αλληλουχίες αμινοξέων που λειτουργούν ως ετικέτα, είναι ευρέως διαδεδομένη στη σήμανση πρωτεϊνών (N-τελική, C-τελική ή εσωτερικές περιοχές) λόγω του ευέλικτου και μικρού μεγέθους τους, καθώς δεν παρεμβαίνουν στη λειτουργία της πρωτεΐνης. Σε αυτή την περίπτωση το φθοροφόρο ενώνεται επιλεκτικά και μη ομοιοπολικά με συγκεκριμένα κατάλοιπα αμινοξέων του tag, μέσω του μετάλλου ενός χηλικού υποκαταστάτη (ligand). Η χρήση της μεταλλοχηλικής σύζευξης προσφέρει μεγάλη επιλεκτικότητα, αποτελεσματικότητα και ευκολία, και την καθιστά μια από τις πιο σημαντικές τεχνικές σήμανσης των μορίων-στόχων.<sup>55</sup>

<sup>52</sup> Lotze, J.; Reinhardt, U.; Seitz, O.; Beck-Sickinger, A.G. *Mol. BioSyst.* **2016**, 12 (6), 1731-1745.

<sup>53</sup> Schneider, A.F.L.; Hackenberger, C.P.R. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2017**, 48, 61-68.

<sup>54</sup> Jing, C.; Cornish, V.W. *Acc. Chem. Res.* **2011**, 44 (9), 784-792.

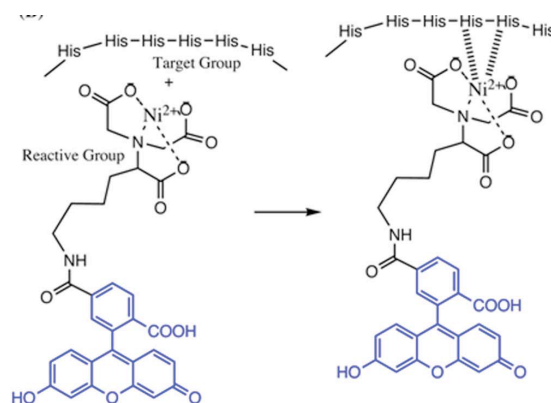
<sup>55</sup> You, C.; Piehler, J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, 406, 3345-3357.



Υπάρχουν αρκετά tags τα οποία αναφέρονται σε στόχευση πρωτεϊνών. Θα εστιάσουμε μόνο στα μοτίβα που περιλαμβάνουν τη χρήση μεταλλοχηλικού συμπλόκου του φθοροφόρου με τα αμινοξέα του tag.

### A) His-tag

Το His-tag<sup>56,59</sup> είναι ένα πεπτίδιο αποτελούμενο από μια αλληλουχία αμινοξέων ιστονίνης (His, συνήθως 6-10 His αλλά μπορεί να υπάρχουν και λιγότερες από 6). Η προς σήμανση πρωτεΐνη ενδιαφέροντος συνδέεται με την αλληλουχία αυτή σε N-τελικό ή C-τελικό άκρο (μέσω τεχνικών ανασυνδυασμένου DNA, κλωνοποίηση). Η επιτυχής σήμανση της επιθυμητής πρωτεΐνης επιτυγχάνεται με τη μη ομοιοπολική αλληλεπίδραση των His του tag με το φθοροφόρο. Συγκεκριμένα, κατάλληλα τροποποιημένο φθοροφόρο συνδέεται ομοιοπολικά με ένα χηλικό ligand (συνήθως νιτριλοτριοξικό οξύ, NTA<sup>57</sup>, ή ιμινοδιοξικό οξύ, IDA) μέσω του οποίου συναρμόζεται με ένα δισθενές μέταλλο μετάπτωσης (συνήθως Ni<sup>2+</sup>) το οποίο αλληλεπιδρά μη ομοιοπολικά (με δεσμό συναρμογής) με τα αμινοξέα His (Σχήμα 1.31).<sup>58</sup>



**Σχήμα 1.31** Φλουορεσκεΐνη (φθοροφόρο, μπλε χρώμα) ενωμένο μέσω Ni<sup>2+</sup>-NTA με His-tag για σήμανση.<sup>72</sup>

Φθοροφόρα που έχουν χρησιμοποιηθεί με Ni<sup>2+</sup>-NTA και His-tag για αυτό το σκοπό περιλαμβάνουν φλουορεσκεΐνη (fluorescein) και παράγωγά της,<sup>59</sup> ροδαμίνη και παράγωγά της,<sup>60</sup> κυανίνες (π.χ Cy3, Cy5),<sup>61</sup> διβρομοβιμάνιο (dibromobimane),<sup>62</sup> περυλένια,<sup>63</sup> κουμαρίνες,<sup>64</sup> BODIPY<sup>65</sup> κ.ά.

Έχει αναφερθεί η σύζευξη φθοροφόρων που φέρουν 1, 2, 3 ή και 4 παράγωγα NTA. Η ύπαρξη περισσότερων ομάδων NTA (>1) που συνδέονται με το φθοροφόρο προσφέρει μεγάλη σταθεροποίηση και συγγένεια σύνδεσης κατά την αλληλεπίδραση με το His-tag ( $K_d = 0.1$  nM).<sup>66,67</sup>

<sup>56</sup> Hochuli, E.; Bannwarth, W.; Döbeli, H.; Gentz, R.; Stüber, D. *Nat. Biotechnol.* **1988**, 6 (11), 1321-1325.

<sup>57</sup> <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/3527600418.mb13913vere4514>

<sup>58</sup> Salam, A.; Aoki, K. *Inorg. Chim. Acta.* **2000**, 311, 15-24.

<sup>59</sup> Goldsmith, C.R.; Jaworski, J.; Sheng, M.; Lippard, S.J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 418-419.

<sup>60</sup> Guignet, E.G.; Hovius, R.; Vogel, H. *Nat. Biotechnol.* **2004**, 22, 440-444.

<sup>61</sup> (a) Mujumdar, R.; Ernst, L.; Mujumdar, S.; Lewis, C.; Waggoner, A. *Bioconjug. Chem.* **1993**, 4, 105-111. (b) Kapanidis, A. N.; Ebright, Y. W.; Ebright, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 12123-12125.

<sup>62</sup> Krishnan, B.; Szymanska, A.; Gierasch, L.M. *Chem. Biol. Drug. Des.* **2007**, 69, 31-40.

<sup>63</sup> Peneva, K.; Mihov, G.; Herrmann, A.; Zarrabi, N.; Börsch, M.; Duncan, T.M.; Müllen, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 5398-5399.

<sup>64</sup> Lai et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2015**, 112 (10), 2948-2953.

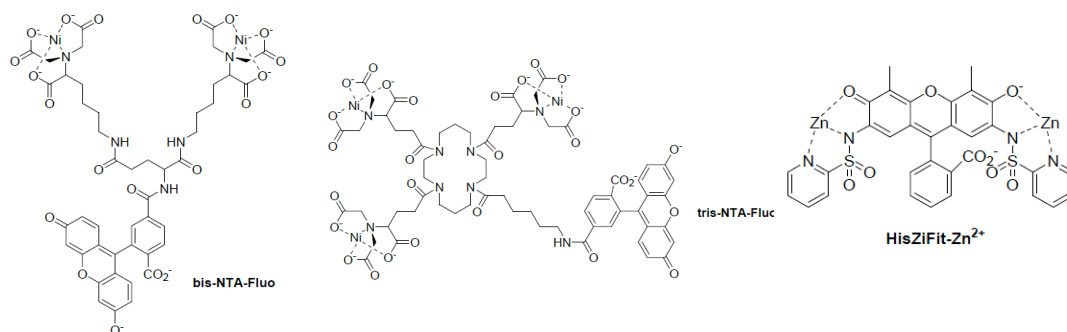
<sup>65</sup> Brellier et al. *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51, 1269-1272.

<sup>66</sup> Lata, S.; Reichel, A.; Brock, R.; Tampe, R.; Piehler, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 10205-10215.

<sup>67</sup> Lata, S.; Gavutis, M.; Tampe, R.; Piehler, J.; *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 2365-2372.

Κατά τη συμπλοκοποίηση του φθοροφόρου-NTA με το  $\text{Ni}^{2+}$  έχει παρατηρηθεί γενικά αυξημένη απόσβεση φθορισμού λόγω του παραμαγνητισμού του  $\text{Ni}^{2+}$  που πιθανώς οφείλεται σε μεταφορά  $e^-$  (photoinduced electron transfer) ή ενέργειας. Υπήρξαν ωστόσο δοκιμές με άλλα φθοροφόρα (φλουορεσκεΐνη)<sup>59</sup> καθώς και με φθοροφόρα που συνδέονταν με 2 ή και 3 ομάδες NTA στα οποία η απόσβεση του φθορισμού ήταν μικρότερη. Συνεπώς, η μείωση του φθορισμού που παρουσιάζεται μετά τη συμπλοκοποίηση του φθοροφόρου-NTA με το  $\text{Ni}^{2+}$  εξαρτάται κατά κύριο λόγο από το μέταλλο αλλά και από το εκάστοτε φθοροφόρο, από τον αριθμό των ομάδων NTA καθώς και την απόσταση NTA-φθοροφόρου.<sup>66,67</sup>

Άλλα μέταλλα που έχουν χρησιμοποιηθεί για αυτό το σκοπό είναι  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ <sup>68</sup> κλπ. Επίσης, αναφέρεται η χρήση του μεταλλοχηλικού μοτίβου σύνδεσης τόσο με διαφοροποιημένα His-tag (His<sub>6</sub>-Tr<sub>3</sub>-tag)<sup>69</sup> όσο και με διαφοροποιημένα φθοροφόρα χωρίς NTA (π.χ HisZiFit-Zn<sup>2+</sup>).<sup>70,71</sup> Πέραν των εξαιρέσεων που αναφέραμε, το πλέον χρησιμοποιούμενο μοτίβο για σήμανση είναι αυτό του μεταλλοχηλικού συμπλόκου του  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-φθοροφόρου με τις δυο ιστιδίνες του His-tag.



**Σχήμα 1.32** i) (αριστερά και μέσο) Φλουορεσκεΐνη ενωμένη με 2 και 3 μονάδες NTA, ii) (δεξιά) φθοροφόρο HisZiFit συμπλοκοποιημένο με  $\text{Zn}^{2+}$ .<sup>72</sup>

Το μοτίβο NTA- $\text{Ni}^{2+}$ -His-tag αναπτύχθηκε αρχικά για την ακινητοποίηση, ανίχνευση και τον καθαρισμό<sup>73</sup> πρωτεϊνών με His-tag με χρωματογραφία συγγένειας (Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography (IMAC)).<sup>74</sup> Πλέον χρησιμοποιείται σε πάρα πολλές εφαρμογές μερικές από τις οποίες είναι η επιτόπια σήμανση πρωτεϊνών με φθορίζουσες χρωστικές, κβαντικές κουκίδες (quantum dots, QDs), διπλοστοιβάδες φωσφολιπιδίων κ.ά, ως τρόπος σύνδεσης λιπιδίων/λιπιδιωμάτων<sup>75</sup> με μεμβρανικές πρωτεΐνες που φέρουν His-tag,<sup>76</sup> και πολλές άλλες.<sup>77,78,79</sup>

Η μη ομοιοπολική μεταλλοχηλική σύζευξη μεταξύ του φθοροφόρου με το NTA- $\text{Ni}^{2+}$  και του His-tag προσφέρει αυξημένη επιλεκτικότητα σήμανσης και χρησιμοποιείται *in vitro* και σε ζωντανά κύτταρα, για σήμανση μεμβρανικών πρωτεϊνών (π.χ. υποδοχέας

<sup>68</sup> (a) Wegner, S.V.; J.P. Spatz. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 7593-7596. (b) Honda, K.; Nakata, E.; Ojida, A.; Hamachi, I. *Chem. Commun.* **2006**, 4024-4026.

<sup>69</sup> Soh, N.; Seto, D.; Nakano, K.; Imato, T. *Mol. BioSyst.* **2006**, 2, 128-131.

<sup>70</sup> Hauser, C.T.; Tsien, R.Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2007**, 104, 3693-3697.

<sup>71</sup> Fujishima, S.; Nonaka, H.; Uchinomiya, S.; Kawase, Y.A.; Ojida, A.; Hamachi, I. *Chem. Commun.* **2012**, 48, 594-596.

<sup>72</sup> Soh, N. *Sensors.* **2008**, 8, 1004-1024.

<sup>73</sup> (a) Hochuli, E.; Döbeli, H.; Schacher, A. *J. Chromatogr.* **1987**, 411, 177-184. (b) Ueda et al. *J. Chromatogr. A.* **2003**, 988, 1-23. (c) Block, H.; Maertens, B.; Spriestersbach, A.; Brinker, N.; Kubicek, J.; Fabis, R.; Labahn, J.; Schäfer, F. *Methods Enzymol.* **2009**, 463, 439-473.

<sup>74</sup> (a) Porath et al. *Nature.* **1975**, 258, 598-599. (b) Porath, J. *Protein Expr. Purif.* **1992**, 3 (4), 263-281.

<sup>75</sup> Huang et al. *Bioconjugate Chem.* **2006**, 17 (6), 1592-1600.

<sup>76</sup> Lata, S.; Piehler, J. *Nat. Protoc.* **2006**, 1, 2104-2109.

<sup>77</sup> Shao et al. *Nat. Chem.* **2015**, 7(5), 438-446.

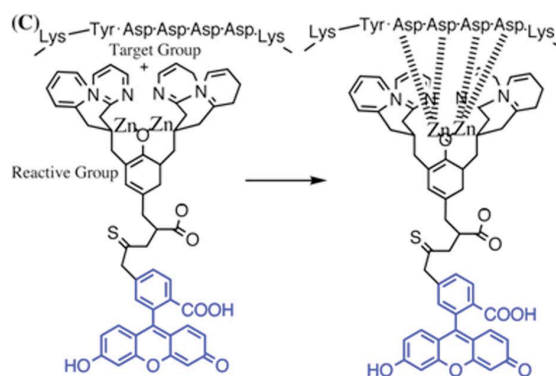
<sup>78</sup> Bruening et al. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **2016**, 8 (16), 10164-10173.

<sup>79</sup> Graff, R.A.; Swanson, T.M.; Strano, M.S. *Chem. Mater.* **2008**, 20 (5), 1824-1829.

σεροτονίνης, ιντερφερόνης κλπ.) στην επιφάνεια ζωντανών κυττάρων. Παρ'όλα αυτά έχουν αναφερθεί παραδείγματα ενδοκυττάριας σήμανσης αρκεί το φθοροφόρο να μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη<sup>64</sup> ή να είναι ενωμένο με αλληλουχία αμινοξέων (πεπτιδίο) που διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη (cell-penetrating peptide).<sup>80</sup>

### B) Oligoaspartate-tag

Χαρακτηριστικό γνώρισμα του Oligoaspartate-tag είναι ότι αποτελείται από αλληλουχία αμινοξέων ασπαρτικού (Asp). Ανάλογα με τον αριθμό των Asp έχουν αναπτυχθεί διάφορα tags όπως τα: D<sub>4</sub> tag ([D<sub>4</sub>]<sub>n</sub>, με n=1-3)<sup>81</sup> και FLAG tag το οποίο αποτελείται από την αλληλουχία (-Lys-Tyr-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-) με κύριο χαρακτηριστικό τα 4 αμινοξέα ασπαρτικού (Asp). Το φθοροφόρο είναι συζευγμένο με ένα διπυρηνικό μεταλλικό σύμπλοκο M<sup>2+</sup>-DpaTyr (2,2'-dipicolylamine, Dpa, όπου M: Zn<sup>2+</sup>) μέσω του οποίου συναρμόζεται με τις τέσσερις καρβοξυλικές ομάδες των Asp στο tag (Σχήμα 1.33).<sup>69,82</sup>



**Σχήμα 1.33** Φλουορεσκεΐνη (μπλε χρώμα) συζευγμένη με μεταλλοχηλικό σύμπλοκο Zn<sup>2+</sup>-DpaTyr, το οποίο αλληλεπιδρά μη ομοιοπολικά με τέσσερα Asp στο tag (εικόνα 2.5).<sup>72</sup>

Ο τρόπος σύνδεσης του φθοροφόρου στο D<sub>4</sub> tag είναι ανάλογος με αυτόν του NTA-Ni<sup>2+</sup>-His-tag.<sup>83</sup> Η συγγένεια του συμπλόκου με το D<sub>4</sub> tag (K<sub>d</sub>=1.4 μM) αυξάνεται με τον αριθμό των Asp και των ομάδων πρόσδεσης στο tag (Σχήμα 1.33). Αυξημένη συγγένεια σύνδεσης με το tag έχει παρατηρηθεί επίσης με μέταλλο το Ni<sup>2+</sup> καθώς και με διαφοροποιήσεις τόσο στην αλληλουχία του tag όσο και στον τρόπο σύνδεσής του με το φθοροφόρο (Σχήμα 1.34).<sup>84,85</sup>

Φθοροφόρα που έχουν χρησιμοποιηθεί για αυτό το σκοπό περιλαμβάνουν: φλουορεσκεΐνη, κυανίνη, ροδαμίνη κλπ.

<sup>80</sup> Wieneke, R.; Labòria, N.; Rajan, M.; Kollmannsperger, A.; Natale, F.; Cardoso, M.C.; Tampe', R. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136 (40), 13975-13978.

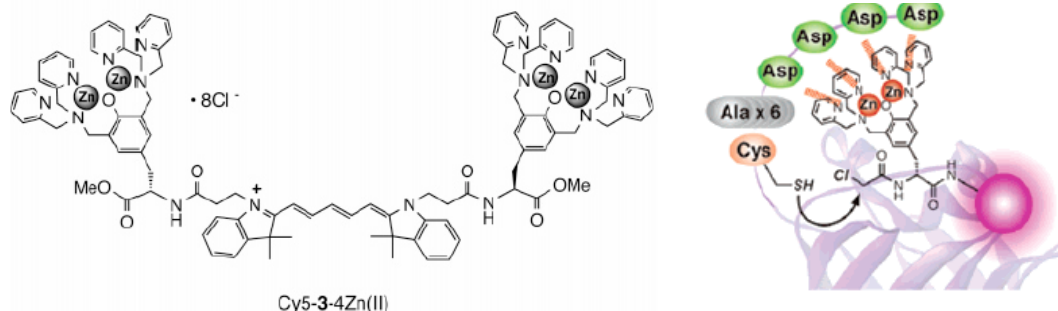
<sup>81</sup> Ojida, A.; Honda, K.; Shinmi, D.; Kiyonaka, S.; Mori, Y.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 10452-10459.

<sup>82</sup> Adams, H.; Bradshaw, D.; Fenton, D.E. *Inorg. Chim. Acta.* **2002**, 332, 195-200.

<sup>83</sup> Fujishima, S.; Nonaka, H.; Uchinomiya, S.; Kawase, Y.A.; Ojida, A.; Hamachi, I. *Chem. Commun.* **2011**, 48, 594-596.

<sup>84</sup> Nonaka, H.; Tsukiji, S.; Ojida, A.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 15777-15779.

<sup>85</sup> Ojida, A.; Fujishima, S.H.; Honda, K.; Nonaka, H.; Uchinomiya, S.H.; Hamachi, I. *Chem. Asian J.* **2010**, 5, 877-886.



**Σχήμα 1.34** i) (αριστερά): Κυανίνη (Cy5) συζευγμένη με τετραπυρηνικό σύμπλοκο Zn<sup>2+</sup>-Dpa.<sup>45</sup> ii) (δεξιά): φθοροφόρο αλληλεπιδρά μη ομοιοπολικά με το CA<sub>6</sub>D<sub>4</sub> tag και ταυτόχρονα συνδέεται ομοιοπολικά μέσω N-a-chloroacetyl ομάδας με αμινοξύ Cys του tag.<sup>34</sup>

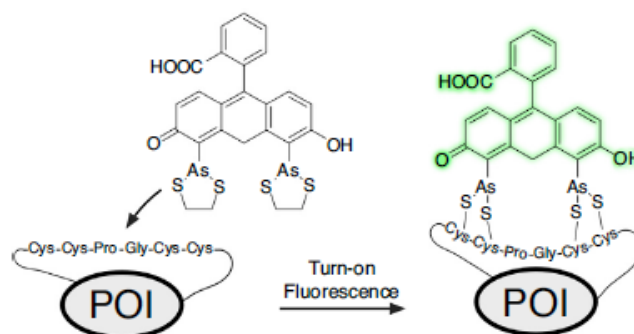
Και σε αυτήν την περίπτωση επιτυγχάνεται αυξημένη επιλεκτικότητα σήμανσης. Το Oligoaspartate-tag χρησιμοποιείται κυρίως για *in vitro* σήμανση μεμβρανικών πρωτεϊνών ενώ έχουν γίνει δοκιμές και σε ζωντανά κύτταρα *E.coli*.<sup>86</sup>

#### Συστήματα εμπνευσμένα από τη μεταλλοχηλική σύζευξη χωρίς μέταλλο

Άλλα συστήματα εμπνευσμένα από τη μεταλλοχηλική σύζευξη στα οποία η σύνδεση του tag με το φθοροφόρο γίνεται απουσία μετάλλου, με ομοιοπολικό δεσμό περιλαμβάνουν τη χρήση: tetracysteine/bioarsenical dye tag (Σχήμα 1.35) και tetraserine-RhoBo tag (Σχήμα 1.37).

#### Tetracysteine/bioarsenical dye tag και Tetraserine-RhoBo tag.

Χρωστικές που φέρουν δυο As<sup>3+</sup> αναπτύχθηκαν από τον Griffin και τους συνεργάτες του. Οι χρωστικές αυτές φθορίζουν μετά τη σύζευξη με το tag (fluorogenic) που αποτελείται από αλληλουχία συνήθως 6 αμινοξέων με κύριο την κυστεΐνη (Cys). Η αλληλουχία των αμινοξέων του tag (Tsien και συνεργάτες του) είναι -Cys-Cys-X-X-Cys-Cys- όπου X μπορεί να είναι οποιοδήποτε αμινοξύ εκτός κυστεΐνης, με πιο συνηθισμένη την αλληλουχία -Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys-.<sup>87,88</sup>



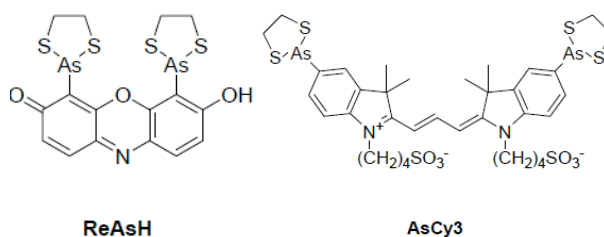
**Σχήμα 1.35** Σήμανση πρωτεΐνης ενδιαφέροντος (POI) με Tetracysteine/bioarsenical dye tag. Το φθοροφόρο φλουορεσκέϊνη (FIAsH, πράσινο χρώμα) ενώνεται ομοιοπολικά μέσω των As στο tag.

<sup>86</sup> Honda, K.; Nakata, E.; Ojida, A.; Hamachi, I. *Chem. Commun.* **2006**, 4024-4026.

<sup>87</sup> Griffin, B.A.; Adams, S.R.; Tsien, R.Y. *Science*. **1998**, *281*, 269-272.

<sup>88</sup> Adams, S.R.; Campbell, R.E.; Gross, L.A.; Martin, B.R.; Walkup, G.K.; Yao, Y.; Llopis, J.; Tsien, R.Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6063-6076.

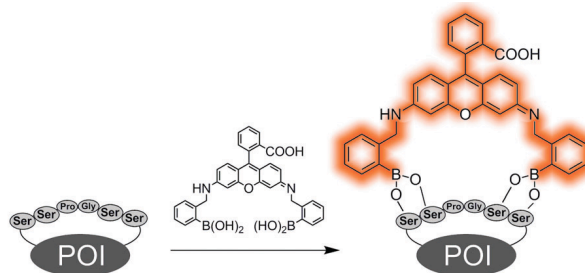
Η χρωστική μέσω των δυο  $\text{As}^{3+}$  ενώνεται με τις  $-\text{SH}$  ομάδες της εκάστοτε Cys (1 ζεύγος Cys ανά άτομο As). Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιας χρωστικής είναι η φλουορεσκεΐνη (Σχήμα 1.35). Άλλα φθοροφόρα συζευγμένα με  $\text{As}^{3+}$  που έχουν μελετηθεί με το Tetracysteine tag περιλαμβάνουν παράγωγα φλουορεσκεΐνης (π.χ FIAsH, CrAsH, CHoXAsH), ReAsH, κυανίνης (AsCy3) κ.ά. με πιο αποτελεσματικό το τελευταίο ( $K_d=80 \text{ nM}$ ,<sup>89</sup> Σχήμα 1.36).



**Σχήμα 1.36** Φθοροφόρα ReAsH, AsCy3 που χρησιμοποιούνται με το Tetracysteine tag.

Το μικρό μέγεθος των χρωστικών (<1 KDa), η ικανότητά τους να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και η επιλεκτικότητα σήμανσης αποτελούν τα πλεονεκτήματα χρήσης του Tetracysteine/bioarsenical dye tag. Η αυξημένη όμως τοξικότητα λόγω  $\text{As}^{3+}$  και η σήμανση υποβάθρου (background labeling) περιορίζει τη χρήση τους.

Αντίστοιχο με το Tetracysteine/bioarsenical dye tag είναι το Tetraserine-RhoBo tag (Schepartz και συνεργάτες), όπου αντί αμινοξέα Cys υπάρχουν αμινοξέα σερίνης (Ser, Εικόνα 1.37).<sup>90</sup>



**Σχήμα 1.37** Tetraserine-RhoBo tag: Σήμανση πρωτεΐνης ενδιαφέροντος (POI) με tag αποτελούμενο από την αλληλουχία  $-\text{Ser-Ser-Pro-Gly-Ser-Ser}-$ . Το φθοροφόρο ροδαμίνη (πορτοκαλί χρώμα) ενώνεται ομοιοπολικά μέσω των διβωρονικών ομάδων (bisboronate) με τα τέσσερα αμινοξέα σερίνης (Ser).

## 1.2.6 Χρήση πορφυρινικών παραγώγων για labeling πρωτεϊνών/πεπτιδίων μέσω μεταλλοχηλικής σύζευξης

### Πορφυρίνες και σήμανση

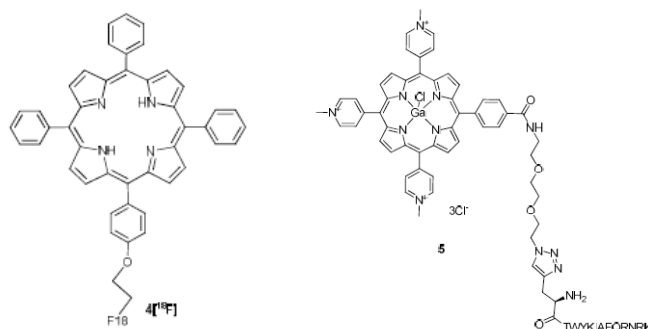
Έχει αναφερθεί η χρήση πορφυρινικών παραγώγων είτε μεταλλωμένων με ραδιοϊσότοπα (radiolabels,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{68/67}\text{Ga}$ ,  $^{140}\text{Nd}$ ,  $^{166}\text{Ho}$  κ.ά), είτε τροποποιημένων περιφερειακά (π.χ  $^{18}\text{F}$ ,  $^{14}\text{O}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{11}\text{C}$ ) καθώς και συζεύγματα πορφυρινών με μονοκλωνικά αντισώματα με απώτερο στόχο απεικόνιση όγκων και φωτοδυναμική θεραπεία (Σχήμα 1.38).<sup>91,92,93,94</sup>

<sup>89</sup> Cao, H.; Xiong, Y.; Wang, T.; Chen, B.; Squier, T.C.; Mayer, M.U. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8672-8673.

<sup>90</sup> Halo, T.L.; Appelbaum, J.; Hobert, E.M.; Balkin, D.M.; Schepartz, A.; *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 438-439.

<sup>91</sup> Bedel-Cloutour et al. *Bioconjug. Chem.* **1996**, *7* (6), 617-627.

<sup>92</sup> Fazaeli et al. *Radiochim. Acta.* **2016**, 1-10.



**Σχήμα 1.38** Παραδείγματα πορφυρινικών παραγώγων με ραδιοϊσότοπα για απεικόνιση όγκων και φωτοδυναμική θεραπεία : **(αριστερά)** 5-(2-[ $^{18}\text{F}$ ]fluoroethoxyphenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin, **(δεξιά)** [ $^{68}\text{Ga}$ ]-5-[4-2-(2-(2-triazole-ethoxy)ethoxy)ethanaminocarbonyl]phenyl]-10,15,20-tris(1-methylpyridinium-4-yl)porphyrin trichloride συζευγμένη με πεπτιδίιο.<sup>93,94</sup>

Η χρήση πορφυρινικών μορίων για σήμανση πρωτεϊνών/πεπτιδίων είναι περιορισμένη και αφορά κυρίως ανοσοδοκιμές (ELISA).

#### Παραδείγματα

Μεταλλωμένα πορφυρινικά παράγωγα όπως Pt-meso-tetra(4-carboxyphenyl)porphine (PTP) και Pt-Corproorphyrin (PTCP) έχουν χρησιμοποιηθεί συζευγμένα με αντισώματα και strept(avidin) για ανοσοδοκιμές (ELISA) καθώς και για ανίχνευση αλληλουχιών DNA και RNA με FISH (Fluorescent In Situ Hybridization).<sup>95</sup>

Έχει αναφερθεί επίσης η χρήση τροποποιημένων τετραφαίνυλο πορφυρινών με μαλεϊμίδιο για *in vitro* χημική σήμανση ροδοφίνης (Rh) που φέρει κατάλοιπα κυστείνης μέσω θειοαιθερικού δεσμού (Σχήμα 1.39).<sup>96</sup>



**Σχήμα 1.39** Πορφυρινικά παράγωγα με ομάδα μαλεϊμιδίου που έχουν χρησιμοποιηθεί για *in vitro* σήμανση ροδοφίνης (Rh) μέσω θειοαιθερικού δεσμού μεταξύ του μαλεϊμιδίου της πορφυρίνης και των κυστεϊνών Cys140 και Cys316 (χημική σήμανση).<sup>95</sup>

<sup>93</sup> Simões et al. *RSC Adv.* **2015**, 5, 99540-99546.

<sup>94</sup> Bryden, F.; Savoie, H.; Rosca, E.V.; Boyle, R.W. *Dalton Trans.* **2015**, 44 (11), 4925-4932.

<sup>95</sup> de Haas et al. *J. Histochem. Cytochem.* **1997**, 45, 1279-1292.

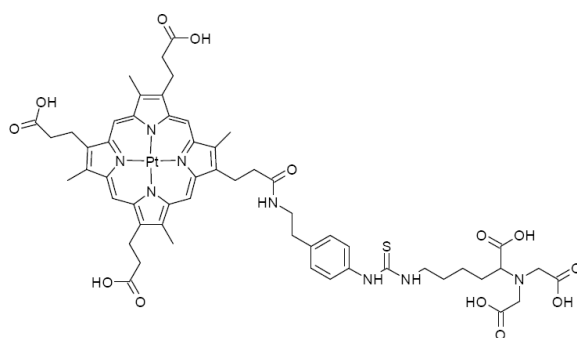
<sup>96</sup> Chen, Y.; Parr, T.; Holmes, A.E.; Nakanishi, K. *Bioconjug. Chem.* **2008**, 19 (1), 5-9.



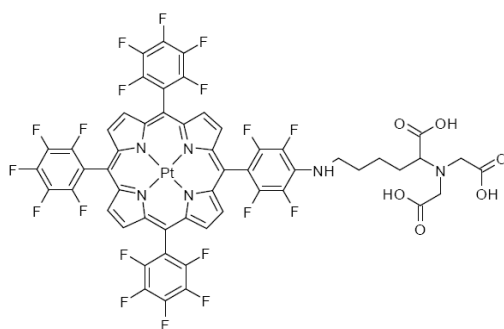
### Μεταλλοχηλική σύζευξη πορφυρινών με πεπτιδία για σήμανση

Στη μεταλλοχηλική σύζευξη φθοροφόρων με αμινοξέα πεπτιδίου (tag) για σήμανση (labeling, τμήμα 1.2) συμμετέχουν κατά κύριο λόγο μικρά οργανικά μόρια. Ελάχιστες είναι οι αναφορές που αφορούν τη χρήση πορφυρινικών παραγώγων για αυτό το σκοπό.

Το 2016 η ομάδα του Dmitriev<sup>97</sup> δημοσίευσε ένα άρθρο σχετικά με τη χρήση μεταλλωμένων πορφυρινικών παραγώγων συζευγμένων με M-NTA (όπου M: Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Σχήματα 1.40 και 1.41) για διάφορους σκοπούς, μεταξύ των οποίων και για σήμανση (labeling) πρωτεϊνών/πεπτιδίων που φέρουν His (Σχήμα 1.42). Η χρήση μεταλλωμένων πορφυρινικών παραγώγων που φωσφορίζουν δεν έχει διερευνηθεί ενδελεχώς στον τομέα της μοριακής αναγνώρισης ως ανιχνευτές (probes).



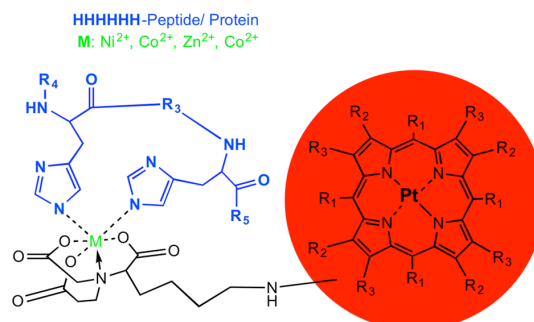
**Σχήμα 1.40** Δομή της ένωσης PtCP-NTA Pt(II)-coproporphyrin I isothiocyanate (PtCP-NCS).



**Σχήμα 1.41** Δομή της ένωσης PtTFPP-NTA (Pt(II)-meso-tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin (PtTFPP)).

Η μεταλλοχηλική σύζευξη M<sup>2+</sup>-NTA αποτελεί ένα από τα μοτίβα σύνδεσης του φθοροφόρου με το προς ανίχνευση πεπτιδίο/ πρωτεΐνη όπως είδαμε στην αντίστοιχη ενότητα.

<sup>97</sup> Dmitriev, R.I.; O'Donnell, N.; Papkovsky, D.B. *Bioconjug. Chem.* **2016**, *27*, 439-445.



**Σχήμα 1.42** Μεταλλοχηλική σύζευξη μεταλλωμένου πορφυρινικού παραγώγου με πεπτίδιο His-tag για σήμανση (labeling).

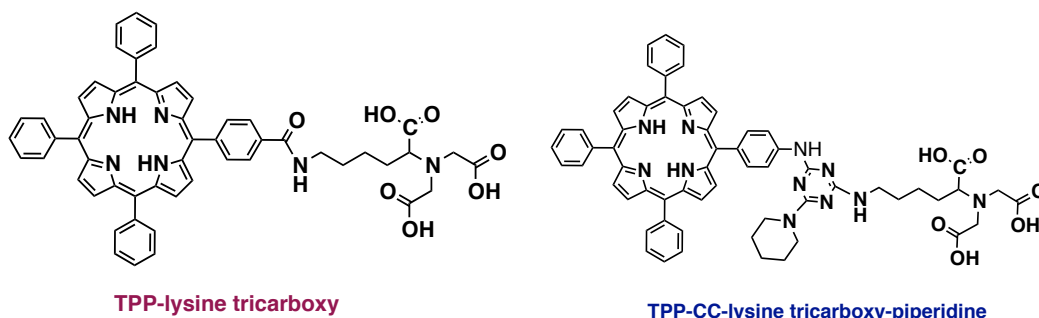
Λαμβάνοντας υπόψη τα όσα αναφέρθηκαν, αποφασίσαμε να διερευνήσουμε την έρευνα στη χρήση πορφυρινικών μορίων με χηλικό υποκαταστάτη (ligand) NTA, τα οποία συμπλοκοποιούνται μέσω του Ni<sup>2+</sup> με κατάλοιπα αμινοξέων His, με στόχο σήμανση πεπτιδίων και κατ' επέκταση πρωτεϊνών που φέρουν His. Προτείνουμε τη σύνθεση δυο νέων δυάδων ελεύθερης πορφυρίνης με NTA, για αλληλεπίδραση μέσω του Ni<sup>2+</sup> με πεπτίδιο που φέρει την αλληλουχία RGD-SGAIITIG-H, όπου στο C-τελικό άκρο φέρει αμινοξύ ιστιδίνη (His).



### Σκοπός εργασίας

Χηλικοί υποκαταστάτες (chelating ligands) όπως είναι το NTA (nitrilotriacetic acid) και το IDA (iminodiacetic acid) χρησιμοποιούνται για διάφορους σκοπούς όπως: καθαρισμός, απομόνωση, σήμανση πρωτεϊνών, κλπ.

Ορμώμενοι από τα βιβλιογραφικά δεδομένα που αφορούν τη μεταλλοχηλική σύζευξη φθοροφόρου με  $Ni^{2+}$ -NTA για σήμανση πρωτεϊνών που φέρουν πεπτιδίο His-tag, προτείνουμε τη χρήση πορφυρινικών παραγώγων για σήμανση πεπτιδίου που στο C-τελικό άκρο φέρει His. Οι συνθετικές προσεγγίσεις που προτείνουμε αφορούν πορφυρίνες συζευγμένες με NTA είτε απευθείας (αμιδικός δεσμός) είτε μέσω cyanuric chloride ως γέφυρα. Στο σχήμα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι δομές των δυάδων που προτάθηκαν.



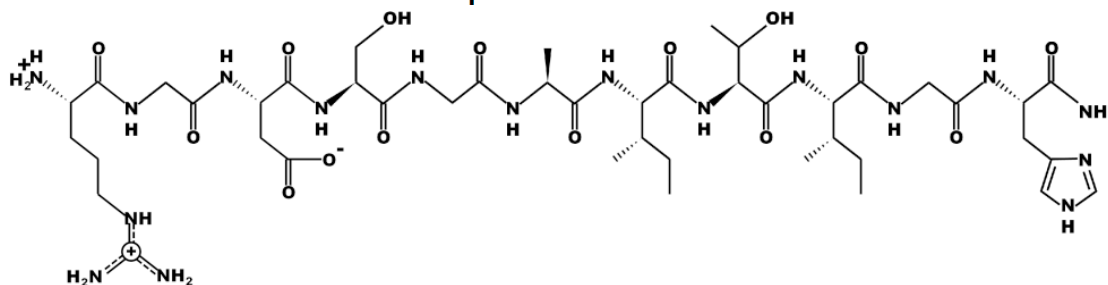
### Σχήμα 1. Προτεινόμενες δυάδες πορφυρίνης με NTA.

Ειδικότερα για το πεπτιδίο στο οποίο θα γίνουν οι δοκιμές έχουμε:

Peptide Sequence: RGD-SGAIITIG-H

- Molecular Formula:  $C_{44}H_{75}N_{17}O_{15}$
- Molecular Weight: 1082.19 g/mol
- Isoelectric point (pI): 7.52

### Peptide Structure



Το πεπτιδίο είναι εμπορικά διαθέσιμο από την εταιρεία Genecust με καθαρότητα 95%.

## Κεφάλαιο 2: Συνθετικές προσεγγίσεις

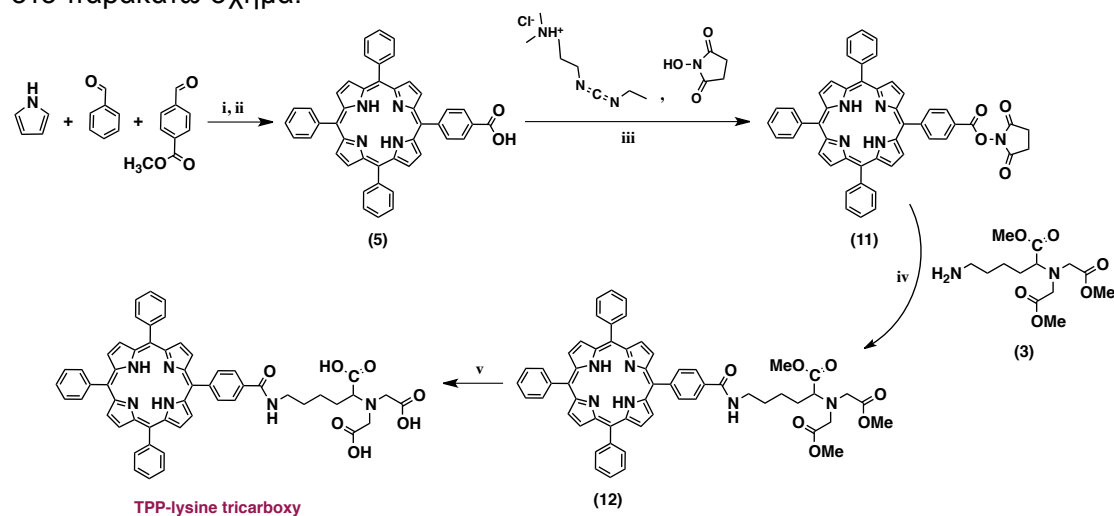
Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η σύνθεση δυο δυάδων που φέρουν πορφυρίνη και ένα χηλικό υποκαταστάτη (ligand), για σήμανση (labeling) πεπτιδίου που στο C-τελικό άκρο έχει αμινοξύ His. Η σύνθεση των δυάδων που αναφέραμε περιλαμβάνει ένα χηλικό υποκαταστάτη (ligand), το νιτριλοτριοξικό οξύ (nitritotriacetic acid, NTA) και μια πορφυρίνη. Για τη σύνθεση των δυάδων πορφυρίνης με NTA χρειάστηκε να ξεκινήσουμε από τη σύνθεση της εκάστοτε πορφυρίνης και του NTA για τη σύζευξη. Για τη σύνθεση του NTA ξεκινάμε από την πρόδρομή του ένωση που είναι το προστατευμένο αμινοξύ λυσίνη (Nα-(Carbobenzyloxy)-L-lysine ή απλά Cbz-lysine).

Στην πρώτη δυάδα η σύνδεση των μορίων γίνεται μέσω αμιδικού δεσμού, ενώ στη δεύτερη δυάδα μέσω μιας γέφυρας cyanuric chloride (CC).

Ο χαρακτηρισμός των ενώσεων έγινε στις μη υδρολυμένες μορφές των δυάδων με φασματομετρία μάζας (MALDI-TOF), φασματοσκοπία NMR και φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-Vis). Οι τελικές δυάδες χαρακτηρίστηκαν μόνο με φασματομετρία μάζας λόγω της μικρής διαλυτότητάς τους σε οργανικούς διαλύτες.

### 2.1 Σύνθεση της δυάδας TPP-lysine tricarboxy

Η σύνθεση της δυάδας **TPP-lysine tricarboxy** με τον αμιδικό δεσμό απεικονίζεται στο παρακάτω σχήμα.



