

# Studij interakcija kationskih kaliksarena s nukleotidima, DNA i RNA

---

Otković, Ena

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:945458>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijски odsjek

Ena Otković

**STUDIJ INTERAKCIJA KATIONSКИH  
KALIKSARENA S NUKLEOTIDIMA,  
DNA I RNA**

**Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku  
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu  
radi stjecanja akademskog zvanja  
magistre kemije

Zagreb, 2021.



Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za biomolekularne interakcije i spektroskopiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc. Ive Piantanide, znanstvenog savjetnika i naslovnog redovitog profesora Sveučilišta u Rijeci. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je prof. dr. sc. Snežana Miljanić.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom „Biomimetic “funnel” and “bowl” supramolecular systems for the selective recognition of DNA/RNA“ („calixDNA“, HrZZ IP-2020-02, voditelj: dr. sc. Aleksandar Višnjevac).



## Zahvale

*Veliko hvala dr. sc. Ivi Piantanidi i dr. sc. Aleksandru Višnjevku na pruženoj prilici i velikom povjerenju tijekom izrade ovog diplomskog rada. Posebno hvala dr. sc. I. Piantanidi na svom prenesenom znanju, ljubaznosti, ugodnoj radnoj atmosferi i velikoj pomoći oko izrade diplomskog rada. Također, veliko hvala Ivoni Krošl na utrošenom vremenu i velikom strpljenu tijekom eksperimentalnog dijela diplomskog rada. Veliko hvala prof. dr. sc. Snežani Miljanić na podršci u najključnijim trenucima te na svom uloženom vremenu, trudu i ljubaznosti.*

*Posebno hvala mojoj „KRPA“ veseloj družini koja je ovaj studentski period pretvorila u period pun smijeha i pozitivnih uspomena. Hvala Nikol na uvijek prisutnoj pozitivni i podršci prije svakog stresnog ispita te veliko hvala na prihvaćanju i međusobnom zbližavanju dvije naizgled različite osobe. Hvala Mariji na međusobnom bodrednju tijekom brojnih sati provedenih u knjižnici, razbijanju naizgled monotone svakodnevnice s brojnim kavama i razgovorima. Hvala Katarini, najprije na bombonima, a potom na svemu što je došlo nakon toga. Na tome što je uvijek tu, uz sve moje uspone i padove, na velikom povjerenju, te na dijeljenju svojih misli i svojih avantura sa mnom.*

*Posebno hvala Moniki na tome što je uvijek moj najveći „navijač“, na neočekivanom prijateljstvu koje se izrodilo iz razgovora koji su trajali dugo u noć, te na brojnim trenucima punim smijeha i pozitivne.*

*Posebno hvala Filipu i Ani koji su tu od samog početka. Hvala na dugogodišnjoj podršci i na svim avanturama koje su odrastanje u malom Daruvaru obogatile brojnim uspomena.*

*Najviše želim zahvaliti mojim roditeljima na svojoj slobodi koju mi uvijek pružaju te velikoj podršci bez koje ovo sve ne bi bilo moguće. Hvala im na svom povjerenju i ne odustajanju od ovog fakulteta skupa sa mnom. Hvala sestri i bratu na svim savjetima, razgovorima i neizmjerne podršci.*

*I za kraj, veliko hvala mojoj dragoj Ivani, čija je upornost, hrabrost, strast i ljubav prema poslu, kreativnost te istinska dobrota moja najveća motivacija.*



# Sadržaj

<b>SAŽETAK.....</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XI</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Kaliksareni.....</b>	<b>2</b>
<b>2.2. Nukleinske kiseline.....</b>	<b>3</b>
2.2.1. Građa nukleinskih kiselina.....	4
2.2.2. Struktura i vrste DNA.....	6
2.2.3. Načini vezanja malih molekula na DNA/RNA sustave.....	9
<b>2.3. Spektroskopske metode vezane uz proučavanje interakcija malih molekula s DNA/RNA sustavima.....</b>	<b>10</b>
2.3.1. UV/Vis spektroskopija.....	11
2.3.2. Promjene temperature mekšanja.....	12
2.3.3. Fluorescencijska spektroskopija .....	14
2.3.4. Cirkularni dikroizam.....	15
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1. Materijali .....</b>	<b>18</b>
3.1.1. Kemikalije .....	18
3.1.2. Instrumentacija .....	20
<b>3.2. Spektrofotometrijska karakterizacija otopina ispitivanih spojeva .....</b>	<b>21</b>
<b>3.3. Ispitivanje interakcija spojeva s polinukleotidima .....</b>	<b>22</b>
3.3.1. Metoda istiskivanja etidijevog bromida .....	22
3.3.2. Pokusi cirkularnog dikroizma (CD).....	22
3.3.3. Temperaturno mekšanje dvolančanih DNA i RNA.....	23
<b>3.4. Ispitivanje interakcija spojeva s nukleotidima.....</b>	<b>24</b>
3.4.1. Ispitivanje interakcija spojeva s nukleobazom D8-111TFA .....	24
3.4.2. Ispitivanje interakcija spojeva s nukleozid-monofosfatima .....	24
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>26</b>
<b>4.1. Spektrofotometrijska karakterizacija ispitivanih spojeva .....</b>	<b>26</b>
4.1.1. UV/Vis spektroskopija.....	26
4.1.2. Stabilnost vodenih otopina spojeva pri grijanju .....	28
4.1.3. Fluorescencija spojeva .....	28



<b>4.2. Ispitivanje interakcija s polinukleotidima .....</b>	<b>31</b>
4.2.1. <i>Temperatura mekšanja polinukleotida.....</i>	<i>31</i>
4.2.2. <i>Metoda istiskivanja etidijevog bromida .....</i>	<i>34</i>
4.2.3. <i>Cirkularni dikroizam.....</i>	<i>37</i>
<b>4.3. Ispitivanje interakcija s nukleotidima.....</b>	<b>39</b>
4.3.1. <i>Interakcije spojeva 1 i 2 s fluorescentnom nukleobazom.....</i>	<i>39</i>
4.3.2. <i>Interakcije ispitivanih spojeva s nukleozid-monofosfatima .....</i>	<i>41</i>
<b>§ 5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>46</b>
<b>§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....</b>	<b>49</b>
<b>§ 7. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>51</b>
<b>§ 8. DODATAK .....</b>	<b>XV</b>
<b>§ 9. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>XXXI</b>



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

## SAŽETAK

### STUDIJ INTERAKCIJA KATIONSКИH KALIKSARENA S NUKLEOTIDIMA, DNA I RNA

Ena Otković

Ranije sintetizirani spojevi kaliks[4]arena i kaliks[6]arena su okarakterizirani u biološki relevantnom vodenom mediju. Spojevi pokazuju fluorescenciju iskorištenu za studij nekovalentnih interakcija s nukleozid-monofosfatima, no preslabih promjena za studij vezanja na dvolančane DNA/RNA. Metodom kompeticije vezanja na DNA/RNA s poznatom bojom, etidijevim bromidom, samo kationski analozi su pokazali afinitet prema DNA i RNA, što uz selektivnu stabilizaciju AT-DNA ukazuje na vezanje u mali utor DNA. Na dvolančanu RNA kationski spojevi se vežu u veliki utor. Nenabijeni analozi ne pokazuju biološki relevantne interakcije s DNA/RNA, ukazujući na važnost pozitivnog naboja. Kaliksareni s nukleozid-monofosfatima tvore interkalandni tip kompleksa u kojemu je nukleobaza smještena između aromatskih jedinica na jednom od rubova kaliksarena. Neutralni analozi vežu nukleozid-monofosfate s nešto većim afinitetom nego kationski analozi, koji pokazuju selektivnost fluorescentnog odgovora prema pirimidinskim nukleobazama, naspram purinskih.

(69 stranica, 79 slika, 6 tablica, 48 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: cirkularni dikroizam, fluorescencija, kaliksaren, nukleinske kiseline, nukleotidi

Mentor: dr. sc. Ivo Piantanida, zn. savj. i nasl. red. prof.

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): prof. dr. sc. Snežana Miljanić

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Snežana Miljanić
  2. prof. dr. sc. Željka Soldin
  3. doc. dr. sc. Marko Močibob
- Zamjena: doc. dr. sc. Adriana Kendel

Datum diplomskog ispita: 22.9.2021.





University of Zagreb  
Faculty of Science  
**Department of Chemistry**

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### STUDY OF CATIONIC CALIXARENES INTERACTIONS WITH NUCLEOTIDES, DNA AND RNA

Ena Otković

Previously synthesized calix[4]arene and calix[6]arene compounds were characterized spectrophotometrically in a biologically relevant aqueous medium. The compounds show weak but applicable fluorescence allowing study of the noncovalent interactions with nucleoside-monophosphates, while interactions with double-stranded DNA/RNA were studied by competition with ethidium bromide and thermal denaturation experiment. Only cationic analogs showed biorelevant interactions within DNA minor groove or RNA major groove binding site. Neutral analogues do not interact with DNA/RNA, stressing importance of positive charge. The tested calixarenes bind nucleoside-monophosphates to form an intercaland type of calixarene-nucleobase complex, nucleobase inserted between the aryl-substituents at the calixarene rim. Neutral analogs bind nucleoside-monophosphates with higher affinity than cationic analogs but cationic analogs show fluorimetric selectivity towards pyrimidine nucleobases.

(69 pages, 79 figures, 6 tables, 48 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: calixarene, circular dichroism, fluorescence, nucleic acids, nucleotides

Mentor: Dr. Ivo Piantanida, Senior Scientist and Professor

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Snežana Miljanić, Professor

Reviewers:

1. Dr. Snežana Miljanić, Professor
2. Dr. Željka Soldin, Professor
3. Dr. Marko Močibob, Assistant Professor
4. Substitute: Dr. Adriana Kenđel, Assistant Professor

Date of exam: 22.9.2021.



## § 1. UVOD

Sintetizirane male molekule koje se vežu s DNA i RNA, ili pak s nukleotidima, privukle su veliku znatiželju i pozornost zbog svoje svestrane primjene u biokemiji i biomedicini. Ta primjena obuhvaća upotrebu malih molekula kao proba za proučavanje bioloških procesa te sposobnost takvih malih molekula da poprime svojstva slična onim svojstvima lijekova ili pak određena štetna svojstva.<sup>1,2</sup> Istraživanje interakcija malih molekula s DNA i RNA većinom se bazira na promatranju utjecaja malih molekula na funkciju DNA i RNA, ili na specifično i selektivno obilježavanje DNA i RNA.<sup>2,3,4</sup> Ipak, posljednjih godina veliki su interes privukli složeni procesi koji ovise o DNA i RNA. Radi se o procesima koji ne ovise samo o nukleotidnoj sekvenci DNA i RNA, već i o epigenetici, odnosno nasljednim promjenama u ekspresiji gena koje nisu uzrokovane promjenom u nukleotidnoj sekvenci DNA.

Kaliksareni se uobičajeno koriste kao supramolekularni receptori za brojne kationske i anionske vrste te su u maloj mjeri ispitani s obzirom na njihov biološki utjecaj ili primjenu.<sup>3,4</sup> Ipak, pokazano je da se kationski kaliksareni mogu primjenjivati u procesu prijenosa DNA unutar stanice.<sup>5,6</sup> Također, pokazano je da se dimeri kationskih kaliksarena vežu u veliki utor DNA, što je pak prilično rijetko svojstvo malih molekula.<sup>2,7</sup> Monomeri kationskih kaliksarena pokazali su nepovoljnu biološku aktivnost i različito vezanje s DNA.<sup>7</sup>

Ispitivani kaliksareni ranije su sintetizirani i strukturno su slični.<sup>8,9</sup> Ipak, prisutna je minimalna razlika u njihovoj strukturi, pa tako dva kaliksarena posjeduju dva, odnosno tri pozitivna naboja, dok su druga dva kaliksarena njihovi neutralni analozi. Ispitivani kaliksareni su topljivi u vodi te je pokazano da efikasno vežu bakrove(I), odnosno cinkove(II) ione.

Ovaj diplomski rad se temelji na istraživanju nekovalentnih interakcija kationskih derivata kaliksarena s nukleotidima, te dvolančanim polinukleotidima DNA i RNA. Cilj ovog diplomskog rada bio je spektroskopskim tehnikama (UV/Vis, fluorescencija, cirkularni dikroizam) ispitati nekovalentne interakcije ranije priređenih derivata kaliksarena s različitim nukleozid-monofosfatima te prirodnim i sintetskim dvolančanim nukleinskim kiselinama. Obradom podataka navedenih eksperimenata okarakterizirani su nastali nekovalentni kompleksi kaliksarena i nukleotida, odnosno kaliksarena i DNA/RNA, s obzirom na selektivnost (spektrofotometrijski odgovor) i afinitet (konstantu stabilnosti) prema određenoj meti (nukleotid, DNA, RNA) te je određeno vezno mjesto na DNA/RNA.

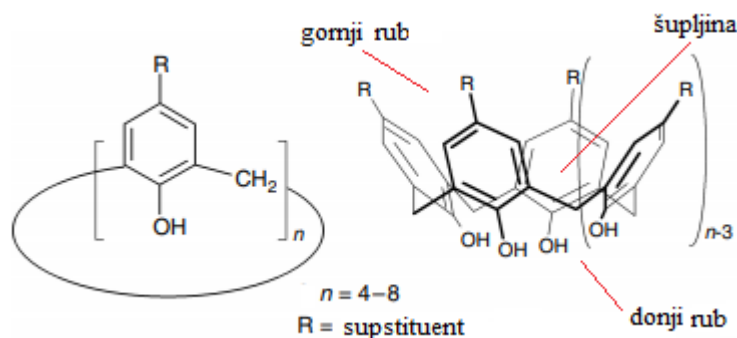
## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Kaliksareni

Kaliks areni ( $n \geq 4$ ) su makrociklički oligomeri sastavljeni od fenolnih podjedinica povezanih metilenskim mostovima u *ortho* položaju fenola.<sup>10</sup> Njihovo svojstvo molekularnih receptora, omogućilo im je da pronađu svoj utjecaj i mjesto u suparmolekularnoj kemiji, koja se u najužem smislu odnosi na asocijaciju (vezanje, kompleksiranje) molekula „domaćina“ i „gosta“ ostvarivanjem međusobnih nekovalentnih interakcija u području njihovih veznih mjesta.<sup>11</sup>

Isprva su kaliksareni ubrajani u obitelj ciklofanskih spojeva, da bi se 1970-ih izdvojili kao zasebna klasa spojeva nakon sustavnih istraživanja C. D. Gutschea, koji im je i nadjenao spomenuto opisno ime prema lat. *calix* = pehar.<sup>11</sup> Najčešće se sintetiziraju i istražuju derivati kaliksarena s 4, 6 i 8 monomera jer se njihovi kosturi jednostavno mogu prirediti bazno kataliziranom kondenzacijom *p-tert*-butilfenola i formaldehida uz odgovarajuće reakcijske uvjete i stehiometrijski odnos reaktanata. Upravo je prisutnost hidrofobne šupljine i mogućnost ugradnje veznih skupina na gornji i donji rub kaliksarena odgovorno za njihovu efikasno i selektivno molekularno prepoznavanje (slika 1). Nasuprot tome, kaliksareni s nesupstituiranim hidroksilnim skupinama fenola nemaju izraženo svojstvo molekularnog prepoznavanja zbog vodikovih veza kojima su navedene skupine međusobno povezane.<sup>11</sup>

Kaliksareni mogu stvarati interakcije s raznim kemijskim vrstama na brojne načine. Moguća je ugradnja neutralnih molekula u kaliksarensku hidrofobnu šupljinu, pri čemu ostvarivanjem interakcija s aromatskim prstenovima nastaju inkluzijski kompleksi. Molekularno prepoznavanje kationa ostvaruje se ugradnjom kationa u kaliksarensku šupljinu te vezanjem kationa s prikladno funkcionaliziranim donjim i gornjim rubom. Ipak, molekularno prepoznavanje aniona nije moguće ostvariti njihovom ugradnjom u kaliksarensku šupljinu zbog toga što je ona bogata elektronima. Molekularno prepoznavanje aniona moguće je samo s derivatima kaliksarena koji posjeduju prikladnu anionsku veznu skupinu.<sup>11</sup>

Slika 1. Shematski prikaz strukture kaliks[n]arena.<sup>11</sup>

Također, osim navedenih interakcija, kaliksareni mogu stvarati komplekse s raznim biomolekulama<sup>12</sup> te tako kationski kaliksareni pokazuju visoku afinitet prema DNA.<sup>7</sup> Ipak, prvi primjer biološke aktivnosti kaliksarena i njihove sposobnosti prepoznavanja biomolekula je zabilježen 1996. godine.<sup>13</sup> Objavljeno je da kaliks[4]aren posjeduje antimikrobijalnu aktivnost i selektivnost prema Gram-pozitivnim bakterijama te da je njegova efikasnost slična onoj prirodnog antibiotika vankomicina.<sup>14</sup> Sposobnost molekularnog prepoznavanja biomolekula omogućuju razna svojstva kaliksarena. Najprije, uvođenje nabijenih skupina, ili pak neutralnih, ali veoma hidrofilnih skupina u strukturu kaliksarena, omogućuje topljivost kaliksarena u vodenom mediju. Nadalje, veličina, oblik i stereokemija vezanih skupina na donji i gornji rub omogućuje kaliksarenima efikasno i selektivno molekularno prepoznavanje. Također, u strukturi kaliksarena istovremeno su prisutne skupine s različitim polarnim svojstvima, što doprinosi hibridnom karakteru kaliksarena, odnosno kaliksarenima omogućuje razne vrste interakcija s biomolekulama.<sup>12</sup>

## 2.2. Nukleinske kiseline

Predstavnicima nukleinskih kiselina su deoksiribonukleinska kiselina i ribonukleinska kiselina. DNA sadrži genetičku informaciju za funkcioniranje i razvitak svih živih organizama, dok RNA sudjeluje u sintezi proteina i u mnogim drugim životno važnim procesima.<sup>15</sup>

Otkriće nukleinskih kiselina pripisuje se švicarskom liječniku i biologu Friedrichu Miescheru koji ih je 1869. godine izolirao iz razgrađenih leukocita (bijelih krvnih stanica). Već deset godina kasnije, 1879. godine, A. Kossel je otkrio sastavne dijelove nukleinskih kiselina i odredio da one ne djeluju niti kao izvor energije u organizmu, niti kao sustav za pohranu energije. Zatim je pedesetih godina dvadesetog stoljeća Chargaff sa suradnicima otkrio da su

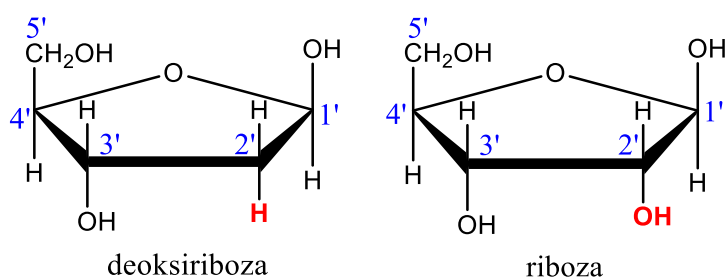


molarni omjeri purinskih i pirimidinskih baza gotovo uvijek jednaki, ali međusobni omjeri svih baza nisu jednaki jedan. Različiti omjeri baza su karakteristični i specifični za pojedinu vrstu organizma. S druge strane, tek 1952. godine je od strane A. Hershey i M. Chase potvrđeno da je DNA uistinu genetski materijal.<sup>16</sup>

### 2.2.1. Građa nukleinskih kiselina

DNA i RNA su dugački linearni polimeri i biomakromolekule koje su izgrađene od međusobno povezanih monomernih jedinica zvanih nukleotidi. Svaka monomerna jedinica se sastoji od šećera, fosfata i jedne od četiriju dušičnih baza. Stoga se DNA i RNA razlikuju prema šećernoj komponenti i prema jednoj od baza.<sup>15</sup>

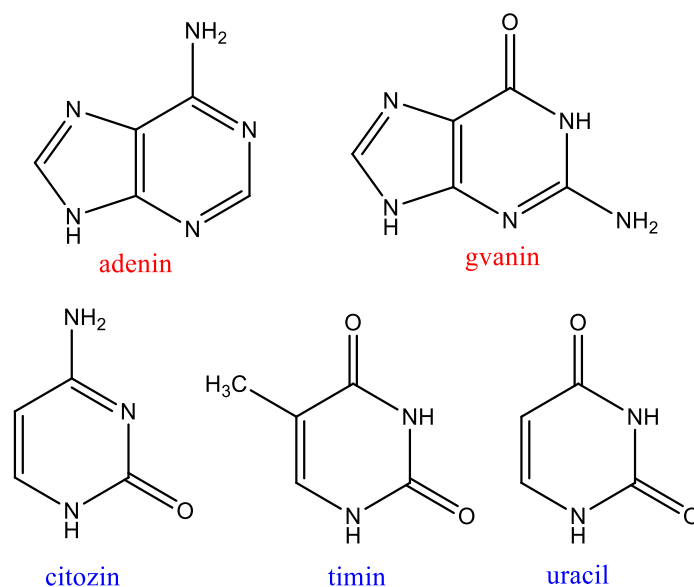
Šećer u deoksiribonukleinskoj kiselini je deoksiriboza. Prefiks deoksi- označuje da na 2`-C atomu nema hidroksilne skupine, koja u sastavu ribonukleinske kiseline, točnije njezine šećerne okosnice riboze, postoji (slika 2).<sup>15</sup> Obje molekule šećera koje grade nukleinske kiseline su derivati furanoze i  $\beta$ -D-stereoizomeri.<sup>17</sup> Oba šećera u prostoru nisu planarna, već postoje u dvije konformacije „omotnice“ i „stolice“. Konformaciju „omotnice“, šećer posjeduje kada se jedan atom nalazi izvan ravnine koju čine preostala četiri atoma, a konformaciju „stolice“ šećer zauzima kada su mu dva susjedna atoma izvan ravnine, pri čemu je jedan atom iznad ravnine, a drugi ispod ravnine prstena. Najčešće jedan od atoma koji se nalazi izvan ravnine prstena više odstupa od drugoga.<sup>18,19</sup>



Slika 2. Struktura šećera riboze i deoksiriboze. Crvenom bojom su naznačene razlike u strukturi šećera, a plavom bojom redosljed C-atoma.

Dušične baze koje grade nukleinske kiseline su adenin (A), timin (T), gvanin (G) i citozin (C). Kod RNA, timin je zamijenjen bazom uracil (U), koja je zapravo nemetilirana forma timina. Navedene dušične baze dijele se na purinske i pirimidinske. U purinske baze spadaju adenin i

gvanin, a u pirimidinske citozin, uracil i timin (slika 3). Purinske i pirimidinske baze su aromatske, planarne i heterocikličke molekule.<sup>15</sup>



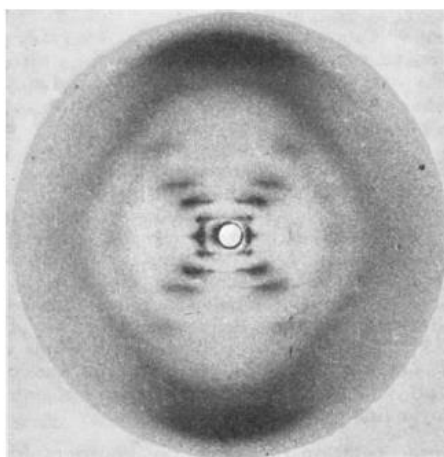
Slika 3. Struktura purinskih (crveno) i pirimidinskih (plavo) dušičnih baza.

Veza između baze i šećera naziva se glikozidna veza. Za purinske baze vezane na šećer glikozidni torzijski kut definiran je s četiri atoma O4'-C1'-N9-C4, a za pirimidinske baze s O4'-C1'-N1-C2.<sup>18</sup> Glikozidni torzijski kut može poprimiti dvije konformacije: *sin* i *anti*. *Anti* konformaciju kod purina čini N1-C2 veza usmjerena nasuprot prstenu šećera, a kod pirimidina C2-N3 veza također usmjerena nasuprot prstenu šećera. S druge strane, kod *sin* konformacije je veza baza usmjerena na istoj strani prstena šećera.<sup>18</sup>

Šećeri su u nukleinskim kiselinama povezani fosfodieterskim mostovima, točnije 3'-OH skupina jednog šećera u nukleotidu je esterificirana fosfatnom skupinom i zatim vezana na 5'-OH skupinu susjednog šećera. Niz međusobno povezanih šećera fosfodieterskim mostovima čini okosnicu nukleinskih kiselina. Svaki fosfodieterski most nosi jedan negativan naboj zbog prisutnosti fosfatne skupine.<sup>17</sup> Prisustvo negativnog naboja odbija nukleofilne reagense, što fosfodietersku vezu čini manje osjetljivom na hidrolizu. Stoga odsutnost 2'-OH skupine na šećeru deoksiribozi u molekuli DNA dodatno povećava njezinu otpornost na hidrolizu. Upravo u toj otpornosti na hidrolizu leži razlog da je DNA genetički materijal i prenosilac informacija u svim stanicama u odnosu na RNA.<sup>15</sup>

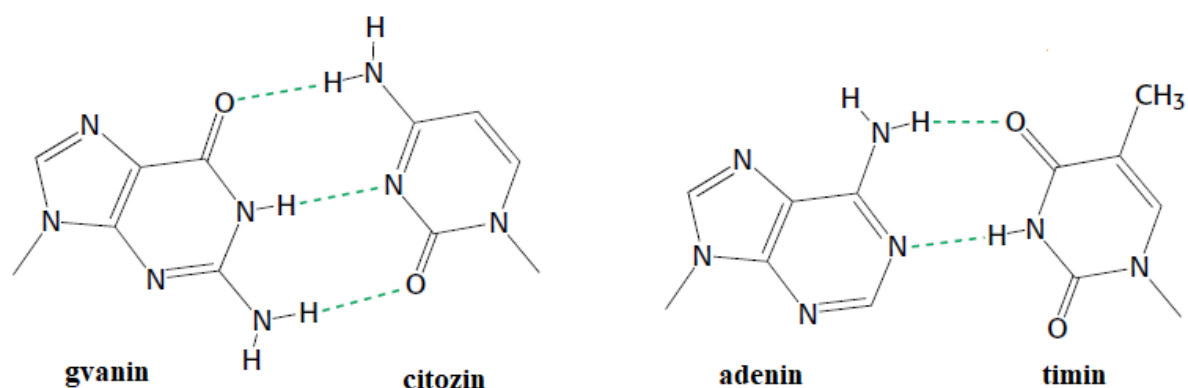
### 2.2.2. Struktura i vrste DNA

Rosalind Franklin i Raymond Gosling su 1952. godine, uz pomoć rendgenske difrakcije, dobili difrakcijsku sliku DNA poznatu kao fotografija 51 (slika 4). Uz pomoć navedene difrakcijske slike DNA i rezultata drugih istraživanja, Francis Crick i James Watson su izveli strukturni model DNA kojim su predložili da se DNA sastoji od dva polinukleotidna lanca, koja se protežu u suprotnim smjerovima te se omataju oko zajedničke osi i time tvore desnu dvostruku uzvojnica. Predloženi model Watsona i Cricka, poznatiji kao B-DNA-uzvojnica, temelji se na poznatoj fotografiji 51, a za to su otkriće, zajedno sa M. H. F. Wilkinsom dobili Nobelovu nagradu iz fiziologije 1962. godine.<sup>15,20</sup>

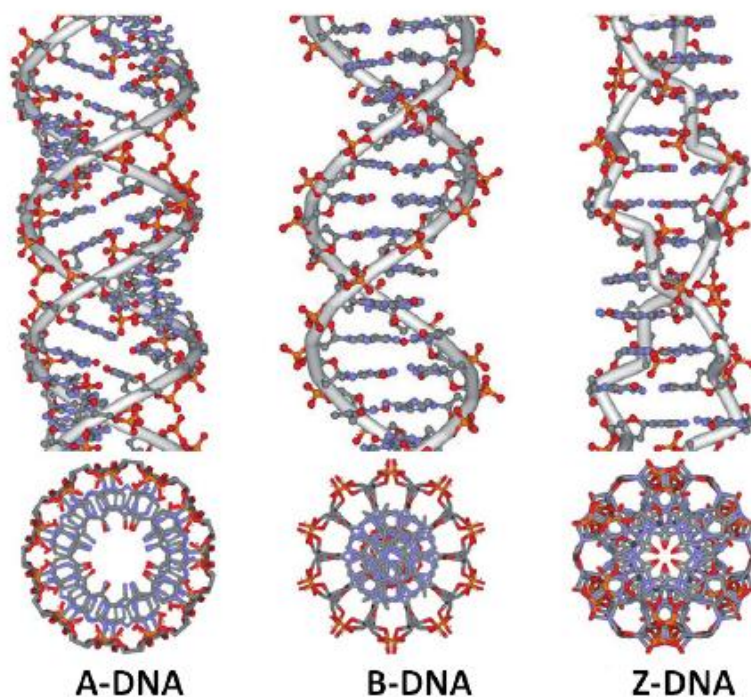


Slika 4. Fotografija dobivena difrakcijom X-zraka s hidratiziranoj vlakna DNA.<sup>21</sup>

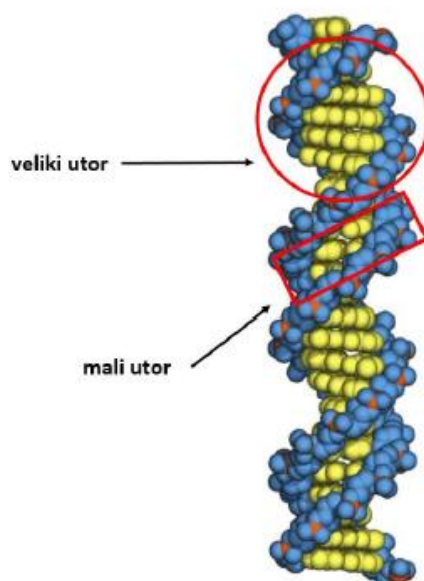
Purinske i pirimidinske baze nalaze se s unutrašnje strane uzvojnice, dok su fosfati i deoksiriboze smješteni s vanjske strane uzvojnice. Adenin se sparuje s timinom preko dvije vodikove veze, a gvanin i citozin s tri vodikove veze. Takvi parovi nazivaju se Watson-Crickovim parovima baza (slika 5). U slučaju ribonukleinske kiseline, adenin se sparuje s uracilom dvjema vodikovim vezama.<sup>17</sup> Prisustvo vodikovih veza između komplementarnih dušičnih baza te aromatskog slaganja baza čini dvostruku uzvojnica DNA stabilnom. Stoga, značajan doprinos u stabilizaciji molekule DNA čini velik broj privlačnih interakcija između vertikalno položenih susjednih parova baza.<sup>15</sup>

Slika 5. Watson-Crickovi parovi baza.<sup>15</sup>

Studije difrakcije rendgenskog zračenja na hidratiziranim oblicima DNA pokazale su da se DNA može nalaziti u tri različita oblika. Ti oblici ili forme DNA su redom: A-DNA, B-DNA i Z-DNA (slika 6).<sup>15</sup> A- i B-DNA su obje desne dvolančane uzvojnice koje čine antiparalelni lanci povezani Watson-Crickovim sparivanjem baza. Uzvojnica tipa A šira je i kraća od B-uzvojnice, a njezini su parovi baza nagnuti, a ne okomiti na os uzvojnice. Stanična DNA je općenito u B-obliku, a dvolančane regije RNA i neki hibridi DNA-RNA poprimaju oblike dvostruke uzvojnice slične A-obliku.<sup>15</sup>

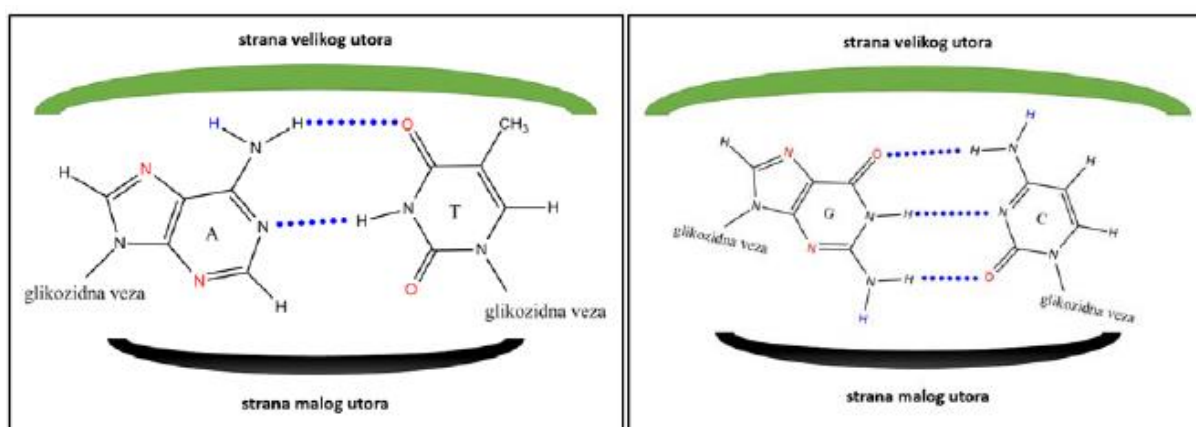
Slika 6. Struktura A-, B- i Z-DNA.<sup>22</sup>