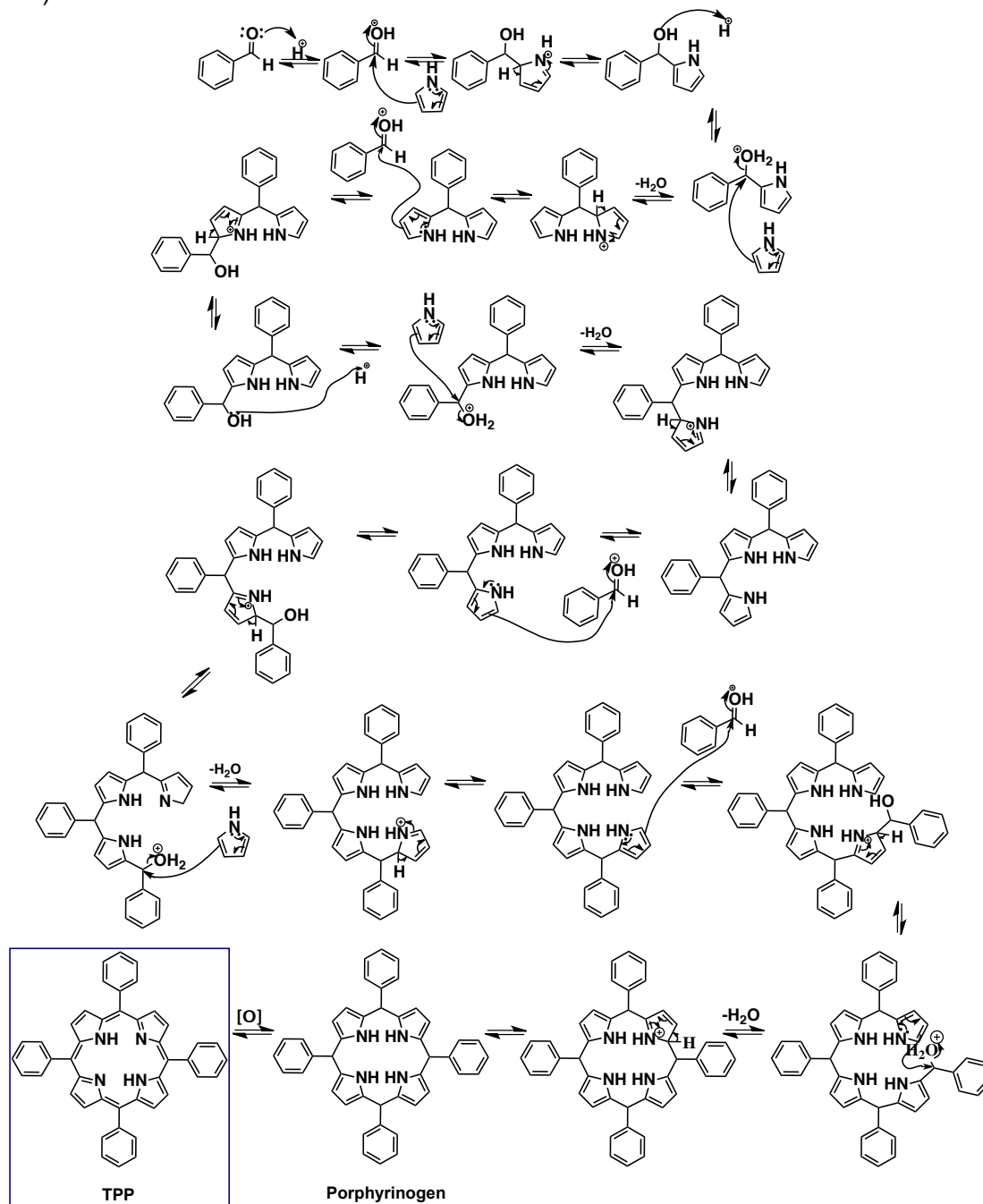
#### Σχήμα 2.1

Συνθετική προσέγγιση για τη δυάδα TPP-lysine tricarboxy. Πειραματικές συνθήκες και αντιδραστήρια: **i)** propionic acid, reflux, 3 hrs, α=16.1%, **ii)** THF, MeOH, KOH (aq), rt, 24 hrs, α=98.3%, **iii)** EDC, NHS, DMF, rt, 24 hrs, **iv)** DMF, Et<sub>3</sub>N, rt, 4 days, α=43.05%, **v)** LiOH.H<sub>2</sub>O, MeOH/THF (1:1), rt, 4 days, α=96.2% .

Για να καταστεί δυνατή η σύνθεση της δυάδας **TPP-lysine tricarboxy** (Σχήμα 2.1) είναι απαραίτητη αρχικά η σύνθεση της πορφυρίνης. Για τη σύνθεση των πορφυρινικών παραγώγων έχουν προταθεί ποικίλα συνθετικά πρωτόκολλα με πιο γνωστά αυτά των Rothmund, Adler & Longo, Lindsey κλπ, ανάλογα με την υποκατάσταση στην *a*, *b* ή *meso* θέση του πορφυρινικού δακτυλίου.<sup>98</sup>

<sup>98</sup> (a) Cavaleiro, J.A.S.; Smith, K.M. *Rev. Port. Quím.* **1989**, *31*, 29-41. (b) Smith, K.M. *New J. Chem.* **2016**, *40*, 5644-5649.

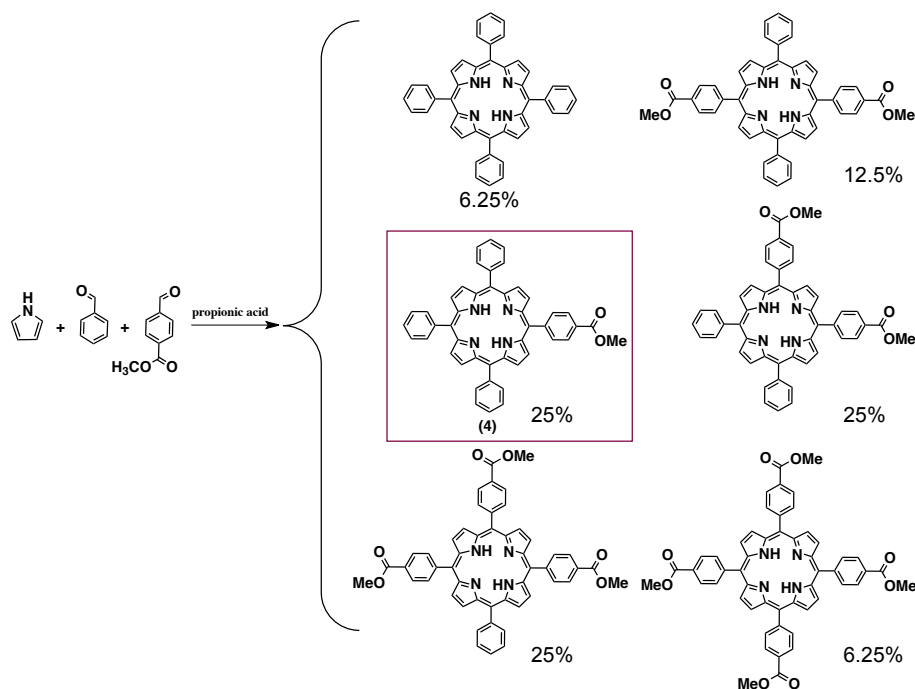
Η σύνθεση του πορφυρινικού παραγώγου (**5**) πραγματοποιήθηκε μέσω μιας όξινα καταλυόμενης αντίδρασης μικτής συμπύκνωσης κατά Adler και Longo<sup>99</sup> μεταξύ των αλδεϋδών **benzaldehyde** και **methyl-4-formylbenzoate** και του **πυρρόλιου**. Ο σχηματισμός της ένωσης (**5**) πραγματοποιείται με την ίδια λογική με την οποία γίνεται η σύνθεση της **TPP** από τη συμπύκνωση της **benzaldehyde** με το **πυρρόλιο** (Σχήμα 2.2).



**Σχήμα 2.2** Πιθανός μηχανισμός όξινα καταλυόμενης αντίδρασης συμπύκνωσης<sup>99</sup> benzaldehyde με πυρρόλιο κατά Adler και Longo για σχηματισμό TPP.

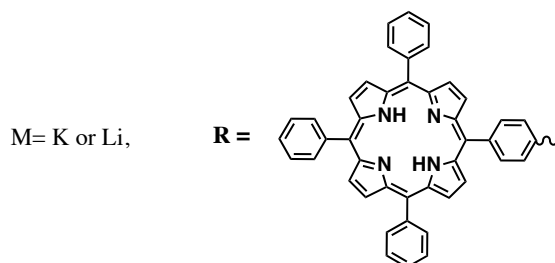
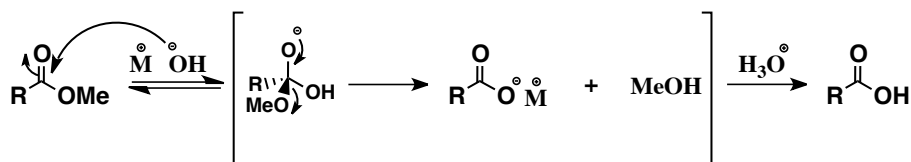
<sup>99</sup> (a) Adler, A.D.; Longo, F.R.; Shergalis, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 3145-3149. (b) Adler, A.D.; Sklar, L.; Longo, F.R.; Finarelli, J.D.; Finarelli, M.G. *J. Heterocycl. Chem.* **1968**, *5*, 669-678. (c) Longo, F.R.; Thorne, E.J.; Adler, A.D.; Dyn, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *12*, 1305-1309.

Η αντίδραση συμπύκνωσης παρήγαγε ένα μίγμα 6 *meso*-υποκατεστημένων εστερικών προϊόντων, από το οποίο απομονώθηκε με χρωματογραφία στήλης, το μόνο-υποκατεστημένο εστερικό προϊόν **TPP-COOMe (4)**, (Σχήμα 2.3).<sup>100</sup>



**Σχήμα 2.3** Προϊόντα μικτής αντίδρασης συμπύκνωσης μεταξύ benzaldehyde, methyl-4-formylbenzoate και πυρρολίου.

Το επιθυμητό προϊόν (**5**) συλλέχθηκε έπειτα από μια αντίδραση βασικής υδρόλυσης της εστερικής ομάδας της ένωσης **TPP-COOMe (4)** στη *meso* θέση. Η βασική υδρόλυση (σαπωνοποίηση) ανήκει στην κατηγορία των αντιδράσεων πυρηνόφιλης άκυλο-υποκατάστασης. Ο μηχανισμός της παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα.<sup>101</sup>



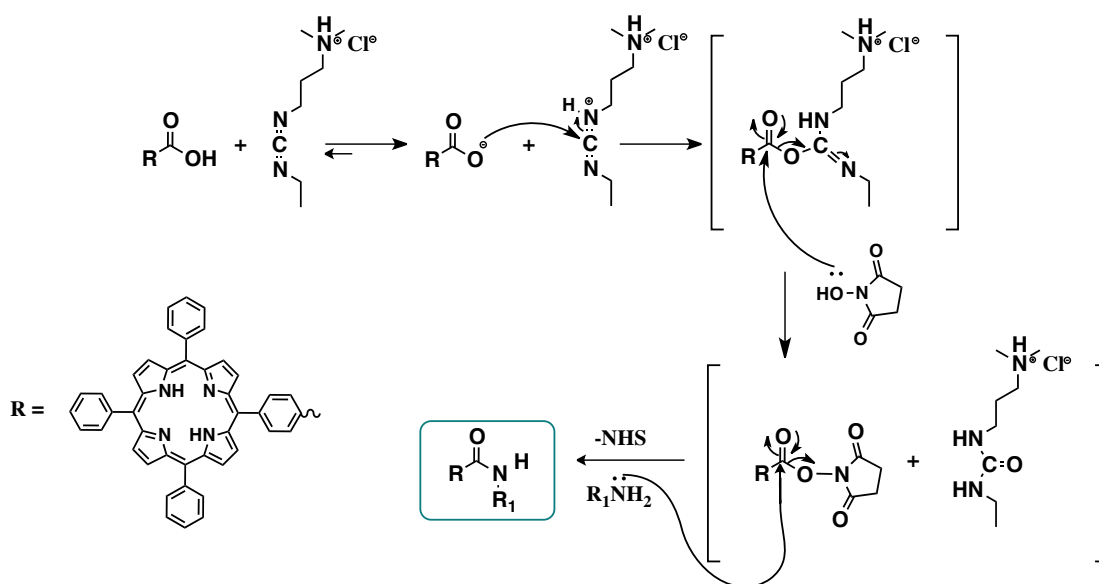
**Σχήμα 2.4** Μηχανισμός βασικής υδρόλυσης (σαπωνοποίησης) της ένωσης (**4**).

<sup>100</sup> Ishikawa, Y.; Yamashita, A.; Uno, T. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, 49 (3), 287-293.

<sup>101</sup> Mc Murry, J.; *Οργανική Χημεία τόμος II*, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, **1998**.

Ο σχηματισμός της ένωσης (**12**) είναι αποτέλεσμα αμιδικής σύζευξης μεταξύ της  $\text{-COOH}$  ομάδας της πορφυρίνης (**5**) και της ελεύθερης  $\text{-NH}_2$  ομάδας της **NH<sub>2</sub>-lysine-trimethyl ester** (**3**) με τη χρήση κλασικών αντιδραστηρίων σύζευξης, *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) και *N*-Hydroxysuccinimide (NHS), όπως είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία.<sup>102</sup> Συνοπτικά, η αντίδραση (one pot reaction) μεταξύ της πορφυρίνης (**5**), των αντιδραστηρίων σύζευξης EDC, NHS και της **NH<sub>2</sub>-lysine-trimethyl ester** (**3**) οδήγησε στο σχηματισμό της ένωσης (**12**).

Αξίζει να αναφερθεί ότι για το σχηματισμό του αμιδικού δεσμού είναι απαραίτητο η  $\text{-COOH}$  ομάδα της πορφυρίνης (**5**) να ενεργοποιηθεί ώστε να μετατραπεί σε ένα ενδιάμεσο σουκινιμιδικό εστέρα που είναι καλύτερη αποχωρούσα ομάδα από το  $\text{-OH}$ . Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται τα αντιδραστήρια σύζευξης EDC και NHS. Ο μηχανισμός της αμιδικής σύζευξης απεικονίζεται στο Σχήμα 2.5.



**Σχήμα 2.5** Μηχανισμός αμιδικής σύζευξης με EDC/NHS.

Έγιναν προσπάθειες χρησιμοποίησης και άλλων αντιδραστηρίων σύζευξης για το σχηματισμό του αμιδικού δεσμού όπως  $\text{SOCl}_2$ , oxalyl chloride,<sup>103</sup> *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) και 1-hydroxybenzotriazole hydrate (HOBt),<sup>104</sup> DCC/NHS.<sup>105</sup> Ο αποτελεσματικότερος συνδυασμός αποτέλεσε το EDC/NHS καθότι το προϊόν απομονώνεται με σχετικά καλή απόδοση, έπειτα από καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης, ενώ η ενδιάμεση ουρία (παραπροϊόν) απομακρύνεται εύκολα με εκχύλιση λόγω της υδατοδιαλυτότητάς της.<sup>106</sup> Τέλος, βασική υδρόλυση<sup>107</sup> της ένωσης (**12**) οδήγησε στην τελική δυάδα.

<sup>102</sup> Zhang, Q.; Donga, X.; Wanga, K.P.; Zhua, T.T.; Suna, F.N.; Meng, S.X.; Feng, Y.Q. *Chinese Chem. Lett.* **2017**, *28*, 777-781.

<sup>103</sup> Genady, A.R.; El-Zaria, M.E.; Gabel, D. *J. Organomet. Chem.* **2004**, *689* (20), 3242-3250.

<sup>104</sup> Karikis, K.; Georgilis, E.; Charalambidis, G.; Petrou, A.; Vakuliuk, O.; Chatziioannou, T.; Raptaki, I.; Tsovolas, S.; Papakyriacou, I.; Mitraki, A.; Gryko, D.T.; Coutsolelos A.G. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 11245-11252.

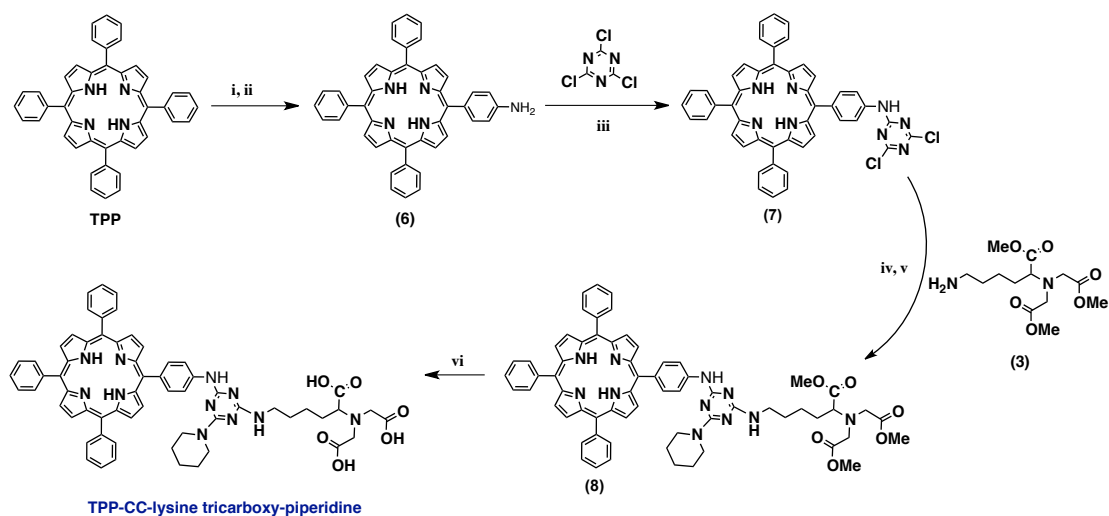
<sup>105</sup> (a) Boisbrun, M.; Vanderesse, R.; Engrand, P.; Olié, A.; Hupont, S.; Regnouf-de-Vains, J.-B.; Frochot, C. *Tetrahedron.* **2008**, *64*, 3494-3504. (b) Lai, Y.T.; Chang, Y.Y.; Hu, L.; Yang, Y.; Chao, A.; Du, Z.Y.; Tanner, J.A.; Chye, M.L.; Qian, C.; Ng, K.M.; Li, H.; Sun, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2015**, *112* (10), 2948-2953. (c) Giuntini, F.; Alonso, C.M.A.; Boyle, R.W. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, *10*, 759-791.

<sup>106</sup> El-Faham, A.; Albericio, F. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6557-6602.

<sup>107</sup> (a) Roy, B.C.; Peterson, R.; Mallik, S.; Campiglia, A.D. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 3644-3651. (b) Roy, B.C.; Mallik, S. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2969-2974.

## 2.2 Σύνθεση της δυάδας TPP-CC-lysine tricarboxy-piperidine

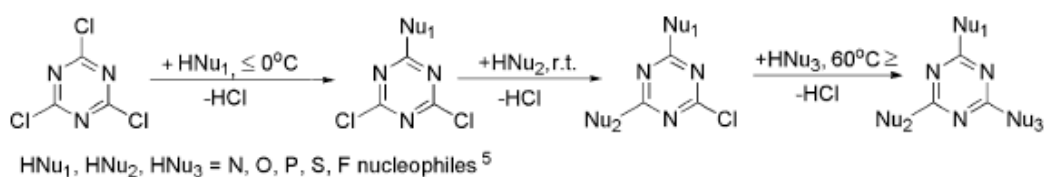
Η σύνθεση της δυάδας **TPP-CC-lysine tricarboxy-piperidine** με τη γέφυρα cyanuric chloride απεικονίζεται στο παρακάτω σχήμα.



**Σχήμα 2.6** Συνθετική προσέγγιση για τη δυάδα TPP-CC-lysine tricarboxy-piperidine. Πειραματικές συνθήκες και αντιδραστήρια: **i)** HNO<sub>3</sub> 65%, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0°C, 2,5 hrs, **ii)** HCl 37%, SnCl<sub>2</sub>, reflux, 12 hrs, α=31.2%, **iii)** THF, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, rt, 2.5 hrs, α=99.5%, **iv)** THF, DIPEA, 65°C, 4 days, **v)** piperidine, THF, DIPEA, 65°C, 24hrs, α=25.4%, **vi)** LiOH.H<sub>2</sub>O, MeOH/THF (1:1), rt, 4 days, α=97.7% .

Η γέφυρα 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine (cyanuric chloride, CC), είναι ιδιαίτερα δημοφιλής για συνθετικούς μετασχηματισμούς,<sup>108</sup> ως αντιδραστήριο σύζευξης πορφυρικών ολιγομερών,<sup>109</sup> διμερών μεταλλοπορφυρινών,<sup>110</sup> δενδριμερών,<sup>111</sup> βιολογικών μορίων<sup>112</sup> και μακρομορίων,<sup>113</sup> ως υλικό πρόσδεσης μορίων σε στερεά φάση<sup>114,18</sup> κ.ά.<sup>115</sup>

Η γέφυρα αυτή διαθέτει τρεις -Cl υποκαταστάτες στις θέσεις 1,3,5 του δακτυλίου της τριαζίνης οι οποίοι μπορούν να αντικατασταθούν σταδιακά από άλλα πυρηνόφιλα (π.χ. αμίνες) σε διαφορετικές θερμοκρασίες (Σχήμα 2.7).<sup>115</sup>



**Σχήμα 2.7** Μονοϋποκατάσταση, διϋποκατάσταση και τριϋποκατάσταση των -Cl υποκαταστατών από πυρηνόφιλα σε διαφορετικές θερμοκρασίες (0°C, rt, >60 °C).<sup>116</sup>

<sup>108</sup> Blotny, G.; *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 1499-1501.

<sup>109</sup> Ichihara, K.; Naruta, Y. *Chem. Lett.* **1995**, 631-632.

<sup>110</sup> (a) Carofiglio, T.; Varotto, A.; Tonellato, U. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 8121-8124. (b) Carofiglio, T.; Lubian, E.; Menegazzo, I.; Saielli, G.; Varotto, A. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 9034-9043.

<sup>111</sup> (a) Chouai, A.; Simanek, E.E. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 2357-2366. (b) Steffensen, M.B.; Simanek, E.E. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2359-2361. (c) Zhang, W.; Simanek, E.E. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 843-845.

<sup>112</sup> Chaleix, V.; Sol, V.; Krausz, P. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 2977-2979.

<sup>113</sup> (a) Löwik, D.W.P.M.; Lowe, C.R. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 1837-1840. (b) Löwik, D.W.P.M.; Lowe, C.R. *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 2825-2839.

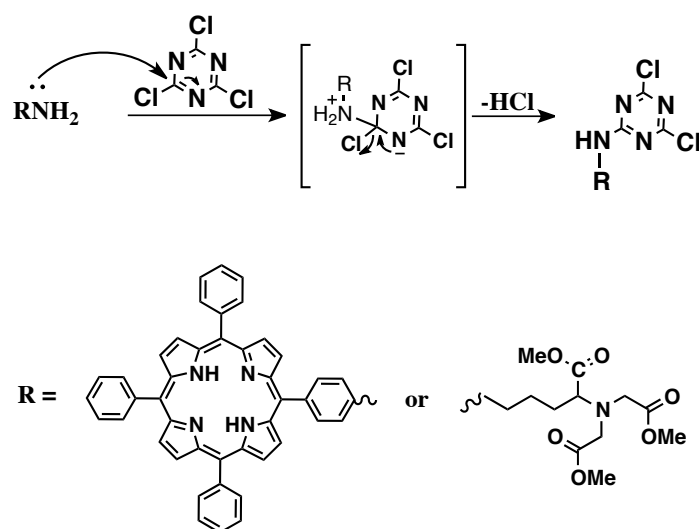
<sup>114</sup> Carofiglio, T.; Schlorlin, M.; Tonellato, U. *J. Porphyrins Phthalocyanines.* **2007**, *11*, 749-754.

<sup>115</sup> Ringot, C.; Sol, V.; BarriOre, M.; Saad, N.; Bressollier, P.; Granet, R.; Couleaud, P.; Frochotand, C.; Krausz, P. *Biomacromolecules.* **2011**, *12*, 1716-1723.

<sup>116</sup> Blotny, G. *Tetrahedron.* **2006**, *62*, 9507-9522.

Η θερμοεξαρτώμενη δραστηριότητα των  $-Cl$  επιτρέπει τη διαδοχική υποκατάστασή τους από διαφορετικά πυρηνόφιλα σε συνθήκες *one-pot*. Η σπουδαιότητά της έγκειται στην ικανότητα διενέργειας αντιδράσεων χωρίς πολλά στάδια, για την απομόνωση ενώσεων με σχετικά μεγάλη απόδοση και χωρίς χρονοβόρα κατεργασία. Επιπλέον αποτελεί ένα οικονομικό εργαλείο για τη σύνδεση πολύπλοκων μορίων με μεγάλη ευκολία.<sup>115</sup>

Η σύνθεση του πορφυρινικού παραγώγου (**6**) με την  $-NH_2$  ομάδα στη *meso* θέση ξεκινά από τη παρασκευή της πορφυρίνης **TPP**, μέσω μιας αντίδρασης συμπύκνωσης κατά Adler και Longo<sup>99</sup> (Σχήμα 2.2). Νίτρωση στην *p*-θέση του φαινυλίου της **TPP** και έπειτα αναγωγή της  $-NO_2$  ομάδας σε  $-NH_2$  οδήγησε στο σχηματισμό της πορφυρίνης (**6**).<sup>117,118</sup> Για το σχηματισμό της τελικής δυάδας είναι απαραίτητη αρχικά η σύζευξη της πορφυρίνης με τη γέφυρα **cyanuric chloride** και έπειτα η προσθήκη *one-pot*, **NH<sub>2</sub>-lysine trimethyl ester** (**3**) και έπειτα **piperidine**.<sup>119, 120</sup> Ο μηχανισμός της σύζευξης αποτελεί μια διαδικασία προσθήκης/απόσπασης<sup>4</sup> και παρουσιάζεται παρακάτω.<sup>121</sup>



**Σχήμα 2.8** Μηχανισμός σύζευξης με γέφυρα cyanuric chloride.

Καθαρισμός με χρωματογραφία στήλης είχε ως αποτέλεσμα την απομόνωση της ένωσης (**8**) με μέτρια απόδοση. Τέλος, βασική υδρόλυση<sup>106</sup> της ένωσης (**8**) συντέλεσε στην παραλαβή της τελικής δυάδας.

### 2.3 Σύνθεση **NH<sub>2</sub>-lysine trimethyl ester**

Ο σχηματισμός του τρικαρβοξυλικού οξέος NTA που θα αποτελέσει το χηλικό ligand, ξεκινά από μια πρόδρομη ένωση, τη λυσίνη, ένα αμινοξύ που φέρει άμινο ( $-NH_2$ ) και καρβόξυ ( $-COOH$ ) ομάδες.

<sup>117</sup> Kruper, W. J.; Chamberlin, T. A.; Kochanny, M. J. *Org. Chem.* **1989**, *54*, 2753-2756.

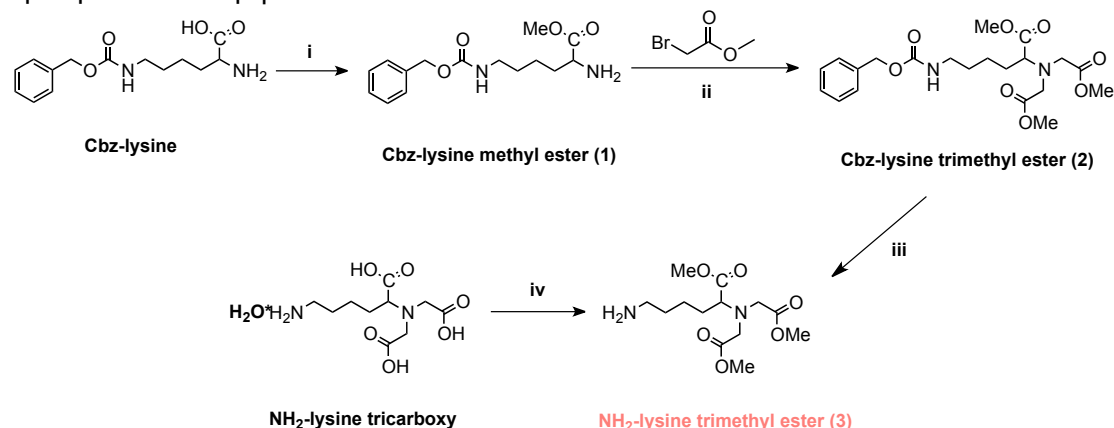
<sup>118</sup> Ladomenou, K.; Lazarides, T.; Panda, M.K.; Charalambidis, G.; Daphnomili, D.; Coutsolelos A.G. *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 10548-10556.

<sup>119</sup> Lazarides, T.; Charalambidis, G.; Vuillamy, A.; Reglier, M.; Klontzas, E.; Froudakis, G.; Kuhri, S.; Guldi, D.M.; Coutsolelos A.G. *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 8926-8936.

<sup>120</sup> Zervaki, G.E.; Papastamatakis, E.; Angaridis, P.A.; Nikolaou, V.; Singh, M.; Kurchania, R.; Kitsopoulos, T.N.; Sharma, G.D.; Coutsolelos, A.G. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2014**, 1020-1033.

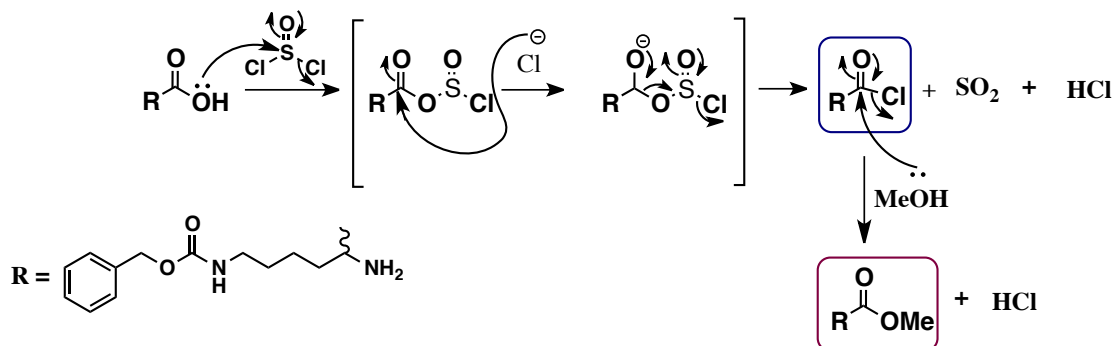
<sup>121</sup> Venkataraman, K.; Wagle, D.R. *Tetrahedron Lett.* **1979**, *3*, 3037-3040.

Η σύνθεση του NTA (Σχήμα 2.9) ξεκινά από την προστασία-εστεροποίηση της καρβοξυλικής ομάδας (-COOH) της προστατευμένης **Cbz-L-lysine** η οποία είναι εμπορικά διαθέσιμη.<sup>122</sup>



**Σχήμα 2.9** Συνθετική προσέγγιση για την **NH<sub>2</sub>-lysine trimethyl ester (3)**. Πειραματικές συνθήκες και αντιδραστήρια: **i)** SOCl<sub>2</sub>, MeOH, rt, 12 hrs, α=99.3%, **ii)** NaHCO<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>CN, reflux, 12 hrs, α=70.1% **iii)** H<sub>2</sub>, Pd/C, MeOH, rt, 1.5 hr, α=97.1%, **iv)** SOCl<sub>2</sub>, MeOH, 60°C, 48 hrs, α=97.85%.

Η αντίδραση εστεροποίησης μπορεί να πραγματοποιηθεί παρουσία οξέος και αλκοόλης. Η πιο αποτελεσματική μέθοδος ήταν αυτή που χρησιμοποιήθηκε SOCl<sub>2</sub><sup>106</sup> και άνυδρη MeOH ενώ έγινε δοκιμή και με H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και MeOH με χαμηλότερη απόδοση.<sup>123</sup> Η αντίδραση εστεροποίησης αποτελεί μια αντίδραση πυρηνόφιλης άκυλο-υποκατάστασης, ο μηχανισμός της οποίας παρουσιάζεται παρακάτω.<sup>101</sup>



**Σχήμα 2.10** Μηχανισμός εστεροποίησης της **Cbz-lysine** με SOCl<sub>2</sub> και MeOH.

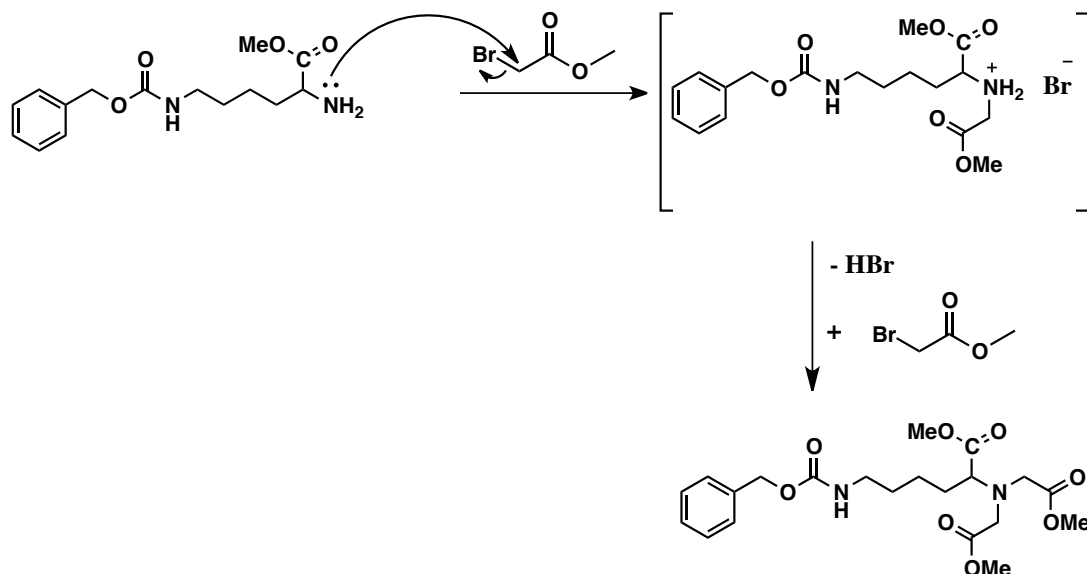
Ο σχηματισμός του τριεστέρα (**2**) πραγματοποιείται μέσω μιας αντίδρασης τύπου S<sub>N</sub>2 μεταξύ της προστατευμένης **Cbz-lysine methyl ester (1)** και του **methyl bromoacetate**. Ο μηχανισμός της αντίδρασης παρουσιάζεται στο σχήμα που ακολουθεί.<sup>124</sup>

<sup>122</sup> (a) Lin, Y.C.; Liang, M.R.; Lin, Y.C.; Chen, C.T. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 13059-13067. (b) Hussein, W.M.; Ross, B.P.; Landsberg, M.J.; Lévy, D.; Hankamer, B.; McGeary, R.P. *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (4), 1473-1479.

<sup>123</sup> Lai, Y.T.; Chang, Y.Y.; Hu, L.; Yang, Y.; Chao, A.; Du, Z.Y.; Tanner, J.A.; Chye, M.L.; Qian, C.; Ng, K.M.; Li, H.; Sun, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2015**, *112* (10), 2948-2953.

<sup>124</sup> Mc Murry, J.; *Οργανική Χημεία τόμος Ι, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1998.*





**Σχήμα 2.11** Μηχανισμός σχηματισμού της Cbz-lysine trimethyl ester.

Η αντίδραση υποκατάστασης οδήγησε στο σχηματισμό ενός μίγματος προϊόντων, από το οποίο απομονώνεται με χρωματογραφία στήλης ο προστατευμένος τριεστέρας **Cbz-lysine trimethyl ester (2)**.<sup>125</sup> Στη συνέχεια, το επιθυμητό προϊόν (**3**) λαμβάνεται μέσω μιας αντίδρασης αποπροστασίας-αναγωγής της **-Cbz** ομάδας με πολύ καλή απόδοση (α~98%).<sup>126,127</sup> Εναλλακτικά, το τελικό προϊόν μπορεί να ληφθεί με καλή απόδοση μέσω μιας αντίδρασης εστεροποίησης<sup>128</sup> των καρβοξυλικών ομάδων (**-COOH**) της ελεύθερης **NH<sub>2</sub>-lysine tricarboxy** χωρίς περαιτέρω κατεργασία παρακάμπτοντας τα παραπάνω στάδια (Σχήμα 2.9, iv).<sup>122</sup>

<sup>125</sup> Zhao, M.; Haldar, S.; Franses, J.; Kim, J.M.; Thompson, D.H. *Supramol. Chem.* **2005**, *17*, 101-111.

<sup>126</sup> Dräger, G.; Kiss, C.; Kunz, U.; Kirschning, A. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 3657-3664.

<sup>127</sup> Fischer, E.; Speier, A.; *Chem. Ber.* **1895**, *28*, 3252-3258.

<sup>128</sup> Furniss, B.; Hannaford, A.; Smith, P.; Tatchell, A.; Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry 5<sup>th</sup> Ed. Longman Science & Technical, **1996**, 695-704.

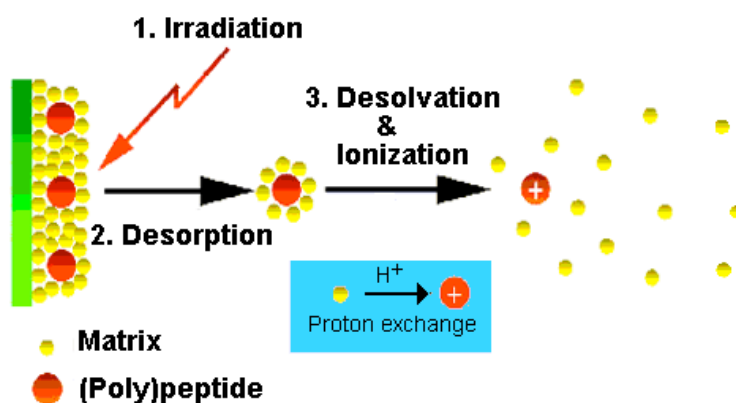
### Κεφάλαιο 3: Ανάλυση αποτελεσμάτων

Η ταυτοποίηση των μη υδρολυμένων μορφών των ενώσεων που συνθέσαμε πραγματοποιήθηκε με τις παρακάτω μεθόδους: φασματομετρία μάζας χρόνου πτήσης (MALDI-TOF), φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-Vis). Οι τελικές δυάδες χαρακτηρίστηκαν μόνο με φασματομετρία μάζας λόγω της μικρής διαλυτότητάς τους σε οργανικούς διαλύτες. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν θεωρητικές μελέτες (θεωρία συναρτησιακού ηλεκτρονιακής πυκνότητας, Density Functional Theory, DFT) για τις τελικές δυάδες καθώς και μετρήσεις φθορισμού για τον έλεγχο αλληλεπίδρασής τους με το  $Ni^{2+}$ .

#### 3.1. Φασματομετρία μάζας Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight (MALDI-TOF)

Μια από τις κυριότερες μεθόδους εισαγωγής δείγματος σε ένα φασματόμετρο μάζας είναι ο ιοντισμός εκρόφησης με λέιζερ υποβοηθούμενος από μήτρα (matrix-assisted laser desorption/ionization). Η τεχνική αυτή συνδέεται συχνά με φασματόμετρο μάζας χρόνου πτήσης (time of flight).

Το MALDI είναι μια αρκετά ευαίσθητη και ήπια τεχνική ιοντισμού στη φασματομετρία μάζας και επιτρέπει την ανάλυση και ταυτοποίηση βιομορίων (βιοπολυμερή όπως το DNA, πρωτεΐνες, πεπτιδία και σάκχαρα) καθώς και μεγάλων οργανικών μορίων (όπως τα πολυμερή, δενδριμερή και άλλα μακρομόρια), τα οποία είναι εύθραυστα και τείνουν να θραυσματοποιούνται όταν ιοντίζονται με άλλες μεθόδους ιοντισμού. Στα πλεονεκτήματα της τεχνικής αυτής περιλαμβάνονται ο ήπιος ιοντισμός των δειγμάτων (λιγότερη θραυσματοποίηση), η ανάλυση μεγάλων μοριακών μαζών ( $10^6$  Da), η απλότητα και ευκολία της μεθόδου και η πολύ μικρή ποσότητα δείγματος προς ανάλυση (μερικά  $\mu$ L).



**Εικόνα 3.1** Ιοντισμός εκρόφησης με λέιζερ υποβοηθούμενος από μήτρα (MALDI).<sup>129</sup>

Η μεθοδολογία που ακολουθείται είναι η εξής:

Μικροποσότητα από το προς ανάλυση δείγμα τοποθετείται σε μία μεταλλική πλάκα-στόχο και αναμειγνύεται με κατάλληλη μήτρα (matrix) [στις πορφυρίνες που είναι

<sup>129</sup> <https://www.ru.nl/science/gi/facilities-activities/other-devices/maldi-tof/>

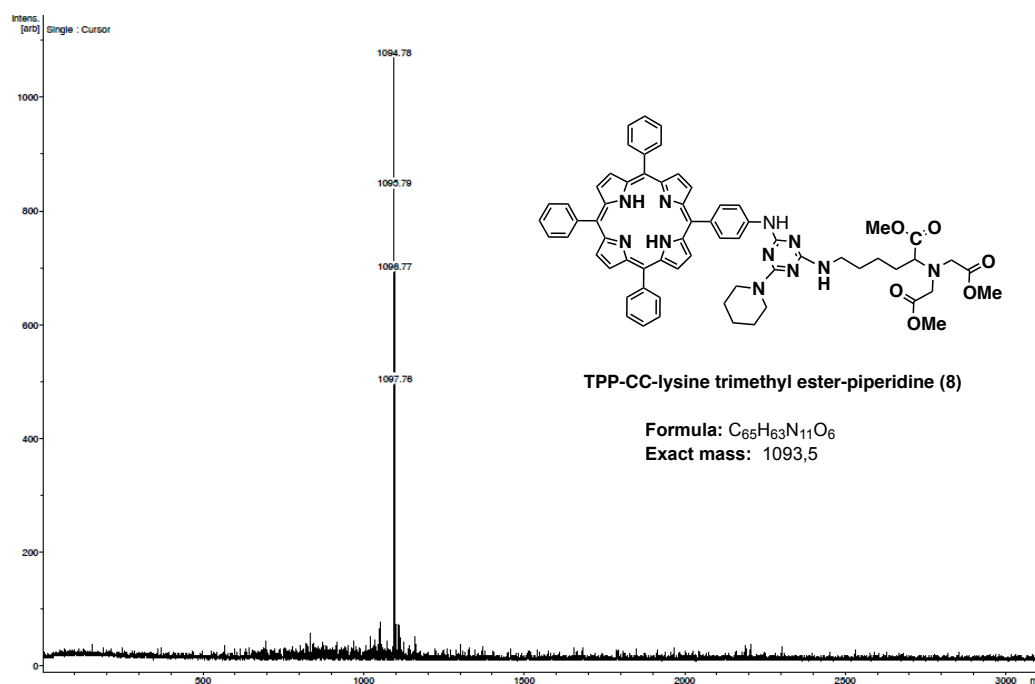
μεγάλα οργανικά μόρια ως μήτρα χρησιμοποιούνται τα: DCTB (trans-2-[3-(4-tert-Butylphenyl)-2-methyl-2-propenylidene]malononitrile) και CHCA ( $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid).