Sve dvostruke uzvojnice nukleinskih kiselina, bez obzira na sastav baza, sadrže dvije vrste utora: veliki i mali (slika 7).<sup>17</sup>



Slika 7. Veliki i mali utor u B-DNA.<sup>17</sup>

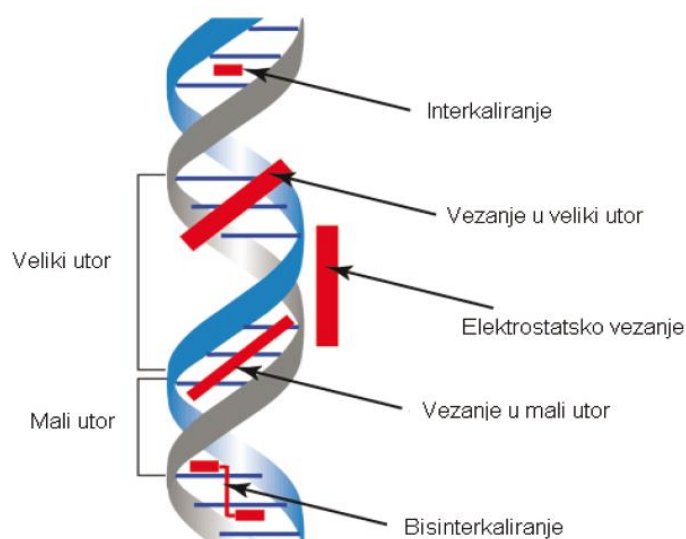
Glikozidne veze u jednom baznom paru nisu potpuno nasuprot jedna drugoj, što za posljedicu ima nastanak utora (slika 8). Mali utor sadržava pirimidinski O-2 i purinski N-3 baznog para, a veliki je utor na suprotnoj strani para. Unutar malog utora N-3 adenina ili gvanina te O-2 timina (citozina) služe kao akceptori vodikove veze, a amino skupina vezana na C-2 gvanina služi kao donor u vodikovoj vezi. S druge strane, u velikom utoru, N-7 gvanina (adenina) te O-4 timina i O-6 gvanina služe kao potencijalni akceptori vodikove veze, dok amino skupina vezana na C6 adenina i C-4 citozina može poslužiti kao donor vodikove veze (slika 8).<sup>15</sup>



Slika 8. Shematski prikaz strana velikog i malog utora s potencijalnim donorima (plavo) i akceptorima (crveno) vodikove veze (plava točkasta linija).<sup>15</sup>

### 2.2.3. Načini vezanja malih molekula na DNA/RNA sustave

Male organske molekule se na polinukleotide mogu vezati nepovratno, pri čemu nastaju kovalentni kompleksi malih molekula s polinukleotidima, ili ravnotežno, pri čemu nastaju nekovalentni kompleksi malih molekula s polinukleotidima. Kod ravnotežnih interakcija razlikuju se tri osnovna načina vezanja: elektrostatske interakcije polikationskih spojeva s negativno nabijenim fosfatima polinukleotida, vezanje malih molekula u utore dvolančanih uzvojnica te interkaliranje (slika 9).<sup>23</sup>



Slika 9. Shematski prikaz interakcija malih molekula s polinukleotidima.<sup>24</sup>

Interkaliranje, tj. umetanje planarnih aromatskih spojeva između parova baza polinukleotida, dovodi do stabilizacije i ukrućivanja polinukleotidnog lanca te do produljenja uzvojnice kao i njenog odvijanja i deformacije.<sup>25,26</sup> Male molekule se ne mogu interkalirati bilo gdje u polinukleotidnom lancu zbog principa „isključenja susjeda“ koji onemogućuje istovremeno vezanje između susjednih parova baza.<sup>23</sup>

Elektrostatske interakcije između pozitivno nabijenih spojeva s negativno nabijenim fosfatima polinukleotida pokazuju malu ili nikakvu selektivnost s obzirom na slijed nukleotida. Afinitet vezanja ovisi o broju pozitivnih naboja molekule spoja. Molekule koje se na polinukleotide vežu na ovaj način su npr. alifatski poliamini.<sup>27</sup>

Kao što je navedeno, važno strukturno svojstvo polinukleotida jest postojanje velikih i malih utora te ovisno o slijedu, utori mogu sudjelovati u vodikovim vezama kao donori ili akceptori vodika.<sup>15</sup> Osim vodikovih veza, važne su i Van der Waalsove interakcije između malih molekula i DNA/RNA.<sup>28</sup> Mnogi antibiotici i antitumorski lijekovi, predmet su mnogih

istraživanja jer se njihovo terapijsko djelovanje temelji na ovom načinu vezanja. Male molekule koje se vežu u utore polinukleotida imaju konveksni oblik koji odgovara konkavnom obliku utora dvostrukih uzvojnica DNA i RNA.<sup>23</sup>

Spojevi koji se vežu na polinukleotide predmet su istraživanja zbog svojih terapijskih, antitumorskih i antibiotskih svojstva. Vezanjem spojeva na polinukleotide dolazi do promjene u njihovoj strukturi, a to pak dovodi i do promjene u biološkoj aktivnosti polinukleotida. U istraživanjima se mogu koristiti prirodni i sintetski polinukleotidi. Od prirodnih polinukleotida najčešće se koristi DNA iz prsne žlijezde teleta (engl. *Calf Thymus DNA*, *ct-DNA*), čiji redoslijed baza nije detaljno poznat, no načelno sadrži 48% GC i 52 % AT parova baza i time je dobar primjer B-uzvojnice uprosječenih strukturnih svojstava. Za provedbu detaljnijih ispitivanja koriste se sintetski polinukleotidi čiji su slijedovi baza poznati. Koriste se homopolinukleotidi (osnovne strukture poli X – poli Y) i alternirajući polinukleotidi (osnovne strukture poli XY – poli XY).

Spojevi koji se vežu u mali utor obično pokazuju veliku selektivnost prema manjem utoru DNA u odnosu na RNA, a to se povezuje sa samim oblikom manjeg utora kod DNA i RNA. Manji utor RNA je bitno širi i plići što smanjuje hidrofobni efekt vezanja malih molekula, a time i utjecaj vodikovih veza između male molekule i DNA. Također, vezanje malih molekula u utor DNA ovisi i o slijedovima DNA. Kod poli dG – poli dC slijedova DNA u malom utoru nalaze se amino skupine gvanina, koje često imaju nepovoljan sterički utjecaj te zbog toga male molekule preferiraju vezanje na DNA koje su bogate A-T slijedovima.<sup>23</sup>

### **2.3. Spektroskopske metode vezane uz proučavanje interakcija malih molekula s DNA/RNA sustavima**

Za ispitivanje nekovalentnih kompleksa malih molekula s DNA/RNA koriste se razne eksperimentalne metode kojima se određuju: promjena viskoziteta otopine DNA/RNA, promjena sedimentacijskog koeficijenta ili elektroforetske pokretljivosti cirkularne DNA te promjena temperature „mekšanja“ dvostruke uzvojnice nakon vezanja ispitivanog spoja. Od spektroskopskih metoda najviše se primjenjuju <sup>1</sup>H NMR, UV/Vis i fluorescencijska spektroskopija te cirkularni i linearni dikroizam.<sup>23</sup>

U daljnjem tekstu detaljnije će biti opisane metode korištene u eksperimentalnom dijelu ovog diplomskog rada: UV/Vis i fluorescencijska spektroskopija, cirkularni dikroizam te određivanje promjene temperature „mekšanja“ dvostruke uzvojnice nakon vezanja ispitivanog spoja na temelju UV/Vis spektara.

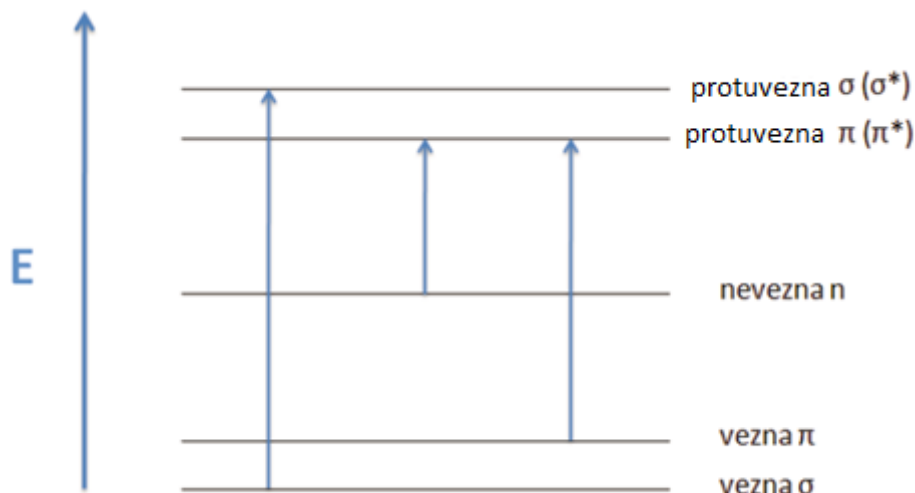
### 2.3.1. UV/Vis spektroskopija

Ultraljubičasta-vidljiva spektroskopija (engl. *ultraviolet-visible spectroscopy*, UV/Vis) jedna je od najčešće korištenih metoda za identifikaciju i određivanje brojnih organskih i anorganskih spojeva. Omogućuje određivanje molekulskih vrsta koje apsorbiraju ultraljubičasto ili vidljivo zračenje. UV/Vis spektroskopija je apsorpcijska spektroskopija kod koje uslijed pobude elektrona molekula u području elektromagnetskog zračenja (100–400 nm za UV i 400–800 nm za Vis područje) dolazi do prijelaza elektrona iz osnovnog u pobuđeno elektronsko stanje. Prednosti ove metode su široka primjenjivost, velika osjetljivost, visoka selektivnost, točnost i jednostavnost.<sup>29</sup>

U UV/Vis spektroskopiji mjeri se količina apsorbirane svjetlosti kao funkcija valne duljine. To može dati i kvalitativne i kvantitativne podatke o uzorku. Elektroni koji su uključeni u dvostruke i trostruke veze organskih spojeva nisu tako snažno vezani te se zbog toga lakše pobuđuju. Nezasićene organske funkcionalne skupine koje apsorbiraju u UV/Vis dijelu elektromagnetskog spektra nazivaju se kromofori. Iako kromofori apsorbiraju zračenje pri karakterističnim valnim duljinama, konjugacija između dva ili više kromofora ima tendenciju pomicanja apsorpcijskih maksimuma koji se definiraju na sljedeći način: batokromni pomak je pojava pomicanja apsorpcijskih maksimuma prema većim valnim duljinama, a hipsokromni pomak je pomak prema manjim valnim duljinama. Ukoliko nekom promjenom uvjeta dolazi do povećanja apsorbanije, riječ je o hiperkromnom efektu, dok je suprotni efekt hipokromni.<sup>29</sup>

Elektronski prijelazi mogu se klasificirati prema tipu orbitala čija se populacija mijenja prilikom apsorpcije zračenja (slika 10). Što je lakše pobuditi elektrone (niži energetska razmak između molekulskih orbitala), to je veća valna duljina svjetlosti koju molekula apsorbira. Tijekom analize organskih molekula najviše se bavimo  $\pi-\pi^*$  i  $n-\pi^*$  prijelazima budući da upravo tim prijelazima odgovara energija UV/Vis zračenja. Prijelaz iz molekulske orbitale  $\sigma$  u  $\sigma^*$  zahtjeva najviše energije te se odnosi na niže valno područje. Neće svi prijelazi između kvantnih razina biti mogući. Postoje izborna pravila koja govore o ograničenjima koja postoje tijekom interakcija elektromagnetskog zračenja i tvari.<sup>30</sup>





Slika 10. Tipovi orbitala kod molekula i elektronski prijelazi uzrokovani apsorpcijom UV ili Vis zračenja.

Dio zračenja koje prolazi kroz otopinu spoja apsorbiraju molekule spoja, dok propušteno zračenje mjeri spektrofotometar. Količina apsorbiranog zračenja može se izraziti kao transmitancija ( $T$ ) što je omjer intenziteta propuštenog zračenja i intenziteta upadnog zračenja ili kao apsorbanca ( $A$ ) što je dano izrazom:

$$A = -\log T$$

Što je veći broj molekula koje apsorbiraju zračenje, to je veća apsorpcija. Što molekula učinkovitije apsorbira zračenje pri određenoj valnoj duljini, to je apsorpcija veća. Iz ovoga proizlazi Beer-Lambertov zakon koji kaže da je apsorbanca proporcionalna koncentraciji apsorbirajuće tvari, dok je molarni apsorpcijski koeficijent ( $\epsilon$ ) konstanta koja opisuje svojstvo molekule da apsorbira zračenje pri određenoj valnoj duljini. Beer-Lambertov zakon dan je jednadžbom:

$$A = \epsilon cl$$

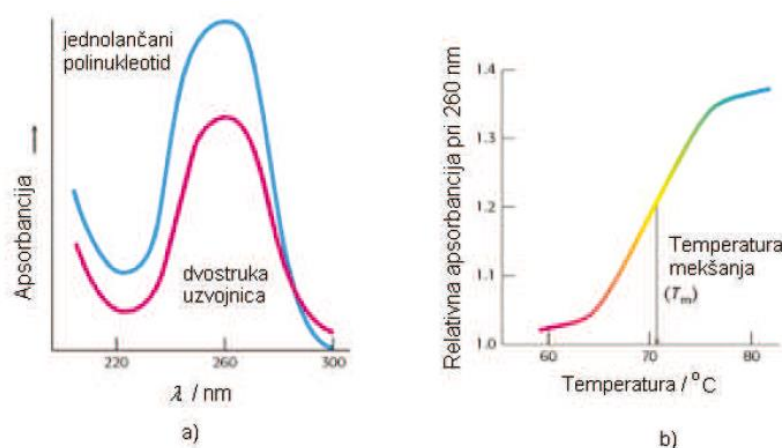
gdje je  $A$  apsorbanca pri određenoj valnoj duljini,  $c$  je molarna koncentracija otopine spoja,  $l$  je duljina puta zračenja, a  $\epsilon$  je molarni apsorpcijski koeficijent.<sup>29</sup>

### 2.3.2. Promjene temperature mekšanja

Dva su lanca u dvolančanoj uzvojnici DNA povezana nizom nekovalentnih interakcija, gdje dominiraju vodikove veze i aromatske interakcije slaganja između nukleobaza. Bilo koja fizikalna promjena koja utječe na navedene nekovalentne interakcije može promijeniti stanje

DNA uzvojnice pa se tako u laboratoriju dvostruka uzvojnica DNA može razoriti grijanjem otopine DNA ili dodatkom kiseline ili baze. Razdvajanje dvostruke uzvojnice na dva jednolančana slijeda događa se pri određenoj temperaturi mekšanja ( $T_m$ ), koja se definira kao temperatura pri kojoj je pola strukture denaturirano, te je karakteristična za određeni slijed baza. Ova promjena je popraćena mjerljivim promjenama fizikalnih svojstva otopine DNA. Primjerice, otopina native DNA je viskozna jer se ukočena zavojnica opire deformaciji, dok se nakon denaturacije viskoznost otopine bitno smanjuje, jer su odvojeni lanci puno savitljiviji.<sup>17</sup>

Denaturacijom molekule DNA mijenja se i njena apsorbancija. Dušikove baze apsorbiraju zračenje u ultraljubičastom dijelu spektra. Nakon denaturacije one više nisu u interakciji aromatskog slaganja pa apsorbiraju oko 40% više zračenja na svim valnim duljinama u ultraljubičastom dijelu spektra. Taj učinak denaturacije na apsorpcijski spektar naziva se hiperkromizam. Denaturacija zavojnice je kooperativan proces jer razdvajanje zavojnice na jednom mjestu jako destabilizira ostatak zavojnice i potiče daljnju denaturaciju.<sup>30</sup>



Slika 11. a) Hiperkromni efekt prilikom denaturacije DNA; b) krivulja mekšanja DNA.<sup>17</sup>

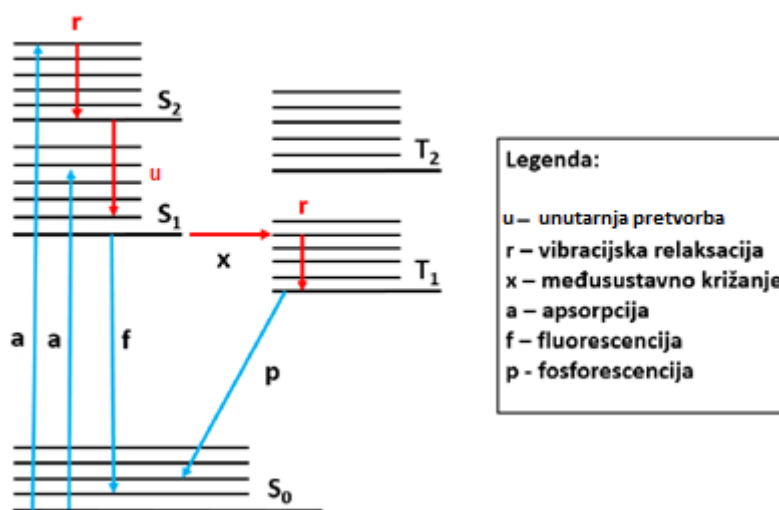
Čimbenici koji utječu na temperaturu mekšanja DNA su sastav baza, ionska jakost, vrijednost pH te molekule koje se vežu na DNA.<sup>31</sup> Budući da GC parove baza povezuju tri vodikove veze, oni su stabilniji od AT parova baza, te je potrebna viša temperatura kako bi se ti parovi baza denaturirali. Povećanjem ionske jakosti otopine, povećava se i dielektrična konstanta koja dovodi do smanjenja međusobnog odbijanja fosfatnih skupina što stabilizira zavojnicu. Bilo koja molekula koja može stvoriti vodikove veze s funkcionalnim skupinama baza u DNA može

doprinijeti denaturaciji zavojnice. Da bi male molekule denaturirale zavojnicu DNA, moraju biti prisutne u velikim koncentracijama, jer je potrebno ostvariti prednost natječući se za vodikove veze s bazama drugog lanca DNA.