Το μίγμα δείγματος και μήτρας κρυσταλλώνεται και στη συνέχεια ακτινοβολείται με ένα σύντομο παλμό λέιζερ, το οποίο προκαλεί εκτομή και εκρόφηση του δείγματος και της μήτρας στην αέρια φάση. Η μήτρα απορροφά ακτινοβολία από το λέιζερ, ιοντίζεται και μεταφέρει φορτία στον αναλύτη. Με τον τρόπο αυτό, τα μόρια του αναλύτη ιονίζονται με το να πρωτονιώνονται ή να αποπρωτονιώνονται και μπορούν στη συνέχεια να επιταχυνθούν προς το φασματομέτρο μάζας TOF (Εικόνα 3.1). Ο αναλυτής μαζών χρόνου-πτήσης TOF είναι ένας μακρύς ευθύγραμμος σωλήνας υπό κενό. Τα ιόντα που εισέρχονται σε αυτόν διανύουν μια σταθερή απόσταση μέχρι τον ανιχνευτή ανάλογα με το λόγο μάζα προς φορτίο ( $m/z$ ), όπου τα ελαφρύτερα ιόντα διανύουν τη σταθερή αυτή απόσταση σε μικρότερο χρόνο από τα βαρύτερα.<sup>130,131,132</sup>

Όλα τα φάσματα των ενώσεων που συντέθηκαν παρουσιάζονται στο παράρτημα. Ενδεικτικά στις επόμενες σελίδες (σελ 38,39) παρουσιάζονται τα φάσματα μάζας των ενώσεων **TPP-CC-lysine trimethyl ester-piperidine (8)** και **TPP-lysine trimethyl ester (12)**.

Σε κάθε περίπτωση για όλα τα φάσματα η ύπαρξη του μοριακού ιόντος αποτελεί ένδειξη για την επιτυχή σύνθεση των δυάδων μας. Η επιβεβαίωση της δομής της κάθε ένωσης πραγματοποιείται από πειράματα <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR καθώς και από φάσματα δυο διαστάσεων (COSY, HSQC, HMBC).

### Φάσμα μάζας για τη δυάδα TPP-CC-lysine trimethyl ester-piperidine (8)



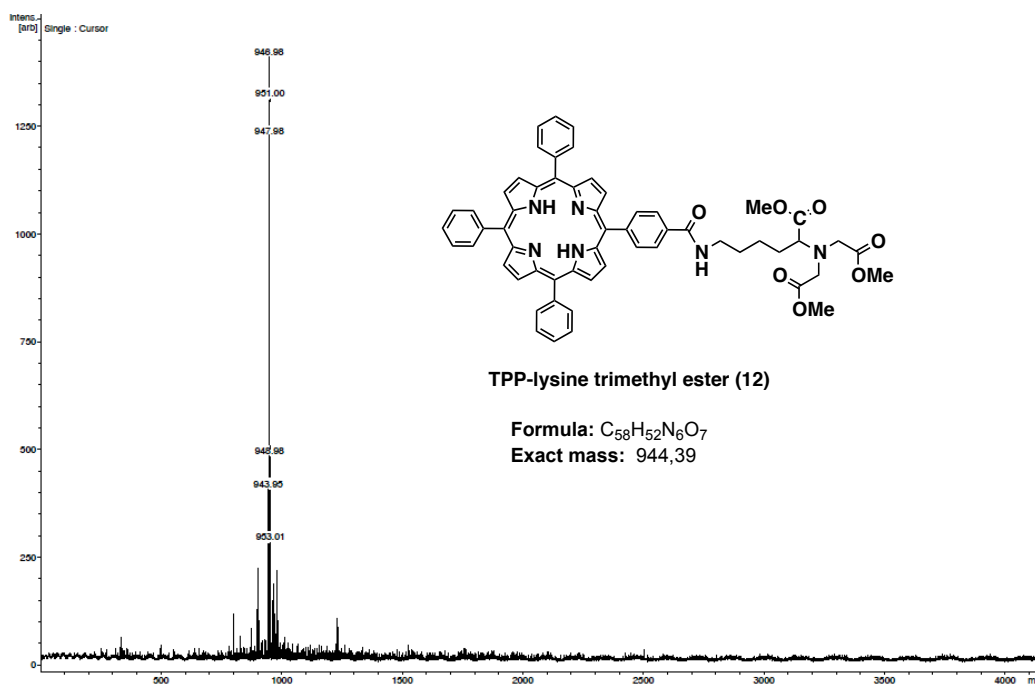
**Σχήμα 3.1** Φάσμα μάζας της TPP-CC-lysine trimethyl ester-piperidine (8).

<sup>130</sup> Harris, D.C. Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση, τόμος II, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, **2010**.

<sup>131</sup> Οξενκιουν-Πετροπούλου, Μ. Φασματομετρικές μέθοδοι, Εκδόσεις Συμμετρία, Αθήνα, **2006**.

<sup>132</sup> Skoog, D.A.; Holler, J.; Nieman, T.A. Αρχές της ενόργανης ανάλυσης, Εκδόσεις Κωσταράκης, Αθήνα, **2005**.

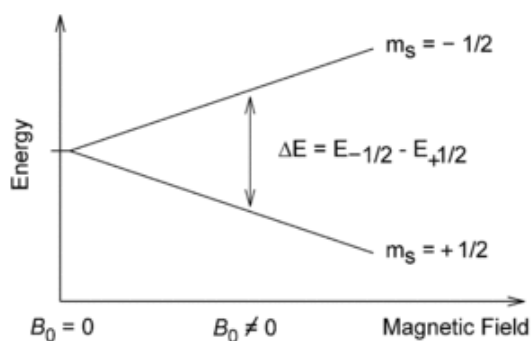
### Φάσμα μάζας για τη δυάδα TPP-lysine trimethyl ester (12)



Σχήμα 3.2 Φάσμα μάζας της TPP- lysine trimethyl ester (12).

### 3.2 Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR)

Όταν μαγνητικοί πυρήνες όπως των:  $^1H$ ,  $^{13}C$ ,  $^{15}N$ ,  $^{17}O$ ,  $^{19}F$ ,  $^{31}P$ ,  $^{35}Cl$  κ.ά. τεθούν υπό την επίδραση ενός ισχυρού εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, τα σπιν τους προσανατολίζονται ομόρροπα ή αντίρροπα προς το πεδίο αυτό (Εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.2 Προσανατολισμός πυρηνικού σπιν παρουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου.<sup>133</sup>

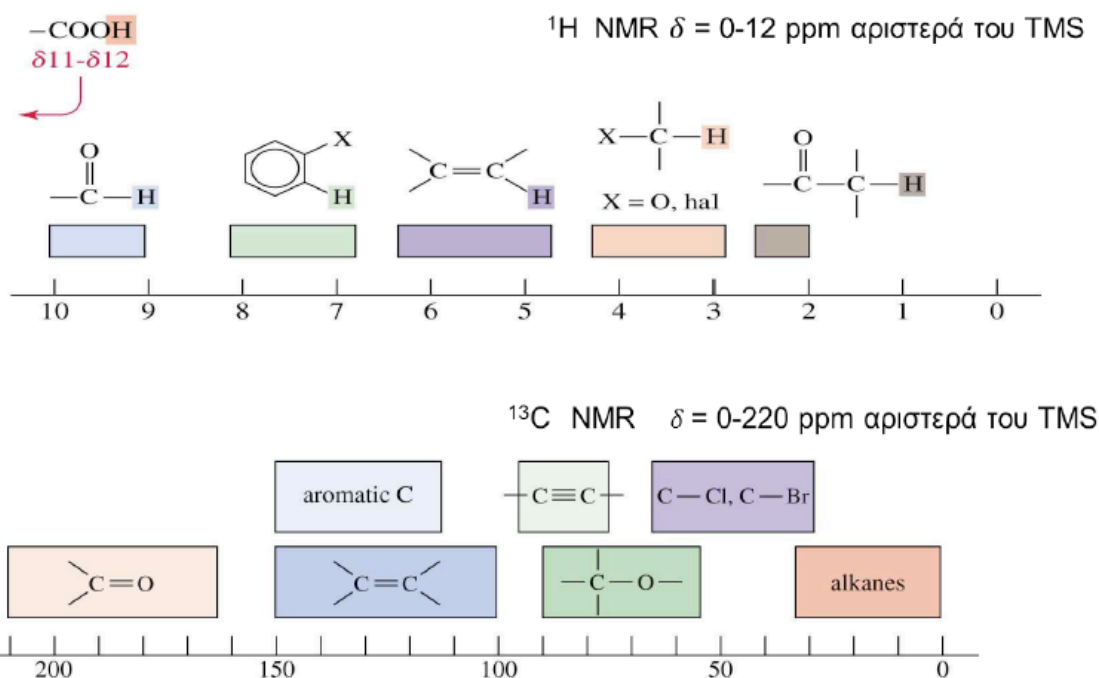
Κατά την ακτινοβολήσή τους με κύματα ραδιοσυχνότητας απορροφάται ενέργεια, και οι πυρήνες εκδηλώνουν αναστροφή του σπιν τους από τη χαμηλότερη προς την υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση. Η απορρόφηση της ενέργειας της

<sup>133</sup> [https://el.wikipedia.org/wiki/Πυρηνικός\\_μαγνητικός\\_συντονισμός](https://el.wikipedia.org/wiki/Πυρηνικός_μαγνητικός_συντονισμός)

ραδιοσυχνότητας ανιχνεύεται, ενισχύεται και απεικονίζεται ως φάσμα NMR. Κάθε χημικά διακριτός πυρήνας συντονίζεται σε διαφορετική τιμή του εφαρμοζόμενου πεδίου ώστε να εμφανίζει το δικό του σήμα απορρόφησης.

Μέσα σε ένα μαγνητικό πεδίο έντασης  $B_0$ , οι ενεργοί πυρήνες ενός μορίου θα έπρεπε να εμφανίζονται στην ίδια συχνότητα. Στην πραγματικότητα όμως αυτό δε συμβαίνει γιατί η επίδραση, και επομένως η τιμή της έντασης του μαγνητικού πεδίου, φθάνει σε κάθε πυρήνα διαφορετοποιημένη, λόγω του διαφορετικού χημικού περιβάλλοντος στον οποίο βρίσκεται.

Οι χημικές μετατοπίσεις (Εικόνα 3.3) εξαρτώνται από τη διαμαγνητική θωράκιση (ηλεκτρόνια δημιουργούν τα δικά τους τοπικά μαγνητικά πεδία τα οποία προστατεύουν τους πυρήνες από το εφαρμοζόμενο πεδίο) και τη μαγνητική ανισοτροπία (π.χ. ρεύμα δακτυλίου).<sup>134</sup>



**Εικόνα 3.3** Χημικές μετατοπίσεις χαρακτηριστικών ομάδων.<sup>135</sup>

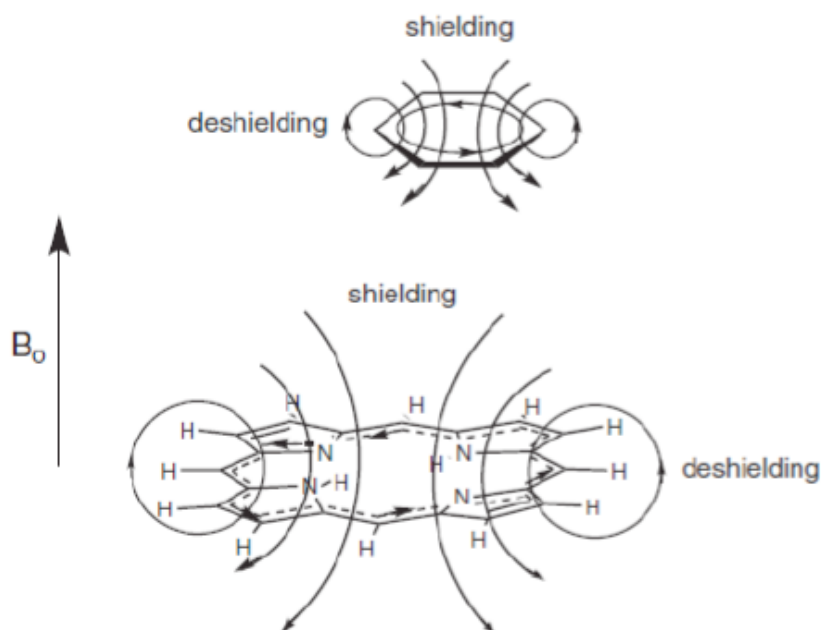
### Πορφυρινικά συστήματα

Στις αρωματικές ενώσεις ( $4n+2$   $\pi$  ηλεκτρόνια, Hückel), όπου περιλαμβάνονται και οι πορφυρίνες, τα  $\pi$  ηλεκτρόνια είναι απεντοπισμένα (delocalized) και κινούνται κυκλικά πάνω και κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου. Αυτή τους η κίνηση καλείται ρεύμα δακτυλίου (ring current) και έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός τοπικού μαγνητικού πεδίου κάθετο στο επίπεδο του δακτυλίου. Το δευτερογενές τοπικό μαγνητικό πεδίο που δημιουργείται παρουσιάζει ανισοτροπία στο χώρο, καθότι είναι ίδιας φοράς προς την ένταση  $B_0$  του εφαρμοζόμενου εξωτερικού μαγνητικού πεδίου στην περιφέρεια του δακτυλίου (περιοχή αποπροστασίας), και αντίθετης φοράς στο εσωτερικό του δακτυλίου (περιοχή προστασίας, Εικόνα 3.4).

<sup>134</sup> Mc Murry, J.; Οργανική Χημεία τόμος I, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1998.

<sup>135</sup> <https://www.ru.ac.za/media/rhodesuniversity/content/nanotechnology/documents/NMR%20Reitumetse.pdf>

Πρωτόνια τα οποία βρίσκονται στο χώρο έξω από τον αρωματικό δακτύλιο (στην περιφέρεια) αποπροστατεύονται και απορροφούν σε ασθενές πεδίο. Αντίθετα, πρωτόνια στο εσωτερικό του δακτυλίου προστατεύονται από την επίδραση του εξωτερικού πεδίου και απορροφούν σε ισχυρό πεδίο.<sup>136</sup>



**Εικόνα 3.4** Μαγνητική ανισοτροπία λόγω ρεύματος δακτυλίου στην πορφυρίνη.<sup>137</sup>

Αυτή η μαγνητική ανισοτροπία που παρατηρείται στον πορφυρινικό δακτύλιο αποτελεί χαρακτηριστικό όλων των αρωματικών ενώσεων, γι'αυτό και το πορφυρινικό φάσμα εκτείνεται σε μια περιοχή 15 ppm περίπου. Για τους παραπάνω λόγους τα εσωτερικά πρωτόνια των δυο αζώτων στο φάσμα της πορφυρίνης, εμφανίζονται στην περιοχή των -2 ppm περίπου, (περιοχή ισχυρού πεδίου λόγω προστασίας) ενώ τα πυρρολικά πρωτόνια του δακτυλίου, στην περιοχή των 9 ppm περίπου (περιοχή ασθενούς πεδίου λόγω αποπροστασίας).<sup>137</sup>

Όλα τα φάσματα των ενώσεων που συντέθηκαν παρουσιάζονται στο παράρτημα. Ενδεικτικά παρουσιάζουμε προς ανάλυση τα φάσματα των ενώσεων **NH<sub>2</sub>-lysine trimethyl ester (3)**, **TPP-lysine trimethyl ester (12)**.

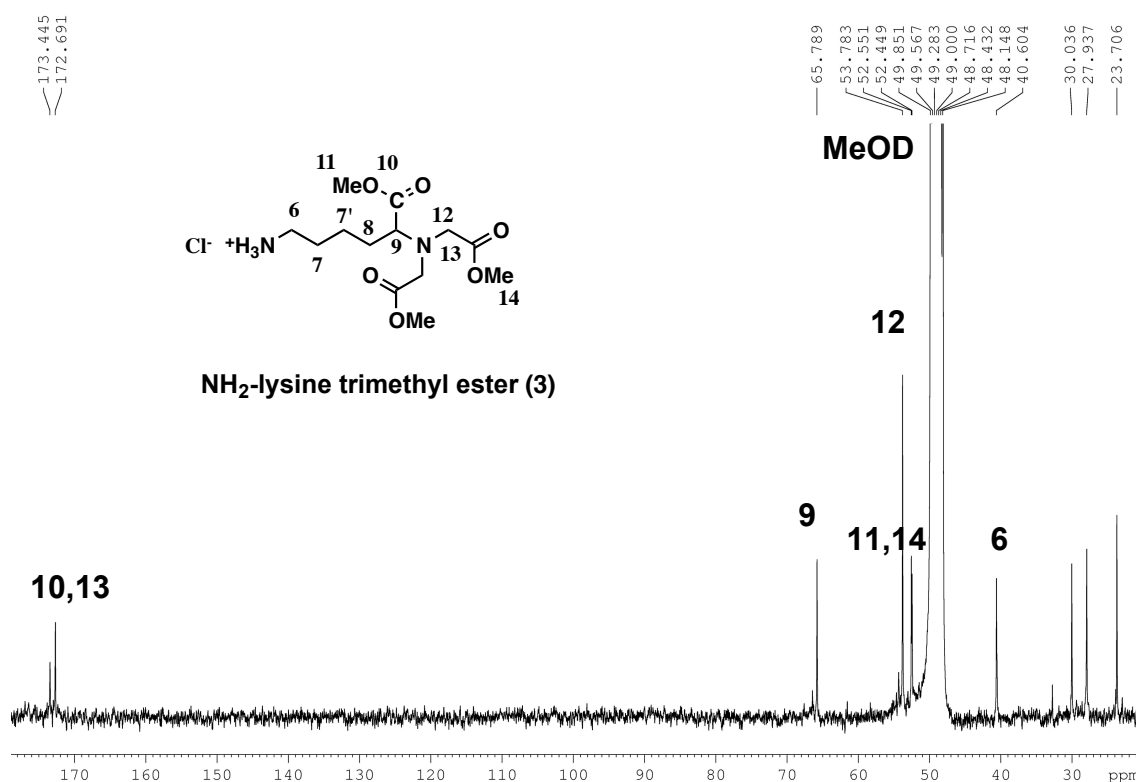
### **NH<sub>2</sub>-lysine trimethyl ester (3)**

Η επιτυχής σύνθεση της ένωσης **NH<sub>2</sub>-lysine trimethyl ester (3)** επιβεβαιώθηκε με <sup>1</sup>H & <sup>13</sup>C NMR. Η ύπαρξη τριεστέρα και όχι μόνο- ή δι-εστέρα επαληθεύεται από το φάσμα <sup>13</sup>C NMR (Σχήμα 3.3), από την παρουσία των δύο καρβονυλικών C στα 173.4 και 172.7 ppm (C10 και C13 αντίστοιχα). Επιπλέον, στο ίδιο φάσμα, οι κορυφές που

<sup>136</sup> Μαυρομούστακος, Θ.; Ματσούκας, Ι. NMR. Αρχές και εφαρμογές φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού στην Ιατρική, Φαρμακευτική Χημεία, Βιοχημεία, Χημεία τροφίμων και ποτών, εκδόσεις Γ.Β. Παρισιάνος, Αθήνα, **2006**.

<sup>137</sup> Katz, J.J.; Scheer, H. Porphyrins and Metalloporphyrins, Nuclear magnetic resonance spectroscopy of porphyrins and metalloporphyrins, Elsevier Publishing Company, New York, **1975**.

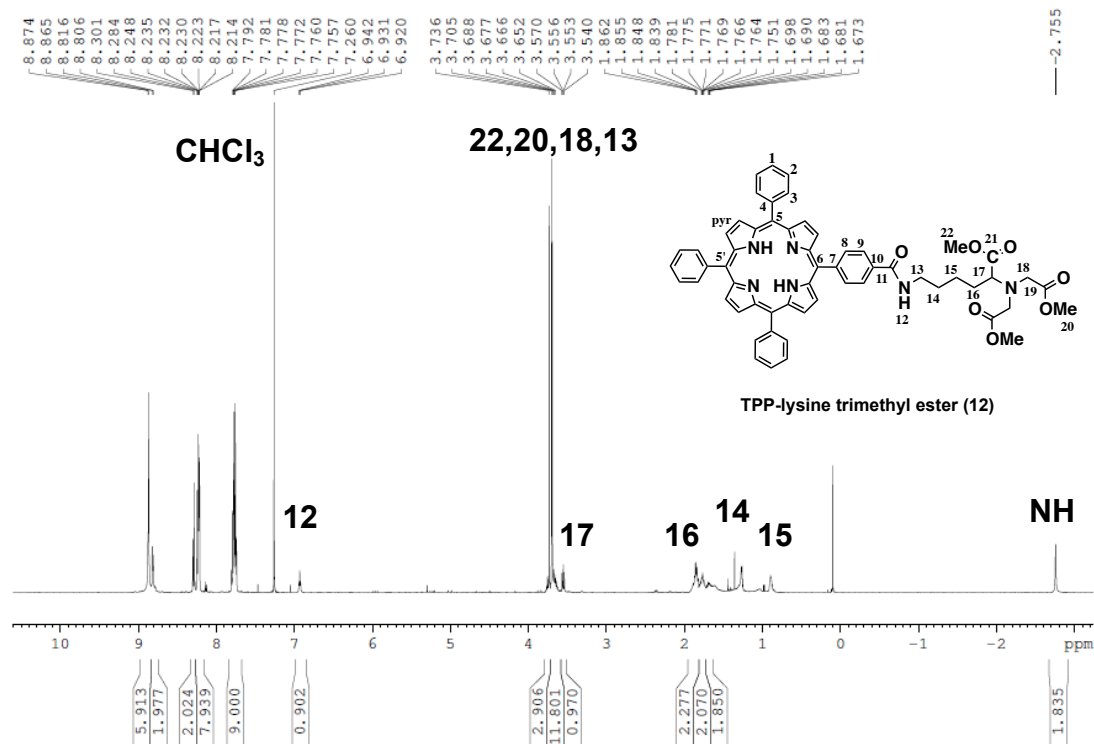
διακρίνονται στα 52.5 και 52.4 ppm (C14 και C11 αντίστοιχα), οφείλονται στην ύπαρξη των ομάδων  $-\text{CH}_3$  του τριεστέρα της λυσίνης. Τέλος, η απομάκρυνση της προστατευτικής ομάδας  $-\text{Cbz}$  πιστοποιείται από την απουσία κορυφών στην αρωματική περιοχή, στα 136.8, 128.6 και 128.2 ppm, καθώς και των κορυφών στα 156.6 και 66.7 ppm.



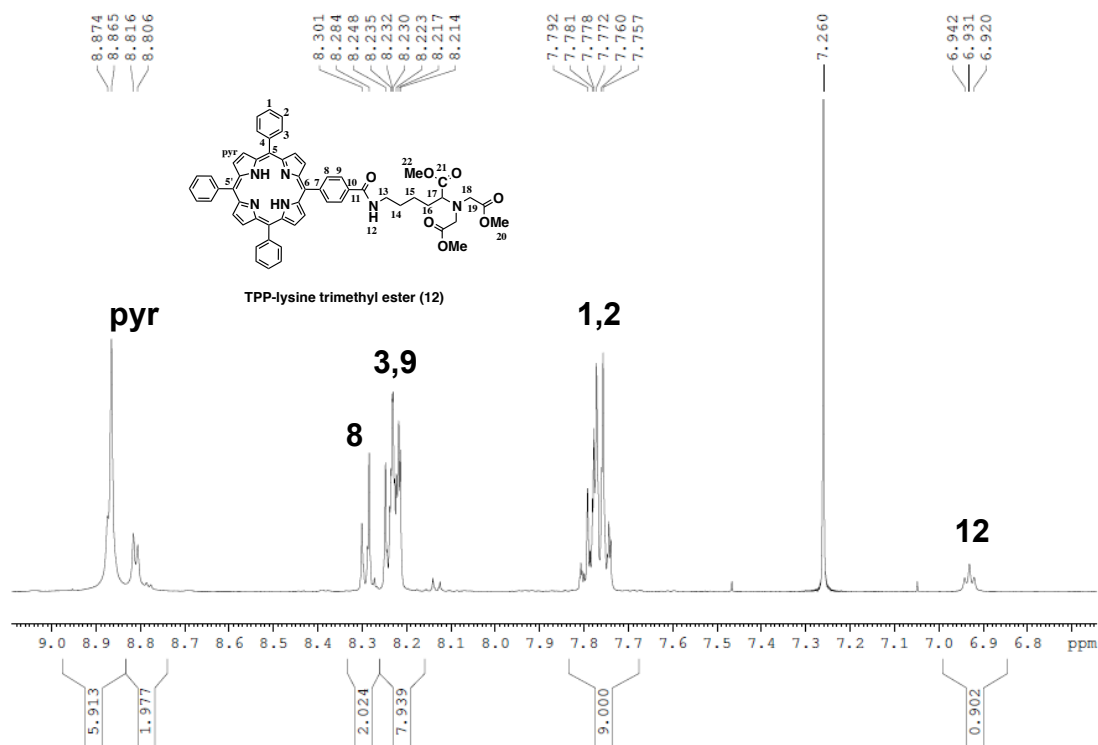
**Σχήμα 3.3** <sup>13</sup>C NMR spectrum of **NH<sub>2</sub>-lysine trimethyl ester (3)** (75 MHz, MeOD).

### **TPP-lysine trimethyl ester (12)**

Το φάσμα <sup>1</sup>H NMR της δυάδας **TPP-lysine trimethyl ester (12)** (Σχήμα 3.5) μας δίνει την πληροφορία ότι η σύζευξη της πορφυρίνης με τη λυσίνη ήταν επιτυχής, από την παρουσία της τριπλής κορυφής στα 6.93 ppm, οφειλόμενη στο αμιδικό NH. Στο φάσμα <sup>13</sup>C NMR (Σχήμα 3.6), διακρίνονται οι καρβονυλικοί C; στα 168 ppm (C11) ο C που οφείλεται στον αμιδικό δεσμό, ενώ στα 173.4 και 172.1 ppm (C21 και C19 αντίστοιχα), οι C που οφείλονται στις εστερικές ομάδες της **lysine trimethyl ester (3)**. Επιπλέον, στο ίδιο φάσμα (Σχήμα 3.7), οι κορυφές που διακρίνονται στα 51.9 και 51.7 ppm (C20 και C22 αντίστοιχα), οφείλονται στην ύπαρξη των ομάδων  $-\text{CH}_3$  του τριεστέρα της λυσίνης. Τέλος, τόσο από <sup>1</sup>H NMR όσο και από <sup>13</sup>C NMR διακρίνονται εύκολα οι κορυφές της πορφυρίνης και της λυσίνης (σελ 43 και 44). Η επιβεβαίωση της δομής πραγματοποιήθηκε και μέσω πειραμάτων 2D (COSY, HSQC, HMBC).

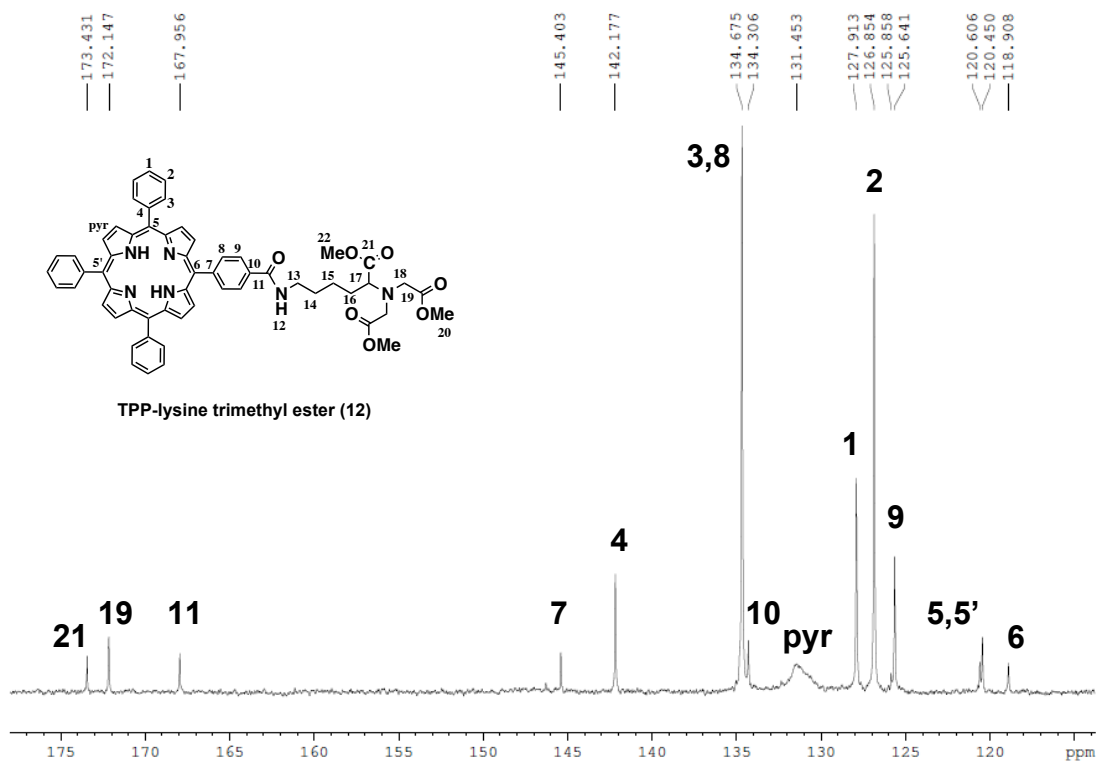


**Σχήμα 3.4**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **TPP-lysine trimethyl ester (12)** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). προστάσις

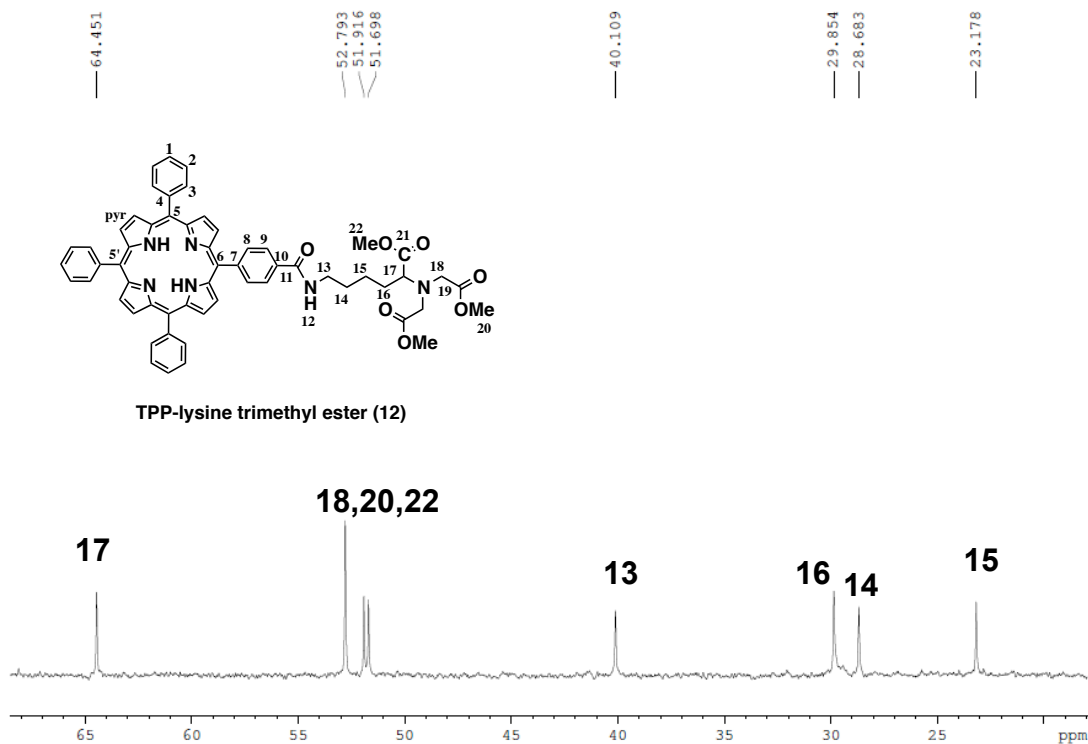


**Σχήμα 3.5** Aromatic region of  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **TPP-lysine trimethyl ester (12)** (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).





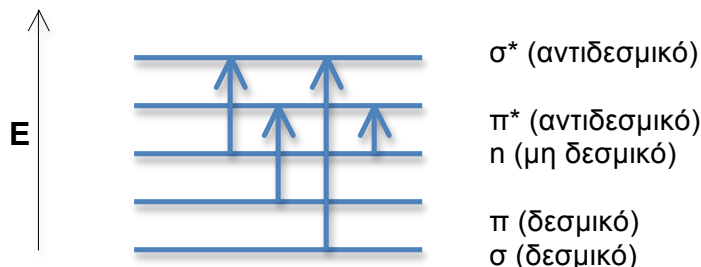
**Σχήμα 3.6** <sup>13</sup>C NMR spectrum of TPP-lysine trimethyl ester (12) (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) zoom.



**Σχήμα 3.7** <sup>13</sup>C NMR spectrum of TPP-lysine trimethyl ester (12) (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) zoom.

### 3.3 Φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-Vis)

Στη φασματοσκοπία UV-Vis ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία με μήκος κύματος από 190-800 nm απορροφάται από μόρια μιας ουσίας, τα οποία υφίστανται ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις.



**Εικόνα 3.5** Ηλεκτρονιακές μοριακές μεταπτώσεις που παρατηρούνται κατά την απορρόφηση UV-Vis ακτινοβολίας.

Η απορρόφηση φωτός από ένα δείγμα υπακούει στο νόμο του Beer-Lambert, σύμφωνα με τον οποίο η απορρόφηση ( $A$ ) είναι ευθέως ανάλογη με τη συγκέντρωση ( $C$ ) της ουσίας που απορροφά φως στο δείγμα. Ένα φάσμα UV-Vis δείχνει πώς το  $A$  ή το  $\epsilon$  μεταβάλλονται με το μήκος κύματος.<sup>131</sup>

$$A = \log I/I_0 = \epsilon C d \quad (\text{v. Beer-Lambert})$$

Όπου:

$A$ : η οπτική πυκνότητα ή απορρόφηση

$I$ : η ένταση εξερχόμενης ακτινοβολίας από το δείγμα

$I_0$ : η ένταση προσπίπτουσας ακτινοβολίας στο δείγμα

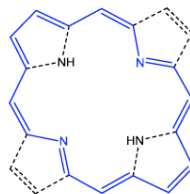
$\epsilon$ : ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης ή απορροφητικότητα ( $M^{-1}cm^{-1}$ )

$C$ : η συγκέντρωση του δείγματος ( $M$ )

$d$ : η οπτική διαδρομή ( $cm$ )

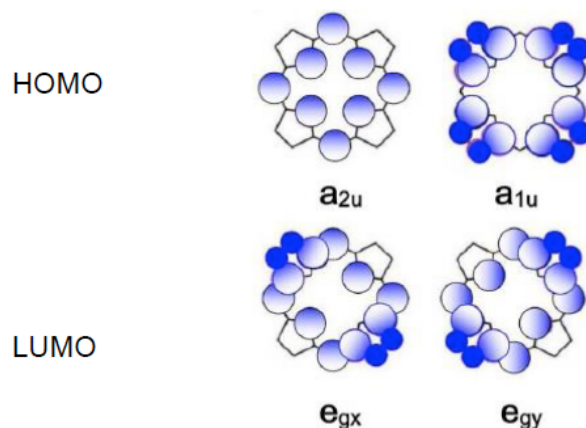
#### Απορρόφηση πορφυρινών

Οι πορφυρίνες είναι ισχυρά έγχρωμες ενώσεις με έντονες ταινίες απορρόφησης στην ορατή περιοχή. Η ιδιότητα αυτή προέρχεται από τον εσωτερικό 16-μελή δακτύλιο με 18  $\pi$  ηλεκτρόνια, (εκτεταμένη συζυγία) που αποτελεί την ηλεκτρονιακή "καρδιά" των πορφυρινών.



**Εικόνα 3.6** Ο πορφυρινικός δακτύλιος, ο οποίος υπακούει στον κανόνα του Hückel ( $4n+2$ )  $\pi$  ηλεκτρόνια. Με μπλε συνεχή γραμμή φαίνονται οι δεσμοί του συζυγιακού πολυενίου.<sup>137</sup>

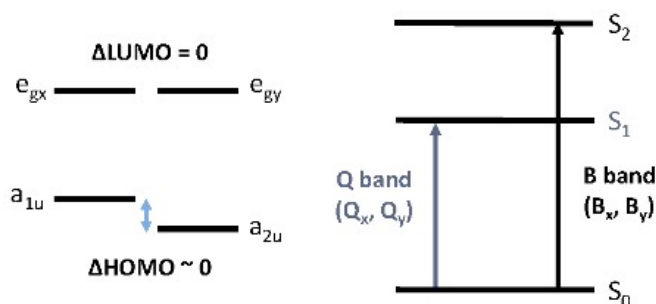
Ο Martin Gouterman<sup>138</sup> ήταν ο πρώτος που πρότεινε το 1960 το μοντέλο των τεσσάρων τροχιακών για να εξηγήσει τα φάσματα απορρόφησης των πορφυρινών. Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία, οι απορροφήσεις σε ζώνες σε συστήματα πορφυρινών οφείλονται σε μεταβάσεις μεταξύ δύο HOMO (υψηλότερης ενέργειας κατειλημμένο μοριακό τροχιακό) και δύο LUMO (χαμηλότερης ενέργειας κατειλημμένο μοριακό τροχιακό) μοριακών τροχιακών της πορφυρίνης τα οποία είναι εκφυλισμένα, ενώ οι ταυτότητες του κεντρικού μετάλλου και οι υποκαταστάτες επι του δακτυλίου επηρεάζουν τις σχετικές ενέργειες αυτών των μεταβάσεων.



**Εικόνα 3.7** Τα δύο HOMO μοριακά τροχιακά του πορφυρινικού δακτυλίου είναι εκφυλισμένα με συμμετρίες  $a_{1u}$  και  $a_{2u}$ . Τα δύο LUMO μοριακά τροχιακά έχουν συμμετρία  $e_g$ .<sup>6</sup>

-Συνολικά υπάρχουν τέσσερις πιθανές επιτρεπτές μεταπτώσεις πορφυρινών (δύο μεταβάσεις  $a_{1u} \rightarrow e_g$  και δύο μεταβάσεις  $a_{2u} \rightarrow e_g$ ).

-Οι μεταπτώσεις που λαμβάνουν χώρα είναι  $\pi \rightarrow \pi^*$ . Η ταινία Soret οφείλεται στη μετάπτωση  $a_{1u} \rightarrow e_g$  ενώ οι Q bands οφείλονται σε μεταπτώσεις  $a_{2u} \rightarrow e_g$ , όπως φαίνεται στην εικόνα που ακολουθεί.



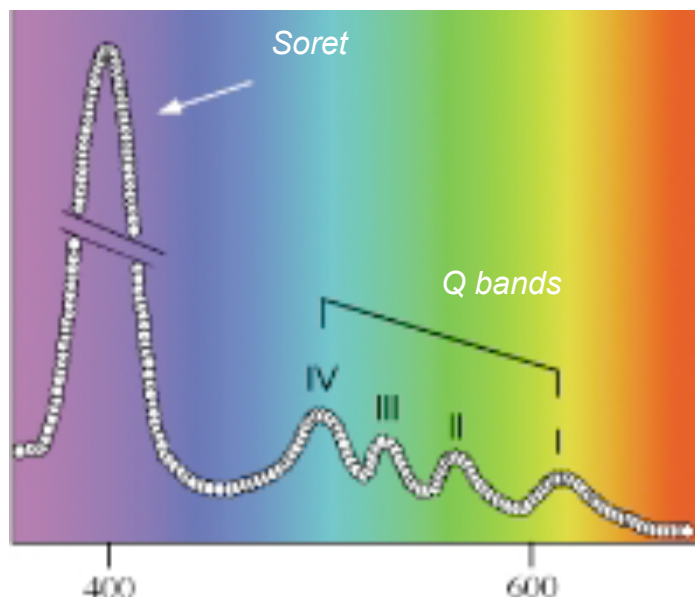
**Εικόνα 3.8** Διάγραμμα βασικών και διεγερμένων καταστάσεων του πορφυρινικού δακτυλίου.<sup>6</sup>

Τα ηλεκτρονικά φάσματα των πορφυρινών δείχνουν μεγάλο αριθμό ταινιών, λόγω της υψηλής τάξεως συζυγίας που παρουσιάζουν, οι οποίες είναι χαρακτηριστικές για κάθε πορφυρίνη, αφού το φάσμα εξαρτάται από τη φύση των υποκαταστατών του πυρρολικού δακτυλίου.

Ένα χαρακτηριστικό φάσμα μιας ελεύθερης πορφυρίνης εμφανίζει μια μεγάλης έντασης ταινία στα 400 nm περίπου (Soret band ή γ ταινία) καθώς και αρκετές ακόμη

<sup>138</sup> Gouterman, M. *J. Mol. Spectrosc.* **1961**, 6, 138-161.

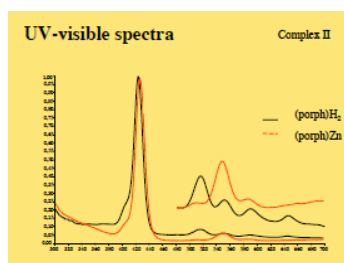
ταινίες ασθενέστερης έντασης (Q bands ή α και β ταινίες) σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (από 450 nm έως 700 nm περίπου). Η παρουσία αζονικών ligands που είναι ισχυροί σ και π δότες αυξάνει την ένταση της ταινίας α. Οι ταινίες αυτές οφείλονται σε  $\pi \rightarrow \pi^*$  μεταπτώσεις κατά την απορρόφηση φωτός της πορφυρίνης.



**Εικόνα 3.9** Ενδεικτικό φάσμα απορρόφησης UV-Vis ελεύθερης πορφυρίνης.<sup>6</sup>

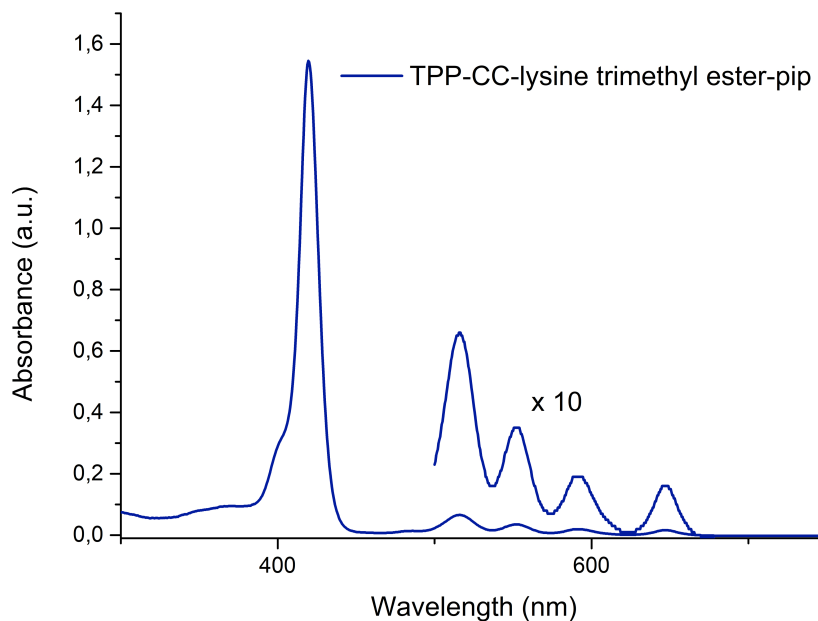
Καθότι ποικιλία περιφερειακών υποκαταστατών του πορφυρινικού δακτυλίου μπορεί να προκαλέσει μικρές αλλαγές στην ένταση και στο μήκος κύματος που απορροφά, πρωτονίωση δύο εκ των έσω αζώτων ή είσοδος/αλλαγή κεντρικού μεταλλοϊόντος στο δακτύλιο αλλάζει σημαντικά τη μορφή του φάσματος απορρόφησης.

Στην εικόνα που ακολουθεί μπορούμε να παρατηρήσουμε τις διαφορές που υπάρχουν ανάμεσα σε ένα φάσμα UV-Vis της ελεύθερης πορφυρίνης και της μεταλλωμένης πορφυρίνης. Στο φάσμα της ελεύθερης πορφυρίνης διακρίνονται οι Q ταινίες και η Soret σε αντίθεση με το φάσμα της μεταλλωμένης όπου ενώ η Soret διακρίνεται εμφανώς οι Q ταινίες δεν εμφανίζονται εκτός από τις δυο πρώτες. Αυτό συμβαίνει λόγω της συναρμογής του μετάλλου στο δακτύλιο όπου μεταβάλλεται η συμμετρία του συστήματος και συνεπώς η διαμόρφωση των Q ταινιών.



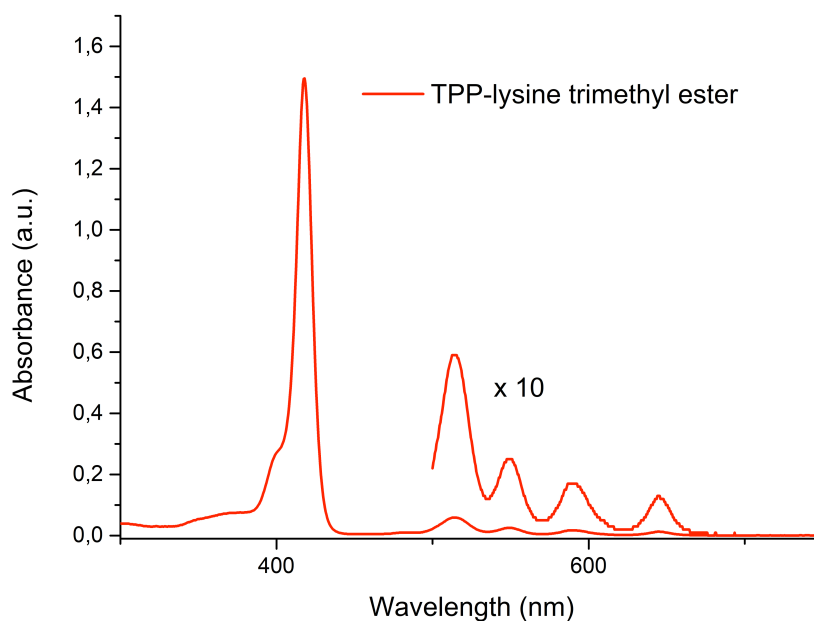
**Εικόνα 3.10** Σύγκριση ελεύθερης και μεταλλωμένης πορφυρίνης σε φάσμα UV-Vis.

**Φάσματα απορρόφησης UV-Vis των ενώσεων TPP-CC-lysine trimethyl ester-piperidine (8) και TPP-lysine trimethyl ester (12)**



**Σχήμα 3.8**

Φάσμα UV-Vis της ένωσης TPP-CC-lysine trimethyl ester-piperidine (8),  $C=0.24 \times 10^{-4}$  M, διαλύτης  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .



**Σχήμα 3.9**

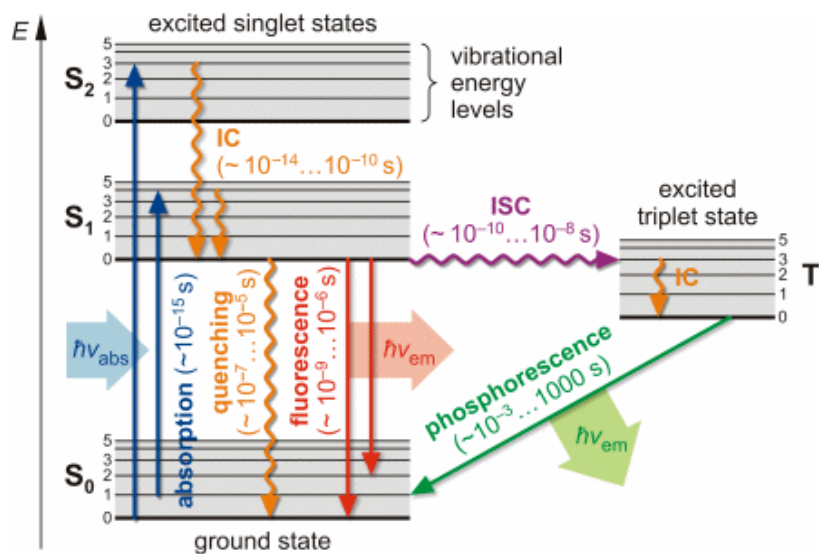
Φάσμα UV-Vis της ένωσης TPP-lysine trimethyl ester (12),  $C=0.2 \times 10^{-4}$  M, διαλύτης  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

Τα φάσματα απορρόφησης UV-Vis των δυάδων μας TPP-CC-lysine trimethyl ester-piperidine (8) και TPP-lysine trimethyl ester (12), αποτελούν αντιπροσωπευτικά φάσματα απορρόφησης ελεύθερης πορφυρίνης. Και στα δύο φάσματα

παρατηρούνται η Soret ταινία στα 420 nm περίπου, καθώς και οι τέσσερις Q ταινίες στην περιοχή 500-650 nm περίπου.

### 3.4 Φασματοσκοπία φθορισμού (Fluorescence)

Ο φθορισμός είναι η αυθόρμητη εκπομπή φωτός κατά τη μετάβαση του συστήματος από το χαμηλότερο επίπεδο δόνησης μιας απλής διεγερμένης κατάσταση  $S_1$  πίσω στη θεμελιώδη κατάσταση  $S_0$ . Έτσι, είναι μια διαδικασία spin-επιτρεπόμενη αφού υπακούει τον κανόνα επιλογής  $\Delta S = 0$ , σε αντίθεση με το φωσφορισμό, όπου συμβαίνει μια απαγορευμένη μετάπτωση χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας σε ένα ισοενεργειακό δονητικό επίπεδο της τριπλής κατάστασης  $T_1$  με αλλαγή του spin (διασυστηματική διασαύρωση).

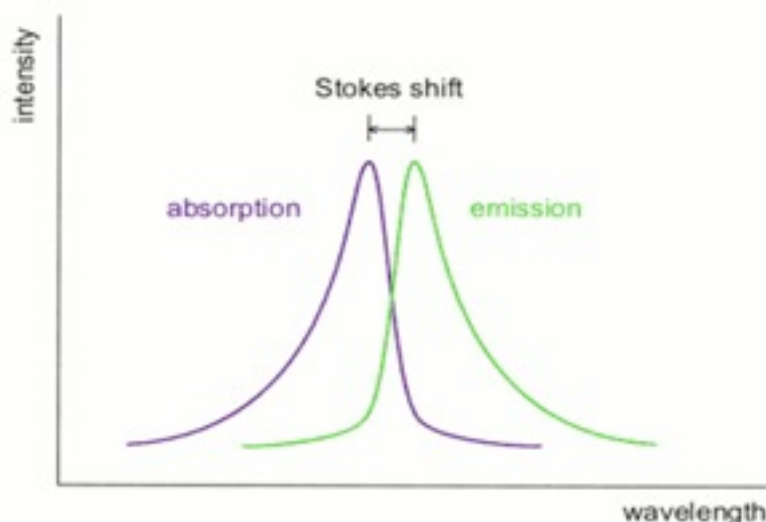


**Εικόνα 3.11** Διάγραμμα Jablonski με τις διεργασίες που παρατηρούνται κατά την απορρόφηση φωτός από μια ουσία.

Το φάσμα φθορισμού εμφανίζεται σε χαμηλότερη ενέργεια, δηλαδή σε μεγαλύτερο μήκος κύματος από αυτό της απορρόφησης λόγω απώλειας ενέργειας στη διεγερμένη κατάσταση εξαιτίας δονητικής αποδιέγερσης.

Ως αποτέλεσμα της αρχής Franck-Condon, συμβαίνει αύξηση του μήκους κύματος του φωτονίου που απορροφάται και εκπέμπεται (μετατόπιση Stokes).<sup>131</sup>

$$\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{abs} > 0 \text{ (μετατόπιση Stokes)}$$



**Εικόνα 3.12** Σχηματική απεικόνιση των φασμάτων διέγερσης και εκπομπής φθορισμού χρωστικών.

Η φθορίζουσα κβαντική απόδοση  $\Phi$  (fluorescence quantum yield) είναι ένα μέτρο απόδοσης φθορισμού ενός μορίου και ορίζεται ως ο λόγος του αριθμού των φωτονίων που εκπέμπονται προς αυτών που απορροφώνται.

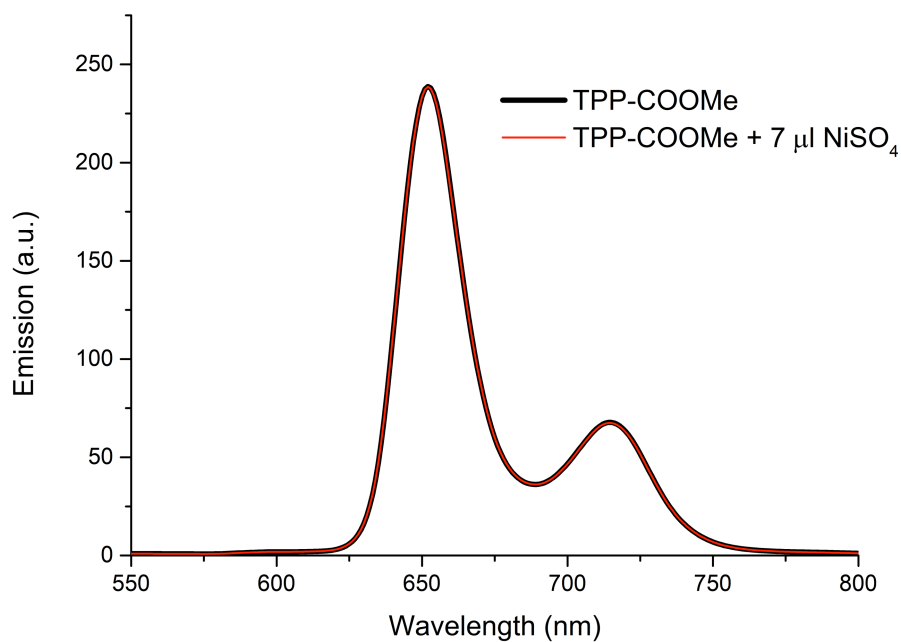
### **Μετρήσεις φθορισμού για έλεγχο αλληλεπίδρασης $\text{Ni}^{2+}$ με τις τελικές δυάδες**

Παρασκευάζονται 4 διαλύματα:

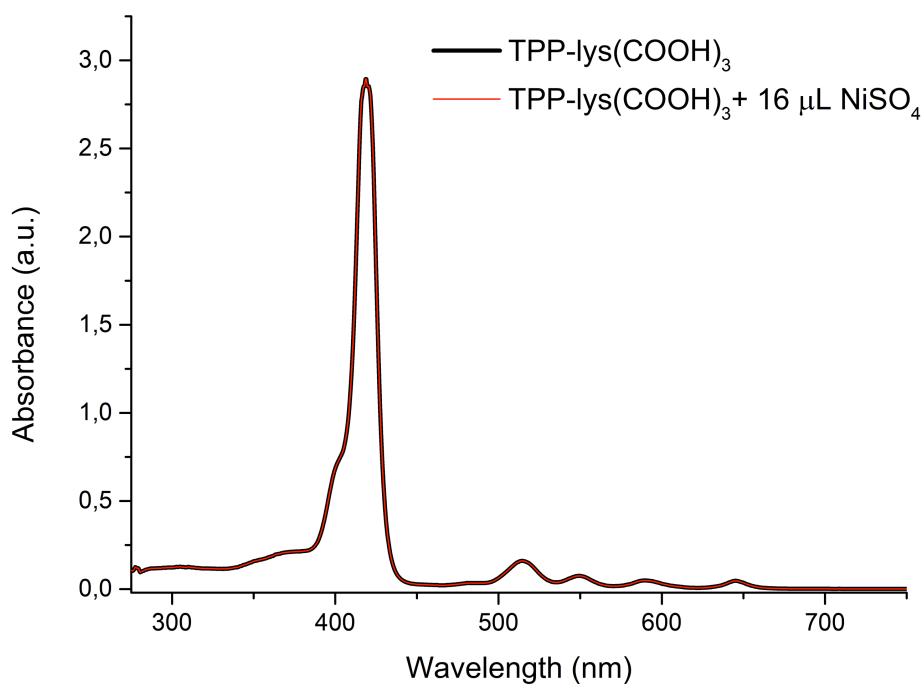
- TPP-COOMe (**4**) συγκέντρωσης  $C = 2.62 \times 10^{-6}$  M σε διαλύτη DMSO,
- TPP-lys(COOH)<sub>3</sub> (**13**) συγκέντρωσης  $C = 3.7 \times 10^{-6}$  M σε διαλύτη DMSO,
- TPP-CC-lys(COOH)<sub>3</sub>-piperidine (**9**) συγκέντρωσης  $C = 3.23 \times 10^{-6}$  M σε διαλύτη DMSO και
- $\text{NiSO}_4$  συγκέντρωσης  $C = 3.8 \times 10^{-3}$  M σε διαλύτη  $\text{H}_2\text{O}$ .

Σε κυψελίδα που περιέχει 0.375 ml διαλύματος TPP-COOMe (**4**) προστίθενται 2.625 ml DMSO και καταγράφονται τα φάσματα απορρόφησης και φθορισμού. Στη συνέχεια προστίθενται 7  $\mu\text{l}$  από το διάλυμα  $\text{NiSO}_4$ . Παρατηρείται ότι η απορρόφηση και ο φθορισμός ( $\lambda_{\text{διεγ}} = 505$  nm) δεν επηρεάζονται από την προσθήκη διαλύματος  $\text{NiSO}_4$  (Σχήμα 3.10). Συνεπώς το  $\text{Ni}^{2+}$  δεν αλληλεπιδρά με την πορφυρίνη TPP-COOMe (**4**).

Στη συνέχεια, καταγράφεται η απορρόφηση και ο φθορισμός για τα διαλύματα TPP-lys(COOH)<sub>3</sub> (**13**) και TPP-CC-lys(COOH)<sub>3</sub>-piperidine (**9**). Κατά την προσθήκη διαλύματος  $\text{NiSO}_4$  (8  $\mu\text{l}$ ) στην κυψελίδα, η απορρόφηση των πορφυρινικών παραγώγων δεν μεταβάλλεται (Σχήμα 3.11), παρατηρείται όμως απόσβεση του φθορισμού των πορφυρινών κάτι το οποίο αναμένεται λόγω αλληλεπίδρασης των ομάδων NTA που φέρουν με το παραμαγνητικό  $\text{Ni}^{2+}$  (Σχήματα 3.12 και 3.13).

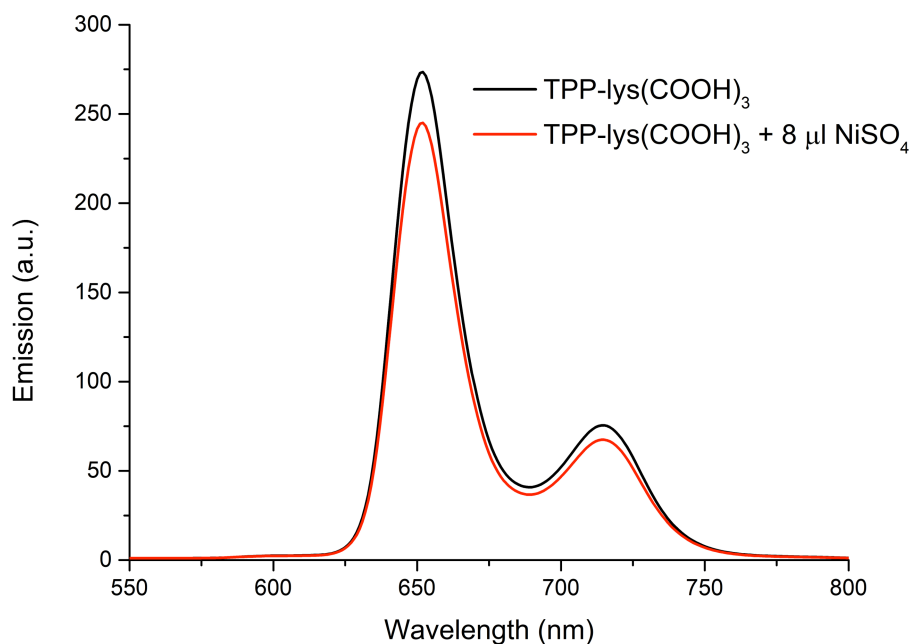


**Σχήμα 3.10** Φάσμα εκπομπής της ένωσης TPP-COOMe (4) (μαύρη γραμμή) πριν και μετά την προσθήκη διαλύματος 7 μl NiSO<sub>4</sub> (κόκκινη γραμμή), διαλύτης DMSO.

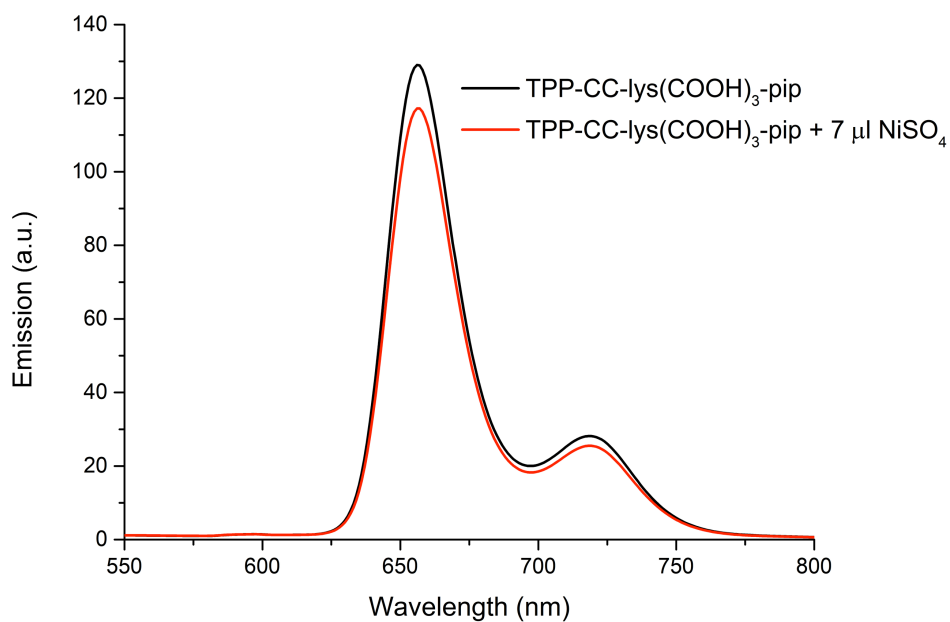


**Σχήμα 3.11** Φάσμα UV-Vis της ένωσης TPP-lysine tricarboxy (13) (μαύρη γραμμή) πριν και μετά την προσθήκη διαλύματος 16 μl NiSO<sub>4</sub> (κόκκινη γραμμή), διαλύτης DMSO.





**Σχήμα 3.12** Φάσμα εκπομπής της ένωσης TPP-lysine tricarboxy (13) (μαύρη γραμμή) πριν και μετά την προσθήκη διαλύματος 8 μl NiSO<sub>4</sub> (κόκκινη γραμμή), διαλύτης DMSO.



**Σχήμα 3.13** Φάσμα εκπομπής της ένωσης TPP-CC-lysine tricarboxy-piperidine (9) (μαύρη γραμμή) πριν και μετά την προσθήκη διαλύματος 7 μl NiSO<sub>4</sub> (κόκκινη γραμμή), διαλύτης DMSO.

### 3.5 Θεωρία συναρτησιακού ηλεκτρονιακής πυκνότητας (Density Functional Theory, DFT)

Η θεωρία συναρτησιακού ηλεκτρονιακής πυκνότητας (DFT) είναι μια υπολογιστική μέθοδος κβαντομηχανικής μοντελοποίησης που χρησιμοποιείται στη φυσική, τη χημεία και την επιστήμη υλικών για τη διερεύνηση της ηλεκτρονιακής δομής της ύλης (άτομα, μόρια, στερεά, πυρήνες κλπ).

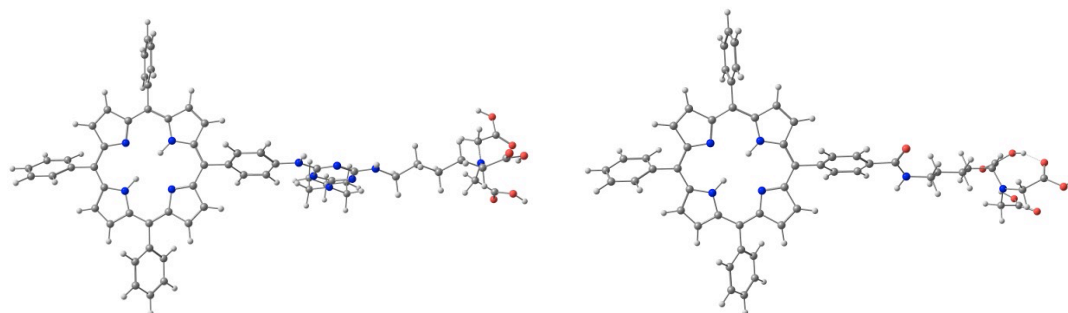
Με αυτή τη θεωρία, μπορούν να προσδιοριστούν οι ιδιότητες ενός συστήματος πολλών ηλεκτρονίων με τη χρήση συναρτήσεων, η οποία στην προκειμένη περίπτωση είναι η χωρικά εξαρτώμενη πυκνότητα ηλεκτρονίων.

Μπορούμε να αντλήσουμε σημαντικές πληροφορίες για τις ιδιότητες της βασικής κατάστασης μιας ένωσης όπως:

- μοριακές δομές,
- συχνότητες δόνησης,
- ενέργειες διάσπασης ατόμων,
- ενέργειες ιονισμού,
- ηλεκτρικές και μαγνητικές ιδιότητες,
- μονοπάτια αντίδρασης κλπ.

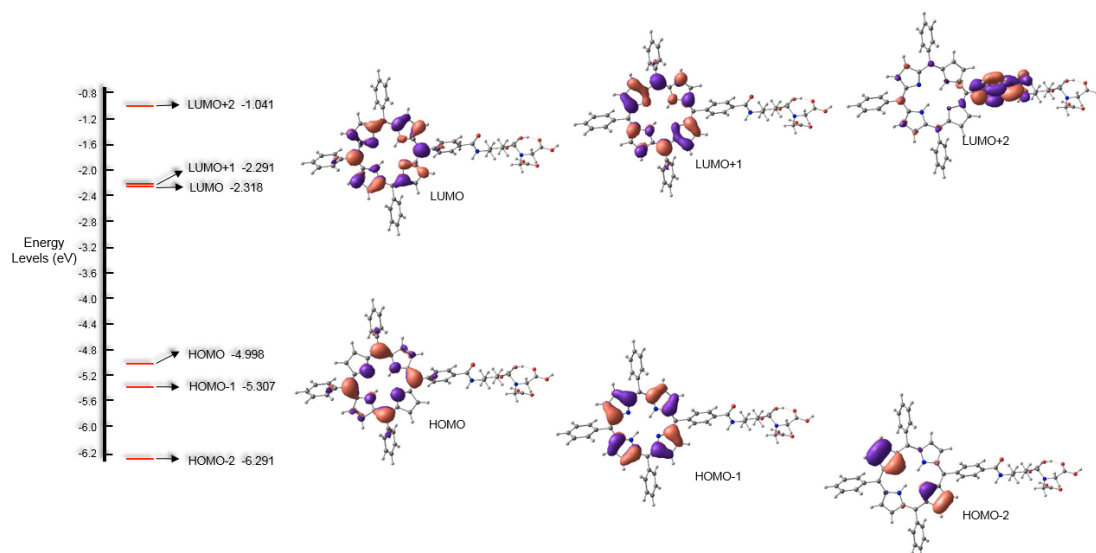
Η θεωρία αυτή είναι πολύ χρήσιμη για την πρόβλεψη των ιδιοτήτων και των δομών των πορφυρινών αφού μας επιτρέπει να υπολογίσουμε την θέση των HOMO και των LUMO τροχιακών και τη διευθέτησή τους στον πορφυρινικό δακτύλιο. Με τη βοήθεια αυτής της θεωρίας μπορεί να βρεθεί επίσης η θεωρητική τιμή διαφοράς ενέργειας ( $\Delta E$ ) για το HOMO-LUMO gap.

#### Αποτελέσματα θεωρητικών υπολογισμών DFT για τις τελικές δυνάδες

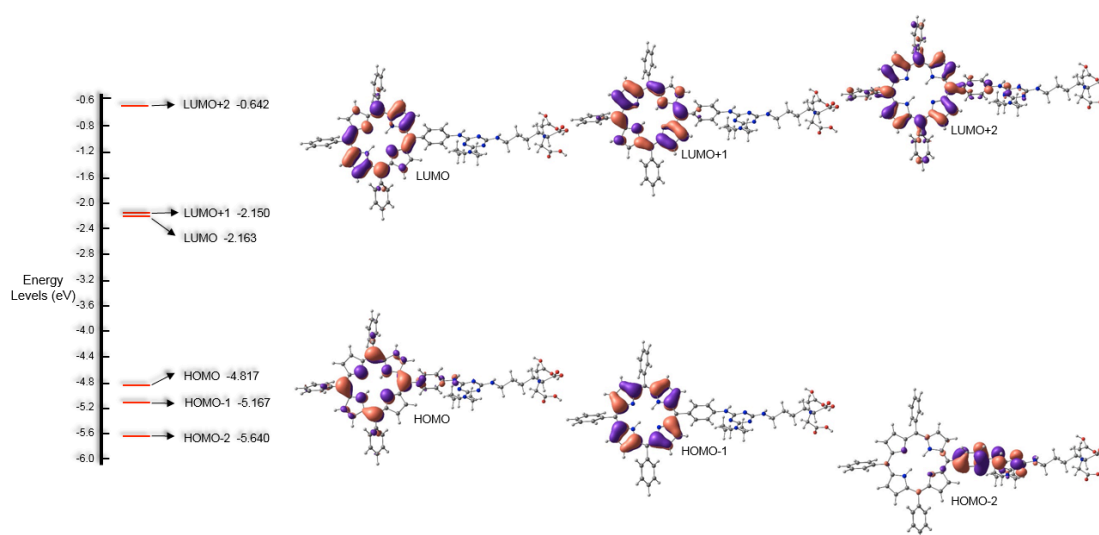


**Εικόνα 3.13** Δομές των τελικών δυνάδων από μελέτες DFT: (αριστερά) TPP-CC-lysine tricarboxy-piperidine (9), (δεξιά) TPP-lysine tricarboxy (13).

Η θεωρητική τιμή  $\Delta E$  για το HOMO-LUMO gap της TPP-CC-lysine tricarboxy-piperidine (9) είναι 2.679 eV και για τη δυνάδα TPP-CC-lysine tricarboxy-piperidine (9) είναι 2.654 eV (Πίνακας 3.1).



**Σχήμα 3.13** Ενεργειακό διάγραμμα των HOMO και LUMO τροχιακών της δυάδας TPP-lysine tricarboxy (**13**) και απεικονίσεις των τροχιακών της βάσει DFT.



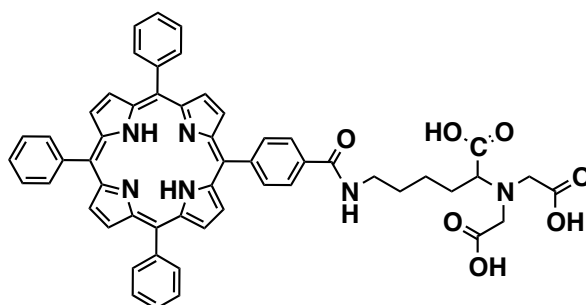
**Σχήμα 3.14** Ενεργειακό διάγραμμα των HOMO και LUMO τροχιακών της δυάδας TPP-CC-lysine tricarboxy-piperidine (**9**) και απεικονίσεις των τροχιακών της βάσει DFT.

| Ένωση  | HOMO (eV) | LUMO (eV) | $\Delta E_{HL}$ (eV) | $\mu(D)$ |
|--|-----------|-----------|----------------------|----------|
| TPP-lysine tricarboxy ( <b>13</b> )              | -4.998    | -2.318    | 2.679                | 4.81     |
| TPP-CC-lysine tricarboxy-piperidine ( <b>9</b> ) | -4.817    | -2.163    | 2.654                | 3.79     |

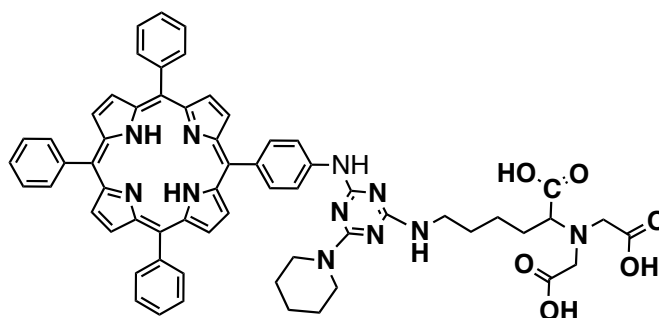
**Πίνακας 3.1** Αποτελέσματα θεωρητικών μελετών DFT για τις δυάδες TPP-CC-lysine tricarboxy-piperidine (**9**) και TPP-lysine tricarboxy (**13**).

## Κεφάλαιο 4: Συμπεράσματα

Καταφέραμε να συνθέσουμε με επιτυχία δυο νέες δυάδες πορφυρίνης ενωμένες με χηλικό υποκαταστάτη (ligand) NTA. Η πιστοποίηση της σύνθεσης πραγματοποιήθηκε στις μη υδρολυμένες μορφές τους με φασματοσκοπία NMR, με φασματομετρία μάζας και με φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-Vis). Δυστυχώς, οι τελικές δυάδες (Σχήμα 4.1) δεν μπόρεσαν να αποτιμηθούν βάσει NMR λόγω της δυσδιαλυτότητάς τους. Παρολ'αυτά καταφέραμε να πιστοποιήσουμε το σχηματισμό τους από την ύπαρξη των μοριακών ιόντων με χρήση της φασματομετρίας μάζας.



TPP-lysine tricarboxy



TPP-CC-lysine tricarboxy-piperidine

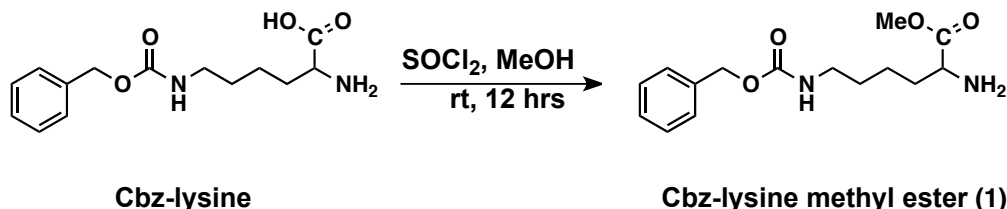
**Σχήμα 4.1** Τελικές δυάδες πορφυρίνης με NTA.

Η παρουσία του χηλικού υποκαταστάτη (ligand) NTA, γνωστό στη βιβλιογραφία ως συμπλοκοποιητή μετάλλων και ειδικότερα στον τομέα της μοριακής αναγνώρισης-σήμανσης (labeling) πρωτεϊνών και πεπτιδίων με His-tag, θα αποτελέσει το μέσο σύνδεσης των ενώσεών μας με το πεπτίδιο που φέρει His, μέσω της συμπλοκοποίησής του με το  $Ni^{2+}$ .

Από μετρήσεις φθορισμού στις δυάδες TPP-lys(COOH)<sub>3</sub> (13) και TPP-CC-lys(COOH)<sub>3</sub>-piperidine (9) διαπιστώσαμε απόσβεση του φθορισμού των πορφυρινών λόγω αλληλεπίδρασης των ομάδων NTA που φέρουν με το παραμαγνητικό  $Ni^{2+}$ , κάτι το οποίο δεν παρατηρήσαμε στην πορφυρίνη TPP-COOMe (4) που δε διαθέτει ομάδα NTA.

Η διενέργεια των δοκιμών για την αποτελεσματικότητα των δυάδων μας να αλληλεπιδράσουν με το πεπτίδιο θα πραγματοποιηθεί άμεσα και ελπίζουμε ότι θα

ανοίξει νέους δρόμους στην εφαρμογή τέτοιων διαδων ως ανιχνευτές (probes) τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* σε ζωντανά κύτταρα.

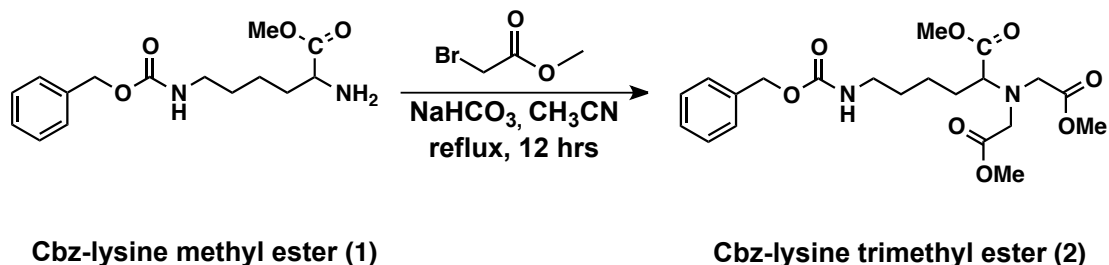
**Κεφάλαιο 5: Πειραματικό Μέρος****5.1 Σύνθεση της Cbz-lysine methyl ester (1)****Σχήμα 5.1** Συνθετική πορεία της Cbz-lysine methyl ester (1).

Σε σφαιρική βιδωτή δίλαιομη φιάλη εισάγονται 300 mgr Cbz-lysine (1.07 mmol) και 12 mL άνυδρου διαλύτη MeOH. Προσαρτάται παγόλουτρο. Στο μίγμα, προστίθενται κατόπιν 1.5 mL SOCl<sub>2</sub> στάγδην και το σύστημα αφήνεται υπό ανάδευση σε παγόλουτρο για 1 ώρα. Στη συνέχεια, απομακρύνεται το παγόλουτρο και η αντίδραση αφήνεται σε αναερόβιες συνθήκες, υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Μετά το πέρας των 12 ωρών γίνεται απόσταξη της MeOH. Στο εναπομένον μίγμα προστίθεται διαλύτης CHCl<sub>3</sub>. Έπειτα, ακολουθεί εκχύλιση του διαλύματος που απομένει στη φιάλη, αρχικά με κορεσμένο διάλυμα NaHCO<sub>3</sub> (3x100 mL) και έπειτα με κορεσμένο διάλυμα NaCl (3x100 mL). Η οργανική φάση συλλέγεται και προστίθεται ξηραντικό Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> για απομάκρυνση της υγρασίας. Μετά τη διήθηση, το μίγμα συλλέγεται και ακολουθεί απόσταξη μέχρι ξηρού προς απομάκρυνση του διαλύτη. Τέλος, το επιθυμητό προϊόν απομονώνεται ως άχρωμο λάδι (1). Απόδοση: 313 mgr (99.3%).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.34 (m, 5H), 5.08 (s, 2 H), 4.84 (s, 1H, NH), 3.71 (s, 3 H), 3.46 (t, 1 H), 3.19 (m, 2 H), 1.4-1.76 (m, 6 H) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 176.2, 156.5, 136.7, 128.7, 128.2, 66.7, 54.3, 52.2, 40.9, 34.2, 29.7, 22.9 ppm.

MALDI-TOF *m/z* : 294.16 (MH<sup>+</sup> calcd for C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: 295.32).

**5.2 Σύνθεση της Cbz-lysine trimethyl ester (2)****Σχήμα 5.2** Συνθετική πορεία της Cbz-lysine trimethyl ester (2).

Σε φιάλη schlenk εισάγονται 105.3 mgr Cbz-lysine methyl ester (1) (0.36 mmol), 2.1 mL άνυδρου διαλύτη CH<sub>3</sub>CN και 41.91 mgr άνυδρο στερεό NaHCO<sub>3</sub>. Το σύστημα αφήνεται υπό ανάδευση σε αναερόβιες συνθήκες για 5 λεπτά. Στη συνέχεια προστίθενται 0,11 mL methyl bromoacetate (1.07 mmol). Η αντίδραση αφήνεται σε

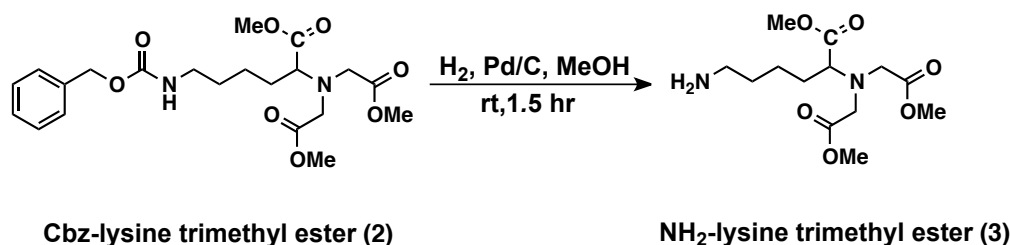
συνθήκες αναρροής με ανάδευση υπό αναερόβιες συνθήκες για 12 ώρες. Μετά το πέρας των 12 ωρών το μίγμα στη φιάλη αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια γίνεται απόσταξη του MeCN. Στο εναπομένον μίγμα προστίθεται διαλύτης Et<sub>2</sub>O. Έπειτα, ακολουθεί εκχύλιση του διαλύματος με κορεσμένο διάλυμα NaCl (2x100 mL). Η οργανική φάση συλλέγεται και προστίθεται ξηραντικό Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> για απομάκρυνση της υγρασίας. Μετά τη διήθηση, το μίγμα συλλέγεται και ακολουθεί απόσταξη μέχρι ξηρού προς απομάκρυνση του διαλύτη. Τέλος το επιθυμητό προϊόν απομονώνεται με χρωματογραφίας στήλης (silica gel, διαλύτης έκλουσης Hexane/Ethyl acetate, 2:1 και έπειτα 1:1) και συλλέγεται ως κίτρινο λάδι (**2**). Απόδοση: 113.1 mgr (70.1%).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 7.33 (m, 5H), 5.08 (s, 2 H), 4.92 (s, 1H, NH), 3.68 (s, 13 H), 3.45 (t, 1 H), 3.18 (m, 2 H), 1.35-1.75 (m, 6 H) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 172.9, 171.6, 156.6, 136.8, 128.6, 128.2, 66.7, 64.7, 52.5, 51.9, 51.7, 40.8, 29.9, 29.4, 23.1 ppm.

MALDI-TOF *m/z* : 438.20 (MNa<sup>+</sup> calcd for C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> : 461.30).

### 5.3 Σύνθεση της NH<sub>2</sub>-lysine trimethyl ester (**3**)

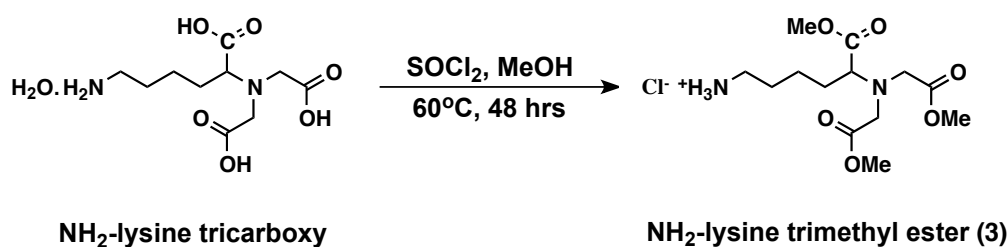


**Σχήμα 5.3** Συνθετική πορεία της NH<sub>2</sub>-lysine trimethyl ester (**3**).

Σε σφαιρική βιδωτή δίκλιμη φιάλη εισάγονται 44.5 mgr Cbz-lysine trimethyl ester (**2**) (0.10 mmol) και 10 mL άνυδρου διαλύτη MeOH. Στο μίγμα, προστίθεται κατόπιν 7.5 mgr Pd/C 10% (0.07 mmol) και το σύστημα αφήνεται σε αναερόβιες συνθήκες υπό ανάδευση για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, στο σύστημα προσαρτάται μπαλόνι που φέρει H<sub>2</sub>. Η φιάλη προστατεύεται από το φως και η αντίδραση αφήνεται σε αναερόβιες συνθήκες, υπό ανάδευση για 90 λεπτά. Μετά το πέρας των 90 λεπτών το μίγμα διηθείται με celite για την απομάκρυνση του Pd/C. Το διάλυμα που απομένει αποστάζει μέχρι ξηρού ώστε να απομακρυνθεί η MeOH. Τέλος, το επιθυμητό προϊόν συλλέγεται ως κίτρινο λάδι (**3**) και φυλάσσεται στο ψυγείο προστατευμένο από το φως. Απόδοση: 30 mgr (97.1%).

<sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>): 3.74 (s, 9H), 3.68 (s, 4H), 3.50 (t, 1H), 2.94 (t, 2H), 1.40-1.82 (m, 6H) ppm.

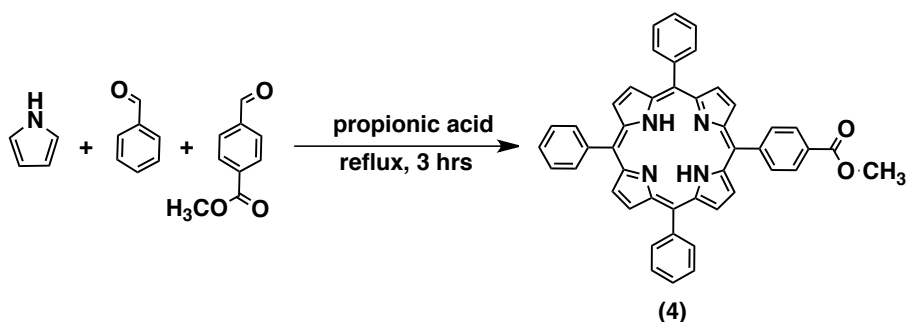
<sup>13</sup>C NMR (75MHz, CDCl<sub>3</sub>): 173.0, 171.9, 64.4, 52.4, 51.7, 51.4, 40.4, 29.8, 29.1, 22.8 ppm.