Nekovalentno vezanje malih molekula na dvolančane polinukleotide uzrokuje promjene u termičkoj stabilnosti polinukleotida, tj. u njihovim temperaturama mekšanja. Vezanje malih molekula na dvolančane polinukleotide može dovesti do stabilizacije (pozitivna vrijednost  $\Delta T_m$ ) ili do destabilizacije (negativna vrijednost  $\Delta T_m$ ) dvolančanog polinukleotida. Interkalativni način vezanja stabilizira dvostruku uzvojnica, dok spojevi koje se vežu u utore mogu dati pozitivne ili negativne  $\Delta T_m$  vrijednosti.<sup>23</sup>

### 2.3.3. Fluorescencijska spektroskopija

Fluorescencijska spektroskopija ili fluorimetrija je spektroskopska metoda koja analizira fluorescenciju analita u uzorku. Elektroni u molekuli se pobuđuju zračenjem (najčešće UV) te se prati emisija zračenja nakon pobude (obično u vidljivom dijelu spektra). Fluorimetrija je komplementarna metoda UV/Vis spektroskopiji. U fluorescencijskoj spektroskopiji kemijska vrsta se apsorbicijom fotona pobuđuje iz svojeg osnovnog elektronskog stanja u različita vibracijska stanja pobuđenog elektronskog stanja. Sudarima s drugim molekulama molekula gubi vibracijsku energiju dok ne dosegne najniže vibracijsko stanje unutar pobuđenog elektronskog stanja. Ovi procesi prikazani su u dijagramu po Jablonskom (slika 12).<sup>30</sup>



Slika 12. Dijagram Jablonskog. Radijativni prijelazi su prikazani plavim strelicama, a neradijativni prijelazi crvenim strelicama.<sup>30</sup>

Struktura većine molekula omogućava vibracijsku relaksaciju i unutarnju pretvorbu tijekom kojih pobuđene molekule pri povratku u osnovno stanje gube energiju bez emisije zračenja. Deaktivacijski proces u kojem pri prijelazu između stanja istog multipliciteta molekula emitira zračenje naziva se fluorescencija, dok pri prijelazu iz tripletnog pobuđenog stanja u osnovno stanje govorimo o fosforescenciji. Učestalost unutarnje pretvorbe razlog je što se fluorescencija javlja pri samo jednoj valnoj duljini, odnosno samo iz prvog pobuđenog elektronskog stanja, neovisno o valnoj duljini pobude. Zbog pojave zvane Stokesov pomak, sve vrpce emisijskog zračenja imat će nešto veću valnu duljinu i manju energiju od pobudnih vrpca.<sup>30</sup> Fluorescencijska spektroskopija koristi se u biokemijskim, medicinskim i kemijskim istraživanjima. Primjenu ove metode ograničava činjenica da istraživana molekula mora fluorescirati. Međutim, kada je primjenjiva, ova metoda je veoma osjetljiva.

Jedna od eksperimentalnih metoda koja se koristi kako bi se provjerilo veže li se spoj na polinukleotid je fluorimetrijska titracija. Ovaj se eksperiment može provoditi samo ako barem jedan od reaktanta ima fluorescencijski spektar u eksperimentalnim uvjetima. Vezanje molekule na polinukleotid može dovesti do porasta kao i do gašenja fluorescencije. U slobodnoj maloj molekuli cijanina moguća je rotacija te se procesom vibracijske relaksacije gubi apsorbirana energija, a posljedica toga je mali ili nikakav intenzitet fluorescencije. Vezanjem na polinukleotid dolazi do strukturnih promjena koje zakoče rotaciju i ukrute strukturu što značajno povećava intenzitet fluorescencije.<sup>32</sup>

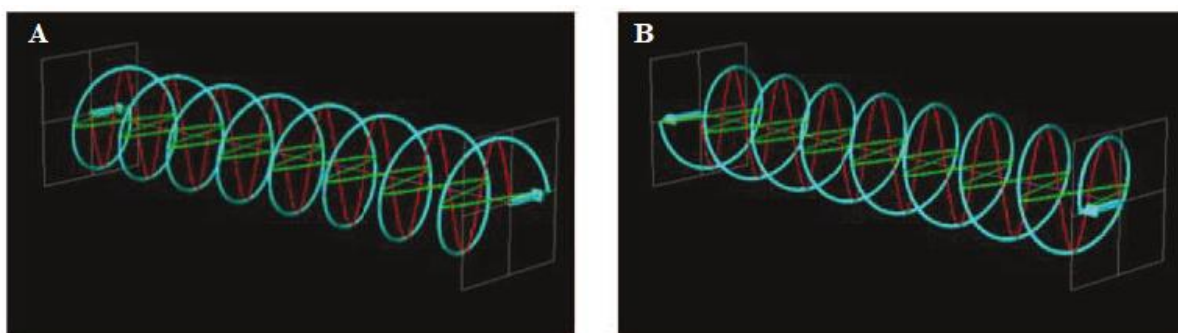
Podatci dobiveni iz fluorometrijskih titracija koriste se za izračunavanje konstanti stabilnosti spojeva te za određivanje gustoće vezanja spoja, odnosno omjera koncentracije vezanog spoja i koncentracije polinukleotida. Kako bi se mogla izračunati konstanta stabilnosti, vezanje spoja na polinukleotid mora biti ravnotežno te spektroskopske promjene moraju biti dovoljno velike.<sup>23</sup> Za računanje konstanti stabilnosti koristi se Scatchardova jednadžba.<sup>33,34</sup>

#### 2.3.4. Cirkularni dikroizam

Cirkularni dikroizam je spektroskopska metoda koja otkriva informacije o kiralnosti molekule. Daje podatke o kiralnim vrstama u otopini koje apsorbiraju zračenje u UV/Vis području tijekom prijelaza iz osnovnog u jedno ili više pobuđenih stanja. CD se oslanja na razliku u apsorpciji između lijeve i desne kružno polarizirane svjetlosti.<sup>35</sup>

Ravninski polarizirano zračenje je ona vrsta zračenja kod kojeg se elektromagnetski valovi šire u samo jednoj ravnini. Pojava nesimetričnog titranja električnog i magnetskog polja

koje tijekom širenja čine zračenje naziva se polarizacija zračenja. Zračenje može biti linearno i cirkularno polarizirano. Ako električno polje konstantno titra u istoj ravnini radi se o linearno polariziranom zračenju, dok se kod cirkularno polariziranog zračenja ravnina titranja električnog polja jednoliko vrti. Ovisno o tome okreće li se ravnina titranja električnog polja u smjeru kazaljke na satu ili u suprotnom smjeru, razlikujemo lijevo i desno polarizirano zračenje (slika 13). Takvo zračenje je kiralno pa će i kiralne molekule različito apsorbirati lijevo i desno cirkularno polarizirano zračenje.<sup>35</sup>



Slika 13. U CD spektroskopiji: A) lijevo, cirkularno polarizirano zračenje; B) desno, cirkularno polarizirano zračenje.<sup>36</sup>

Nukleinske kiseline, kao i mnoge druge biološke molekule su kiralne i kromoforne. Jedna od najčešće korištenih metoda u karakterizaciji sekundarne strukture DNA i RNA je spektroskopija cirkularnog dikroizma. Budući da su polinukleotidi najčešće desne zavojnice, promjene njihove konformacije mogu se pratiti na ovaj način.<sup>35</sup>

Spektar cirkularnog dikroizma prikazuje se kao funkcija molarne eliptičnosti [mdeg] u ovisnosti o valnoj duljini. Na određenoj valnoj duljini postoji razlika između apsorpcije lijevo i desno cirkularno polariziranog zračenja:

$$\Delta A = A_L - A_D$$

Primjermom Beer-Lambertovog zakona dobije se sljedeći izraz:

$$\Delta A = (\varepsilon_L - \varepsilon_D)cl$$

gdje su  $\varepsilon_L$  i  $\varepsilon_D$  molarni apsorpcijski koeficijenti za lijevo, odnosno desno cirkularno polarizirano zračenje,  $c$  je molarna koncentracija, a  $l$  je duljina optičkog puta.

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_D$$

$\Delta\varepsilon$  je molarni cirkularni dikroizam. Ukoliko se na  $\Delta\varepsilon$  primijeni koncentracijski korektivni faktor, dobije se molarna eliptičnost koja se prikazuje u stupnjevima.

Simetrične molekule nemaju CD spektar jer jednako apsorbiraju i lijevo i desno polariziranu svjetlost. Kiralne molekule imaju CD signal u području u kojem se javlja njihova apsorpcijska vrpca. Iako akiralne molekule nemaju svoj CD signal, vezanjem na polinukleotid može doći do stvaranja induciranog signala cirkularnog dikroizma (ICD). Uočeno je da se ICD signali javljaju pri valnim duljinama apsorpcijskih maksimuma kromofora male molekule.<sup>37</sup>

Prilikom CD titracija polinukleotida s malim molekulama prate se promjene CD spektra polinukleotida u rasponu valnih duljina od 200 do 300 nm, gdje apsorbiraju DNA i RNA, te promjene u spektrima na valnim duljinama iznad 300 nm, gdje se pojavljuje CD spektar malih molekula ukoliko su molekule kiralne, te eventualni ICD spektar nekiralnih malih molekula. Promjene koje se događaju između 200 i 300 nm povezuju se sa specifičnim promjenama u sekundarnoj strukturi polinukleotida, što je posljedica kiralnosti fosfatno-šećerne okosnice.<sup>38</sup> Kod promjena CD spektra iznad 300 nm interpretacija rezultata je jednostavnija jer u tom području ne apsorbiraju DNA i RNA, te se samo prate promjene spektra male molekule.<sup>35</sup>

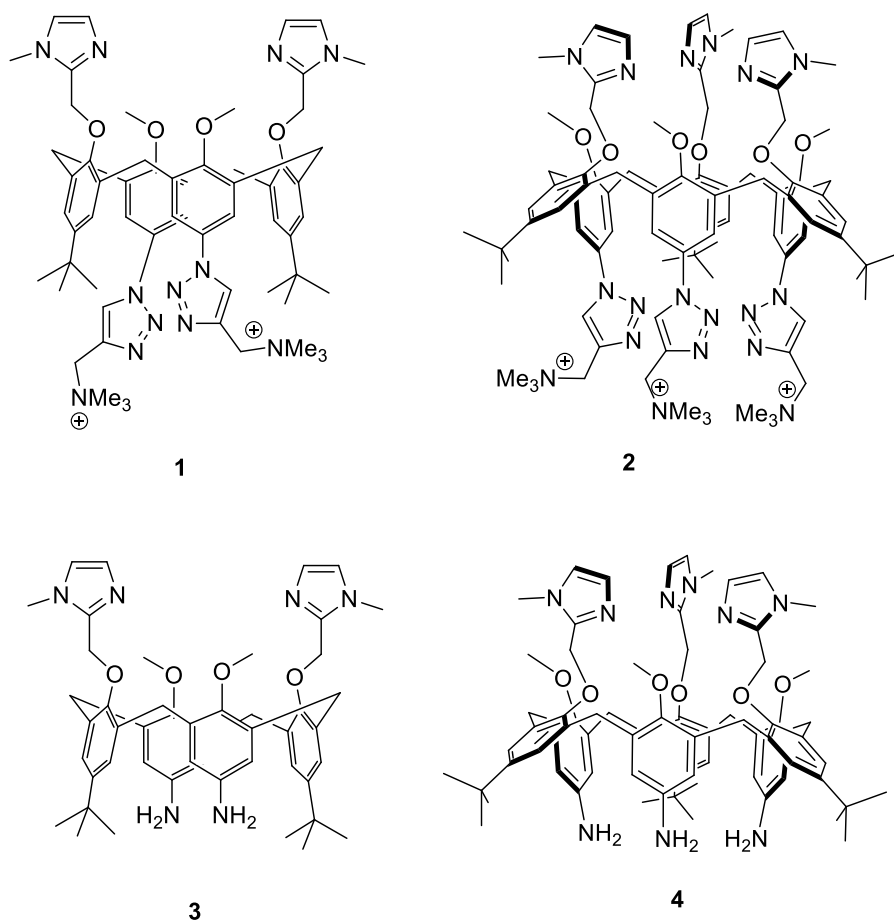
Prema jačini ICD signala može se zaključiti o kojem tipu interakcije spoja i polinukleotida se radi. Slabi negativni ili pozitivni ICD signali upućuju na interkaliranje, dok jači ICD signali upućuju da se spoj vezao u mali utor polinukleotida.<sup>35</sup> Ovisno o predznaku ICD signala, može se zaključiti koja je orijentacija male molekule. Nadalje, tzv. bisignatni signali (pozitivni i negativni signal) obično upućuju na vezanje dimera spoja u utor polinukleotida.<sup>35</sup>

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Kemikalije

Spojevi: 11,23-di-*tert*-butil-26,28-dimetoksi-25,27-di-[(1-metilimidazol-2-il)metoksi]-5,17-di-[4-(*N,N,N*-trimetilaminometil)-1,2,3-triazol-1-il]kaliks[4]aren (**1**),<sup>8</sup> 11,23,34-tri-*tert*-butil-37,39,41-trimetoksi-36,38,40-di-[(1-metilimidazol-2-il)metoksi]-5,17,28-tri-[4-(*N,N,N*-trimetilaminometil)-1,2,3-triazol-1-il]kaliks[6]aren (**2**),<sup>9</sup> 5,17-diamino-11,23-di-*tert*-butil-26,28-dimetoksi-25,27-di-[(1-metilimidazol-2-il)metoksi]kaliks[4]aren (**3**),<sup>8</sup> 5,17,28-triamino-11,23,34-tri-*tert*-butil-37,39,41-trimetoksi-36,38,40-tri-[(1-metilimidazol-2-il)metoksi]kaliks[6]aren (**4**).<sup>9</sup> Spojevi su sintetizirani u grupi koju vodi dr. sc. O. Reinaud (*Laboratoire de Chimie, Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques, Université Paris Descartes*). Strukturne formule spojeva prikazane su na slici 14.



Slika 14. Strukture spojeva korištenih u radu.<sup>8,9</sup>

Spojevi su otopljeni u dimetil-sulfoksidu (DMSO) uz primjenu ultrazvučne kupelji te su koncentracije pripremljenih otopina spojeva iznosile  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Sve otopine spojeva pohranjene su pri temperaturi od  $8 \text{ }^\circ\text{C}$  i stabilne su tijekom nekoliko tjedana.