5.4 Σύνθεση της NH<sub>2</sub>-lysine trimethyl ester (3)**Σχήμα 5.4** Συνθετική πορεία της NH<sub>2</sub>-lysine trimethyl ester (3).

Σε σφαιρική βιδωτή δόλιμη φιάλη εισάγονται 56.4 mgr NH<sub>2</sub>-lysine tricarboxy (0.22 mmol) και 15 mL άνυδρου διαλύτη MeOH. Προσαρτάται παγόλουτρο. Στο μίγμα, προστίθεται κατόπιν 0.31 mL SOCl<sub>2</sub> στάγδην. Αφού ολοκληρωθεί η προσθήκη του SOCl<sub>2</sub> το παγόλουτρο απομακρύνεται. Εν συνεχεία, το σύστημα θερμαίνεται μέχρι τους 60°C και αφήνεται υπό ανάδευση και θέρμανση για 48 ώρες. Μετά το πέρας των 48 ωρών, το μίγμα στη φιάλη αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια γίνεται απόσταξη MeOH και SOCl<sub>2</sub> υπό ελαττωμένη πίεση. Τέλος, το επιθυμητό προϊόν συλλέγεται ως κίτρινο λάδι (3) και φυλάσσεται στο ψυγείο προστατευμένο από το φως. Απόδοση: 71.6 mgr (97.85%).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, MeOD): δ = 4.08 (m, 1 H), 3.6-3.8 (m, 13 H), 2.94 (m, 2 H), 1.56-1.77 (m, 6 H) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, MeOD): δ = 173.4, 172.7, 65.8, 53.8, 52.5, 52.4, 40.6, 30, 27.9, 23.7 ppm.

5.5 Σύνθεση της πορφυρίνης TPP-COOMe (4)**Σχήμα 5.5** Συνθετική πορεία της πορφυρίνης TPP-COOMe (4).

Σε σφαιρική φιάλη εισάγονται 0.7 mL benzaldehyde (6.89 mmol), 377.1 mgr methyl 4-formylbenzoate (2.3 mmol) και εν συνεχεία 40 mL διαλύτη propionic acid. Το σύστημα θερμαίνεται μέχρι τους 100°C και προστίθεται στάγδην 0.6 mL pyrrole (9.19 mmol). Στη συνέχεια, η θερμοκρασία αυξάνεται μέχρι το σημείο βρασμού του διαλύτη (T<sub>b</sub>=145°C). Η σφαιρική φιάλη προστατεύεται από το φως και το σύστημα αφήνεται υπό ανάδευση σε συνθήκες αναρροής για 3 ώρες. Μετά το πέρας των 3 ωρών το μίγμα στη φιάλη αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου και τέλος προστίθεται H<sub>2</sub>O. Ακολουθεί διήθηση του μίγματος και εκπλύσεις του ιζήματος αρχικά με H<sub>2</sub>O, ώστε να απομακρυνθεί ο διαλύτης propionic acid και έπειτα με



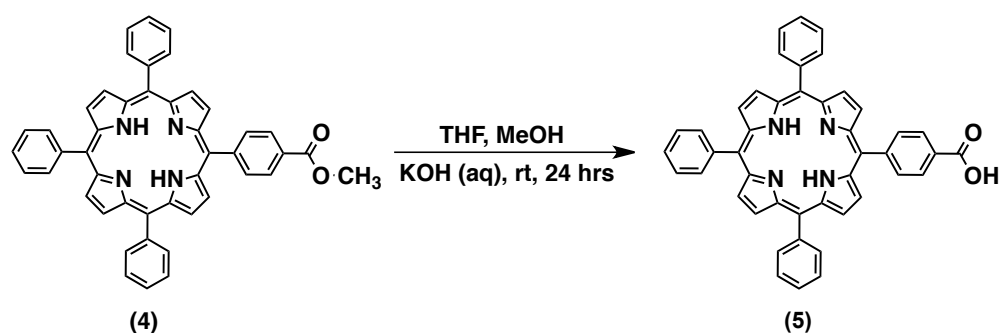
MeOH. Στη συνέχεια το επιθυμητό προϊόν απομονώνεται με χρωματογραφία στήλης (silica gel, διαλύτης έκλουσης CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Hexane (40:60)) και συλλέγεται ως μωβ στερεό (**4**). Απόδοση: 249 mgr (16.1%).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.87 (m, 6 H), 8.79 (d, J= 4.8 Hz, 2 H), 8.45 (d, J= 8.1 Hz, 2H), 8.32 (d, J= 8.1 Hz, 2 H), 8.22 (m, 6 H), 7.78 (m, 9 H), 4.12 (s, 3 H), -2.78 (s, 2 H) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 167.5, 147.2, 142.2, 134.7, 131.4, 129.7, 128, 127.9, 126.9, 120.7, 120.5, 118.6, 52.6 ppm.

MALDI-TOF *m/z* : 672.23, (M<sup>+</sup> calcd for C<sub>46</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O: 672.49).

### 5.6 Σύνθεση της πορφουρίνης TPP-COOH (**5**)



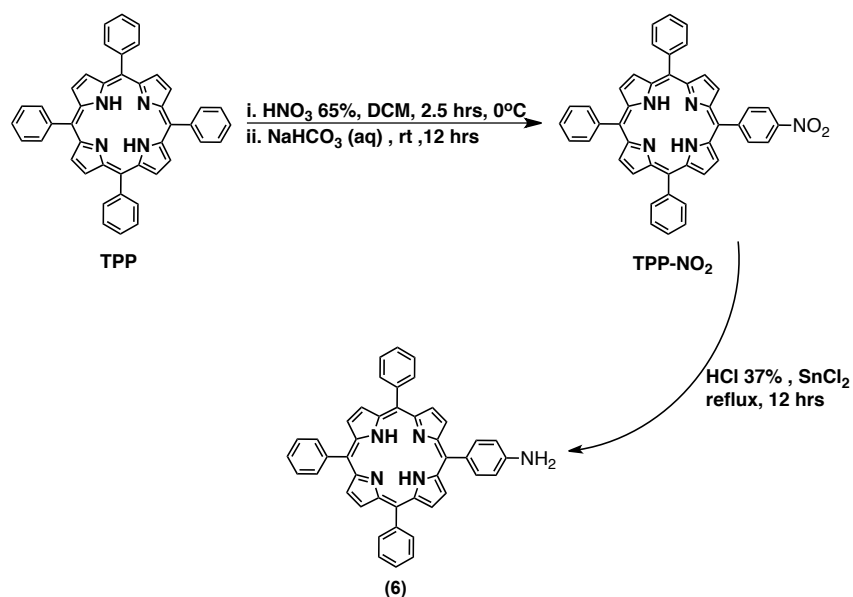
**Σχήμα 5.6** Συνθετική πορεία της πορφουρίνης TPP-COOH (**5**).

Σε σφαιρική φιάλη εισάγονται 93.5 mgr TPP-COOMe (**4**) (0.14 mmol), 66 mL THF, 27 mL MeOH, και εν συνεχεία διάλυμα KOH [1.98 gr KOH (0.035 mol) σε 33 mL H<sub>2</sub>O]. Το σύστημα αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Μετά το πέρας των 24 ωρών ακολουθεί απόσταξη των διαλυτών MeOH και THF. Στη συνέχεια, στο μίγμα προστίθενται περίπου 60 mL H<sub>2</sub>O και αφήνεται στο ψυγείο για 1 ώρα ώστε να καταβυθιστεί το πορφουρινικό προϊόν ως ίζημα. Κατόπιν, στη φιάλη προστίθεται διάλυμα HCl 1M έως ότου το pH του διαλύματος γίνει ελαφρώς όξινο (pH~ 5.5-6). Ακολουθεί διήθηση του μίγματος και εκπλύσεις του ιζήματος με H<sub>2</sub>O. Τέλος, το επιθυμητό προϊόν συλλέγεται ως μωβ στερεό (**5**). Απόδοση: 90 mgr (98.3 %).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO): δ = 8.83 (br s, 8 H), 8.33-8.35 (br s, 4H), 8.21 (br s, 6 H), 7.83 (br s, 9 H), -2.94 (s, 2 H) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO): δ = 167.6, 145.4, 141.2, 134.4, 134.3, 131.4, 128.2, 127.9, 127.1, 120.3, 120.2, 118.9 ppm.

MALDI-TOF *m/z* : 658.24, (M<sup>+</sup> calcd for C<sub>45</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>: 658.45).

5.7 Σύνθεση της πορφυρίνης TPP-NH<sub>2</sub> (6)

**Σχήμα 5.7** Συνθετική πορεία της πορφυρίνης TPP-NH<sub>2</sub> (6).

Σε σφαιρική δίδαιμη φιάλη εισάγονται 2 gr TPP (3.25 mmol), και 300 mL διαλύτη CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> και το σύστημα αφήνεται υπό ανάδευση σε παγόλουτρο στους 0°C. Στο σύστημα προσαρτάται προσθετική φιάλη με 8.2 mL διαλύματος HNO<sub>3</sub> 65%. Το οξύ αφήνεται να πέσει στάγδην στη φιάλη. Αφού ολοκληρωθεί η προσθήκη του οξέος στη φιάλη σε διάστημα περίπου 3 ωρών, απομακρύνεται το παγόλουτρο και το σύστημα αφήνεται να έρθει σε θερμοκρασία δωματίου. Η εξέλιξη της αντίδρασης σχηματισμού TPP-NO<sub>2</sub> ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) (διαλύτης CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/hexane (40:60)). Αφού ολοκληρωθεί η αντίδραση, γίνεται προσθήκη κορεσμένου διαλύματος NaHCO<sub>3</sub> ώστε να εξουδετερωθεί το οξύ. Στη συνέχεια, η φιάλη αφήνεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 12 ώρες. Μετά το πέρας των 12 ωρών το μίγμα εκχυλίζεται, αρχικά με κορεσμένο διάλυμα NaHCO<sub>3</sub> (1x150 mL) και έπειτα με νερό (3x150 mL). Κατόπιν, η οργανική φάση συλλέγεται προς απόσταξη για απομάκρυνση CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Το στερεό υπόλειμμα εισάγεται σε σφαιρική φιάλη στην οποία προστίθενται ~ 65 mL HCl 35% και 2 gr SnCl<sub>2</sub> (10.5 mmol). Η φιάλη αφήνεται υπό συνθήκες αναρροής και ανάδευσης για 12 ώρες. Μετά το πέρας των 12 ωρών το μίγμα στη φιάλη αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθείται εξουδετέρωση του οξέος με ~85 mL υδατικού διαλύματος NH<sub>3</sub> 25%. Στη φιάλη προστίθενται ~ 60 mL CHCl<sub>3</sub> και το σύστημα αφήνεται υπό συνθήκες αναρροής και ανάδευσης για 12 ώρες. Μετά το πέρας των 12 ωρών το μίγμα στη φιάλη αφήνεται να ηρεμήσει σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες και έπειτα εκχυλίζεται με H<sub>2</sub>O (3x150 mL). Κατόπιν, η οργανική φάση συλλέγεται προς απόσταξη μέχρι ξηρού. Τέλος, το επιθυμητό προϊόν απομονώνεται με χρωματογραφία στήλης (silica gel, διαλύτης έκλουσης CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/hexane (60:40) και έπειτα CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) και συλλέγεται ως μωβ στερεό (6). Απόδοση: 640 mgf (31.2 %).

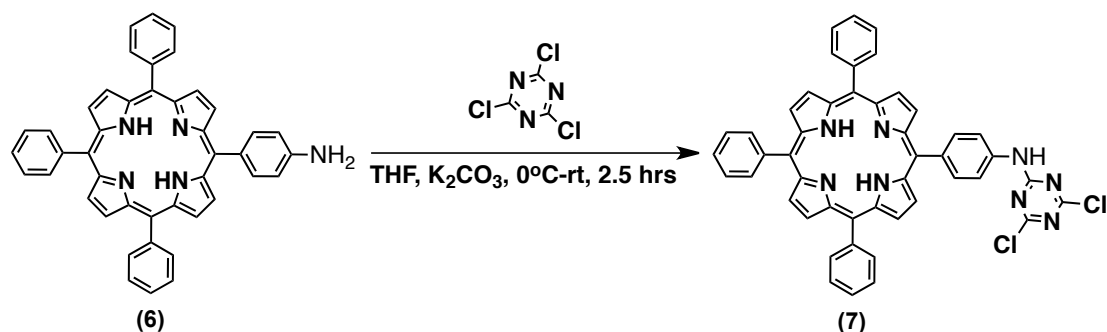
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 8.95 (d, *J* = 4.5 Hz, 2 H), 8.85 (s, 6 H), 8.23 (m, 6 H), 8.00 (m, 2 H), 7.75 (m, 9H), 7.05 (m, 2 H), 3.99 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>), -2.73 (s, 2 H) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 146.1, 142.4, 135.8, 134.7, 132.5, 131.1, 127.8, 126.8, 121.0, 120.1, 119.9, 113.6 ppm.

UV-Vis (toluene): λ<sub>max</sub> (ε, mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) 422 (258.2), 516 (12.5), 552 (6.8), 594 (3.6), 650 nm (2.8).

MALDI-TOF *m/z* : 629.26, (M<sup>+</sup> calcd for C<sub>44</sub>H<sub>31</sub>N<sub>5</sub>: 629.45).

## 5.8 Σύνθεση της πορφυρίνης TPP-CC (7)



Σχήμα 5.8 Συνθετική πορεία της πορφυρίνης TPP-CC (7).

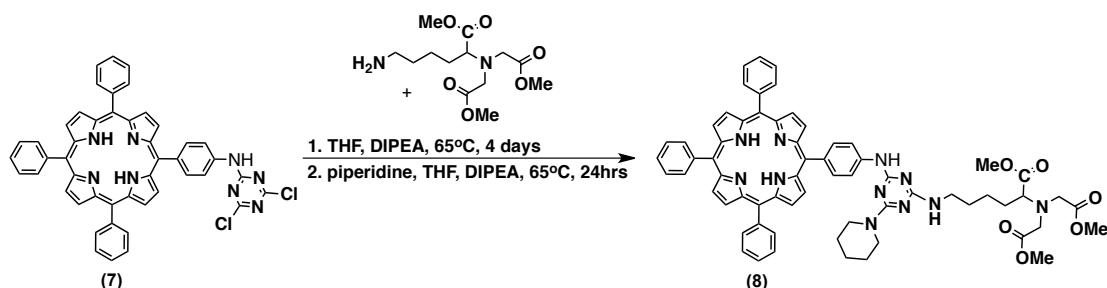
Σε σφαιρική βιδωτή δόλιμη φιάλη εισάγονται 70 mg TPP-NH<sub>2</sub> (**6**) (0.11 mmol), 76 mg άνυδρο στερεό K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.55 mmol) και 10 mL άνυδρου διαλύτη THF. Προσαρτάται παγόλουτρο και ακολουθεί ανάδευση του μίγματος για 5 λεπτά υπό αναερόβιες συνθήκες στους 0°C. Στη συνέχεια, το παγόλουτρο απομακρύνεται και στο μίγμα προστίθενται 24 mg cyanuric chloride (0.13 mmol). Το σύστημα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση και αναερόβιες συνθήκες για διάστημα περίπου 2.5 ωρών. Ακολουθεί διήθηση για απομάκρυνση του K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> και απόσταξη του διαλύτη THF. Τέλος, το επιθυμητό προϊόν απομονώνεται με χρωματογραφία στήλης (silica gel, διαλύτης έκλουσης CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/hexane (60:40) και έπειτα CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) και συλλέγεται ως μωβ-κόκκινο στερεό (**7**). Απόδοση: 86 mg (99.5%).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.86 (m, 8H), 8.23 (m, 8H), 7.92 (d, 2H), 7.87 (s, 1H, NH), 7.76 (m, 9H), -2.77 ppm (s, 2H) ppm.

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 171.7, 170.5, 164.3, 142.2, 139.7, 135.7, 135.4, 134.7, 131.4, 131.3, 127.9, 126.9, 120.5, 120.4, 119.2, 118.8 ppm.

UV-Vis (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): λ<sub>max</sub> (ε, M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) 418 (478 000), 514 (19 000), 549 (9000), 589 (6000), 645 nm (4500).

MALDI-TOF *m/z*: 776.2, (MH<sup>+</sup> calcd for C<sub>47</sub>H<sub>30</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>8</sub>: 777.4).

5.9 Σύνθεση της δυάδας TPP-CC-lysine trimethyl ester-piperidine (**8**)Σχήμα 5.9 Συνθετική πορεία της δυάδας TPP-CC-lysine trimethyl ester-piperidine (**8**).

Σε σφαιρική βιδωτή δόλιμη φιάλη εισάγονται 42 mg TPP-CC (**7**) (0.054mmol), 33 mg lysine trimethyl ester (**3**) (0.107 mmol) και 9 mL άνυδρου διαλύτη THF. Στη συνέχεια προστίθεται καταλυτική ποσότητα DIPEA (25 μL) και η αντίδραση αφήνεται, υπό ανάδευση σε ήπια θέρμανση (65°C) και υπό αναερόβιες συνθήκες για 4 μέρες,

προστατευμένη από το φως. Κατόπιν, προστίθενται *one-pot*, περίσσεια piperidine (70  $\mu\text{L}$ ) και καταλυτική ποσότητα DIPEA (185  $\mu\text{L}$ ) και η αντίδραση αφήνεται, υπό ανάδευση και ήπια θέρμανση στους 65 °C κάτω από αναερόβιες συνθήκες για 24 ώρες προστατευμένη από το φως. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) (διαλύτης έκλουσης  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$  (98:2)). Ακολουθεί απόσταξη του διαλύτη THF υπό ελαττωμένη πίεση. Τέλος, το επιθυμητό προϊόν απομονώνεται με χρωματογραφία στήλης (silica gel, διαλύτης έκλουσης  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$  (98:2)) και συλλέγεται ως μωβ-κόκκινο στερεό (**8**). Απόδοση: 14.9 mgr (25.4 %).

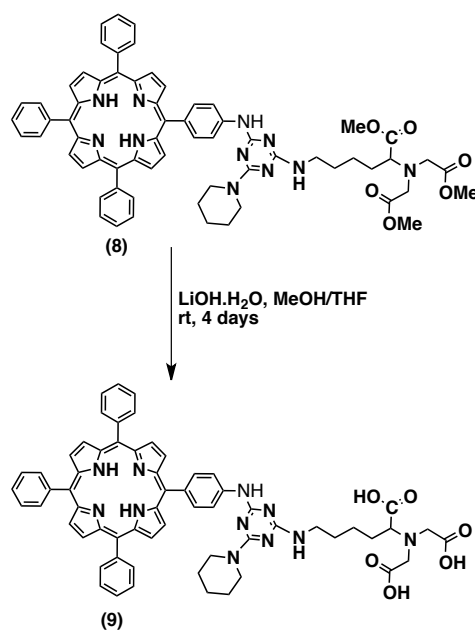
$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  8.96 (d,  $J = 4.5$  Hz, 2H), 8.86 (m, 6H), 8.23 (m, 6H), 8.16 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 8.04 (br s, 2 H), 7.77 (m, 9H), 3.86 (br s, 4 H), 3.67 (m, 13 H), 3.48 (m, 3 H), 1.47-1.8 (m, 12 H), -2.74 (s, 2H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  173.3, 172, 164.6, 142.3, 139.5, 136.1, 135.2, 134.7, 131.2, 130.6, 127.8, 126.8, 120.4, 120.2, 120.1, 117.9, 64.8, 52.5, 51.8, 51.6, 44.7, 40.5, 30.3, 29.5, 26.0, 25.0, 23.4 ppm.

UV-Vis ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ ,  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) 419.5 (321 875), 515.5 (13 750), 551.5 (7292), 591 (3958), 647 nm (3333).

MALDI-TOF  $m/z$ : 1093.5, ( $\text{MH}^+$  calcd for  $\text{C}_{65}\text{H}_{63}\text{N}_{11}\text{O}_6$ : 1094.78).

#### 5.10 Σύνθεση της δυάδας TPP-CC-lysine tricarboxy-piperidine (**9**)



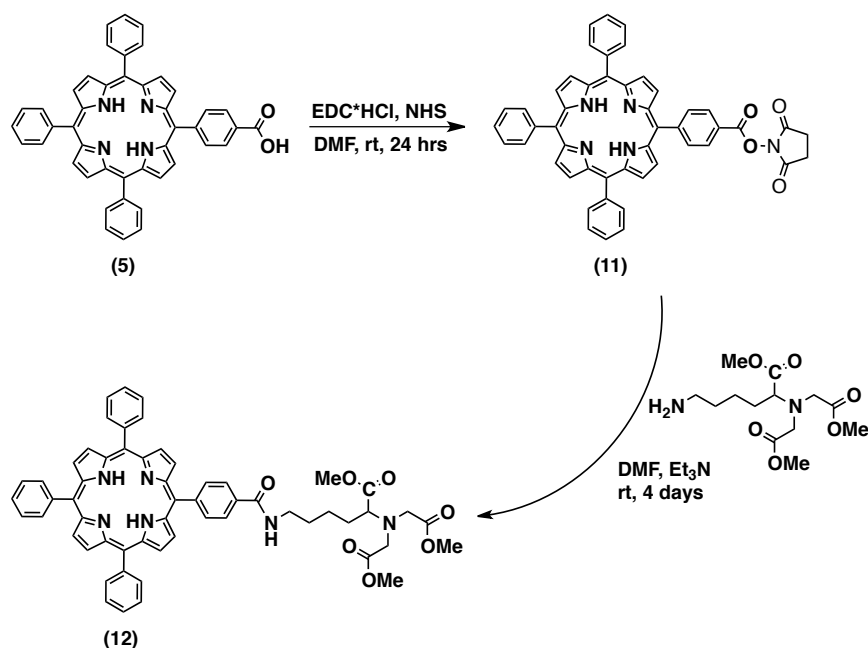
**Σχήμα 5.10** Συνθετική πορεία της δυάδας TPP-CC-lysine tricarboxy-piperidine (**9**).

Σε φιάλη schlenk εισάγονται 14.9 mgr TPP-CC-lysine trimethyl ester-piperidine (**8**) (0.0136 mmol), 2 mL διαλύτη THF και 2 mL διαλύτη MeOH. Η φιάλη schlenk τοποθετείται σε παγόλουτρο και έπειτα προστίθενται σε αυτήν 39 mgr στερεού  $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$  (0.93 mmol). Ακολουθεί ανάδευση του μίγματος για ~10 λεπτά υπό στους 0°C. Στη συνέχεια, το παγόλουτρο απομακρύνεται και το σύστημα αφήνεται υπό ανάδευση για 24 ώρες. Η εξέλιξη της αντίδρασης ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) (διαλύτης  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (95:5)). Η αντίδραση δεν είχε ολοκληρωθεί οπότε προστέθηκε επιπλέον ποσότητα στερεού  $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$  (~32 mgr, 0.76 mmol) και το σύστημα αφέθηκε υπό ανάδευση για 3 μέρες. Αφού ολοκληρωθεί

η αντίδραση υδρόλυσης, στη φιάλη προστίθενται ~20 mL H<sub>2</sub>O. Ακολουθεί απόσταξη των διαλυτών MeOH και THF και κατόπιν, προσθήκη στη φιάλη διαλύματος HCl 1M για εξουδετέρωση της βάσης (pH~ 3.5-4). Το επιθυμητό προϊόν (**9**) καταβυθίζεται ως ίζημα. Ακολουθεί διήθηση του μίγματος και εκπλύσεις του ιζήματος με νερό. Τέλος, το επιθυμητό προϊόν απομονώνεται ως μωβ-κόκκινο στερεό (**9**). Απόδοση: 13.9 mgr (97.7 %).

MALDI-TOF  $m/z$  : 1051.45. (MH<sup>+</sup> calcd for C<sub>62</sub>H<sub>57</sub>N<sub>11</sub>O<sub>6</sub>: 1052.26).

### 5.11 Σύνθεση της δυάδας TPP-lysine trimethyl ester (**12**)



**Σχήμα 5.11** Συνθετική πορεία της δυάδας TPP-lysine trimethyl ester (**12**).

Σε φιάλη schlenk εισάγονται 22 mgr TPP-COOH (**5**) (0.033 mmol), 3 mL άνυδρου διαλύτη DMF, και έπειτα 10.3 mgr EDC·HCl (0.053 mmol) και 7.7 mgr NHS (0.067 mmol). Το σύστημα αφήνεται υπό ανάδευση σε αναερόβιες συνθήκες και προστατευμένο από το φως για 24 ώρες. Ο σχηματισμός του ενδιάμεσου **TPP-NHS** (**11**) ελέγχεται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) (διαλύτης CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Στη συνέχεια, προστίθενται one-pot 31 mgr lysine trimethyl ester (**3**) (0.102 mmol) διαλυμένη σε 2 mL DMF με καταλυτική ποσότητα Et<sub>3</sub>N (100 μL). Το σύστημα αφήνεται υπό ανάδευση σε αναερόβιες συνθήκες και προστατευμένο από το φως για 24 ώρες. Η εξέλιξη της αντίδρασης παρακολουθείται με πλακίδιο TLC (διαλύτης CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (95:5)). Η αντίδραση δεν είχε ολοκληρωθεί και προστέθηκε επιπλέον ποσότητα lysine trimethyl ester (**3**) (~21 mgr, 0.069 mmol) στο μίγμα της αντίδρασης. Στη συνέχεια, το σύστημα αφέθηκε υπό ανάδευση, σε αναερόβιες συνθήκες και προστατευμένο από το φως για 3 μέρες. Μετά το πέρας των 3 μερών πραγματοποιείται απόσταξη των διαλυτών και στο μίγμα της φιάλης προστίθεται διαλύτης CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> για εκχύλιση με H<sub>2</sub>O (3x30 mL). Κατόπιν, η οργανική φάση συλλέγεται προς απόσταξη μέχρι ξηρού. Το επιθυμητό προϊόν απομονώνεται με χρωματογραφία στήλης (silica gel, διαλύτης έκλουσης CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (98:2) και έπειτα 90:1, αυξάνοντας σταδιακά την πολικότητα της MeOH) και συλλέγεται ως μωβ-κόκκινο στερεό (**12**). Απόδοση: 13.6 mgr (43.05 %).

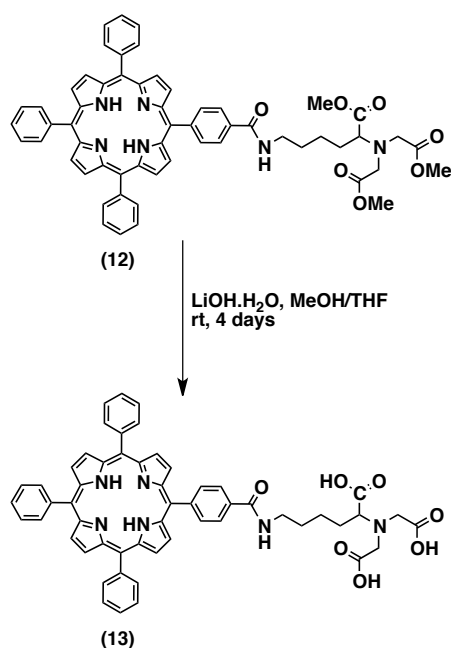
$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 8.87 (m, 6 H), 8.81 (d,  $J$  = 5 Hz, 2 H), 8.29 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 2 H), 8.23 (m, 8 H), 7.77 (m, 9 H), 6.93 (t, 1 H, NH), 3.69 (m, 15 H), 3.55 (t, 1 H), 1.67-1.86 (m, 6 H), -2.75 (s, 2 H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 173.4, 172.1, 168, 145.4, 142.2, 134.7, 134.3, 131.4, 127.9, 126.8, 125.7, 120.6, 120.4, 118.9, 64.4, 52.8, 51.9, 51.7, 40.1, 29.8, 28.7, 23.2 ppm.

UV-Vis ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ ,  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) 418 (373 750), 514 (14 750), 549.5 (6250), 589.5 (4250), 644.5 nm (3250).

MALDI-TOF  $m/z$  : 944.39, ( $\text{MH}^+$  calcd for  $\text{C}_{58}\text{H}_{52}\text{N}_6\text{O}_7$ : 945.44).

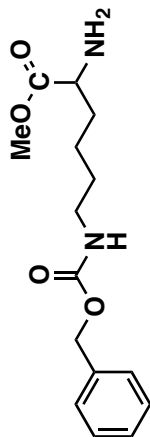
### 5.12 Σύνθεση της δυάδας TPP-lysine tricarboxy (13)



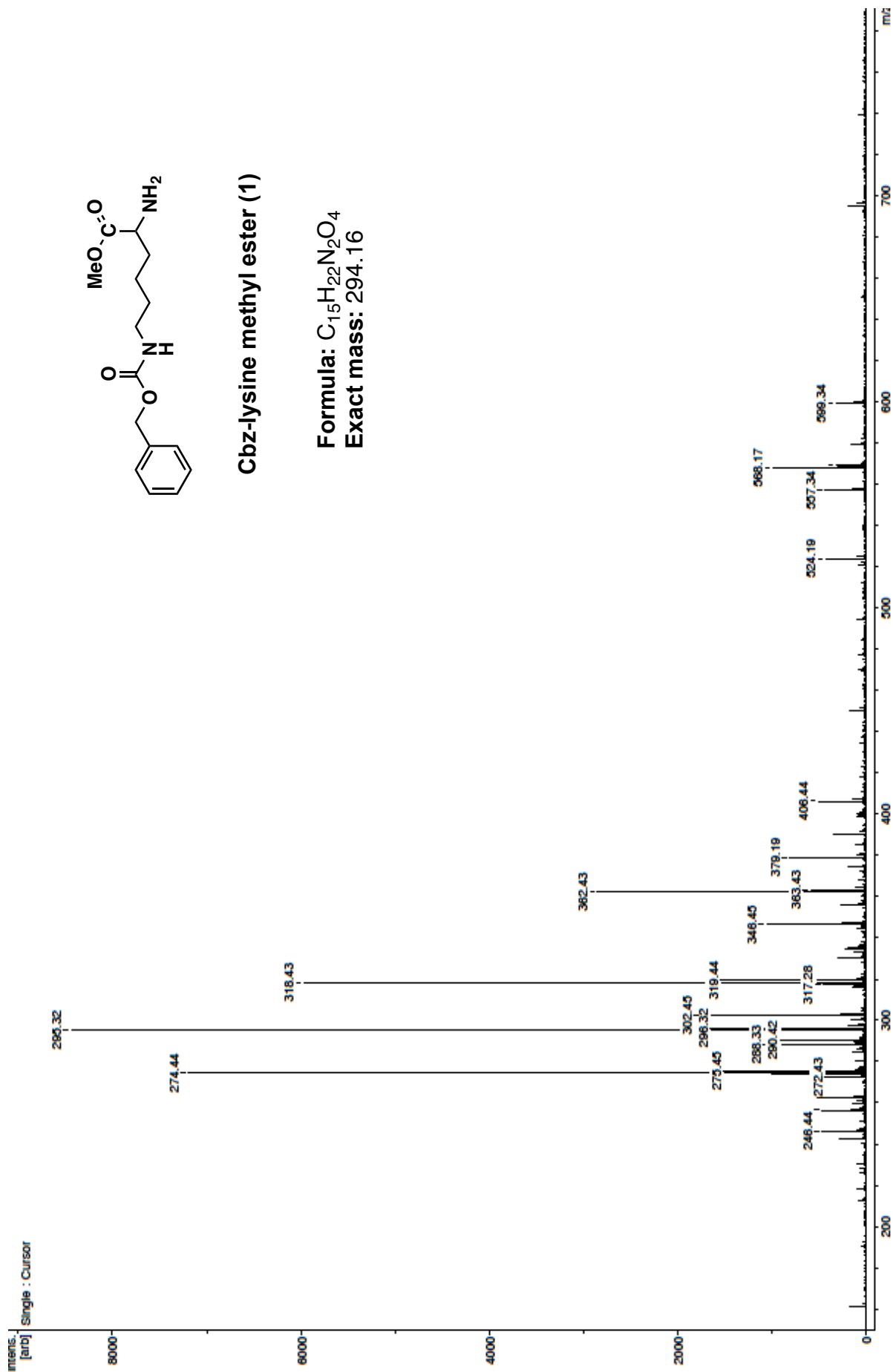
#### Σχήμα 5.12 Συνθετική πορεία της δυάδας TPP-lysine tricarboxy (13).

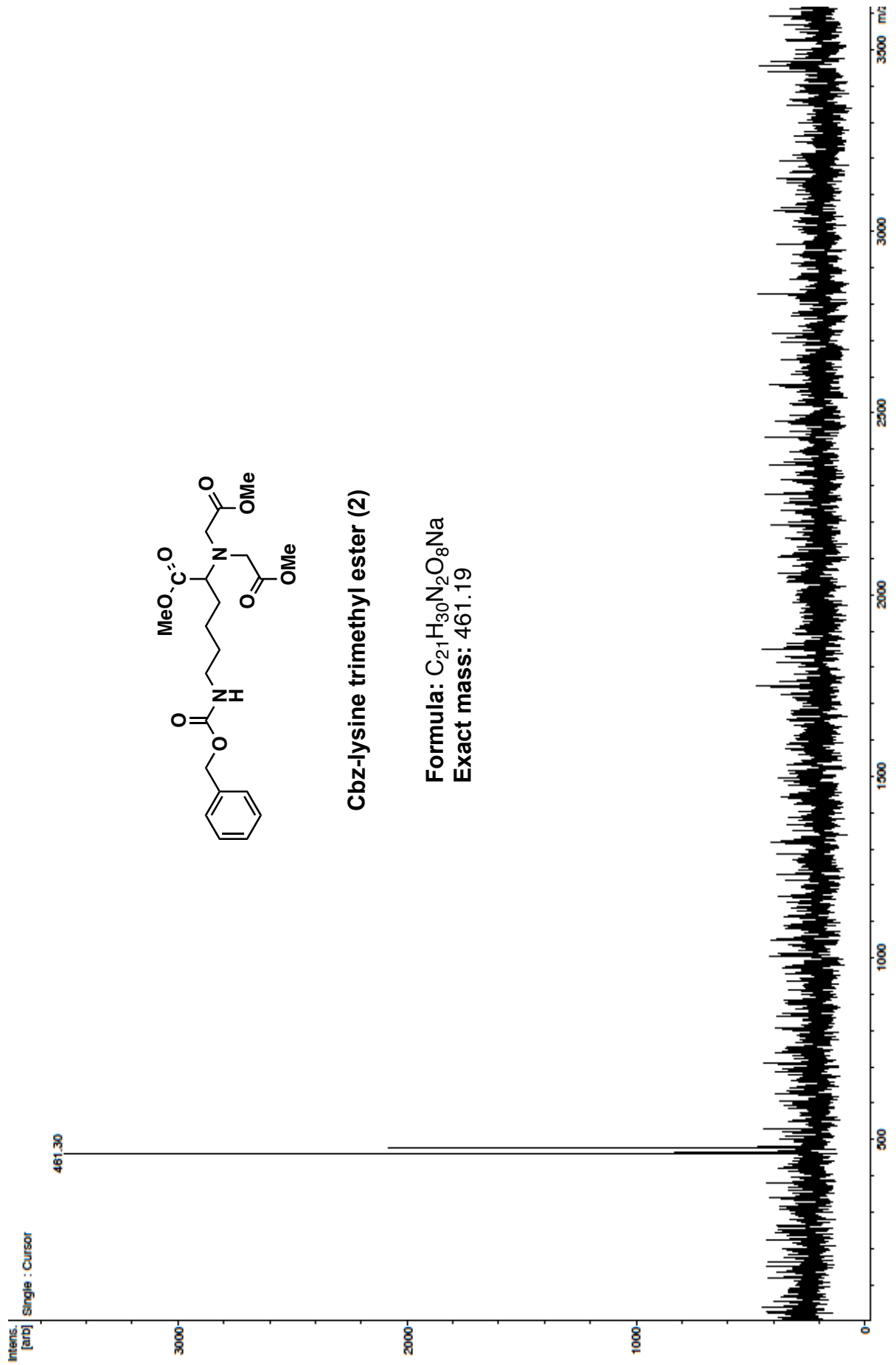
Σε φιάλη schlenk εισάγονται 13.6 mgr TPP-lysine trimethyl ester (**12**) (0.014 mmol), ~2 mL διαλύτη THF, 47 mgr στερεό  $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$  (1.12 mmol) και ~2 mL MeOH. Προσαρτάται παγόλουτρο και ακολουθεί ανάδευση του μίγματος για 10 λεπτά στους  $0^\circ\text{C}$ . Στη συνέχεια, το παγόλουτρο απομακρύνεται και το σύστημα αφήνεται υπό ανάδευση για 4 ημέρες. Η εξέλιξη της αντίδρασης παρακολουθείται με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδος (TLC) (διαλύτης  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (95:5)). Αφού ολοκληρωθεί η αντίδραση υδρόλυσης, στη φιάλη προστίθενται ~20 mL  $\text{H}_2\text{O}$ . Ακολουθεί απόσταξη των διαλυτών MeOH και THF και κατόπιν, προσθήκη στη φιάλη διαλύματος  $\text{HCl}$  1M για εξουδετέρωση της βάσης (pH~ 3.5-4). Το επιθυμητό προϊόν (**12**) καταβυθίζεται ως ίζημα. Ακολουθεί διήθηση του μίγματος και εκπλύσεις του ιζήματος με  $\text{H}_2\text{O}$ . Τέλος, το επιθυμητό προϊόν συλλέγεται ως μωβ-κόκκινο στερεό (**12**). Απόδοση: 12,5 mgr (96.2 %).

MALDI-TOF  $m/z$  : 902.34, ( $\text{M}^+$  calcd for  $\text{C}_{55}\text{H}_{46}\text{N}_6\text{O}_7$ : 902.99).