Sva mjerenja provedena su u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ). Korišteni polinukleotidi (*calf thymus* DNA, poli A – poli U, poli dA – poli dT, poli dAdT – poli dAdT i poli dGdC – poli dGdC) otopljeni su prema uputi proizvođača (Sigma Aldrich, SAD) u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ). Koncentracija polinukleotida (izražena po nukleobazi/fosfatu) određena je spektrofotometrijskim mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini te izračunom pomoću molarnog ekstinkcijskog koeficijenta definiranim od proizvođača (tablica 1). Otopine polinukleotida pohranjene su pri temperaturi od  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  te su u takvim uvjetima stabilne nekoliko mjeseci.

Tablica 1. Molarni apsorpcijski koeficijenti za različite polinukleotide pri maksimalnim valnim duljinama apsorpcije (po uputama proizvođača).

polinukleotid	$\varepsilon / \text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$
<i>ct</i> -DNA	6600 ( $\lambda_{\text{maks}} = 260 \text{ nm}$ )
poli dAdT – poli dAdT	6600 ( $\lambda_{\text{maks}} = 262 \text{ nm}$ )
poli dGdC – poli dGdC	8400 ( $\lambda_{\text{maks}} = 254 \text{ nm}$ )
poli A – poli U	6000 ( $\lambda_{\text{maks}} = 260 \text{ nm}$ )
poli dA – poli dT	6000 ( $\lambda_{\text{maks}} = 260 \text{ nm}$ )

Tablica 2. Šrina i dubina utora različitih polinukleotida.<sup>39,40</sup>

polinukleotid	širina utora / Å		dubina utora / Å	
	veliki utor	mali utor	veliki utor	mali utor
poli A – poli U	3,8	10,9	-	-
<i>ct</i> -DNA	11,7	5,7	8,5	7,5
poli dGdC – poli dGdC	13,5	9,5	10,0	7,2
poli dAdT – poli dAdT	11,2	6,3	-	-
poli dA – poli dT	11,4	3,3	-	-

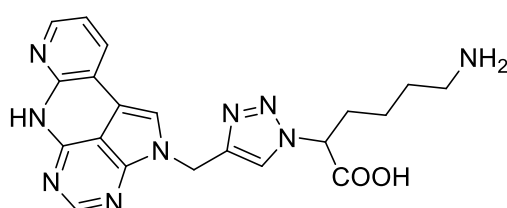
Korišteni nukleozid-5'-monofosfati (Sigma Aldrich, SAD): adenzin-5'-monofosfat (AMP), gvanozin-5'-monofosfat (GMP), citidin-5'-monofosfat (CMP) i uridin-5'-monofosfat (UMP),



otopljeni su u redestiliranoj vodi uz korištenje ultrazvučne kupelji te su koncentracije pripremljenih otopina iznosile  $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ . Otopine mononukleotida pohranjene su pri temperaturi od  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  te su u takvim uvjetima stabilne nekoliko mjeseci. Također, otopina fluorescentnog analoga adenina (D8-111TFA, slika 15),<sup>41</sup> koji je ranije priređen reakcijom „CuAAC-klik“ adenina s  $\alpha$ -amino skupinom lizina pripremljena je u DMSO-u te je koncentracija pripremljene otopine iznosila  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .

Bakrov(I) jodid (Sigma Aldrich, SAD) otopljen je u redestiliranoj vodi uz korištenje ultrazvučne kupelji. Koncentracija pripremljene otopine iznosila je  $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  te je pohranjena pri temperaturi od  $8 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Otopine etidijevog bromida (EtBr) i 4',6-diamidino-2-fenilindola (DAPI)<sup>42</sup> pripremljene su u DMSO-u. Koncentracija pripremljene otopine etidijevog bromida iznosila je  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  te je pohranjena pri temperaturi od  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Koncentracija pripremljene otopine DAPI-a iznosila je  $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  te je pohranjena pri temperaturi od  $8 \text{ }^\circ\text{C}$ .



Slika 15. Struktura fluorescentnog analoga adenina D8-111TFA

### 3.1.2. Instrumentacija

Za UV/Vis apsorpcijska mjerenja korišten je UV/Vis spektrometar Varian/Agilent Cary 100 Bio (Agilent Technologies, SAD). Korištene su kvarcne kivete duljine optičkog puta od 1 cm.

Fluorimetrijske titracije izvedene su na fluorimetrima Agilent Cary Eclipse (Agilent Technologies, SAD) i FS5 (Edinburgh Instruments, UK). Korištene su kvarcne kivete duljine optičkog puta od 1 cm.

Mjerenja cirkularnog dikroizma provedena su pomoću CD spektrometra JASCO J-815. Brzina snimanja spektra iznosila je  $200 \text{ nm min}^{-1}$ . Korištene su kvarcne kivete duljine optičkog puta od 1 cm.

Sva mjerenja provedena su u programu *Scan*, dok su svi eksperimentalni podaci obrađeni korištenjem programa *OriginPro 7.5*.

### 3.2. Spektrofotometrijska karakterizacija otopina ispitivanih spojeva

Pomoću UV/Vis spektara određeni su baždarni pravci te su iz njih izračunati molarni ekstincijski koeficijenti ispitivanih spojeva. U kvarcnu kivetu pipetiran je 1 mL pufera natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) te je snimljen apsorpcijski spektar pufera, odnosno bazna linija. Potom su dodani alikvoti otopine ispitivanog spoja. Mjerenja su provedena u rasponu valnih duljina od 200 do 650 nm, pri temperaturi od 25 °C, te u koncentracijskom području spojeva od  $5 \times 10^{-6}$  do  $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  u slučaju spojeva **1** i **2**, odnosno od  $2,5 \times 10^{-6}$  do  $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  u slučaju spojeva **3** i **4**.

Za određivanje ovisnosti apsorpcije ispitivanih spojeva o promjeni temperature, snimljeni su UV/Vis spektri spoja koncentracije  $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  u temperaturnom rasponu od 25 do 95 °C ( $\Delta T = 5 \text{ °C}$ ). Nakon hlađenja otopine ponovno je snimljen UV/Vis spektar pri 25 °C.

Prilikom ispitivanja fluorescencije spojeva u kvarcnu kivetu pipetirano je 1,5 mL pufera natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) te je snimljen spektar pufera (radi utvrđivanja položaja i intenziteta signala raspršenog zračenja). Potom su dodani alikvoti spoja u koncentracijskom rasponu od  $5 \times 10^{-7}$  do  $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Uzorak je pobuđen zračenjem valne duljine maksimuma apsorpcije očitano iz prethodno snimljenog UV/Vis spektra te je u slučaju sva četiri ispitivana spoja valna duljina pobude iznosila 300 nm. Emisijski spektar snimljen je u rasponu od 320 do 600 nm pri odgovarajućim širinama ulazne i izlazne pukotine. Potom je snimljen pobudni spektar ispitivanog spoja pri valnoj duljini očitano emisijeskog maksimuma. Također, istražena je ovisnost fluorescencije spoja **2** o temperaturi. Ispitivanje je provedeno snimanjem emisijskih spektara spoja **2** koncentracije  $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  u temperaturnom rasponu od 25 do 95 °C ( $\Delta T = 5 \text{ °C}$ ). Nakon hlađenja otopine ponovno je snimljen emisijski spektar pri 25 °C.

Provedene su fluorimetrijske titracije s bakrovim(I) ionima kako bi se provjerila promjena fluorescencije spojeva **1** i **2** prilikom kompleksiranja, odnosno kako bi se provjerilo je li fluorescencijska spektroskopija dobra metoda za praćenje kompleksiranja. U kvarcnu kivetu pipetirano je 1,5 mL redestilirane vode te je snimljen spektar pri valnoj duljini pobude od 300 nm. Potom je dodana otopina spoja kako bi koncentracija spoja u kiveti iznosila  $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Zatim su postepeno dodani alikvoti otopine Cu(I) pri čemu je početna koncentracija metalnog iona u otopini iznosila  $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ .

### 3.3. Ispitivanje interakcija spojeva s polinukleotidima

#### 3.3.1. Metoda istiskivanja etidijevog bromida

Interakcije spojeva s polinukleotidima ispitivane su metodom istiskivanja etidijevog bromida iz kompleksa s polinukleotidom. U kvarcnu kivetu pipetirano je 1,5 mL pufera natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) te je snimljen spektar pufera pri valnoj duljini pobude od 520 nm i odgovarajućim širinama ulazne i izlazne pukotine. Potom je dodana otopina etidijevog bromida kako bi koncentracija etidijevog bromida u kiveti iznosila  $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  te je snimljen emisijski spektar. Nakon toga, dodana je otopina odgovarajućeg polinukleotida kako bi koncentracija istog u kiveti iznosila  $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  te je snimljen emisijski spektar. Potom su postepeno dodavani alikvoti ispitivanog spoja kako bi omjer koncentracije etidijevog bromida i ispitivanog spoja ( $r = [\text{etidijev bromid}]/[\text{spoj}]$ ) u kiveti bio u rasponu od 1 do 0,1. Emisijski spektri snimljeni su u rasponu valnih duljina od 500 do 700 nm. Također, vrijeme inkubacije iznosilo je 1 minutu. Od očitanih intenziteta emisije se oduzme početni intenzitet etidijevog bromida (bez dodane DNA). Tako dobivene vrijednosti emisije proporcionalne su postotku etidijevog bromida vezanog na DNA, koji se postepeno smanjuje s dodatkom ispitivanog spoja. Pri padu intenziteta emisije etidijevog bromida na pola početne vrijednosti (početni spektar EtBr/DNA kompleksa) smatra se kako je polovica EtBr istisnuta iz DNA zbog kompeticije s ispitivanim spojem te se taj omjer  $r = [\text{EtBr}]/[\text{spoj}]$  definira kao  $IC_{50}$ .

#### 3.3.2. Pokusi cirkularnog dikroizma (CD)

CD spektri spojeva s odgovarajućim polinukleotidima snimljeni su pri sobnoj temperaturi. Sva mjerenja su odrađena u puferu natrijevog kakodilata (pH = 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) s početnom koncentracijom polinukleotida od  $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Najprije je u kivetu pipetirano 1,5 mL pufera, a potom je snimljen CD spektar otopine polinukleotida. Zatim su snimani spektri kompleksa polinukleotida s ispitivanim spojevima na način da su ispitivani spojevi dodani u omjerima  $r = [\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}] = 0,1, 0,3 \text{ i } 0,5$ . Svi snimljeni CD spektri su korigirani oduzimanjem CD spektra pufera.

Također, provedena je i metoda istiskivanja DAPI-a<sup>42</sup> iz kompleksa s polinukleotidom poli dAdT – poli dAdT pomoću spojeva **1** i **2**. U kvarcnu kivetu je pipetirano 1,5 mL pufera natrijeva kakodilata (pH = 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) te je snimljen CD spektar polinukleotida poli dAdT – poli dAdT koncentracije  $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Potom je dodana otopina DAPI-a tako da je omjer DAPI-a i polinukleotida u kiveti iznosio 0,6. Nakon toga, postepeno su dodani alikvoti

otopina spojeva u omjerima  $r = [\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}] = 0,2, 0,4, 0,8, 1,6$  i  $3,2$ . Svi snimljeni CD spektri su korigirani oduzimanjem CD spektra pufera.

### 3.3.3. Temperaturno mekšanje dvolančanih DNA i RNA

Metodom temperaturnog mekšanja ispitivan je utjecaj spojeva na stabilizaciju dvolančane uzvojnice sljedećih polinukleotida uslijed povišenja temperature: *ct*-DNA, poli dAdT – poli dAdT, poli A – poli U te poli dA – poli dT.

Pri određivanju temperature mekšanja najprije je u svaku kivetu pipetiran 1 mL pufera natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) te je očitana apsorbancija pufera pri odgovarajućoj valnoj duljini. Dobiveni rezultati se koriste kao nulte vrijednosti otopina, a potom se u svaku od kiveta pipetira prethodno izračunati alikvot otopine polinukleotida tako da koncentracija polinukleotida u kiveti iznosi  $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . U istom programu, očita se apsorbancija pufera s polinukleotidom te se dobivene vrijednosti unesu u program *OriginPro 7.5*, čime se izračunaju potrebni alikvoti spojeva. Sva su mjerenja odrađena za dva uzorka pripremljena na potpuno isti način, pri čemu je za par kiveta s otopinama polinukleotida bez spojeva određena referentna vrijednost  $T_m$ . U svakom sljedećem paru kiveta, dodani su ispitivani spojevi u omjeru  $r = [\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}] = 0,3$ . Potom je mjerena temperatura mekšanja pomoću programa *Thermal* tako da je cijeli set do maksimalno 12 kiveta (6 parova) postupno zagrijavan od 25 do 95 °C brzinom od 1 °C/min uz očitavanje vrijednosti apsorbancije pri određenoj maksimalnoj valnoj duljini svakih 0,5 °C.

Rezultati su prikazani grafički kao krivulje ovisnosti apsorbancije pri određenoj valnoj duljini (obično 260 nm) o temperaturi. Dobivene sigmoidalne krivulje posjeduju točku infleksije koja upravo odgovara vrijednosti temperature mekšanja ( $T_m$ ). Vrijednosti  $T_m$  određene su prvom derivacijom krivulje (iz točke infleksije). Vrijednosti  $\Delta T_m$  izračunate su pomoću sljedeće formule:

$$\Delta T_m = T_{m,nk} - T_{m,komp}$$

gdje je  $T_{m,nk}$  temperatura mekšanja slobodnog polinukleotida, a  $T_{m,komp}$  temperatura mekšanja kompleksa polinukleotida i ispitivanog spoja. Svaka vrijednost  $\Delta T_m$  je prosjek dvaju mjerenja, a pogreška mjerenja iznosi  $\pm 0,5$  °C.

### 3.4. Ispitivanje interakcija spojeva s nukleotidima

#### 3.4.1. Ispitivanje interakcija spojeva s nukleobazom D8-111TFA

Interakcije spojeva **1** i **2** s fluorescentnom nukleobazom D8-111TFA<sup>41</sup> ispitivane su fluorimetrijskim titracijama. Mjerenja su provedena u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ). Najprije je u kivetu pipetirano 1,5 mL pufera te je snimljen emisijski spektar pufera (bazna linija) pri valnoj duljini pobude od 350 nm.<sup>41</sup> Potom je u kivetu pipetirana otopina D8-111TFA tako da je koncentracija nukleobaze u kiveti iznosila  $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  te je snimljen emisijski spektar. Zatim su postepeno dodavani alikvoti odgovarajućeg spoja pri čemu je početna koncentracija spoja u kiveti iznosila  $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Vrijeme inkubacije bilo je 1 minutu, a spektri su snimani u rasponu valnih duljina od 370 do 600 nm. Dobiveni podaci obrađeni su u programu *OriginPro 7.5* nelinearnom regresijom pomoću eksponencijalne jednadžbe 1. reda, čime je određena konstanta stabilnosti kompleksa.

Također, provedena je metoda istiskivanja nukleobaze D8-111TFA iz kompleksa sa spojem **2** pomoću polinukleotida poli A. Mjerenja su provedena u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ). Najprije je u kivetu pipetirano 1,5 mL pufera te je snimljen emisijski spektar pufera (bazna linija) pri valnoj duljini pobude od 350 nm. Potom je u kivetu pipetirana otopina nukleobaze tako da koncentracija D8-111TFA u kiveti iznosi  $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  te je snimljen emisijski spektar. Nadalje, u kivetu je pipetirana otopina spoja **2** tako da koncentracija spoja u kiveti iznosi  $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  te je snimljen emisijski spektar. Zatim su postepeno dodani alikvoti polinukleotida poli A u koncentracijskom rasponu od  $5 \times 10^{-6}$  do  $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Vrijeme inkubacije iznosilo je 1 minutu, a spektri su snimani u rasponu valnih duljina od 370 do 600 nm.