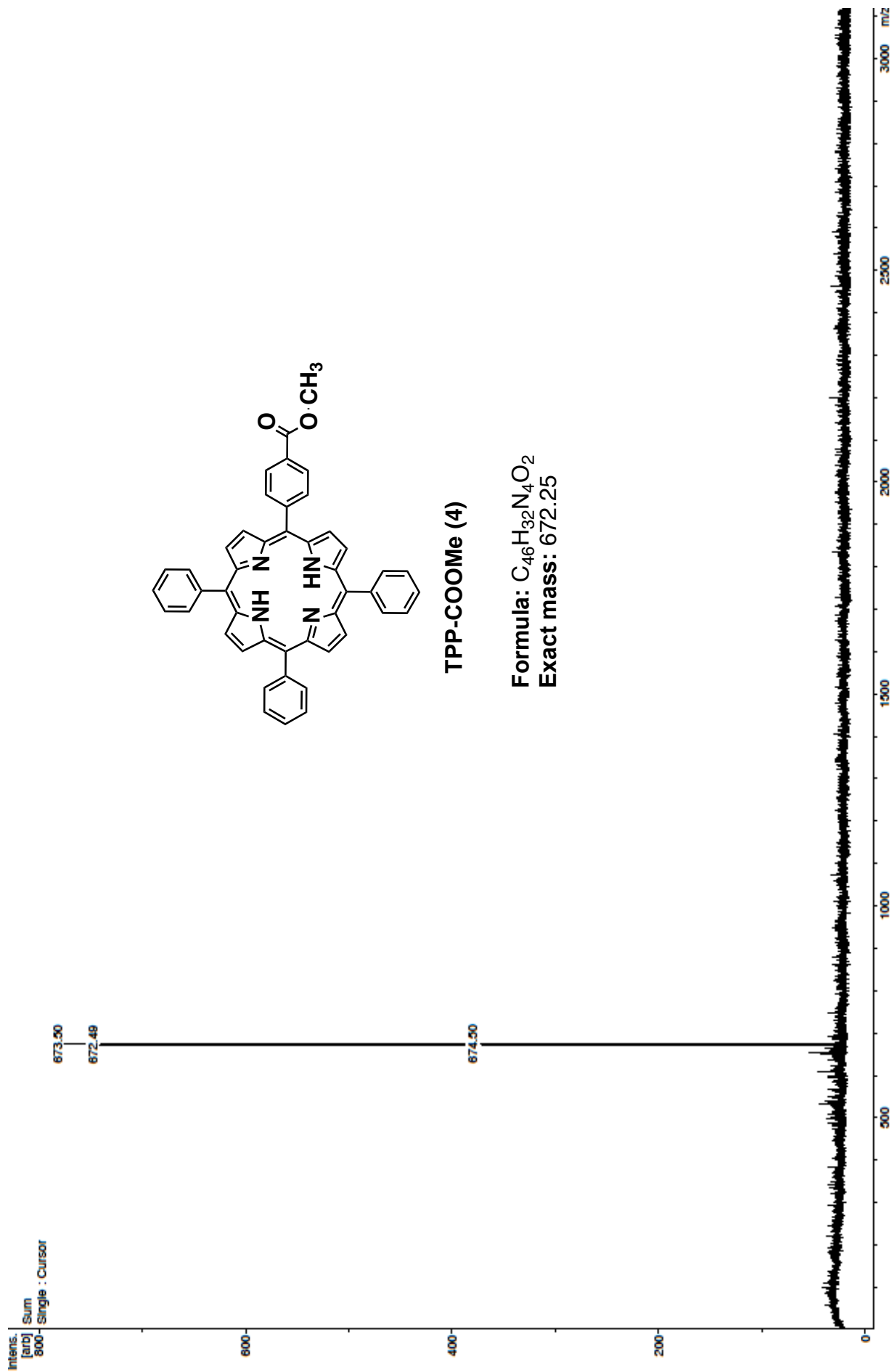
**Cbz-lysine methyl ester (1)**

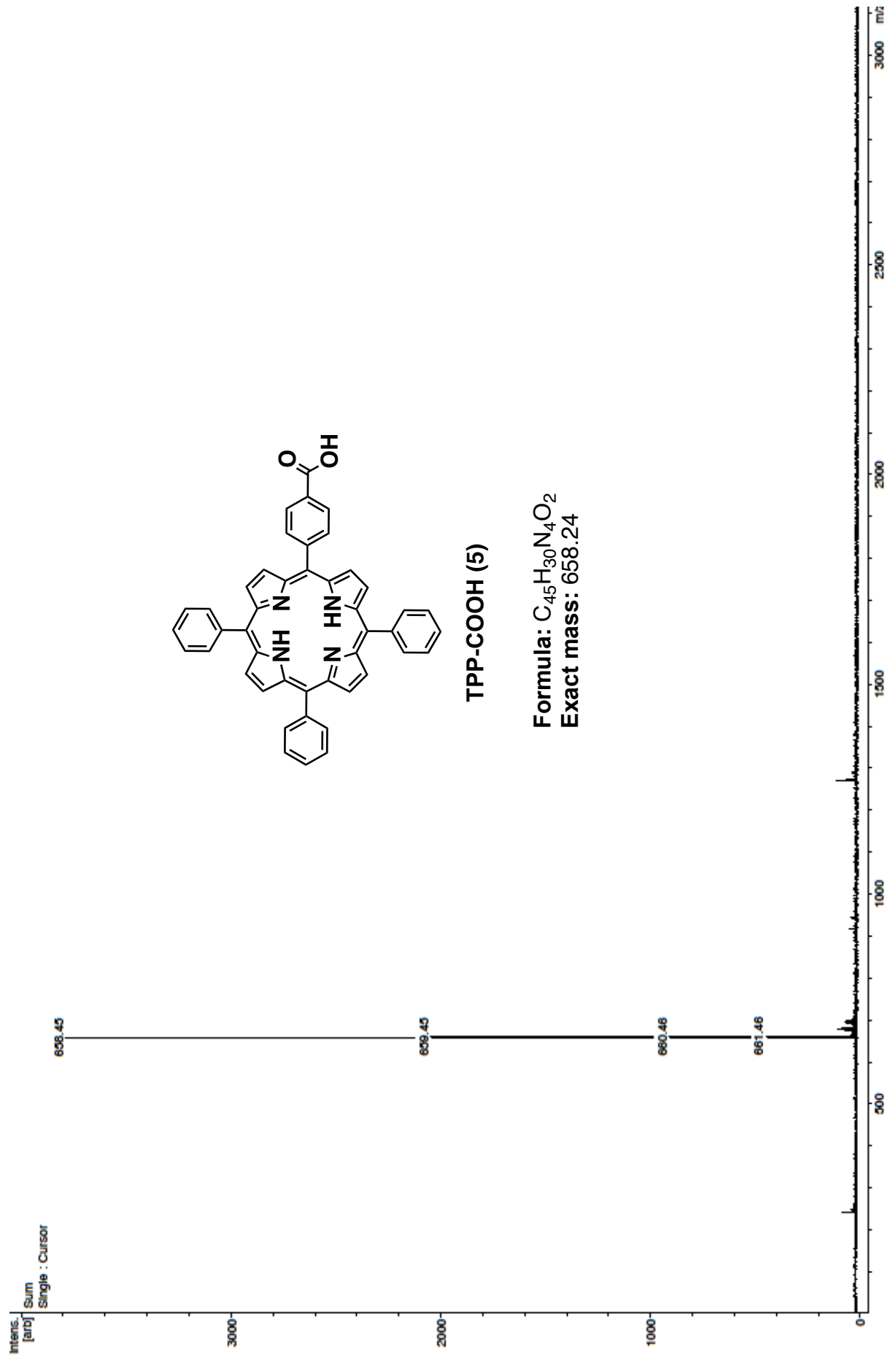
**Formula:**  $C_{15}H_{22}N_2O_4$   
**Exact mass:** 294.16

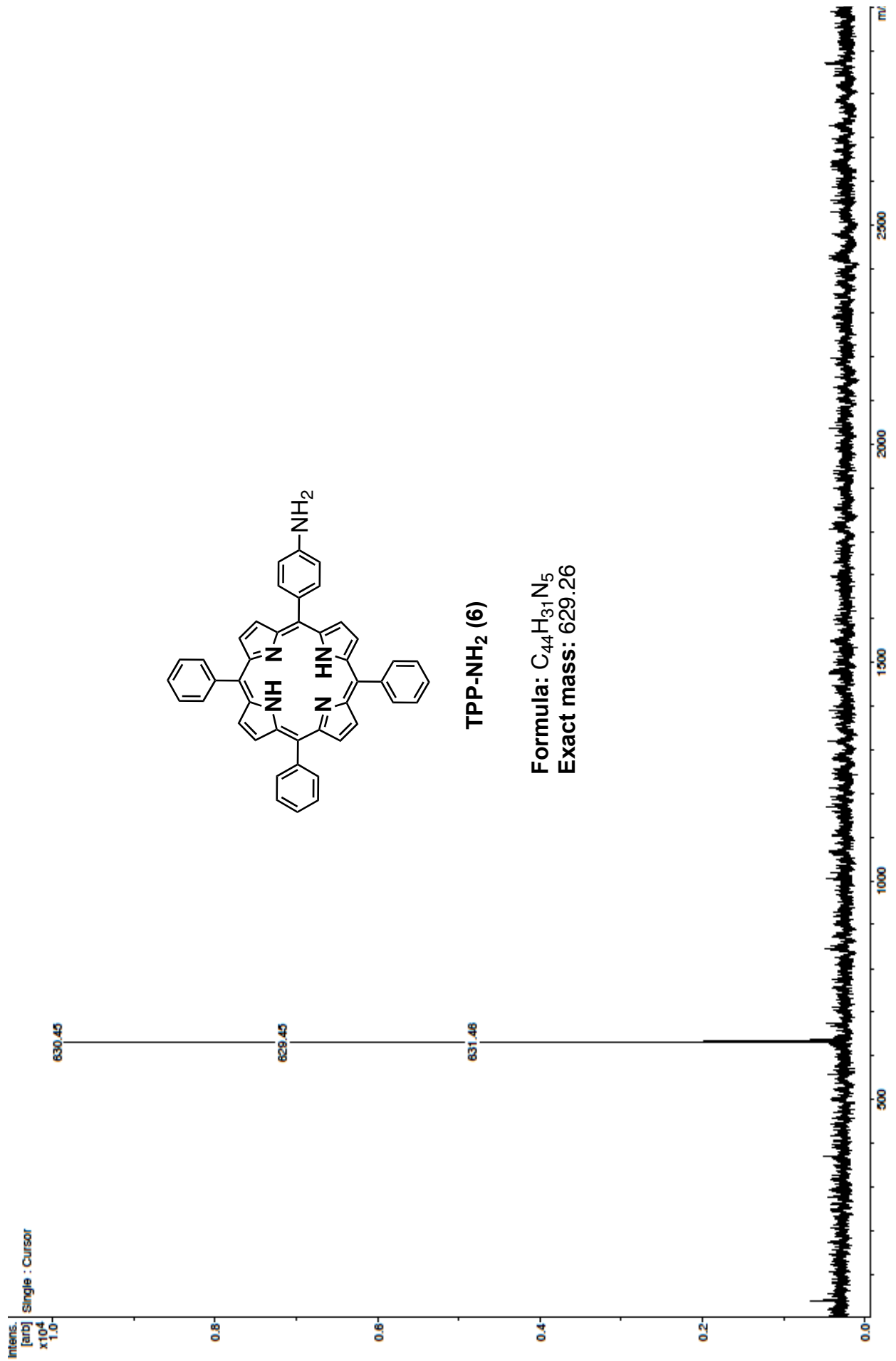


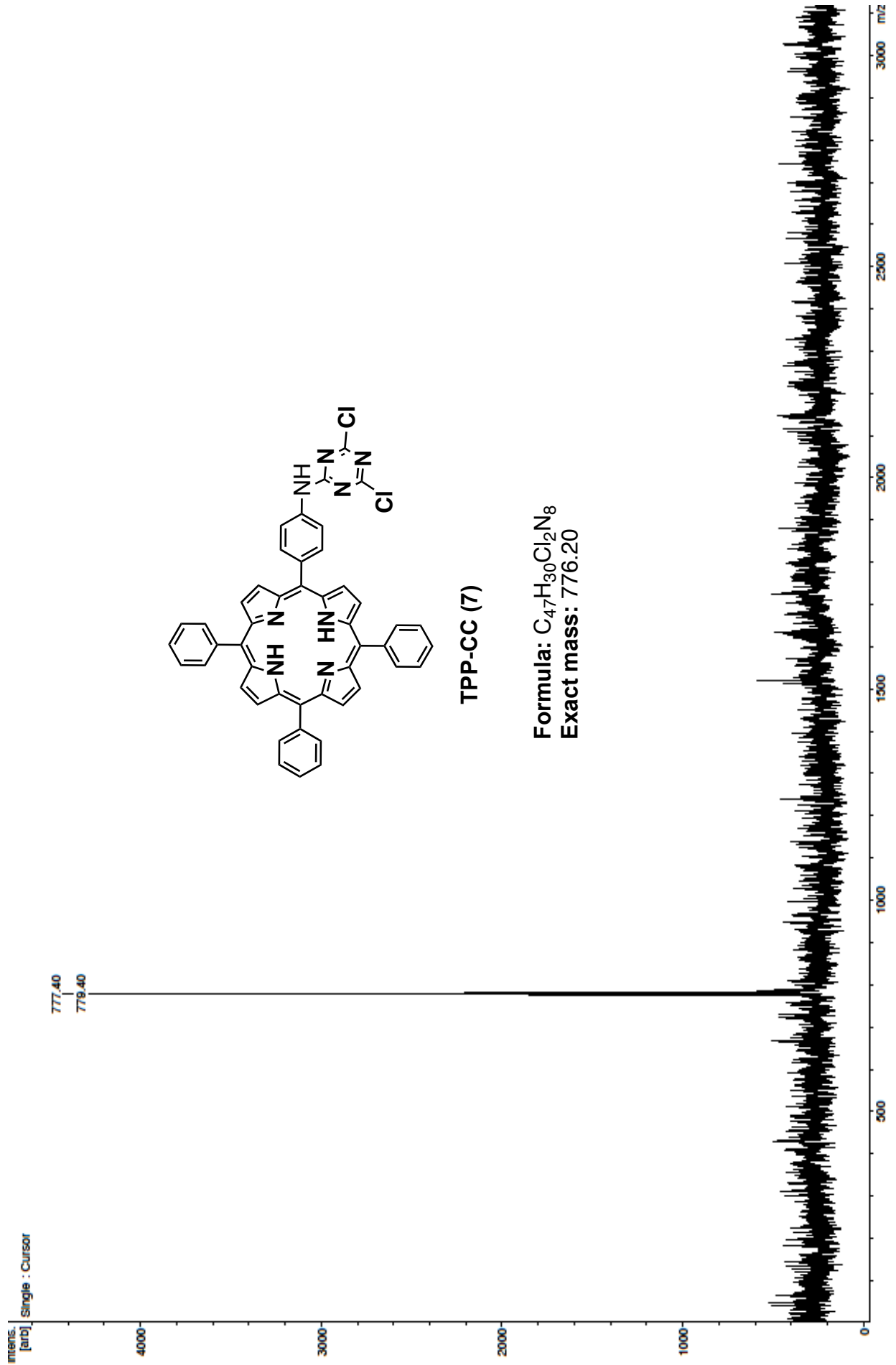


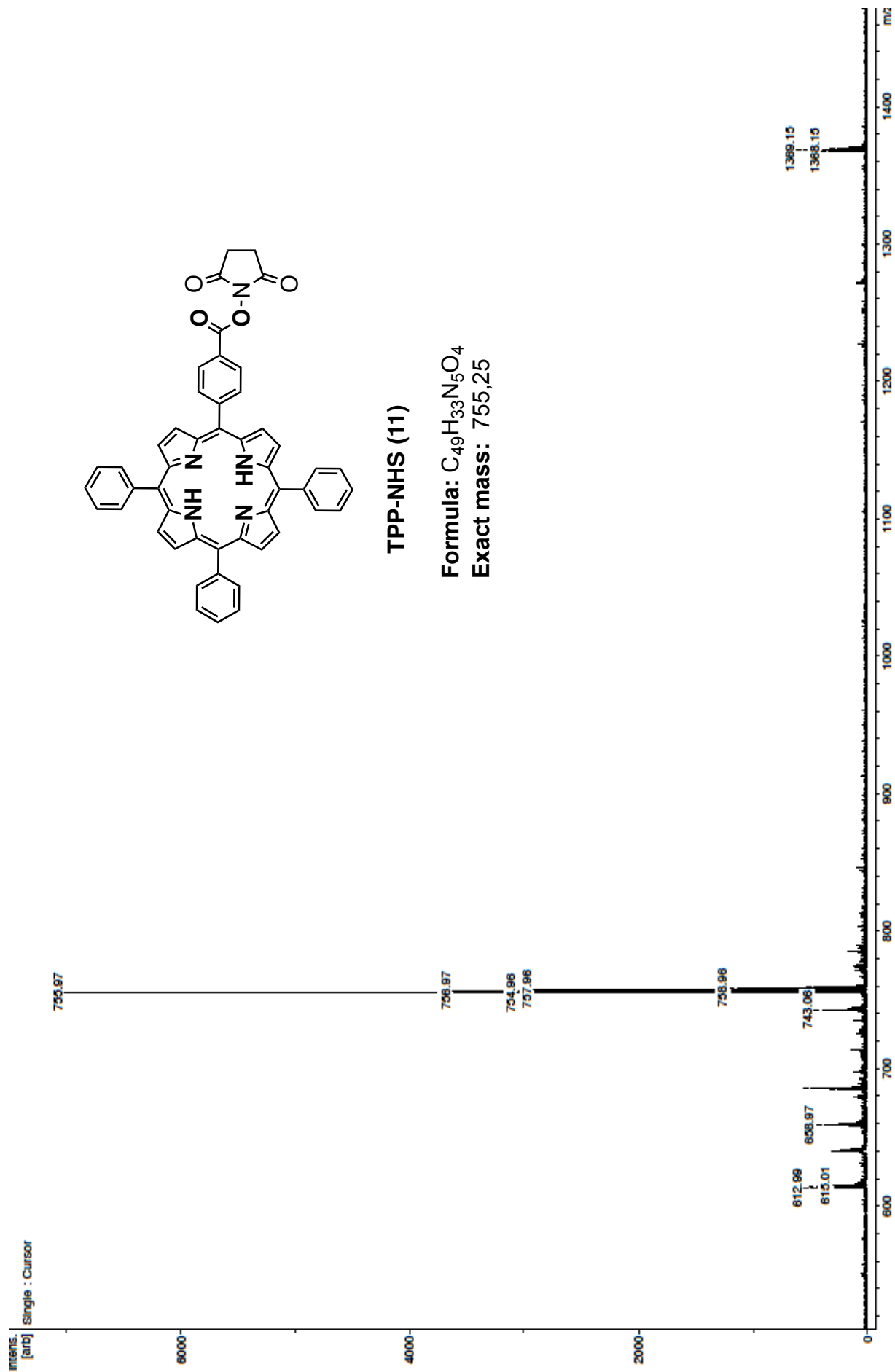


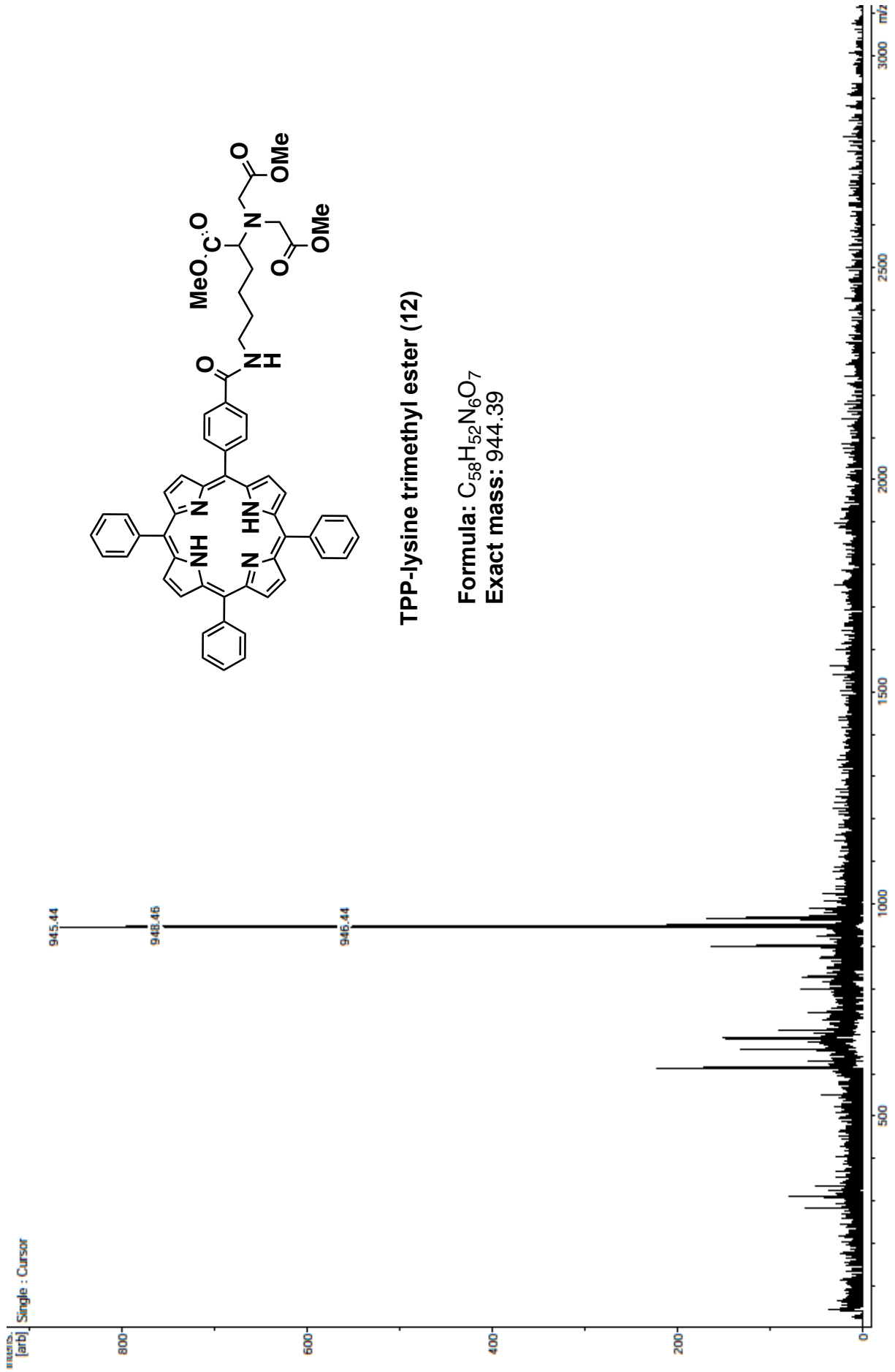


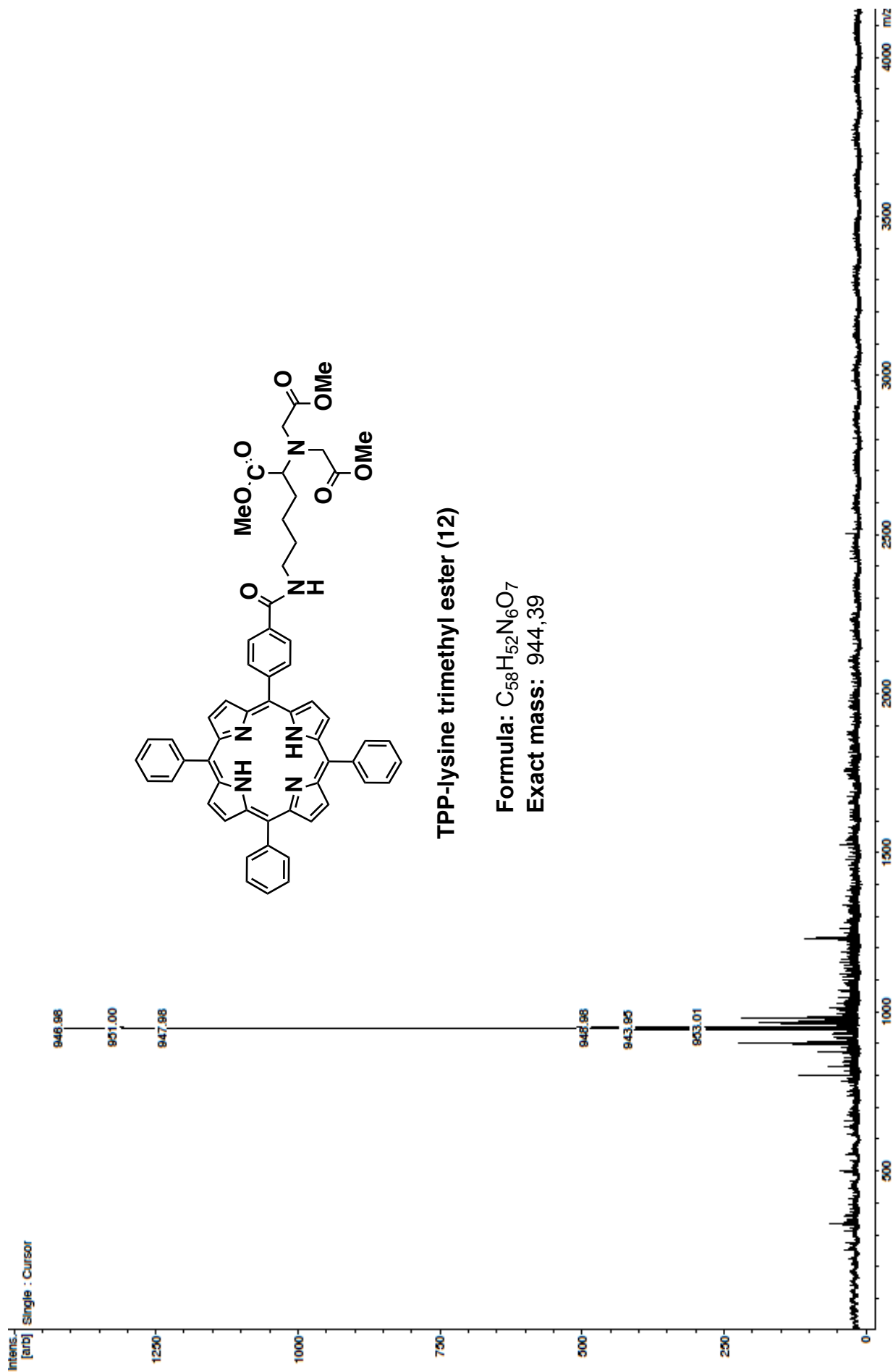


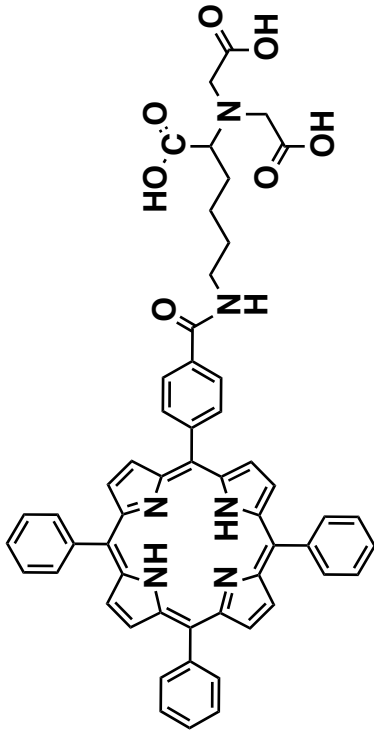








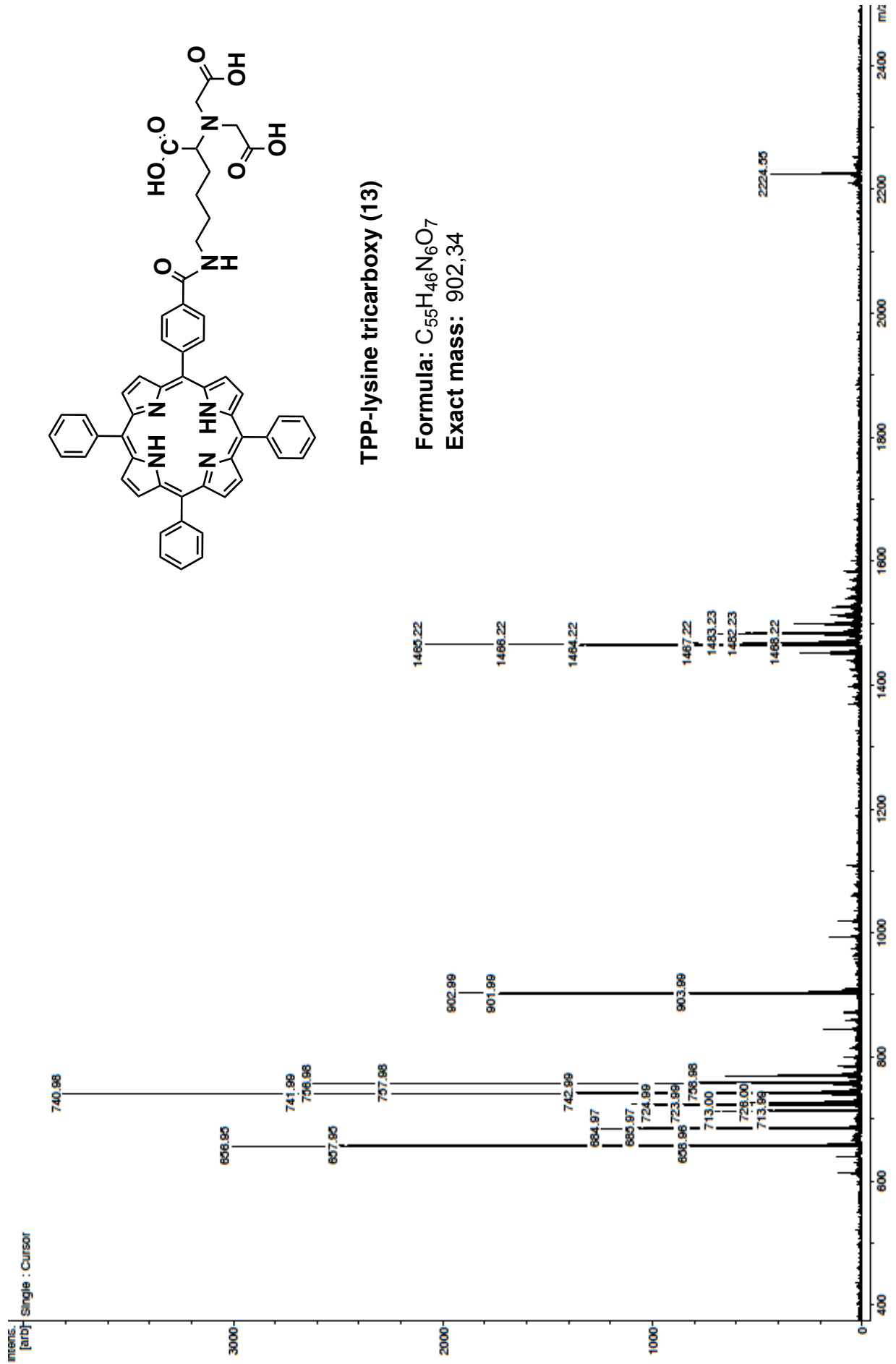




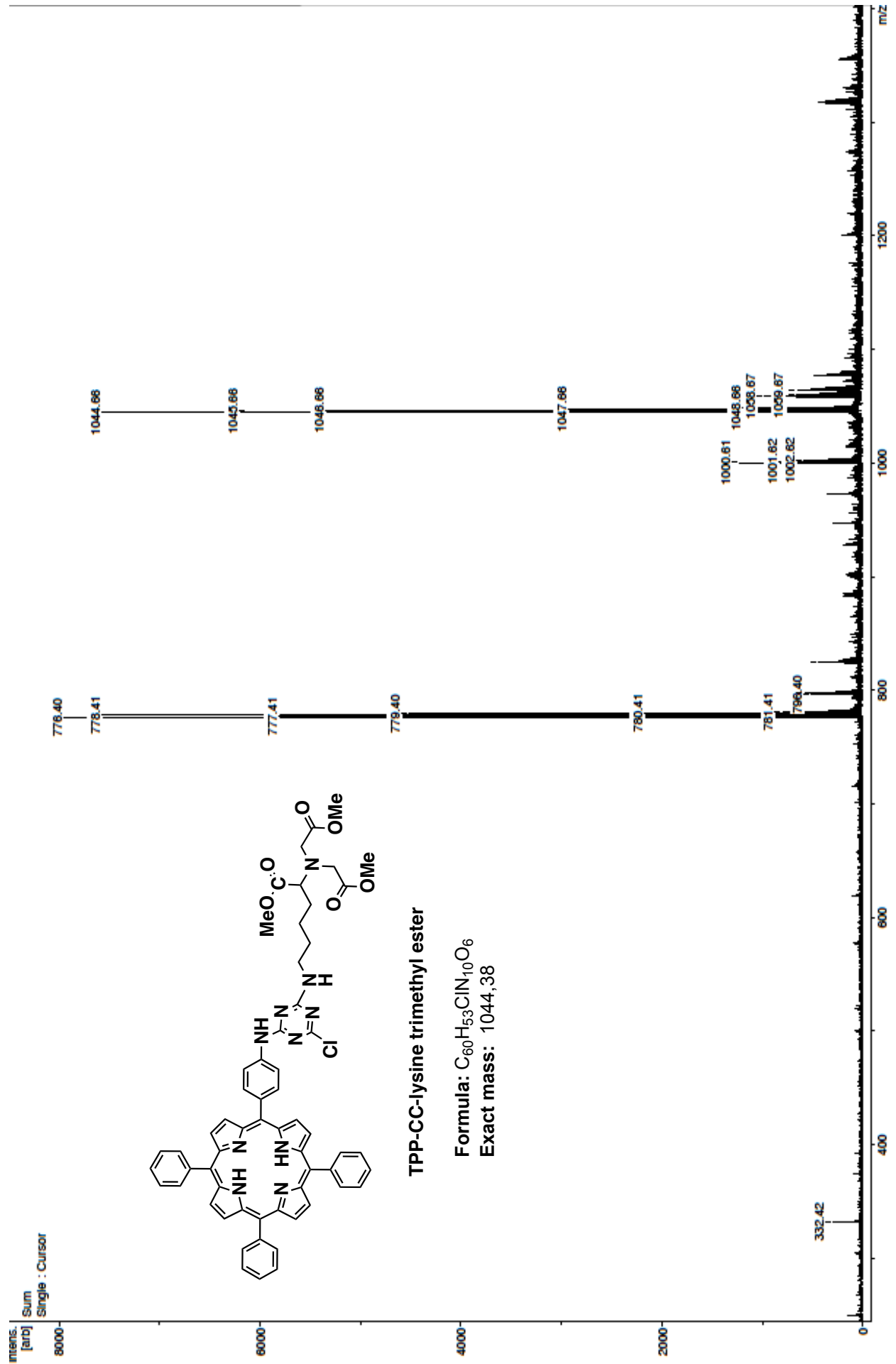
TPP-lysine tricarboxy (13)

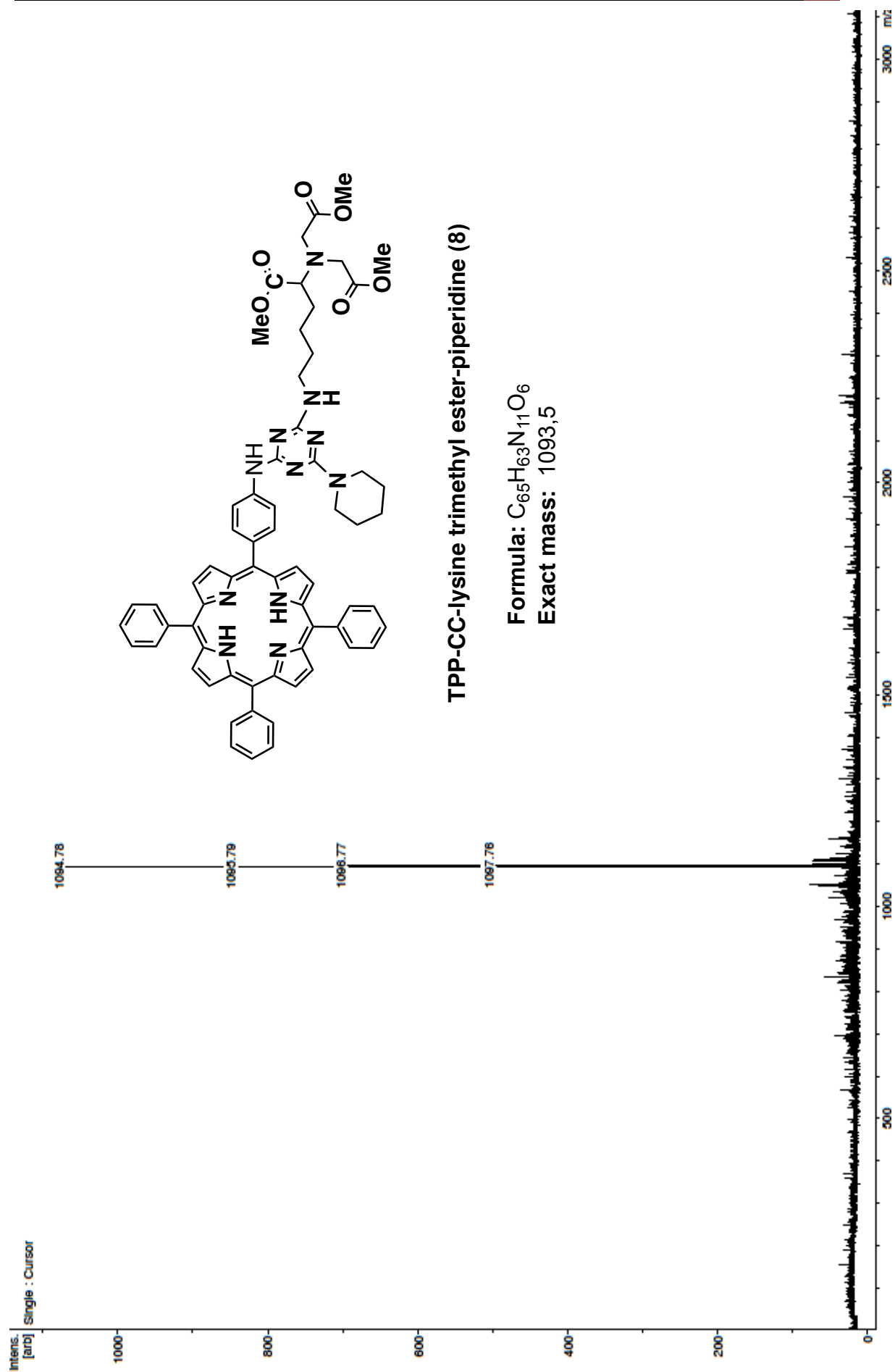
Formula:  $C_{55}H_{46}N_6O_7$

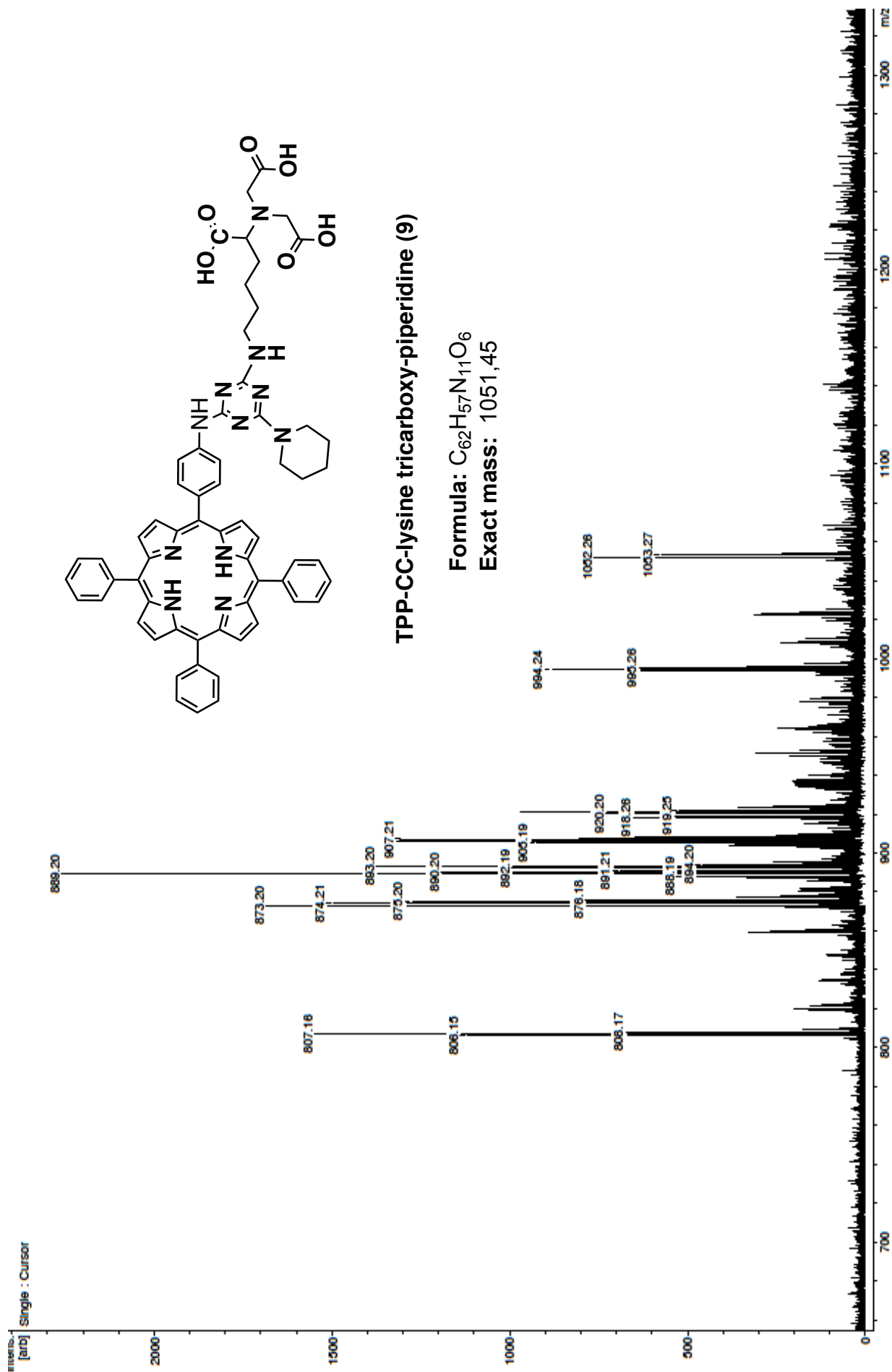
Exact mass: 902,34

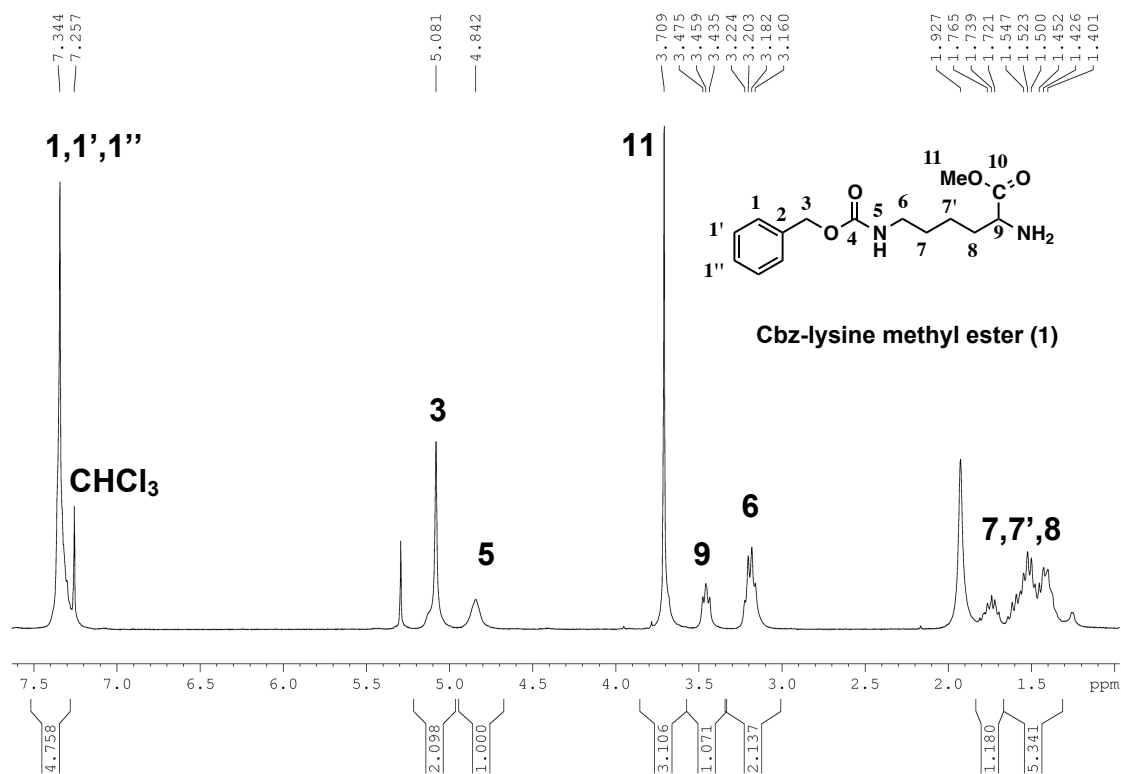




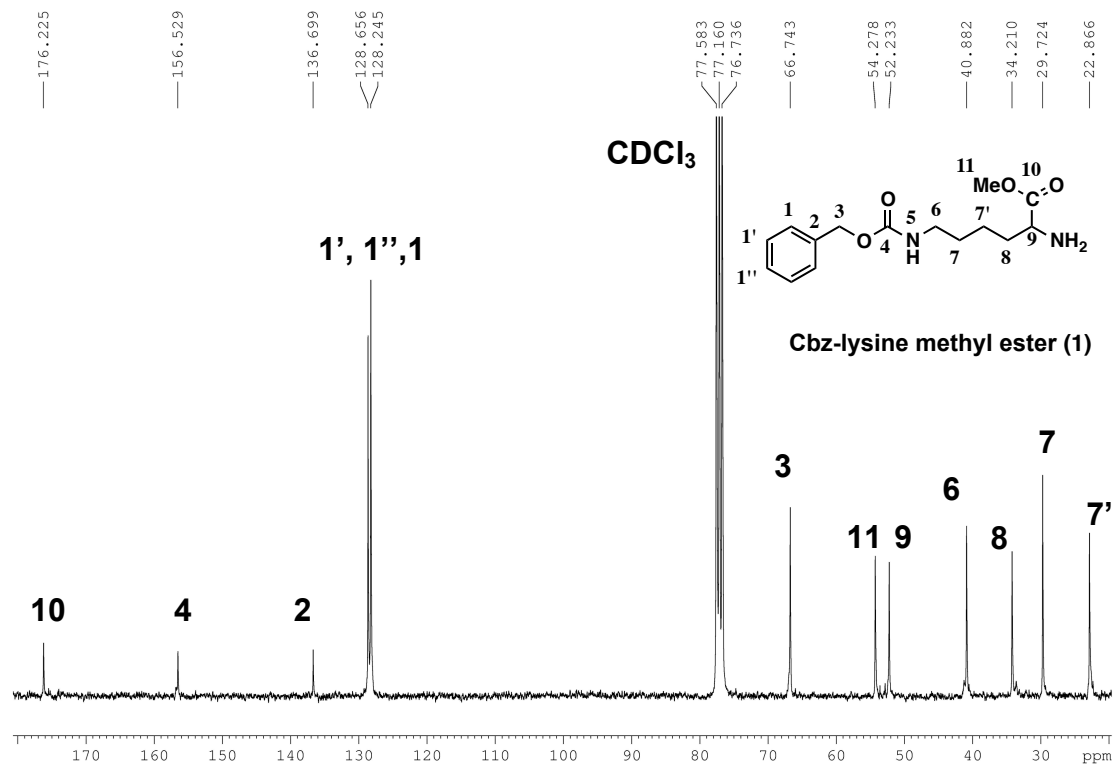




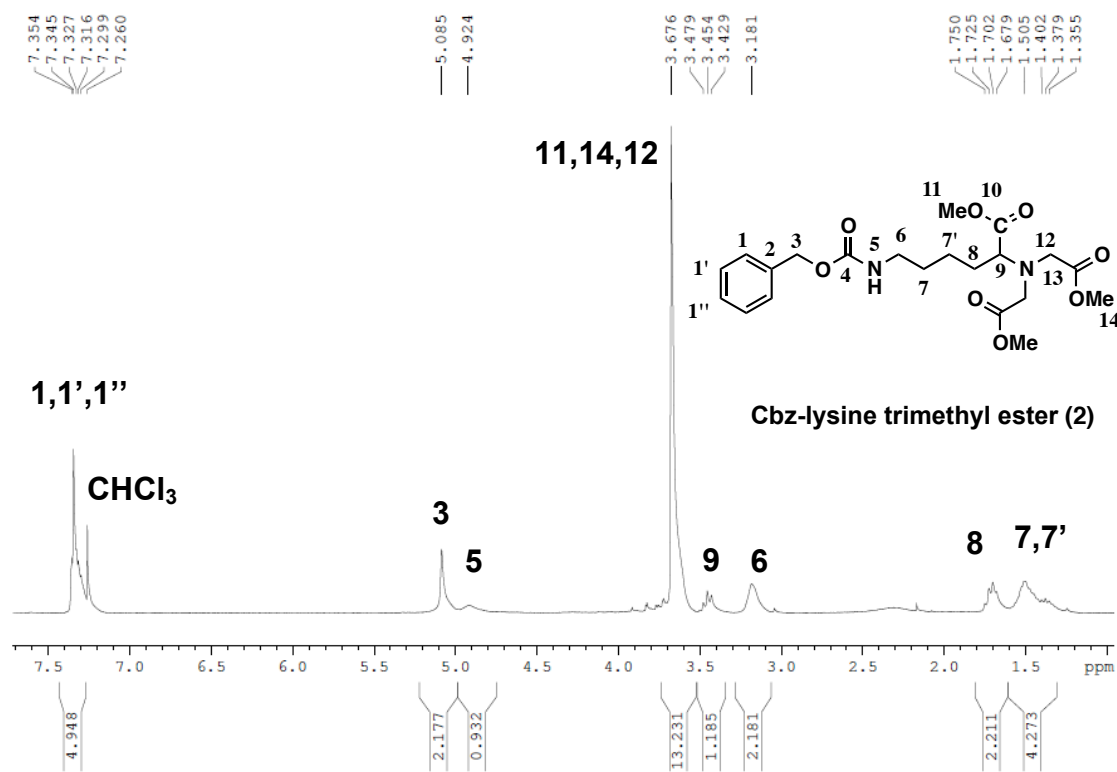




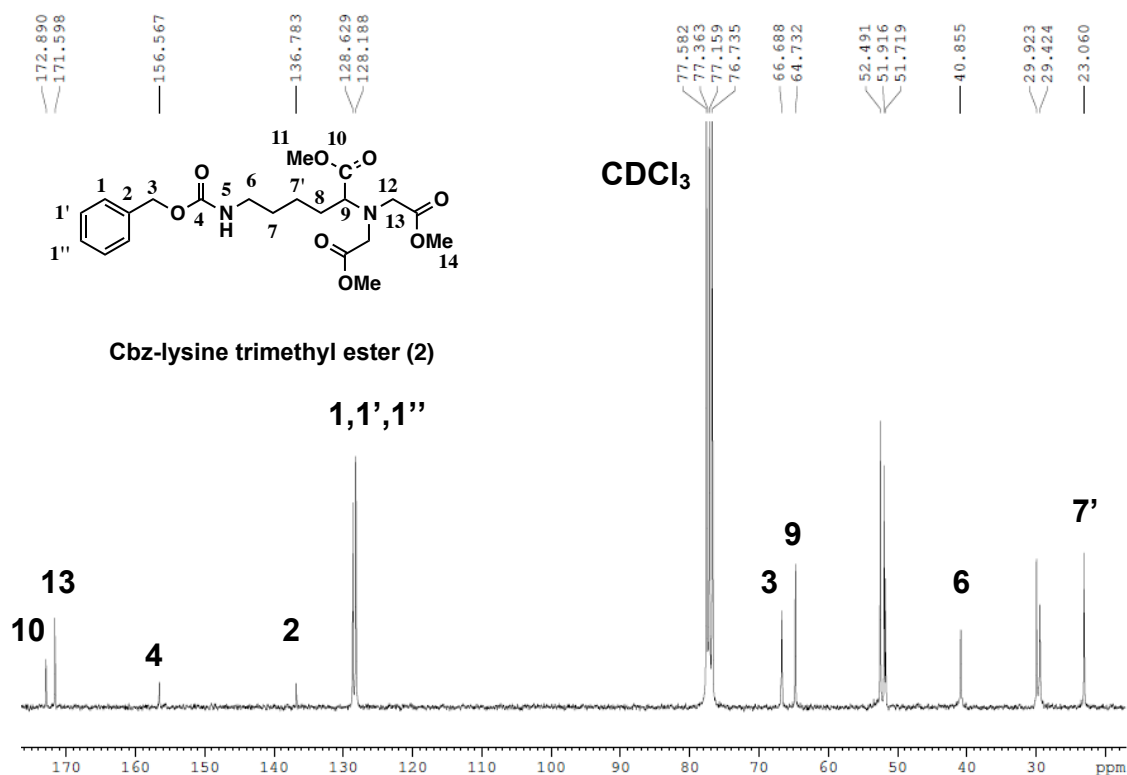
**Figure S1:**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of Cbz-lysine methyl ester (1) (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



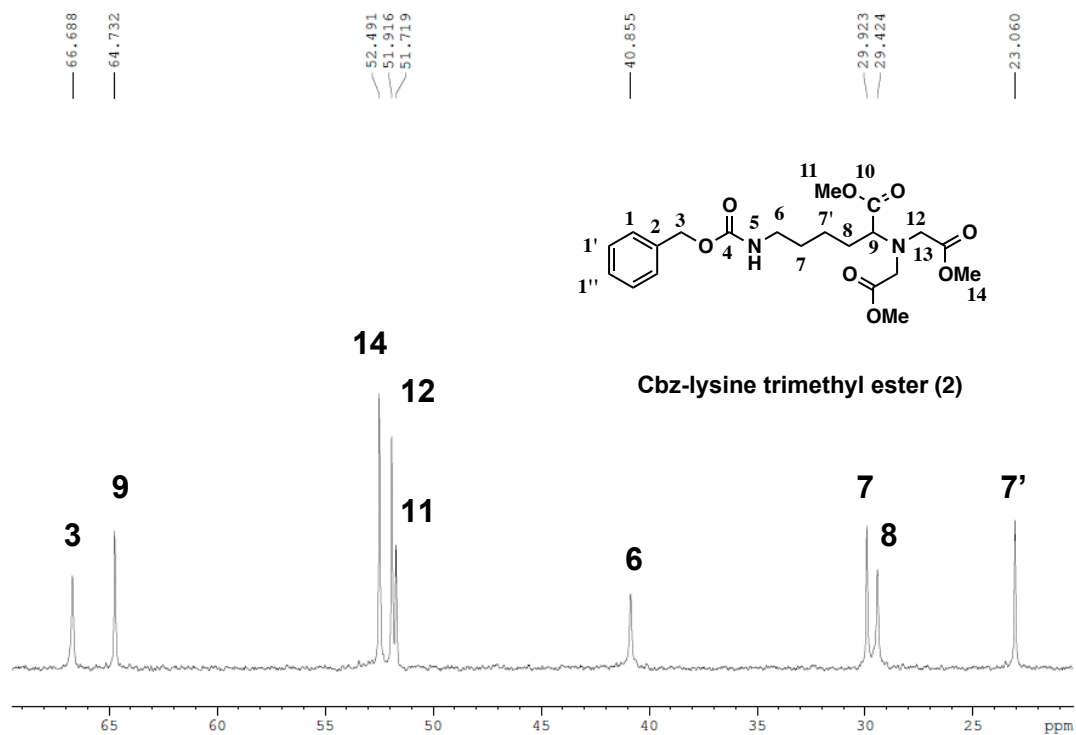
**Figure S2:**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of Cbz-lysine methyl ester (1) (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



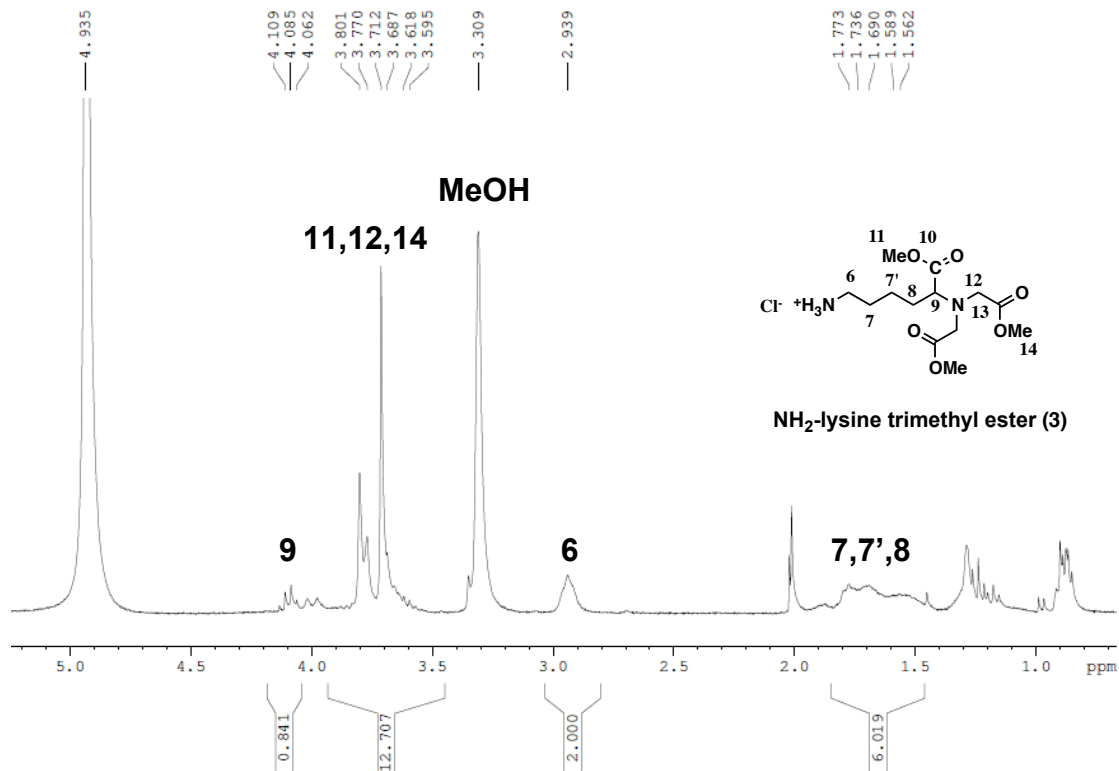
**Figure S3:** <sup>1</sup>H NMR spectrum of Cbz-lysine trimethyl ester (2) (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



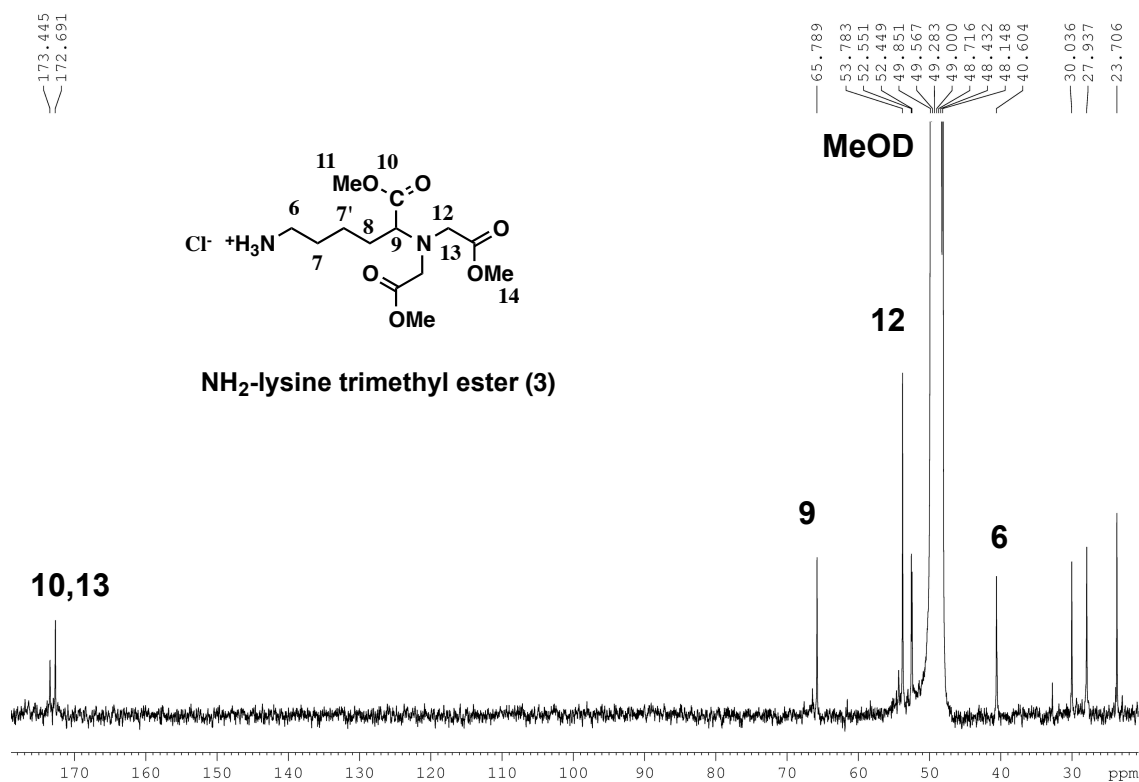
**Figure S4:** <sup>13</sup>C NMR spectrum of Cbz-lysine trimethyl ester (2) (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



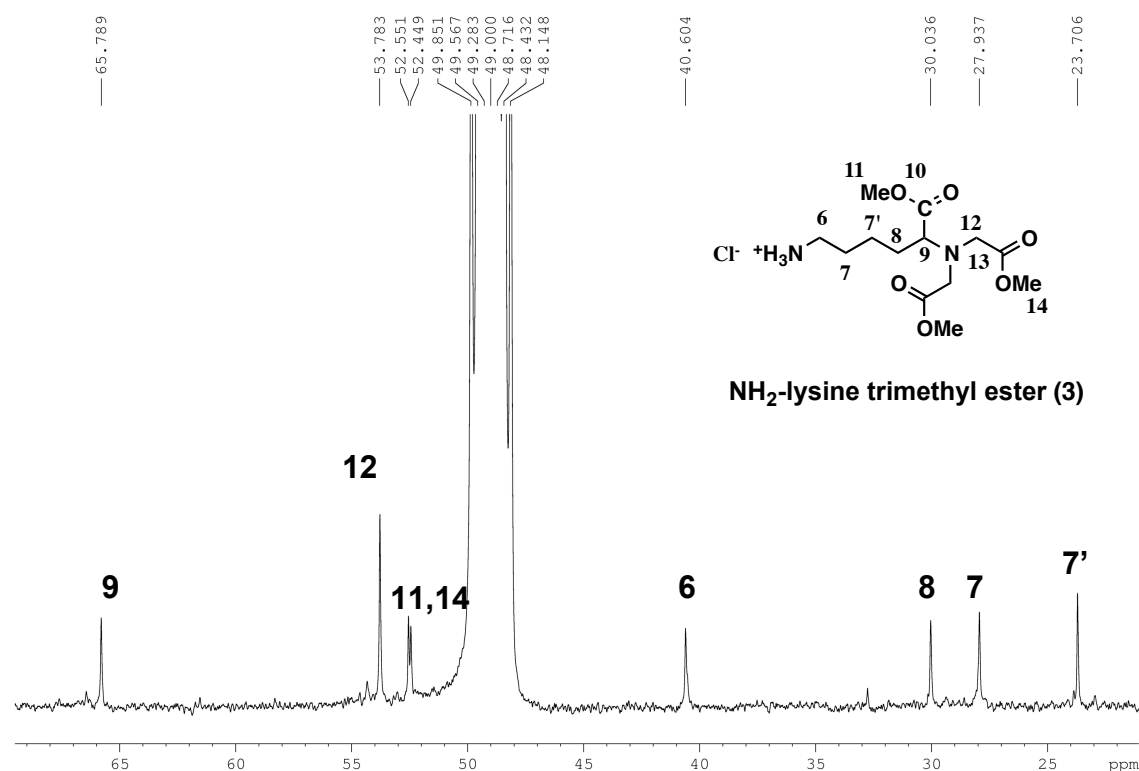
**Figure S5:**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of Cbz-lysine trimethyl ester (2) (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) zoom.



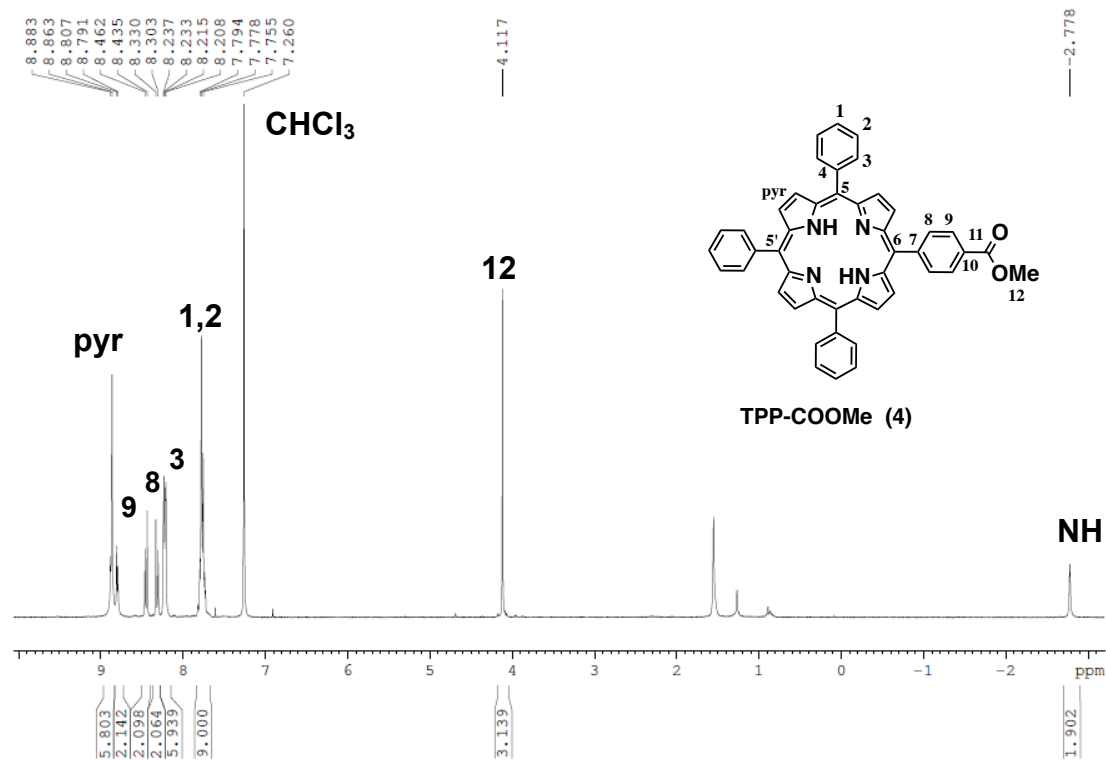
**Figure S6:**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of  $\text{NH}_2$ -lysine trimethyl ester (3) (75 MHz, MeOD).



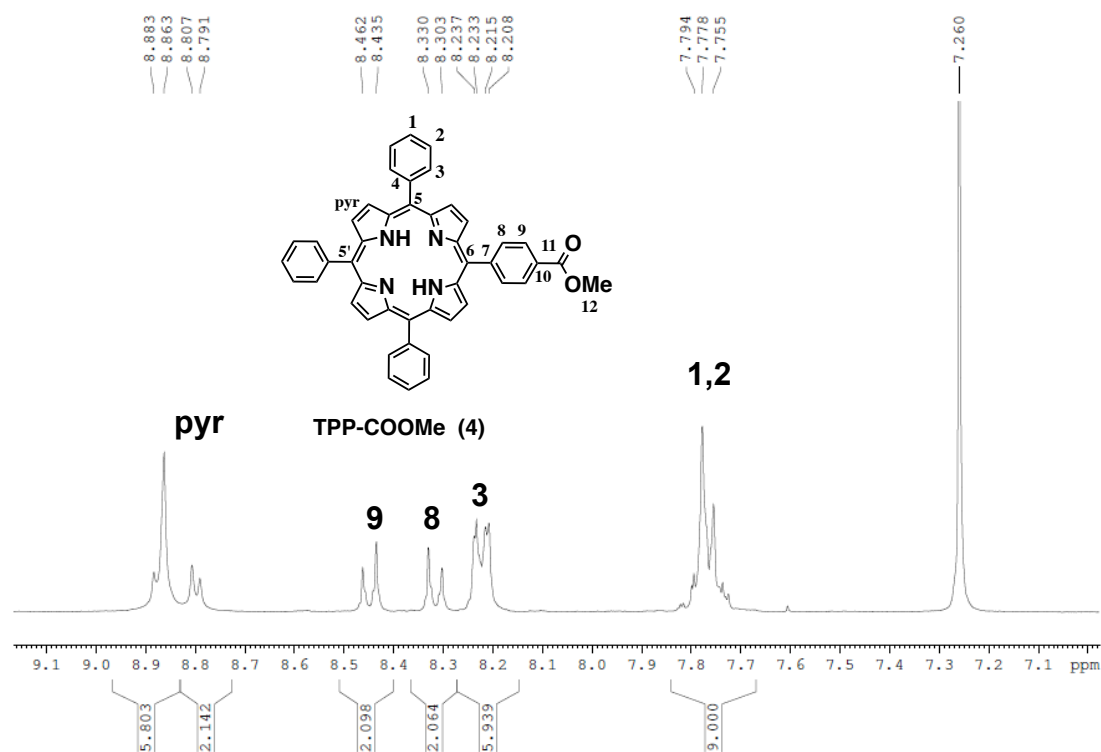
**Figure S7:** <sup>13</sup>C NMR spectrum of NH<sub>2</sub>-lysine trimethyl ester (3) (75 MHz, MeOD).



**Figure S8:** <sup>13</sup>C NMR spectrum of NH<sub>2</sub>-lysine trimethyl ester (3) (75 MHz, MeOD) zoom.

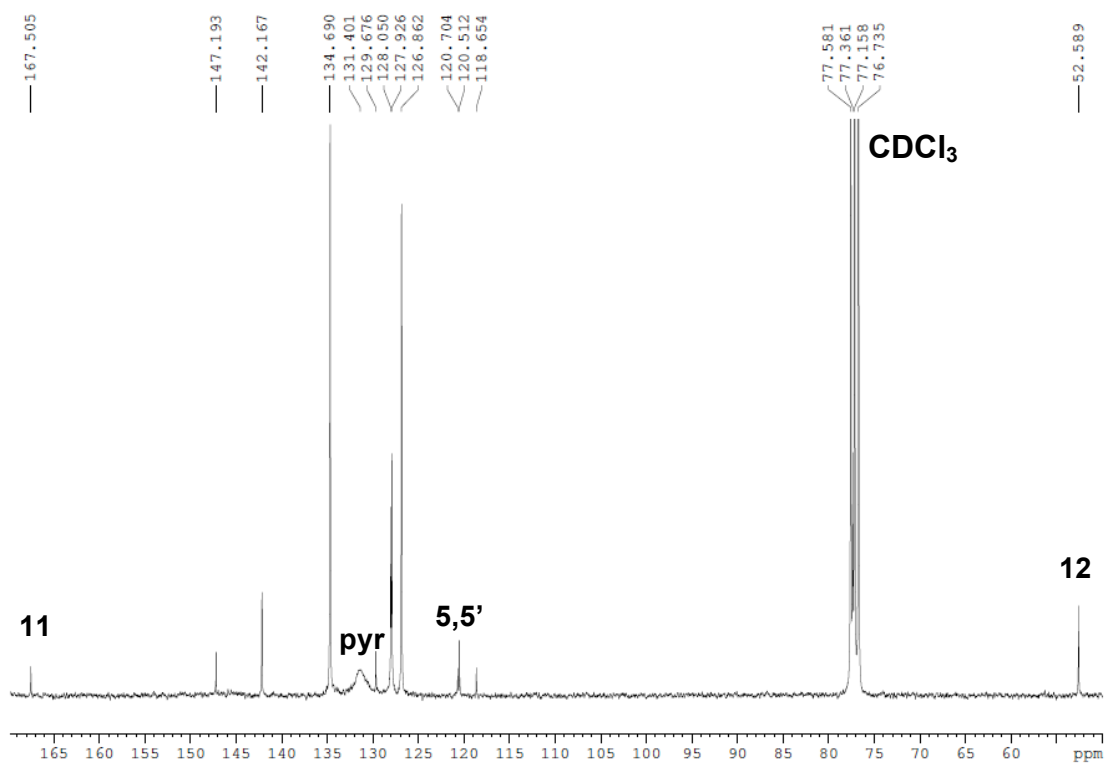


**Figure S9:**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of TPP-COOMe (4) (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

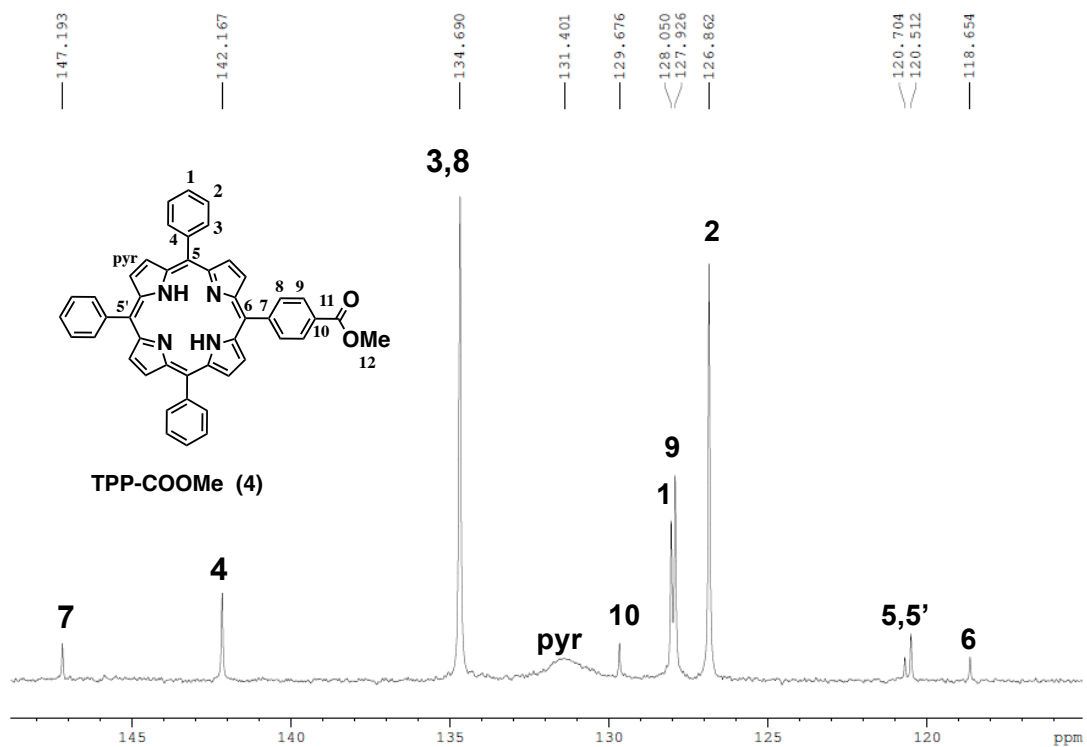


**Figure S10:** Aromatic region of  $^1\text{H}$  NMR spectrum of TPP-COOMe (4) (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

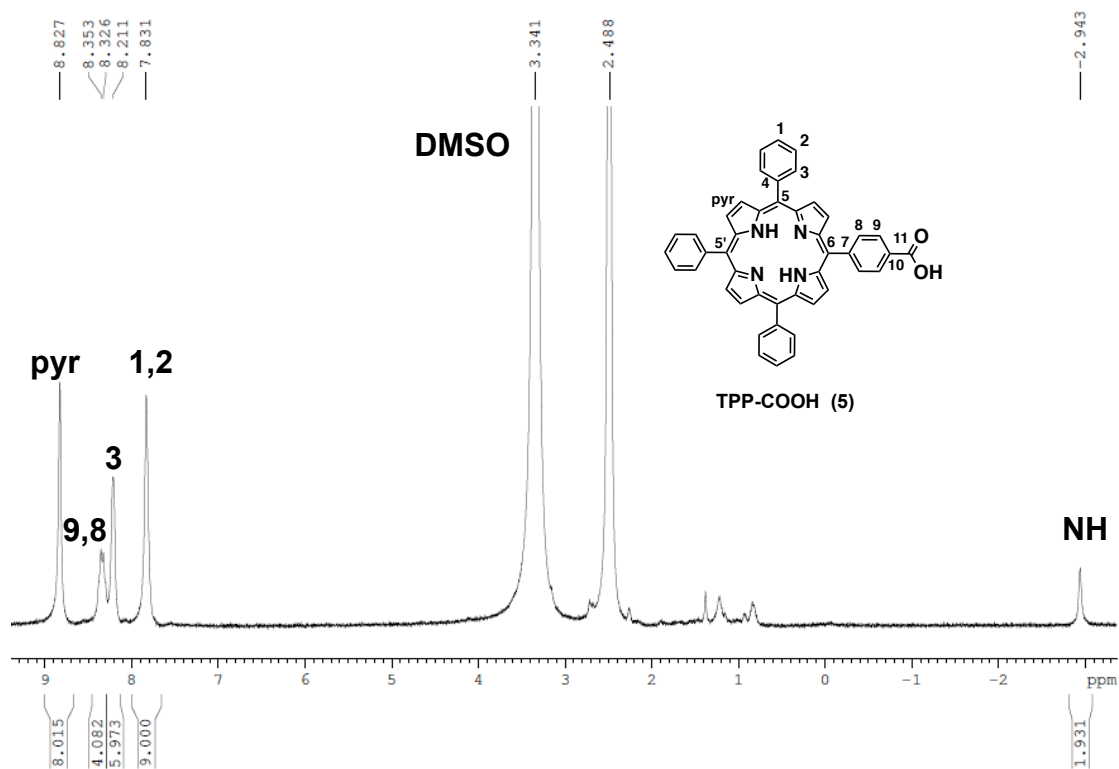




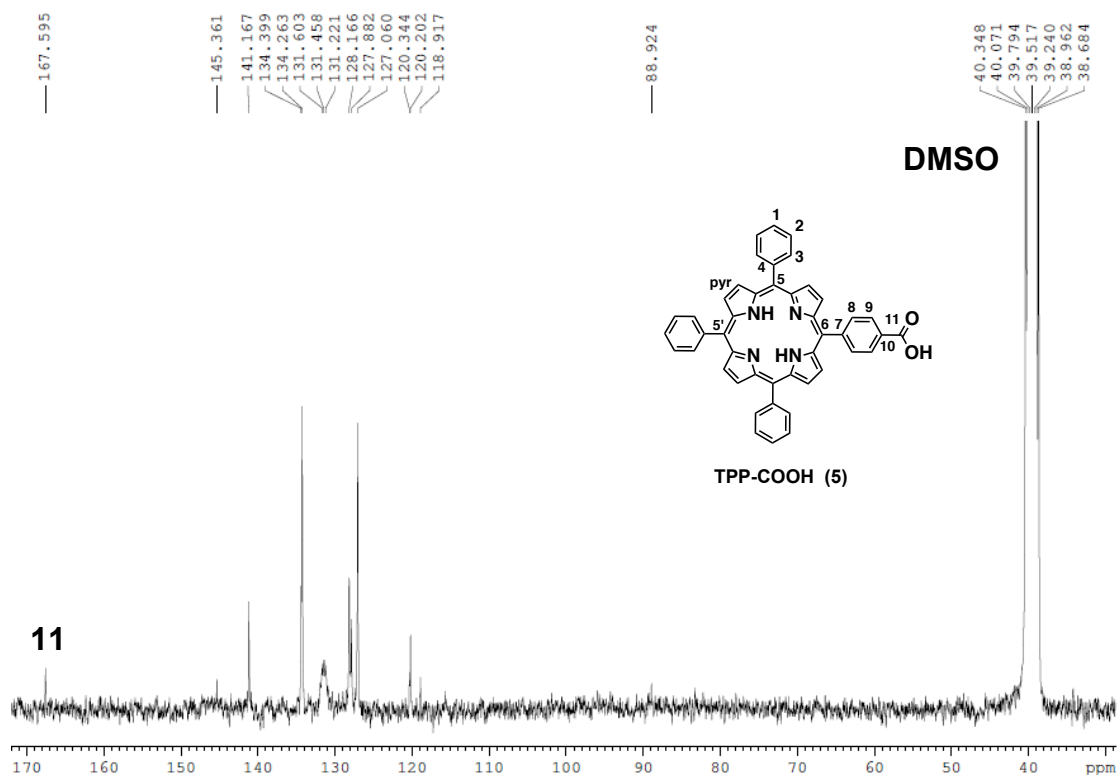
**Figure S11:**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of TPP-COOMe (4) (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



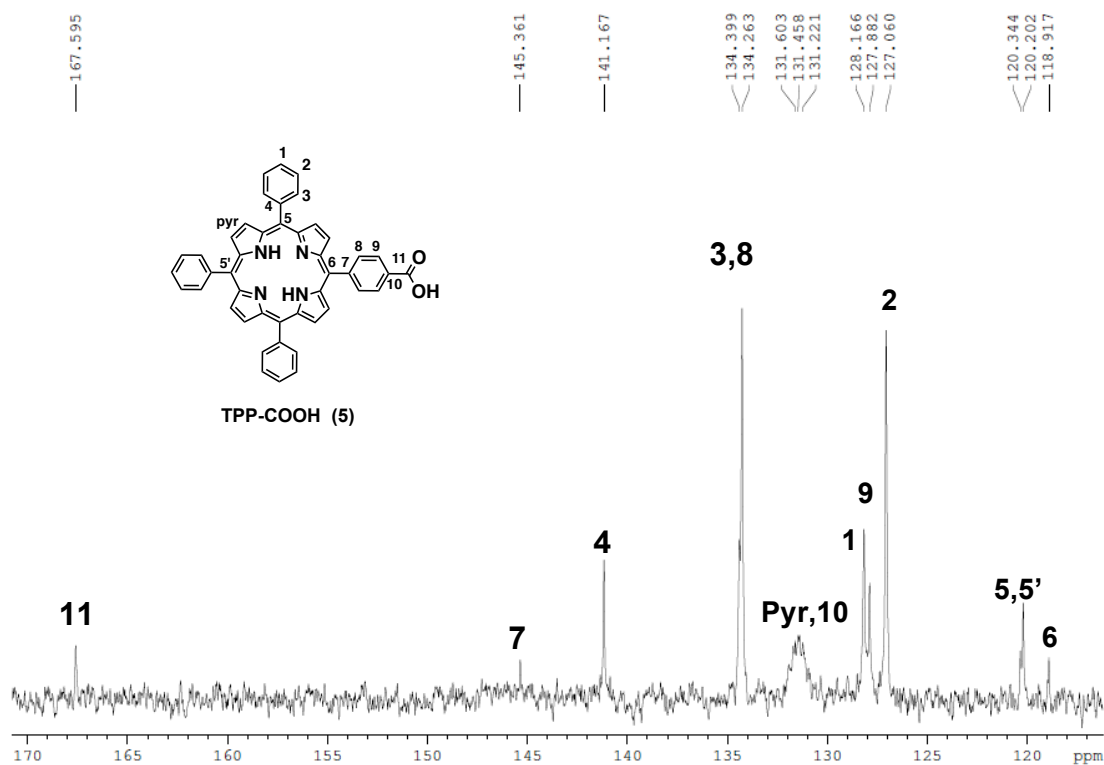
**Figure S12:**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of TPP-COOMe (4) (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) zoom.



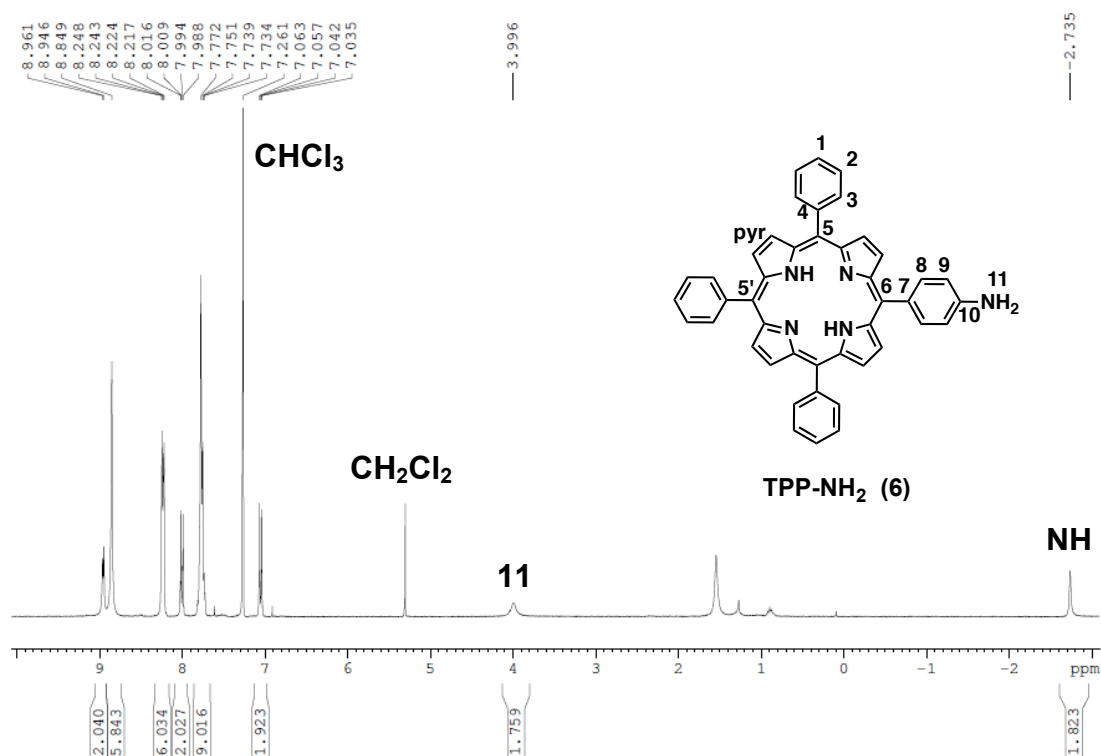
**Figure S13:**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of TPP-COOH (5) (300 MHz,  $\text{d}_6$ -DMSO).



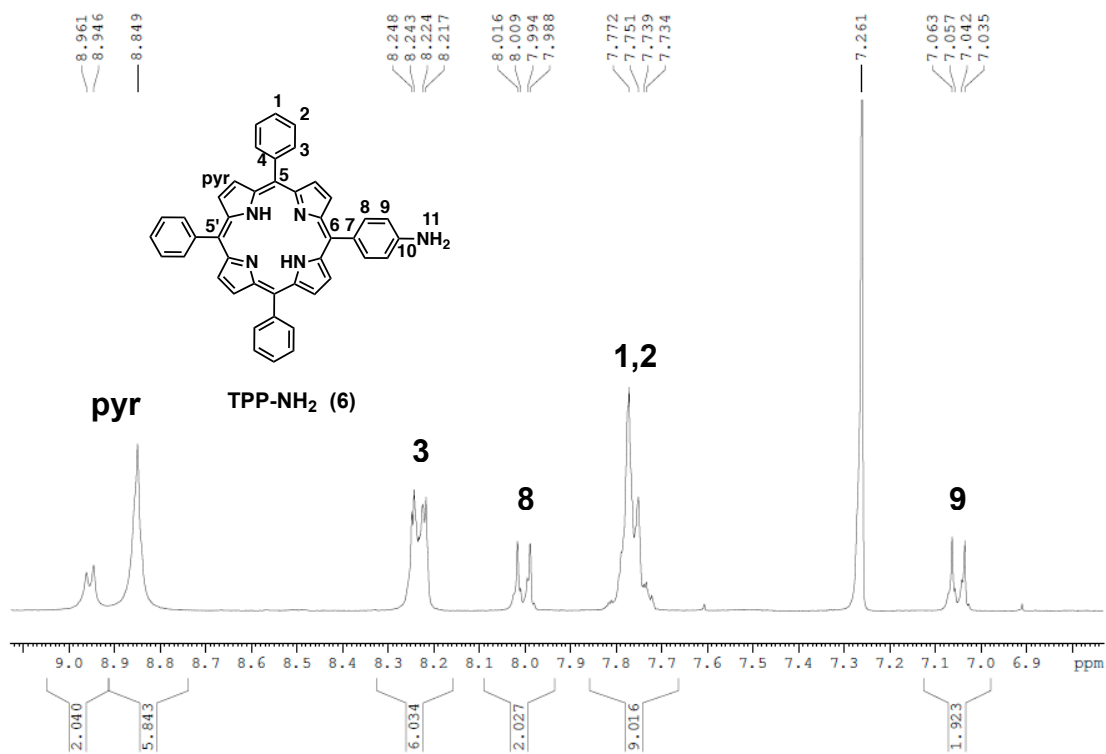
**Figure S14:**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of TPP-COOH (5) (75 MHz,  $\text{d}_6$ -DMSO).