#### 3.4.2. Ispitivanje interakcija spojeva s nukleozid-monofosfatima

Interakcije spojeva **1** i **2** s nukleozid-monofosfatima AMP, GMP, CMP i UMP ispitivane su fluorimetrijskim titracijama korištenjem instrumenta Agilent Cary Eclipse (Agilent Technologies, SAD) i programa *Scan*. Mjerenja su provedena u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ). Najprije je u kivetu pipetirano 1,5 mL pufera te je snimljen emisijski spektar pufera (bazna linija) pri valnoj duljini pobude od 300 nm. Potom je u kivetu pipetirana otopina ispitivanog spoja tako da je koncentracija spoja u kiveti iznosila  $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  te je snimljen emisijski spektar. Zatim su postepeno dodavani alikvoti odgovarajućeg nukleotida pri čemu je početna koncentracija nukleotida u kiveti iznosila  $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  u slučaju nukleotida

AMP i GMP, odnosno  $1 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> u slučaju nukleotida CMP i UMP. Vrijeme inkubacije iznosilo je 1 minutu, a emisijski spektri su snimani u rasponu valnih duljina od 320 do 550 nm. Dobiveni podaci obrađeni su u programu *OriginPro 7.5* nelinearnom regresijom pomoću eksponencijalne jednadžbe 1. reda, čime je određena konstanta stabilnosti kompleksa.

Interakcije spojeva **3** i **4** s nukleozid-monofosfatima AMP, GMP, CMP i UMP ispitivane su fluorimetrijskoim titracijama korištenjem instrumenta FS5 Fluorescence Spectrometer (Edinburgh Instruments, UK) i programa *Fluoracle*. Mjerenja su provedena u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05$  mol L<sup>-1</sup>). Najprije je u kivetu pipetirano 2 mL pufera i otopina ispitivanog spoja tako da je koncentracija spoja u kiveti iznosila  $2 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> te je snimljen spektar pri valnoj duljini pobude od 300 nm. Zatim su postepeno dodavani alikvoti odgovarajućeg nukleotida pri čemu je početna koncentracija nukleotida u kiveti iznosila  $2 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>. Vrijeme inkubacije bilo je 1 minutu, a spektri su snimani u rasponu valnih duljina od 320 do 550 nm. Dobiveni podaci obrađeni su u programu *OriginPro 7.5* nelinearnom regresijom pomoću eksponencijalne jednadžbe 1. reda, čime je određena konstanta stabilnosti kompleksa.

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

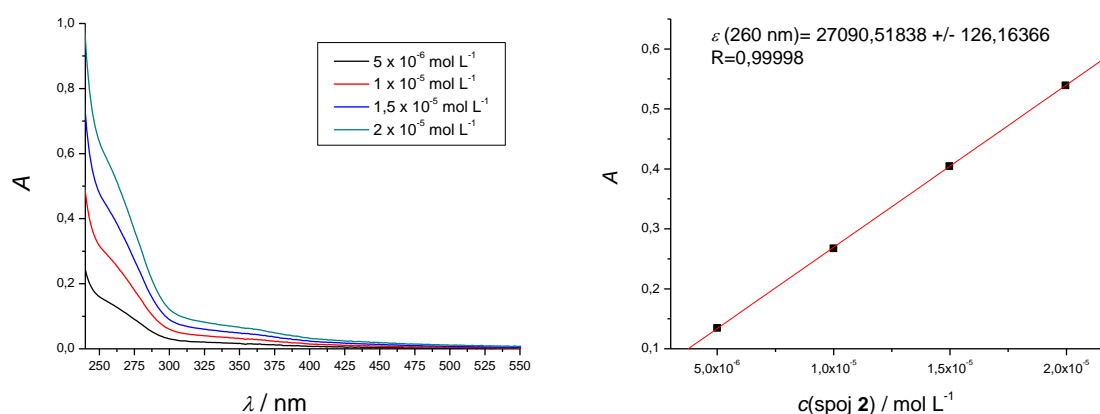
### 4.1. Spektrofotometrijska karakterizacija ispitivanih spojeva

#### 4.1.1. UV/Vis spektroskopija

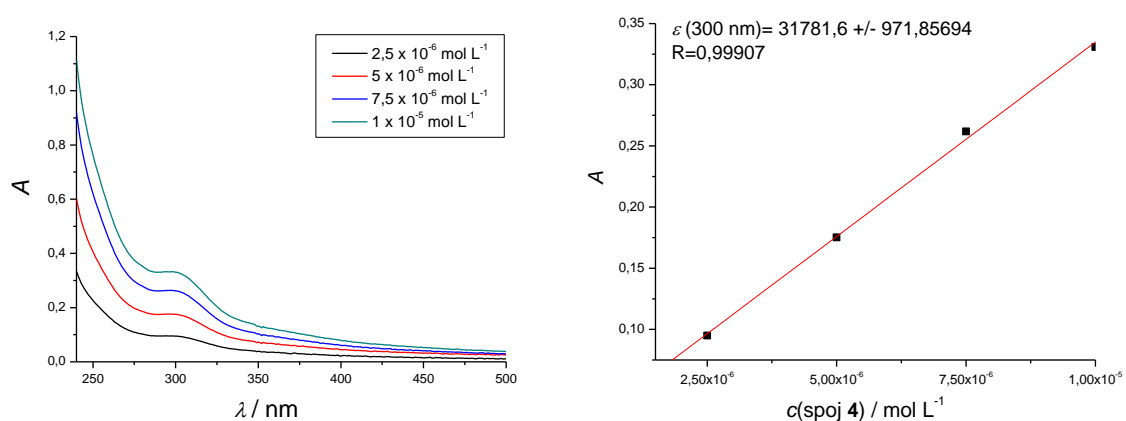
U sklopu spektrofotometrijske karakterizacije spojeva **1**, **2**, **3** i **4** pripremljene su ishodne otopine spojeva u DMSO-u koncentracije  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  te su snimljeni njihovi UV/Vis spektri u vodenom mediju, dodavanjem malih alikvota ishodnih otopina, pri čemu je  $\varphi(\text{DMSO}) < 1\%$ . Spektri su snimljeni prema opisu u poglavlju 3.2.

U slučaju spojeva **1** i **2** apsorpcija zračenja linearno se povećava s povećanjem koncentracije spoja u koncentracijskom rasponu od  $5 \times 10^{-6}$  do  $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , što odgovara Beer-Lambertovom zakonu (slika 16). U slučaju spojeva **3** i **4**, pri istim uvjetima, značajno se podiže bazna linija u području valnih duljina većem od 500 nm (gdje spojevi ne apsorbiraju zračenje) s povećanjem koncentracije spojeva, što pak sugerira nastanak koloida u kiveti (*dodatak*, slika D2). Upravo su zbog toga snimljeni UV/Vis spektri spojeva **3** i **4** u koncentracijskom rasponu  $2,5 \times 10^{-6}$  do  $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  u kojem nije opažen isti fenomen, a linearno povećanje apsorbancije s povećanjem koncentracije spojeva **3** i **4** odgovara Beer-Lambertovom zakonu (slika 17).

Svi spojevi imaju maksimum apsorpcije u ultraljubičastom dijelu spektra, kako je i očekivano za kaliksarenske strukture,<sup>8,9</sup> za koje su određeni molarni ekstincijski koeficijenti dani u tablici 3.



Slika 16. Lijevo: UV/Vis spektri spoja **2** u koncentracijskom rasponu od  $5 \times 10^{-6}$  do  $2 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> snimljeni u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05$  mol L<sup>-1</sup>) uz  $\varphi(\text{DMSO}) < 0,1\%$ ; Desno: Ovisnost apsorbancije o koncentraciji spoja **2** pri 260 nm.



Slika 17. Lijevo: UV/Vis spektri spoja **4** u koncentracijskom rasponu od  $2,5 \times 10^{-6}$  do  $1 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> snimljeni u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05$  mol L<sup>-1</sup>) uz  $\varphi(\text{DMSO}) < 0,1\%$ ; Desno: Ovisnost apsorbancije o koncentraciji spoja **4** pri 300 nm.

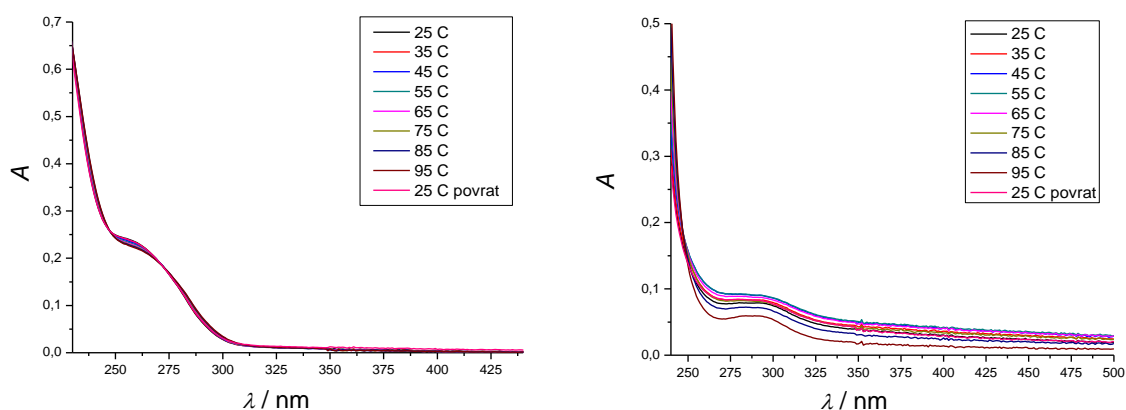
Tablica 3. Molarni ekstincijski koeficijenti ( $\varepsilon$ ) ispitivanih spojeva

spoj	$\lambda_{\text{maks}} / \text{nm}$	$\varepsilon / 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$
<b>1</b>	259	12,8 +/- 0,2
<b>2</b>	260	27,1 +/- 0,1
<b>3</b>	292	7,5 +/- 0,4
<b>4</b>	300	31,8 +/- 1,0



#### 4.1.2. Stabilnost vodenih otopina spojeva pri grijanju

Stabilnost vodenih otopina spojeva **1**, **2**, **3** i **4** pri zagrijavanju provjerena je na način kako je opisano u poglavlju 3.2. Na apsorpciju otopina spojeva **1**, **2** i **4** grijanje nema utjecaja, dok utječe na apsorpciju spoja **3** (slika 18). Zagrijavanjem otopine spoja **3** do temperature od 65 °C apsorpcija raste, dok zagrijavanje iznad temperature od 65 °C uzrokuje pad apsorpcije spoja **3**. Kontinuirano podizanje bazne linije u području valnih duljina većih od 400 nm sugerira natanak taloga ili koloida.



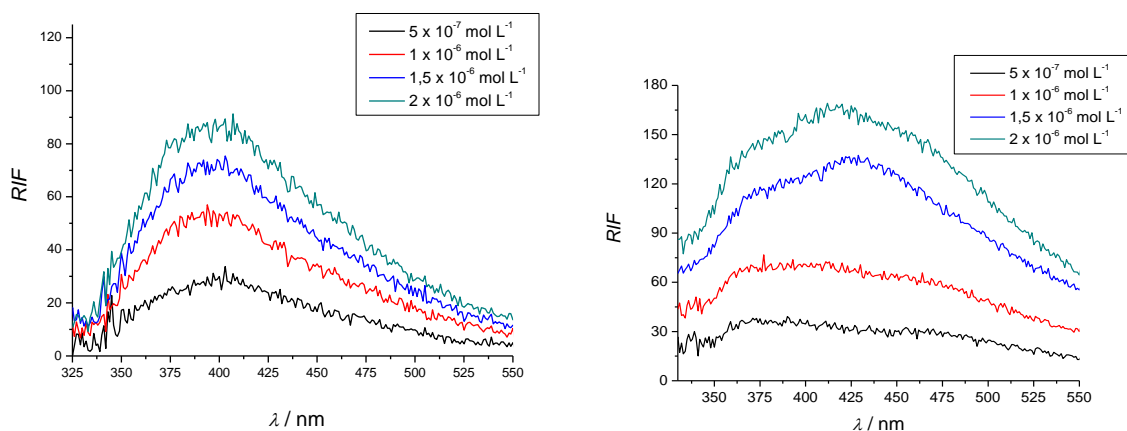
Slika 18. Utjecaj temperature na apsorpciju spoja **1** (lijevo;  $c = 2,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) i spoja **3** (desno;  $c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) u temperaturnom rasponu od 25 do 95 °C, uz  $\varphi(\text{DMSO}) < 0,1\%$ .

#### 4.1.3. Fluorescencija spojeva

Fluorescencija vodenih otopina ispitivanih spojeva provjerena je na način kako je opisano u poglavlju 3.2. Strukture ispitivanih spojeva prikazane su na slici 1. Struktura spojeva **1** i **2** sadržava 4-fenil-1,2,3-triazolni dio te pozitivne naboje. Spoj **1** posjeduje dva, a spoj **2** tri pozitivna naboja. U strukturi spojeva **3** i **4** izostaje pozitivan naboj i navedeni 1,2,3-triazolni dio, koji je zamijenjen amino skupinama.

Najprije je ispitana fluorescencija pozitivno nabijenih spojeva **1** i **2**. Iako sami spojevi ne fluoresciraju jako, pokazuju mjerljivu fluorescenciju kada se primjene maksimalne širine ulazne i izlazne pukotine instrumenta od 20,0 nm (slika 19). Maksimalna emisija spojeva pojavljuje se pri valnoj duljini od 400 nm. Literaturnim pretraživanjem, nađeno je da spoj, koji sadrži sličan fenil-1,2,3-triazolni dio, pokazuje maksimalnu emisiju pri sličnoj valnoj duljini od 430 nm.<sup>43</sup> To sugerira da je kromofor odgovoran za fluorescenciju spojeva **1** i **2** upravo 4-fenil-

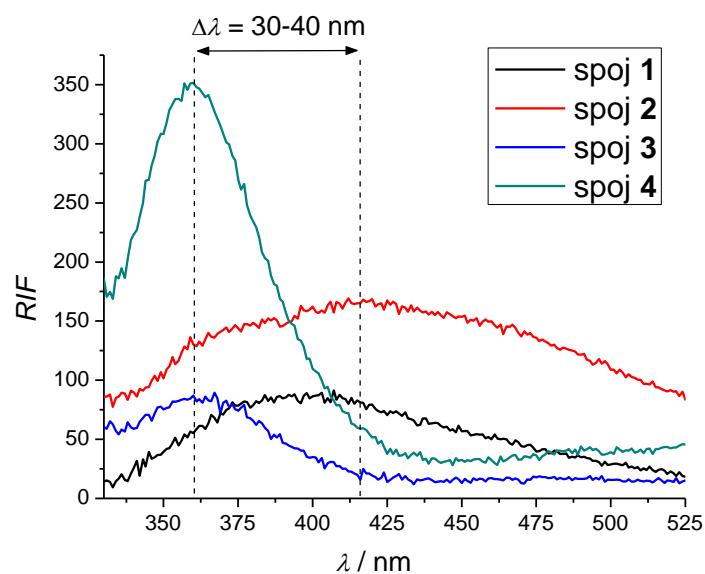
1,2,3-triazol. Također, uočeno je dobro slaganje pobudnog spektra i odgovarajućeg UV/Vis spektra, što ukazuje kako je kromofor UV spektra ujedno i fluorofor.



Slika 19. Spektri fluorescencije spoja **1** (lijevo) i **2** (desno) snimljeni u koncentracijskom rasponu od  $5 \times 10^{-7}$  do  $2 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup> u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05$  mol L<sup>-1</sup>) pri valnoj duljini pobude 300 nm.

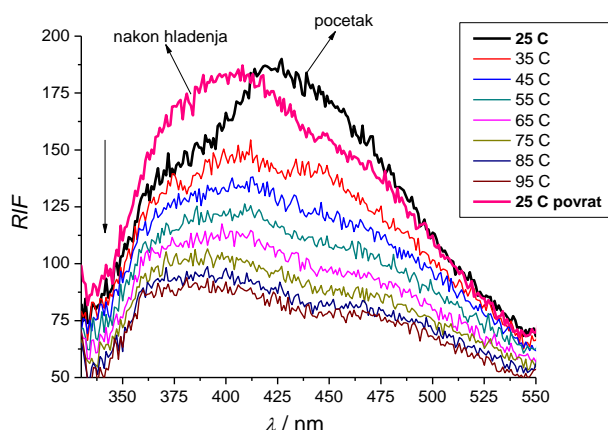
Potom je ispitana fluorescencija nenabijenih spojeva **3** i **4**. S obzirom da je u njihovoj strukturi kromofor (1,2,3-triazol) zamijenjen s amino skupinom, očekivalo se da će spojevi promijeniti fluorescentna svojstva. Primjećen je hipsokromni pomak maksimuma emisije (slika 20) spojeva **3** i **4** ( $\lambda_{\text{maks}} = 370$  nm) u usporedbi s pozitivno nabijenim analogima **1** i **2** ( $\lambda_{\text{maks}} = 400$  nm). Potrebno je napraviti detaljniju fotofizikalnu analizu ispitivanih spojeva, kako bi se detaljnije objasnila njihova fluorescencija.

Spoj **3**, isto kao i prethodno ispitani spojevi, pokazuje mjerljivu fluorescenciju pri maksimalnim širinama ulazne i izlazne pukotine od 20,0 nm (slika D5). Fluorescencija spoja **4** je intenzivnija od fluorescencije prethodno opisanih spojeva. Ipak, u spektrima spoja **4**, podiže se bazna linija pri višim koncentracijama spoja, što sugerira nastanak koloida u kiveti (slika D5). Također, snimljeni pobudni spektri vodenih otopina spojeva **3** i **4** pri valnoj duljini maksimuma emisije, podudaraju se s njihovim UV/Vis spektrima.



Slika 20. Usporedba valnih duljina maksimuma emisija spojeva **1**, **2**, **3** i **4**. Koncentracije spojeva iznose  $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ , osim koncentracije spoja **4** ( $c = 1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) zbog podizanja bazne linije spektra pri višim koncentracijama. Sva mjerenja su provedena u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) pri valnoj duljini pobude 300 nm.

Tijekom ovog dijela mjerenja, provjeren je i utjecaj temperature na fluorescenciju spoja **2** kako je opisano u poglavlju 3.2. Grijanje otopine uzrokuje smanjenje fluorescencije spoja **2**, no hlađenjem uzorka na prvotnu temperaturu od  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  emisija zračenja vraća se na početne vrijednosti prije grijanja (slika 21).



Slika 21. Temperaturna ovisnost fluorescencije spoja **2** ( $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) u temperaturnom rasponu od 25 do 95 °C, pri valnoj duljini pobude 300 nm.

Također, tijekom ovog dijela istraživanja napravljene su i fluorimetrijske titracije s ionima Cu(I) kako je opisano u poglavlju 3.2 u svrhu provjere promjene fluorescencije spojeva **1** i **2** prilikom kompleksiranja. Dodatak kationa uzrokovao je mjerljivi pad fluorescencije spojeva (slike D6 i D7), u skladu s rezultatima drugih metoda opisanim u radovima.<sup>8,9</sup>

## 4.2. Ispitivanje interakcija s polinukleotidima

Nakon spektrofotometrijske karakterizacije, ispitane su interakcije spojeva **1**, **2**, **3** i **4** s dvolančanim polinukleotidima. U tu svrhu korištene su metode istiskivanja etidijevog bromida, određivanja temperature mekšanja dvolančanih polinukleotida i CD spektroskopija.

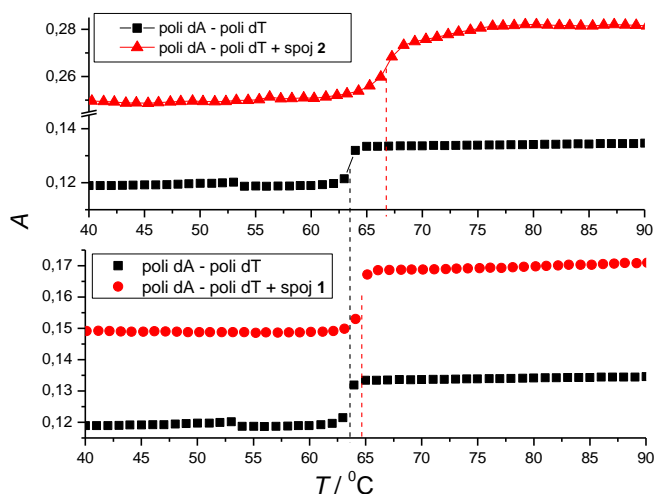
### 4.2.1. Temperatura mekšanja polinukleotida

Promjene temperature mekšanja dvolančanih polinukleotida *ct*-DNA, poli A – poli U, poli dAdT – poli dAdT (alternirajući polinukleotid) i poli dA – poli dT (homopolinukleotid) u interakciji sa spojevima **1**, **2**, **3** i **4** ispitane su kako je opisano u poglavlju 3.3.3. Temperatura mekšanja  $T_m$  je karakteristična temperatura pri kojoj je 50% DNA denaturirano, odnosno mjera je stabilnosti DNA te stabilnija DNA ima višu  $T_m$ . Temperature mekšanja određene su očitavanjem točki maksimuma prve derivacije sigmoidnih krivulja ovisnosti apsorbancije o temperaturi. Promjene temperature mekšanja prosjek su dvaju mjerenja i dane su u tablici 4.

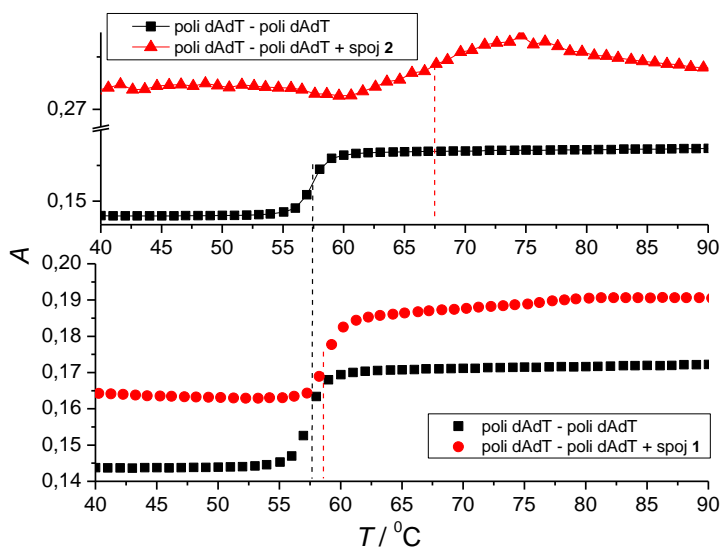
Niti jedan od ispitivanih spojeva nije utjecao na temperaturu mekšanja polinukleotida *ct*-DNA. Kationski spojevi **1** i **2** stabilizirali su RNA polinukleotid poli A – poli U za 1 °C, odnosno 2 °C, dok nenabijeni spojevi **3** i **4** nisu utjecali na stabilizaciju istog (slike D8–D11). Izostanak stabilizacije u slučaju spojeva **3** i **4** je očekivan, zbog toga što u njihovoj strukturi nema pozitivnog naboja (slika 14), čime je umanjeno broj veznih interakcija s DNA i RNA. Također, nenabijeni spojevi **3** i **4** nisu stabilizirali niti homopolinukleotid poli dA – poli dT niti alternirajući polinukleotid poli dAdT – poli dAdT (slike D12 i D13). Spojevi **1** i **2** stabilizirali su homopolinukleotid poli dA – poli dT za 1 °C, odnosno 3 °C (slika 22). Uočena je značajna stabilizacija alternirajućeg polinukleotida poli dAdT – poli dAdT, sa spojem **1** za 1 °C, te sa spojem **2** za 10 °C (slika 23).

Polinukleotidi poli dA – poli dT i poli dAdT – poli dAdT se uobičajeno koriste za ispitivanje vezanja molekula u mali utor DNA, koje u slučaju efikasnog vezanja uzrokuju značajnu stabilizaciju navedenih polinukleotida.<sup>44</sup> Razlika u širini malog utora poli dA – poli dT (3,3 Å) i poli dAdT – poli dAdT (6,3 Å) (tablica 2),<sup>45</sup> pogodna je mjera za ispitivanje idealne širine male molekule koja se umeće u mali utor. Posljedično, možemo zaključiti kako se veći spoj (**2**) bolje uklapa u mali utor poli dAdT – poli dAdT od manjeg (**1**), vjerojatno bolje popunjavajući raspoloživi prostor i time učinkovitije istiskujući molekule vode (hidrofobni efekt), a moguće i ostvarujući povoljnije van der Waalsove vezne kontakte. Mali utor poli dA – poli dT je očigledno preuzak za oba spoja te zahjeva steričku promjenu polinukleotida (odmatanje i proširenje), pa je konačna temperaturna stabilizacija je manja.

Stabilizacija dvolančane RNA (poli A – poli U) usporediva je s poli dA – poli dT, vjerojatno pošto je širina velikog utora RNA (uobičajenog veznog mjesta malih molekula) vrlo slična širini malog utora poli dA – poli dT. Odsustvo stabilizacije *ct*-DNA možemo pripisati 48% GC parova baza, gdje amino skupina gvanina u malom utoru sterički ometa vezanje malih molekula, te je time broj efikasno vezanih molekula nedovoljan da bi uzorokovao mjerljivu stabilizaciju dvolančanih DNA.



Slika 22. Krivulje temperature mekšanja polinukleotida poli dA – poli dT ( $c(\text{poli dA} - \text{poli dT}) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $r_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]} = 0,3$ ) snimljene u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) nakon dodatka spojeva **1** i **2**. Greška u vrijednostima  $\Delta T_m$  iznosi  $\pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Prve derivacije sigmoidnih krivulja ovisnosti apsorbancije o temperaturi prikazane su u Dodatku.



Slika 23. Krivulje temperature mekšanja polinukleotida poli dAdT – poli dAdT ( $c(\text{poli dAdT} - \text{poli dAdT}) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $r_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]} = 0,3$ ) snimljene u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) nakon dodatka spojeva **1** i **2**. Greška u vrijednostima  $\Delta T_m$  iznosi  $\pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Prve derivacije sigmoidnih krivulja ovisnosti apsorbancije o temperaturi prikazane su u Dodatku.

Tablica 4. Vrijednosti  $\Delta T_m$  (°C)<sup>a</sup> polinukleotida *ct*-DNA, poli A – poli U, poli dAdT – poli dAdT i poli dA – poli dT nakon dodatka spojeva **1**, **2**, **3** i **4** ( $r = 0,3$ )<sup>b</sup> pri pH 7,0 (pufer: natrijev kakovodilat,  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ),  $c(\text{polinukleotid}) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ .

Spoj	$\Delta T_m / ^\circ\text{C}$			
	<i>ct</i> -DNA	poli A – poli U	poli dAdT – poli dAdT	poli dA – poli dT
<b>1</b>	0	2	1	1
<b>2</b>	0	1	10	3
<b>3</b>	0	0	0	0
<b>4</b>	0	0	0	0

<sup>a</sup>Greška  $\Delta T_m = \pm 0,5$

<sup>b</sup> $r = [\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]$

#### 4.2.2. Metoda istiskivanja etidijevog bromida

Metodom istiskivanja etidijevog bromida iz kompleksa s određenim polinukleotidom, ispitane su interakcije spojeva **1**, **2**, **3** i **4** s dvolančanim polinukleotidima: *ct*-DNA, poli A – poli U, poli dAdT – poli dAdT te poli dGdC – poli dGdC. Metoda je provedena kako je opisano u poglavlju 3.3.1. Etidijev bromid tek po interkaliranju u DNA pokazuje intenzivnu fluorescenciju pri valnoj duljini od 520 nm.<sup>43,45</sup> Metoda se temelji na sposobnosti drugih molekula koje se nekovalentno vežu na dvolančanu DNA, da istisnu etidijev bromid iz kompleksa s DNA, pri čemu se emisija etidijevog bromida skoro u potpunosti gasi.<sup>46</sup> Rezultat metode prikazan je kao parametar  $IC_{50}$  koji predstavlja omjer koncentracije etidijevog bromida i koncentracije ispitivanog spoja u trenutku kada je 50% etidijevog bromida istisnuto iz kompleksa s polinukleotidom, odnosno predstavlja efikasnost vezanja ispitivanog spoja s polinukleotidom. Znači, veća vrijednost parametra  $IC_{50}$  predstavlja efikasnije vezanje spoja s polinukleotidom, odnosno veći afinitet spoja za polinukleotid te se može koristiti kao parametar relativne usporedbe afiniteta serije sličnih spojeva prema pojedinoj DNA ili RNA.

Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 5. Najprije se mogu usporediti rezultati spojeva koji posjeduju pozitivni naboj u svojoj strukturi. Spoj **1** u svojoj strukturi posjeduje dva pozitivna naboja, dok spoj **2** posjeduje tri pozitivna naboja (slika 14). Budući da spoj **2** nosi više pozitivnih naboja nego spoj **1**, efikasnije se veže s ispitivanim polinukleotidima, što ukazuje na značajan doprinos elektrostatskih interakcija pozitivno nabijenih dijelova male molekule s negativno nabijenom okosnicom DNA/RNA. Posljedično, određene su veće vrijednosti parametra  $IC_{50}$  za spoj **2**, nego za spoj **1**, što upućuje na veći afinitet spoja **2** prema ispitivanim polinukleotidima. Navedena razlika, veoma je uočljiva u primjeru istiskivanja

etidijevog bormida iz kompleksa s polinukleotidom poli A – poli U. Parametar  $IC_{50}$  u slučaju istiskivanja etidijevog bromida sa spojem **1** iznosi 0,09 (slika 24), dok za spoj **2**, parametar  $IC_{50}$  iznosi 0,68 (slika 25). Odnosno, potrebno je dodati manju količinu spoja **2**, nego spoja **1**, kako bi se istisnulo 50% etidijevog bromida iz kompleksa. Iz toga se može zaključiti da spoj **2** ima veći afinitet prema polinukleotidu poli A – poli U, nego spoj **1**.

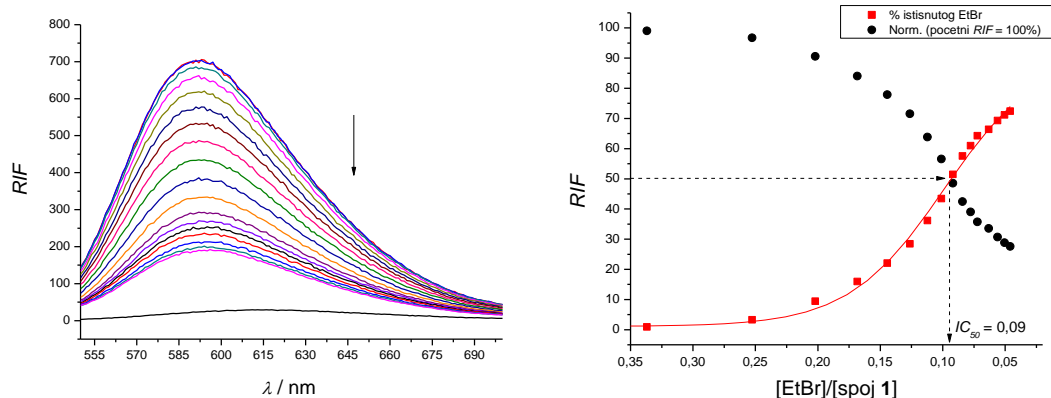
Tablica 5. Omjeri etidijevog bromida i spojeva **1**, **2**, **3** i **4** ( $IC_{50} = [EtBr]/[spoj]$ ) određeni istiskivanjem etidijevog bromida ( $c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) iz kompleksa s ispitivanim polinukleotidom ( $c = 5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ). Mjerenja su provedena u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ).

Spoj	$IC_{50}$			
	<i>ct</i> -DNA	poli dAdT – poli dAdT	poli dAdT – poli dAdT	poli A – poli U
<b>1</b>	0,15	0,10	0,11	0,09
<b>2</b>	0,34	0,47	0,68	0,68
<b>3</b>	NP <sup>a</sup>	-	-	-
<b>4</b>	NP <sup>a</sup>	-	-	-

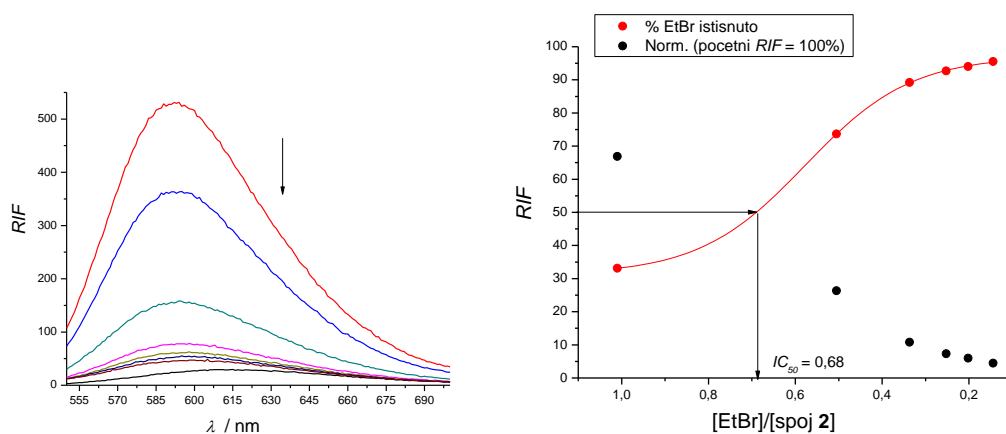
<sup>a</sup>NP = nema promjene emisije kompleksa

Nadalje, može se usporediti afinitet spojeva **1** i **2** za polinukleotid *ct*-DNA s afinitetom spojeva **3** i **4** za isti polinukleotid. Spojevi **3** i **4** nemaju pozitivne naboje u svojim strukturama. Rezultati dobiveni istiskivanjem etidijevog bromida iz kompleksa s polinukleotidom *ct*-DNA sa spojevima **3** i **4** prikazani su slikama 26 i 27. Uočava se da pri istim uvjetima, nema značajne promjene u emisiji kompleksa etidijev bromid/*ct*-DNA. S druge strane, dobivene vrijednosti za parametar  $IC_{50}$  u slučaju spojeva **1** i **2** iznose 0,15, odnosno 0,34 (tablica 5). Time se pokazalo da je afinitet spojeva, koji nemaju pozitivne naboje u svojoj strukturi (**3** i **4**), prema DNA, barem za dva reda veličine manji od afiniteta spojeva s pozitivnim nabojima u strukturi (**1** i **2**) prema DNA. To ponovo ukazuje na značaj elektrostatskih interakcija ovdje ispitivanih kaliksarena s negativno nabijenom okosnicom DNA/RNA.