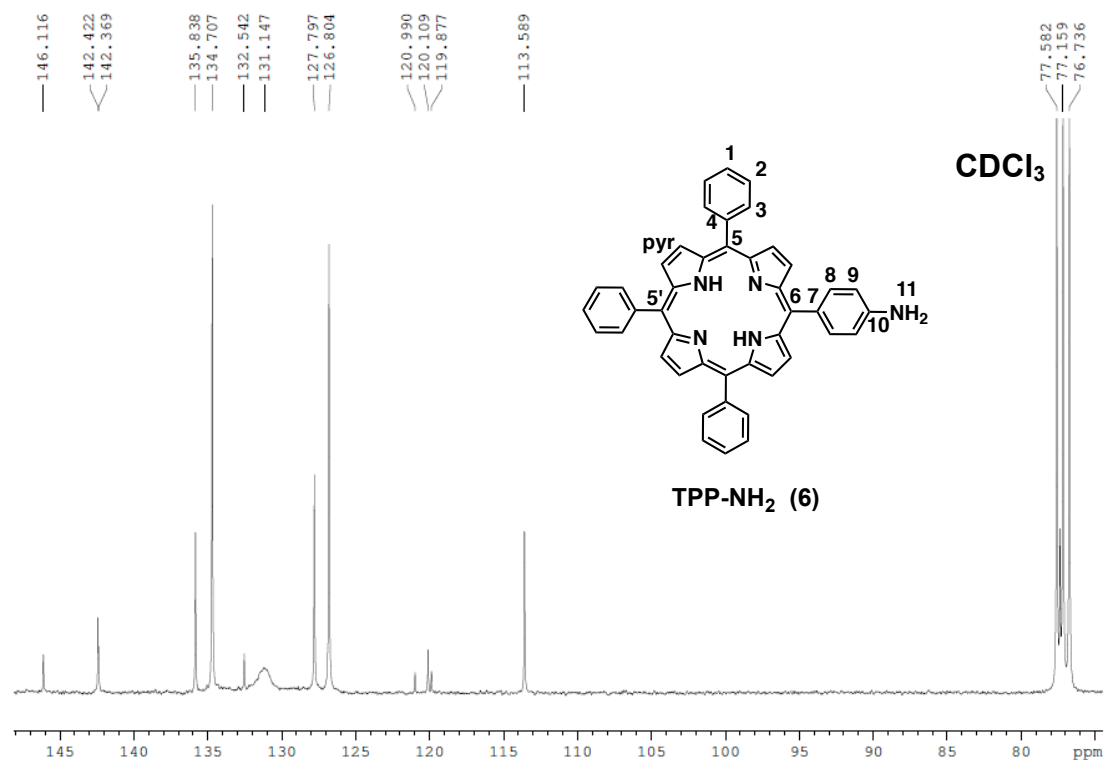
**Figure S15:**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of TPP-COOH (4) (75 MHz,  $d_6$ -DMSO) zoom.



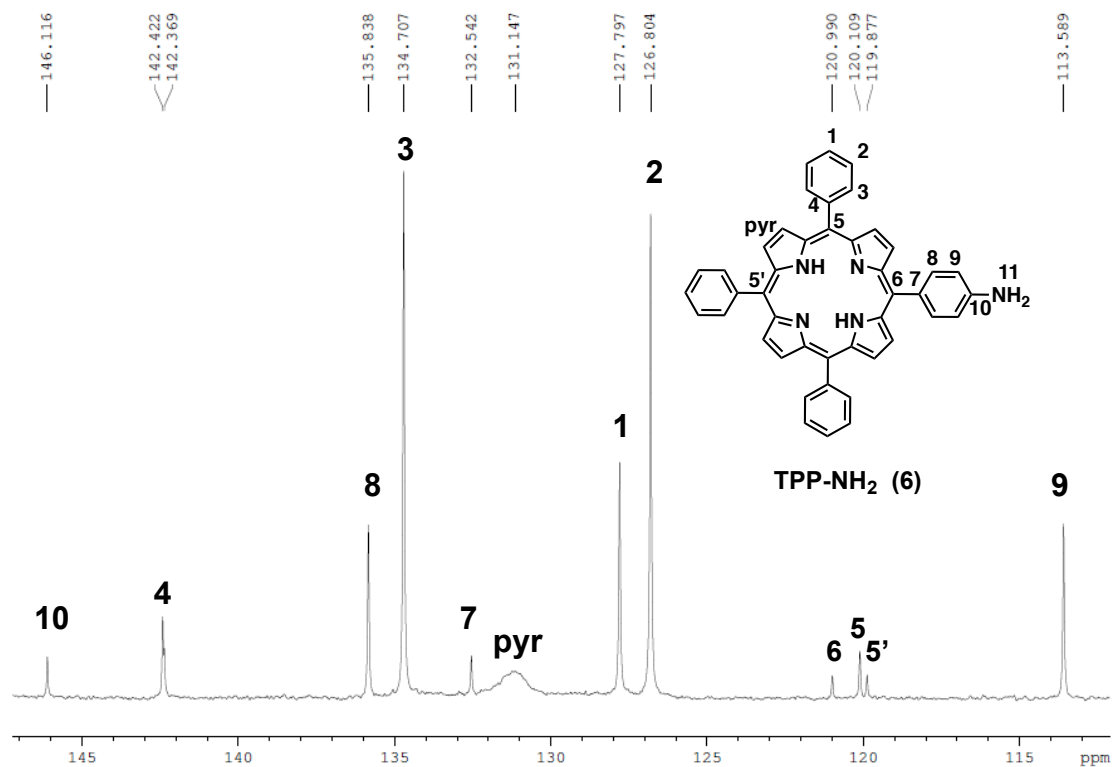
**Figure S16:**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of TPP-NH<sub>2</sub> (6) (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



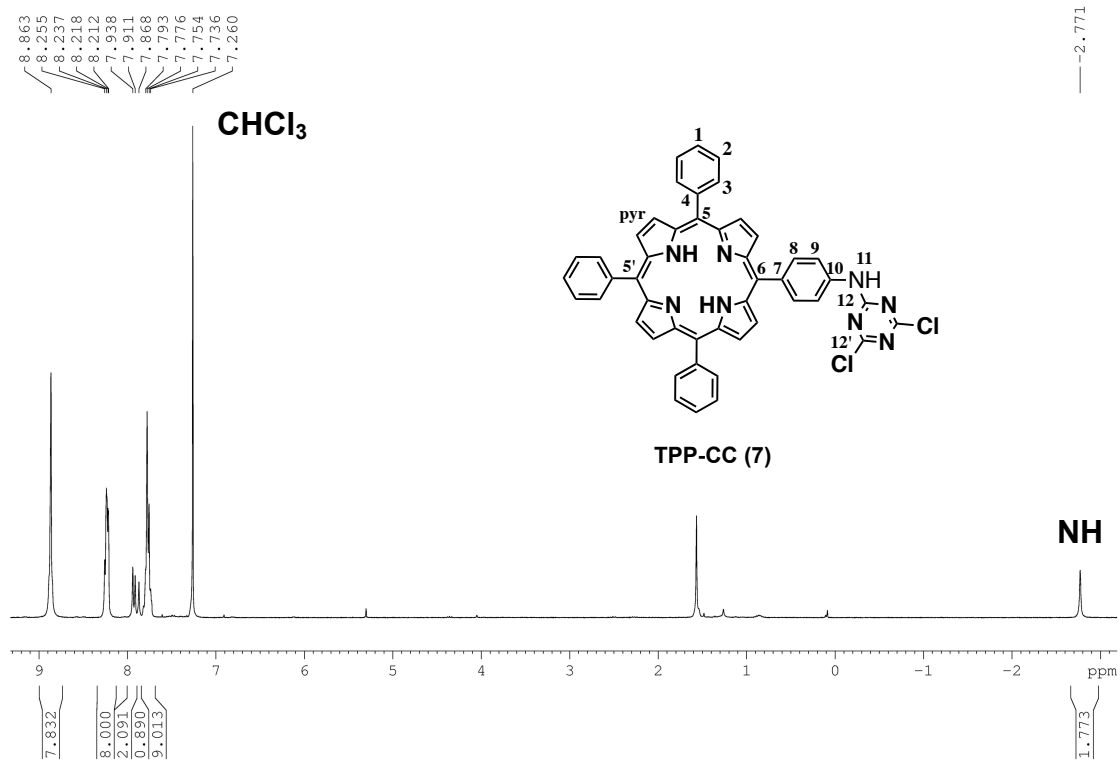
**Figure S17:** Aromatic region of <sup>1</sup>H NMR spectrum of TPP-NH<sub>2</sub> (6) (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



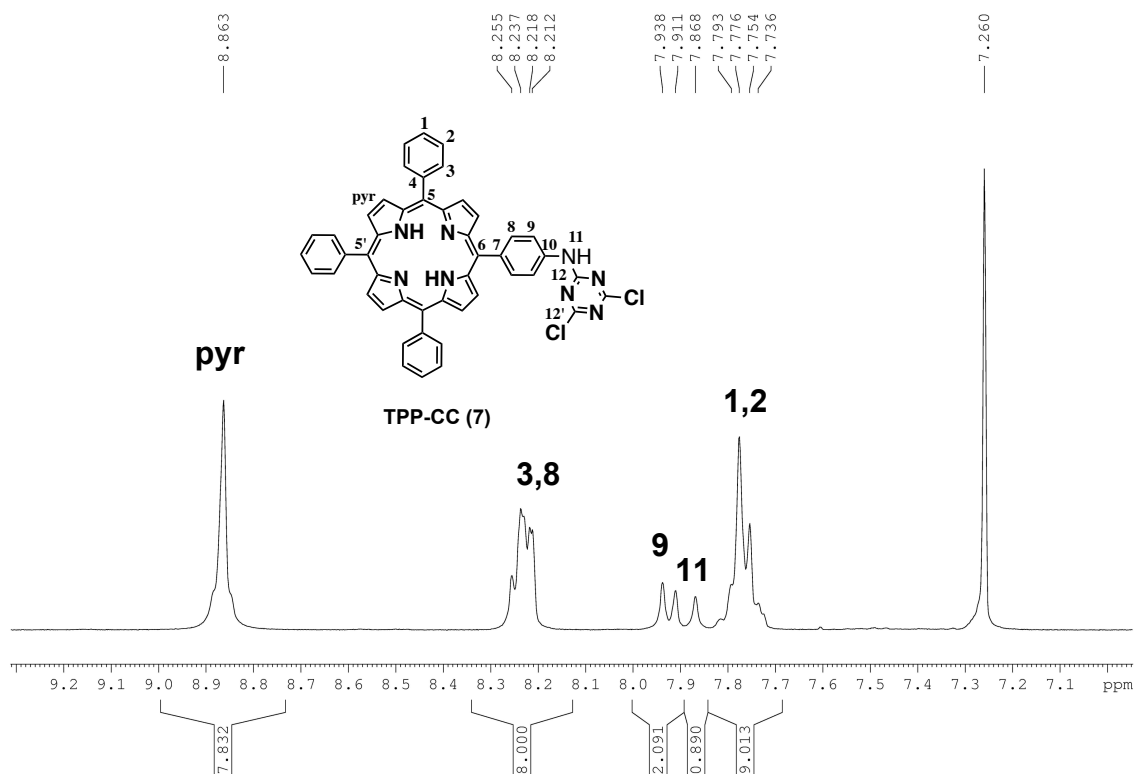
**Figure S18:** <sup>13</sup>C NMR spectrum of TPP-NH<sub>2</sub> (6) (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



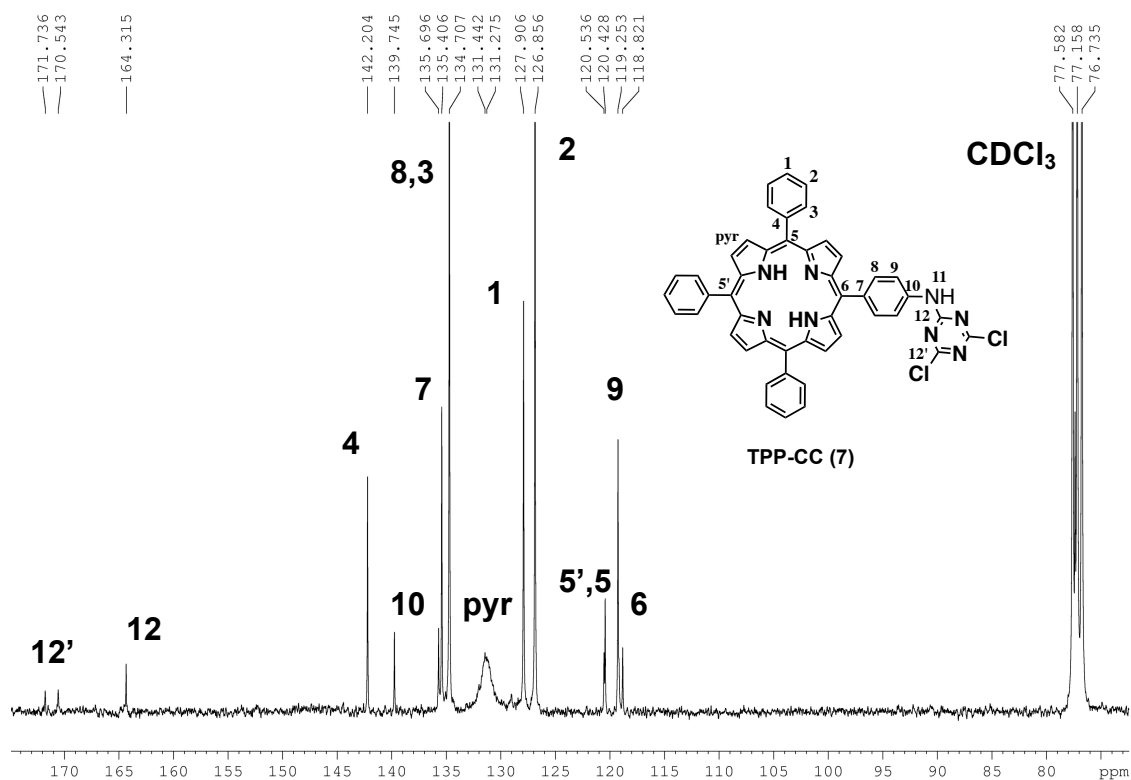
**Figure S18:**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of TPP-NH<sub>2</sub> (6) (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) zoom.



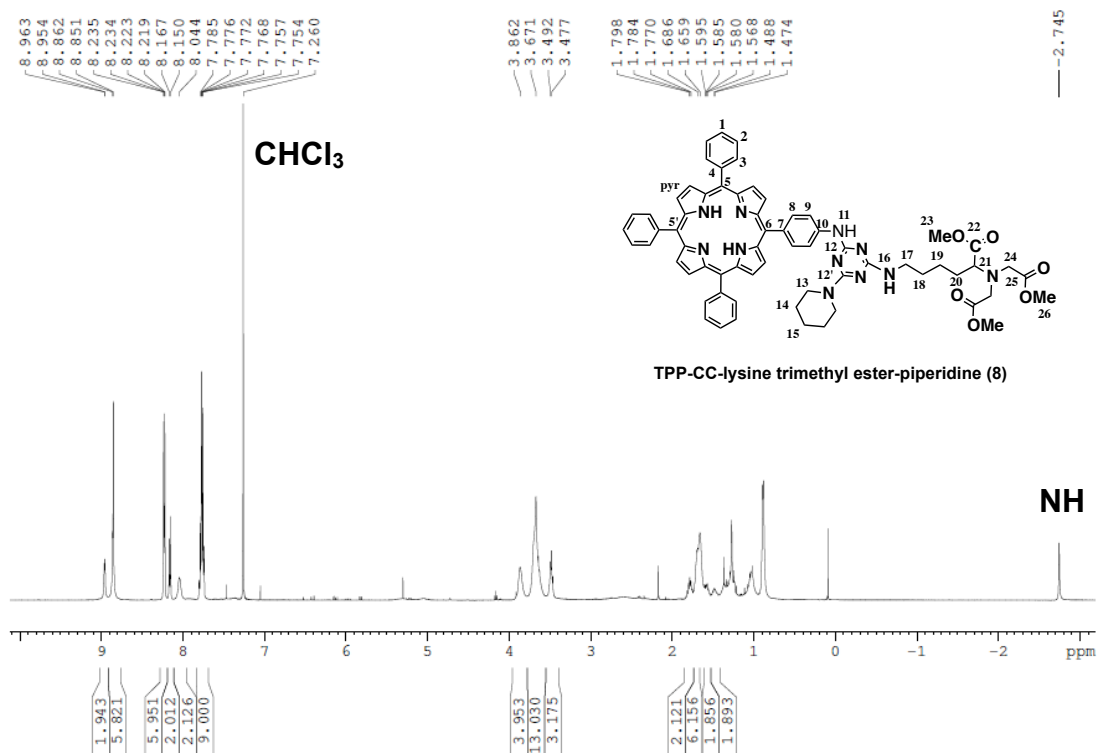
**Figure S19:**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of TPP-CC (7) (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



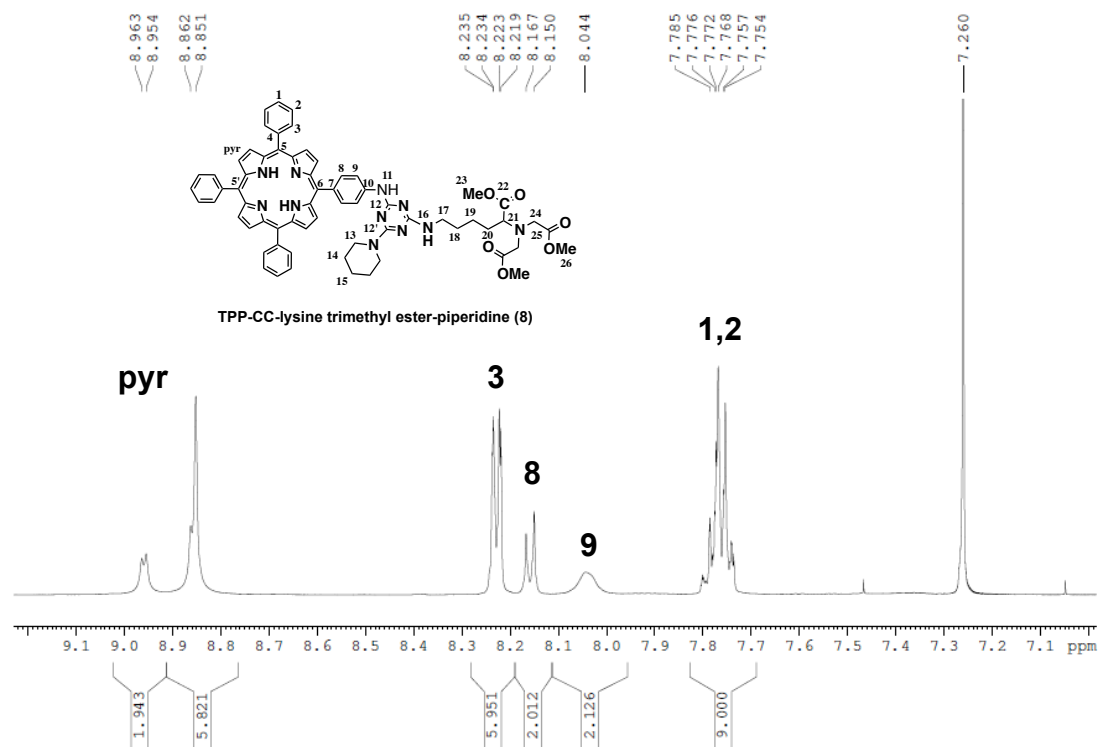
**Figure S20:** Aromatic region of  $^1\text{H}$  NMR spectrum of TPP-CC (7) (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



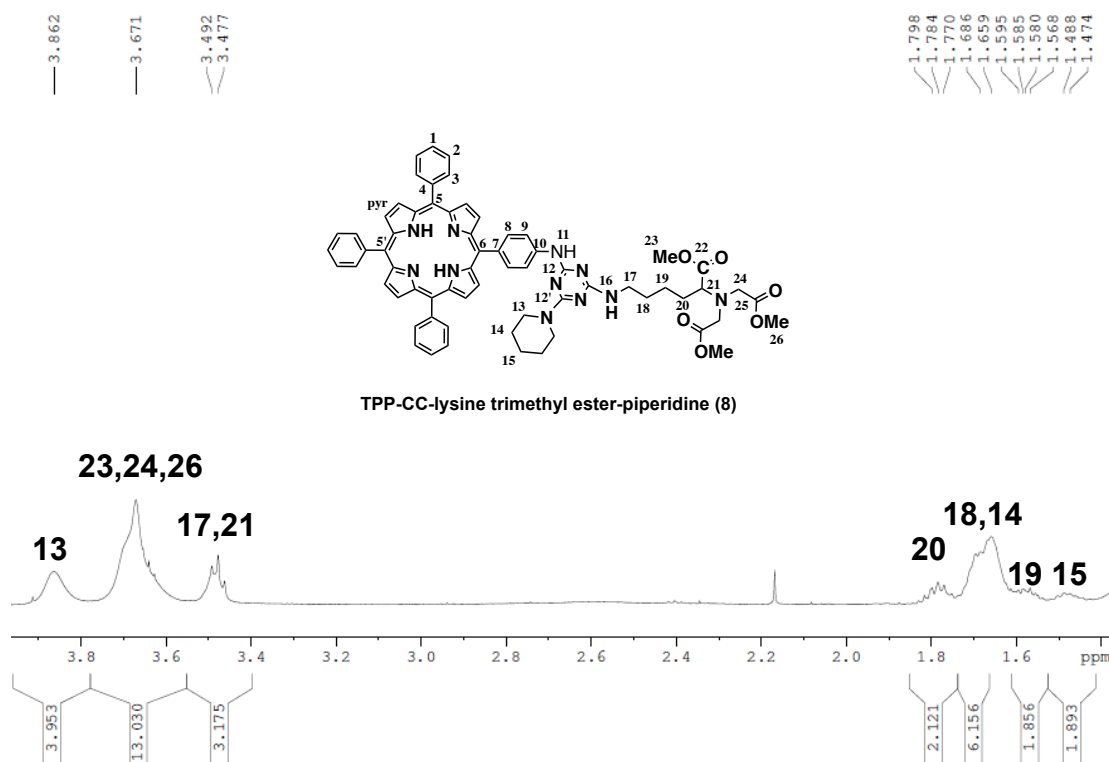
**Figure S21:**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of TPP-CC (7) (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



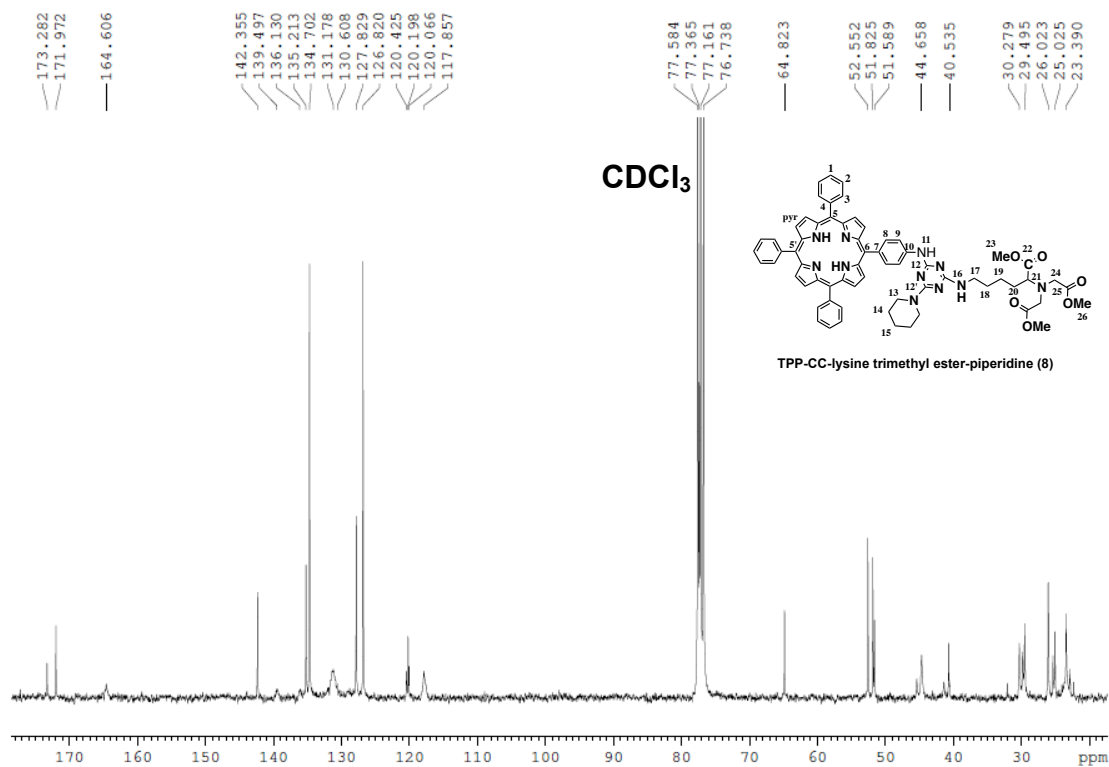
**Figure S22:**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of TPP-CC-lysine trimethyl ester-piperidine (8) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figure S23:** Aromatic region of  $^1\text{H}$  NMR spectrum of TPP-CC-lysine trimethyl ester-piperidine (8) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

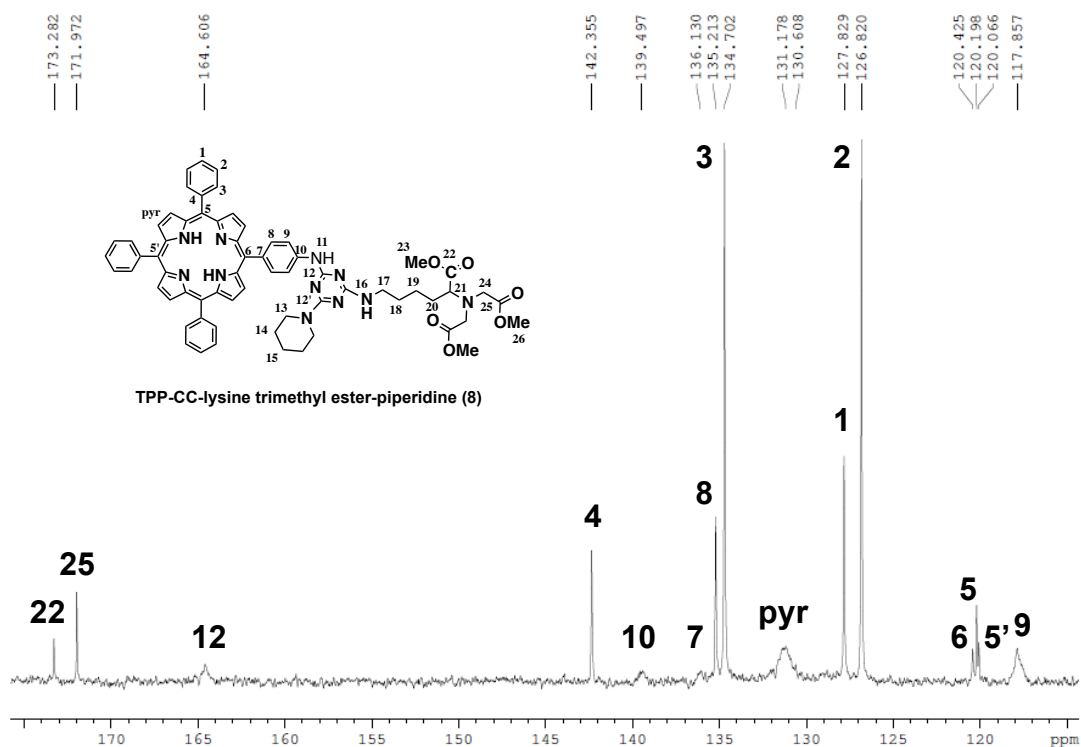


**Figure S24:**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of TPP-CC-lysine trimethyl ester-piperidine (8) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) zoom.

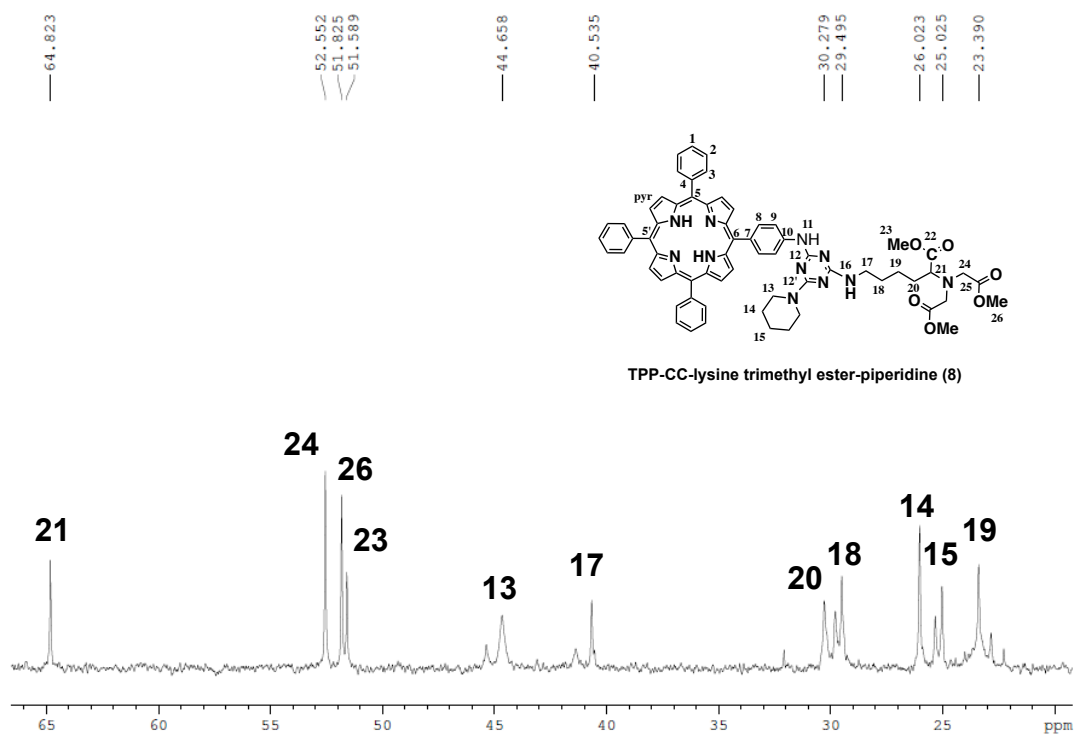


**Figure S25:**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of TPP-CC-lysine trimethyl ester-piperidine (8) (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

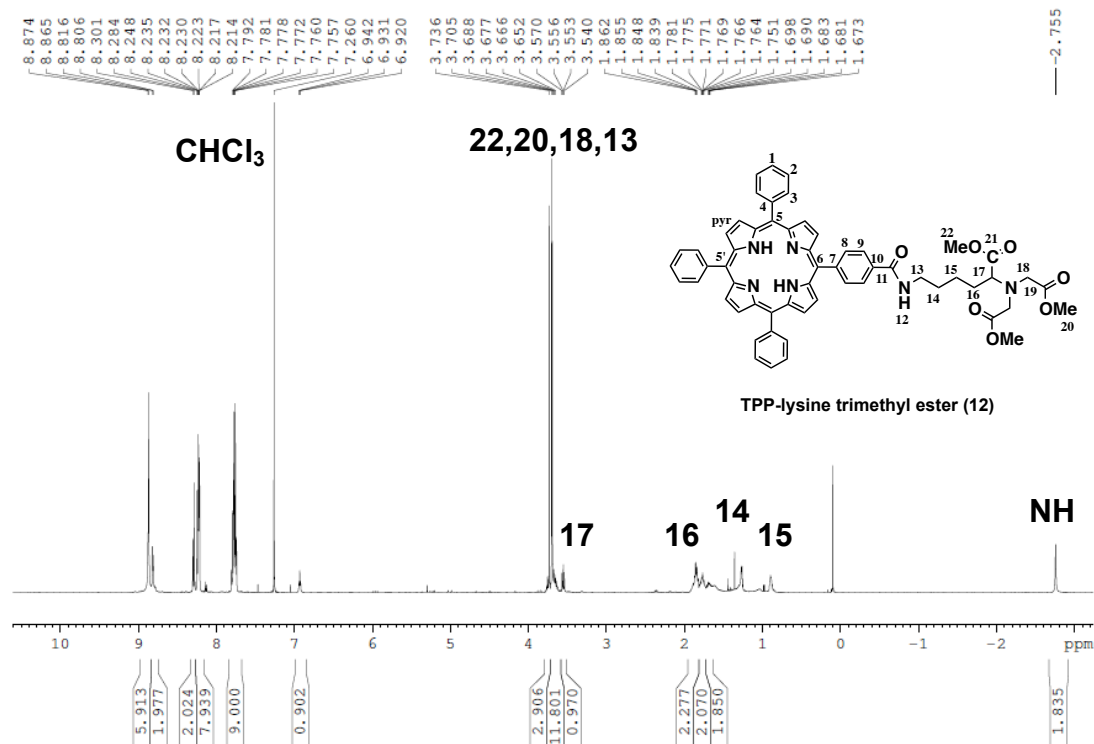




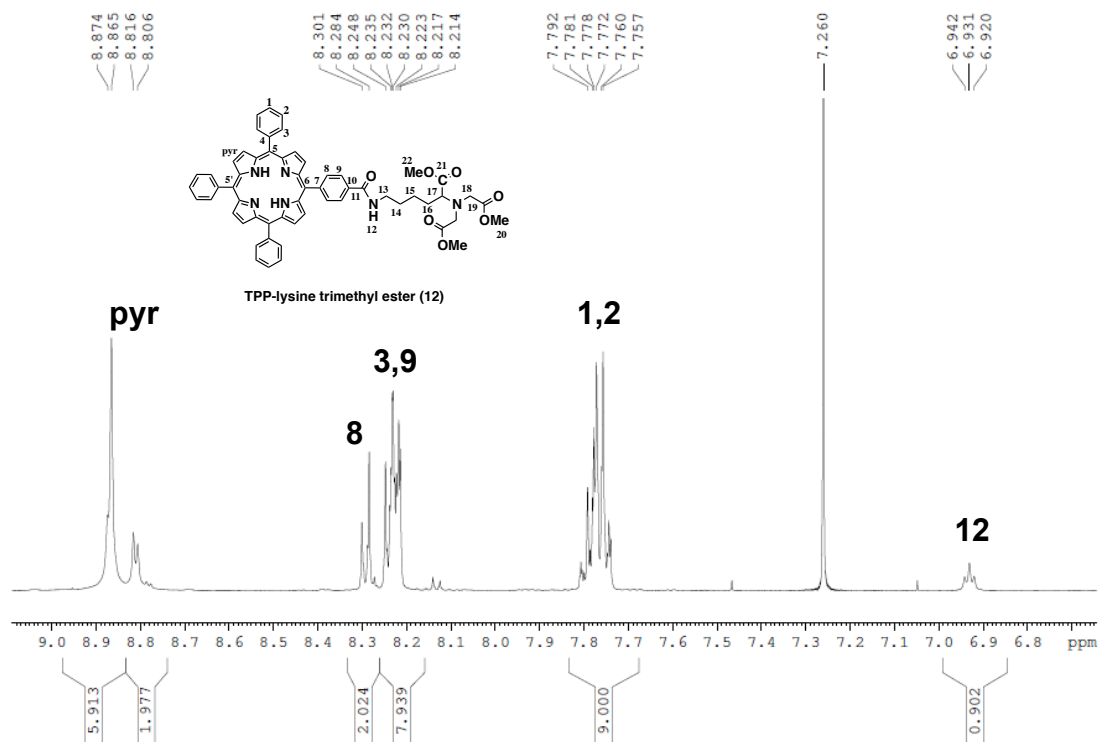
**Figure S26:**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of TPP-CC-lysine trimethyl ester-piperidine (8) (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) zoom.



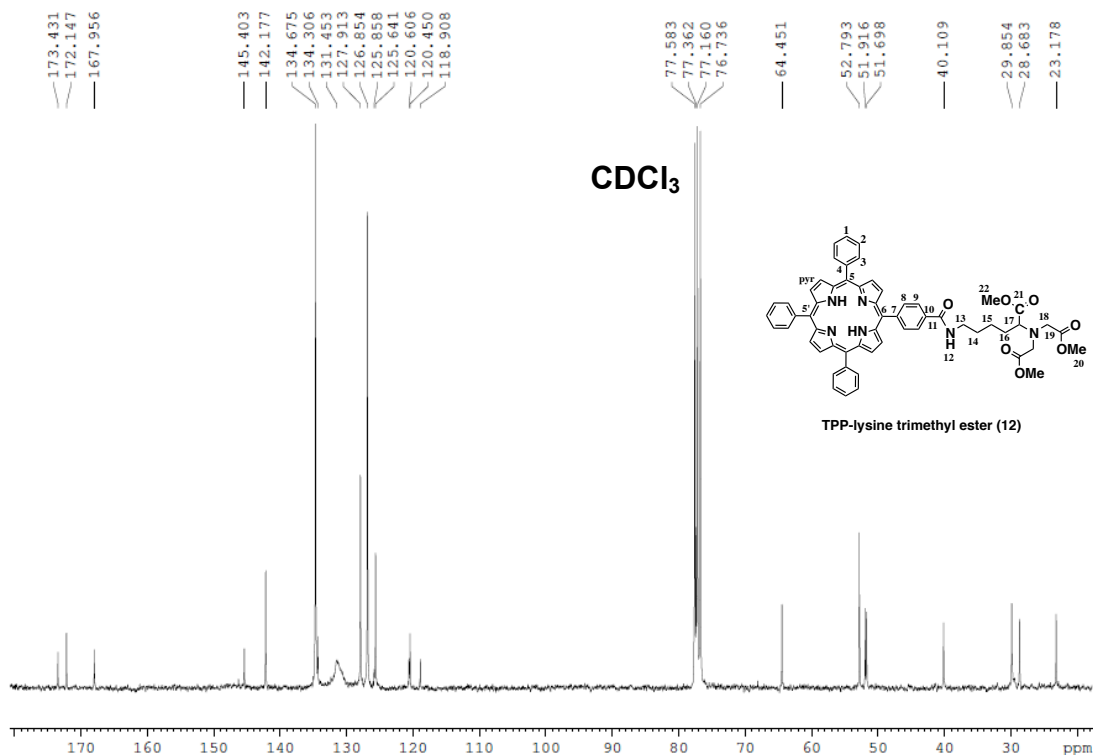
**Figure S27:**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of TPP-CC-lysine trimethyl ester-piperidine (8) (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) zoom.



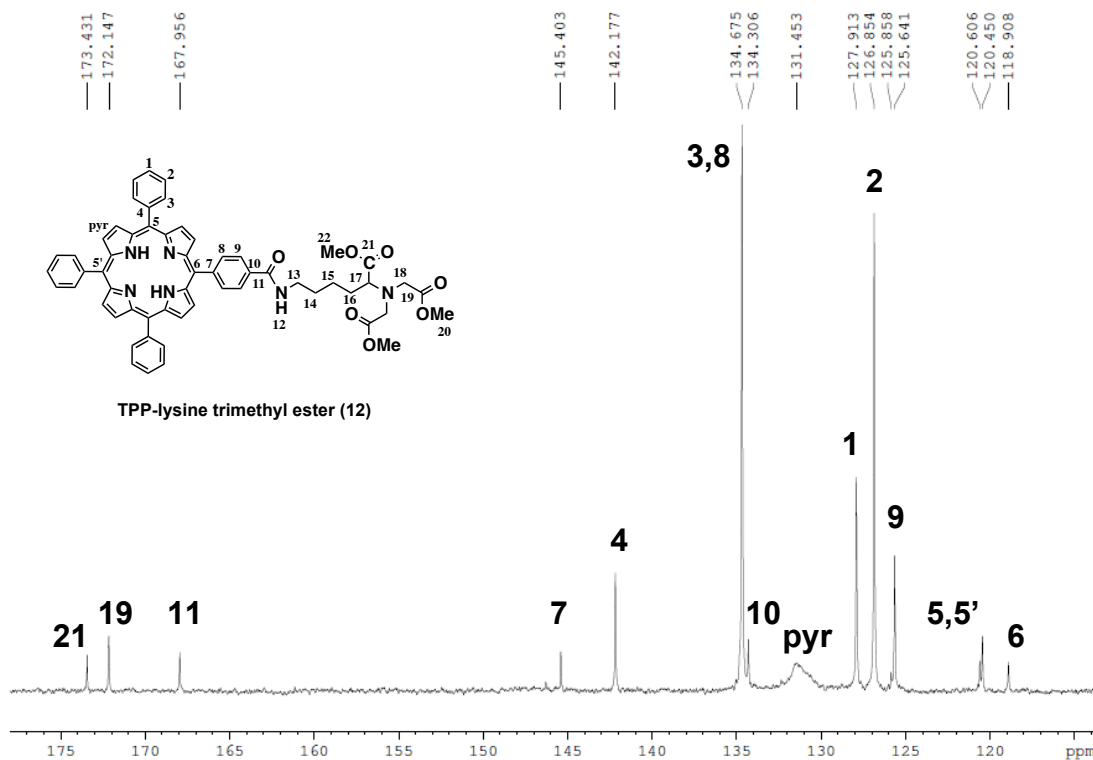
**Figure S28:** <sup>1</sup>H NMR spectrum of TPP-lysine trimethyl ester (12) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



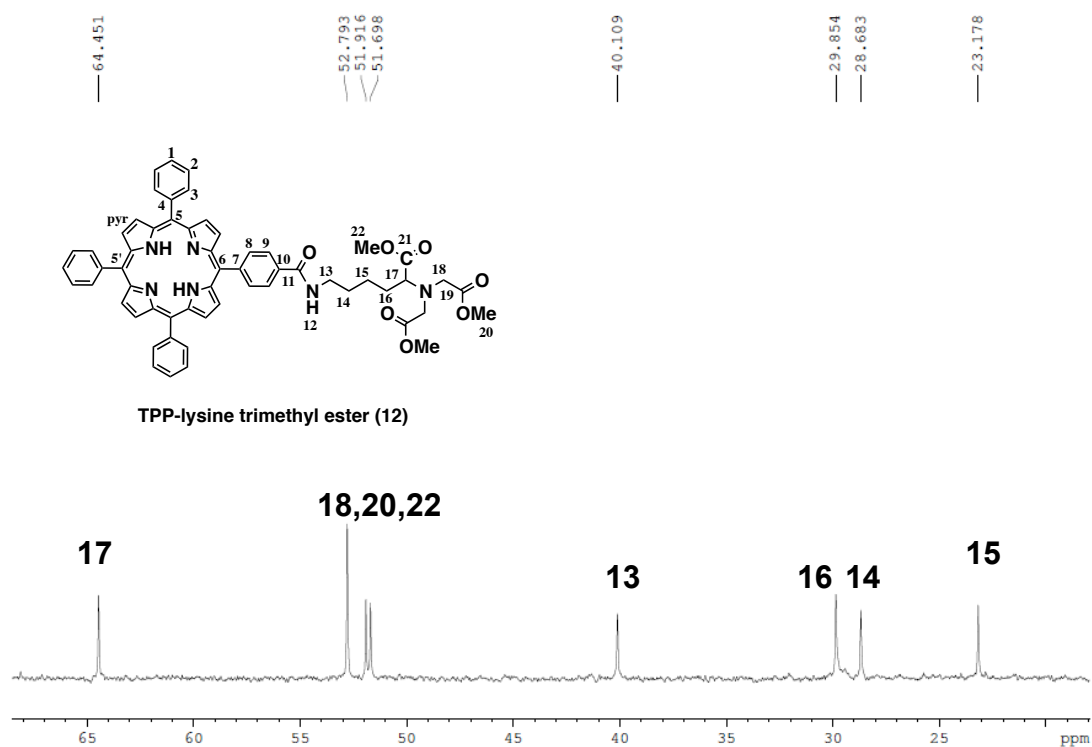
**Figure S29:** Aromatic region of <sup>1</sup>H NMR spectrum of TPP-lysine trimethyl ester (12) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



**Figure S30:**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of TPP-lysine trimethyl ester (12) (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figure S31:**  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of TPP-lysine trimethyl ester (12) (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) zoom.



**Figure S32:** <sup>13</sup>C NMR spectrum of TPP-lysine trimethyl ester (12) (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) zoom.