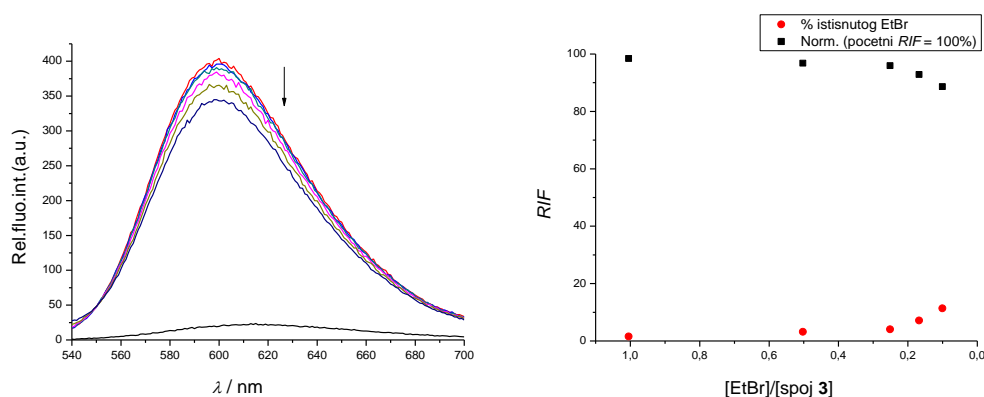




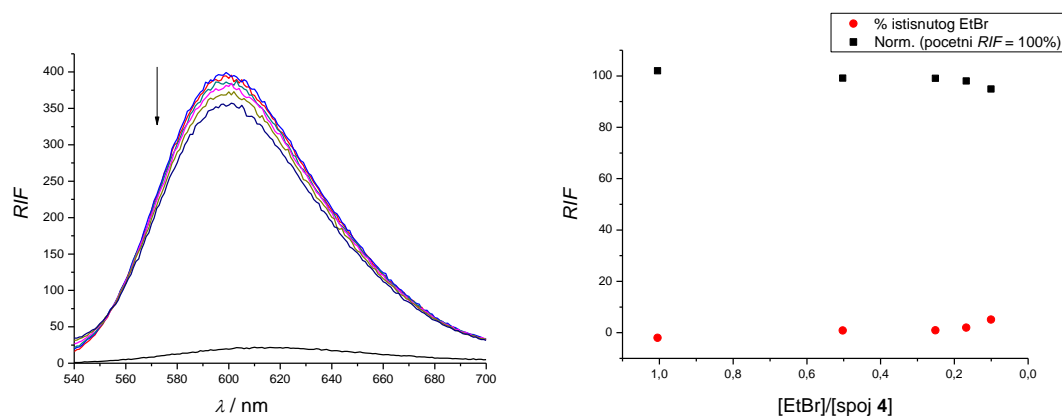
Slika 24. Lijevo: Emisijski spektri pri istiskivanju etidijevog bromida ( $c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 520 \text{ nm}$ ) nakon vezanja s polinukleotidom poli A – poli U ( $c = 5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), sa spojem **1** u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ); B) Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 600 nm o omjeru koncentracije EtBr i spoja **1**.



Slika 25. Lijevo: Emisijski spektri pri istiskivanju etidijevog bromida ( $c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 520 \text{ nm}$ ) nakon vezanja s polinukleotidom poli A – poli U ( $c = 5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), sa spojem **2** u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ); Desno: Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 593 nm o omjeru koncentracije EtBr i spoja **2**.



Slika 26. Lijevo: Emisijski spektri pri istiskivanju etidijevog bromida ( $c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 520 \text{ nm}$ ) nakon vezanja s polinukleotidom *ct*-DNA ( $c = 5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), sa spojem **3** u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ); Desno: Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 600 nm o omjeru koncentracije EtBr i spoja **3**.



Slika 27. Lijevo: Emisijski spektri pri istiskivanju etidijevog bromida ( $c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 520 \text{ nm}$ ) nakon vezanja s polinukleotidom *ct*-DNA ( $c = 5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), sa spojem **4** u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ); Desno: Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 600 nm o omjeru koncentracije EtBr i spoja **4**.

#### 4.2.3. Cirkularni dikroizam

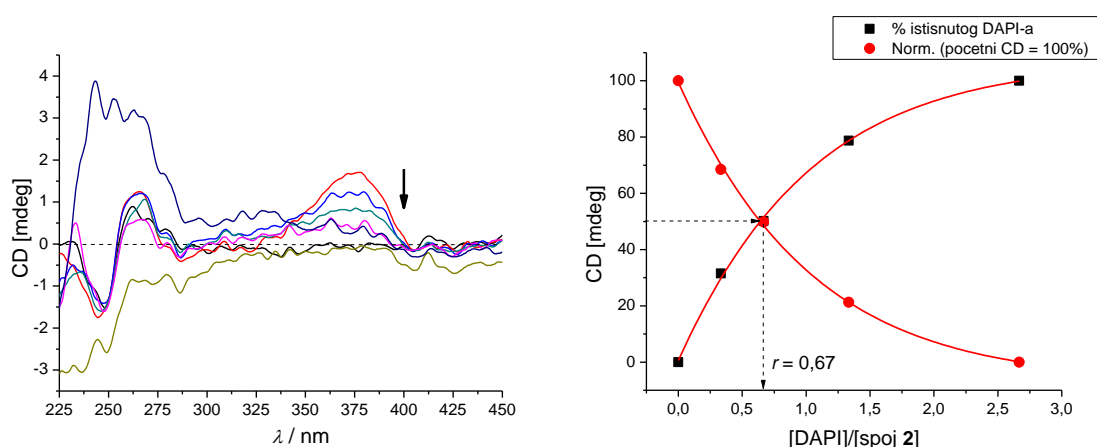
CD spektroskopijom praćene su interakcije dvolančanih polinukleotida *ct*-DNA, poli dAdT – poli dAdT i poli A – poli U sa spojevima **1** i **2**. Metoda je provedena kako je opisano u poglavlju 3.3.2. U rasponu od 200 do 300 nm, DNA i RNA apsorbiraju zračenje pa se promjene spektra mogu povezati s promjenom sekundarne strukture dvostruke uzvojnice polinukleotida zbog

vezanja spoja.<sup>35</sup> Pri valnim duljinama iznad 300 nm, DNA i RNA ne apsorbiraju zračenje, stoga se svi inducirani CD (ICD) spektri mogu pripisati isključivo spojevima.<sup>35</sup>

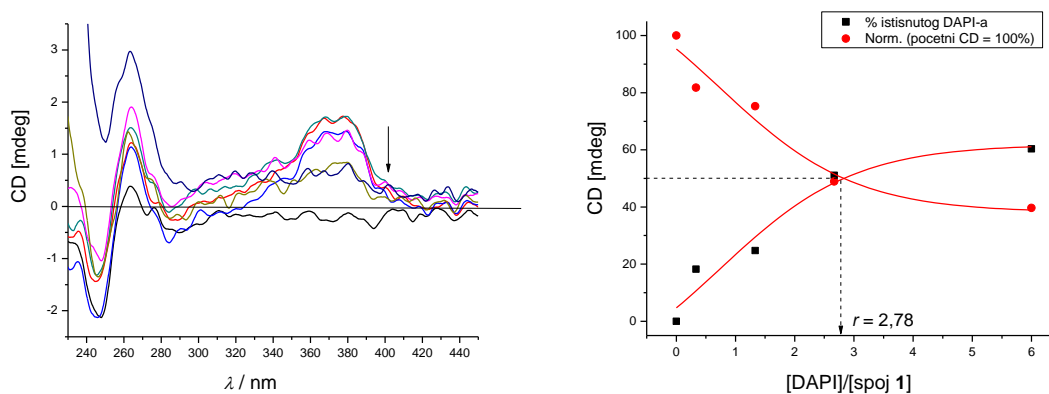
Nisu opaženi ICD signali pri valnim duljinama iznad 300 nm tijekom proučavanja interakcija navedenih dvolančanih polinukleotida sa spojevima **1** i **2** (slike D28 i D29) te je primijenjena metoda istiskivanja DAPI-a. DAPI je fluorescentna, akiralna (nema intrinzični CD spektar) boja, koja se selektivno veže u mali utor AT-slijedova DNA te se po vezanju u CD spektru pojavljuje inducirani CD signal pri 376 nm.<sup>45</sup> Srednja vrijednost afiniteta DAPI-a za DNA bogate AT-slijedovima omogućuje provođenje metode istiskivanja DAPI-a i ispitivanje vezanja drugih molekula s DNA.<sup>37</sup> Metodom istiskivanja DAPI-a ispitane su interakcije spojeva **1** i **2** s dvolančanim polinukleotidom poli dAdT – poli dAdT.

Metoda je provedena kako je opisano u poglavlju 3.3.2 te su dobiveni rezultati prikazani na slikama 28 i 29. Uočava se ICD signal pri valnim duljinama iznad 300 nm koji se pripisuje vezanju DAPI-a za dvolančani polinukleotid poli dAdT – poli dAdT. Postepenim dodavanjem spojeva, smanjuje se navedeni signal, odnosno istiskuje DAPI iz kompleksa s dvolančanim polinukleotidom. Rezultat metode je parametar  $r$  koji označava omjer koncentracije DAPI-a i spoja u trenutku kada je 50% DAPI-a istisnuto iz kompleksa s polinukleotidom.

U slučaju spoja **1**, parametar  $r$  iznosi 2,78, a u slučaju spoja **2** iznosi 0,67. Time je potvrđeno da se spojevi **1** i **2** uistinu vežu u mali utor DNA.



Slika 28. Lijevo: CD spektri pri istiskivanju DAPI-a ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) spojem **2** nakon vezanja s polinukleotidom poli dAdT – poli dAdT ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ); Desno: Ovisnost ICD signala pri valnoj duljini 376 nm o omjeru koncentracija DAPI-a i spoja **2**.

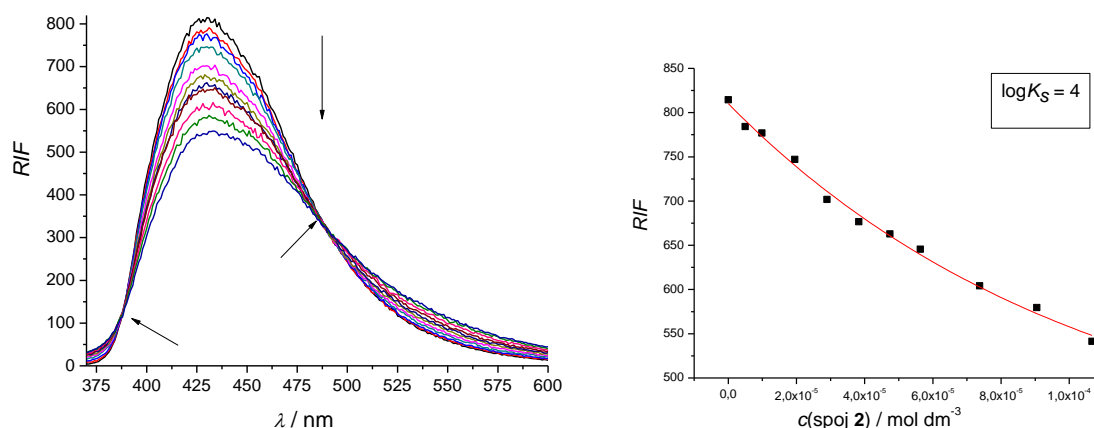


Slika 29. Lijevo: CD spektri pri istiskivanju DAPI-a ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) spojem **1** nakon vezanja s polinukleotidom poli dAdT – poli dAdT ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) u puferu natrijeva kakovilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ); Desno: Ovisnost ICD signala pri valnoj duljini 376 nm o omjeru koncentracija DAPI-a i spoja **1**.

### 4.3. Ispitivanje interakcija s nukleotidima

#### 4.3.1. Interakcije spojeva **1** i **2** s fluorescentnom nukleobazom

Ispitane su interakcije spojeva **1** i **2** s fluorescentnom nukleobazom D8-111TFA.<sup>41</sup> Interakcije su ispitane fluorimetrijskim titracijama kako je opisano u poglavlju 3.4.1. Metoda se temelji na promatranju promjene emisije fluorescentne nukleobaze s postepenim dodavanjem spojeva. Rezultati fluorimetrijskih titracija su obrađeni pomoću pomoću nelinearne regresije primjenom eksponencijalne jednadžbe prvog reda u svrhu određivanja vrijednosti konstante vezanja ( $\log K_s$ ).



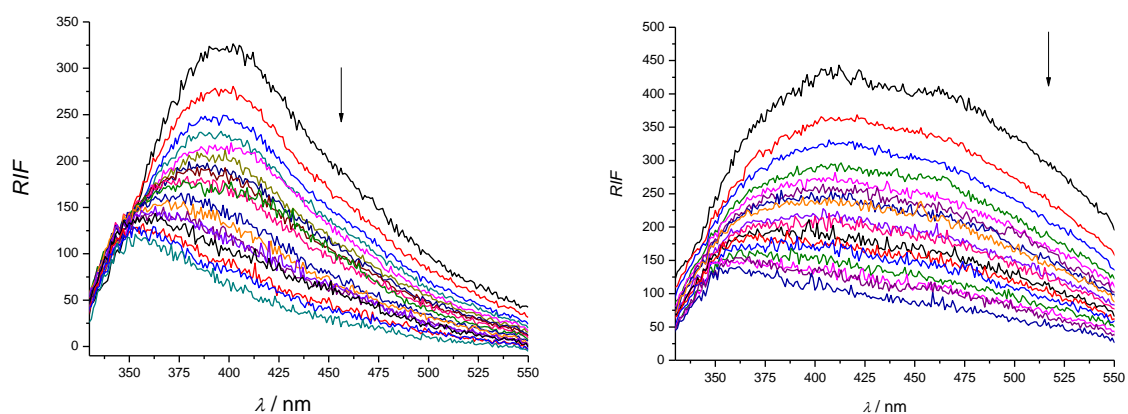
Slika 30. Lijevo: Emisijski spektri pri fluorimetrijskoj titraciji D8-111TFA ( $c = 5 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>;  $\lambda_{\text{ex}} = 350$  nm) spojem **2** ( $c = 5 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>) u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05$  mol L<sup>-1</sup>). Desno: Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri valnoj duljini 430 nm o koncentraciji spoja **2**.

Analiza snimljenih spektara tijekom fluorimetrijske titracije nukleobaze D8-111TFA spojem **2** (slika 30) ukazala je na nastanak samo jednog tipa kompleksa (izoemisijске točke), te je obradom rezultata nelinearnom regresijom za stehiometriju kompleksa spoj **2** : D8-111TFA = 1 : 1 određena konstanta vezanja  $\log K_s = 4,0$ . S druge pak strane, postepeni dodatak spoja **1**, nije uzrokovao promjenu u emisiji nukleobaze DB-111TFA (slika D30). Iz toga se zaključuje da navedena nukleobaza pokazuje selektivnost prema spoju **2**. Promjena fluorescencije nukleobaze D8-111TFA po vezanju **2** se iskoristila za ispitivanje interakcija spoja **2** i jednolančanog polinukleotida poli A na način koji je opisan u poglavlju 3.4.1. Metoda se temeljila na istiskivanju nukleobaze iz kompleksa sa spojem pomoću jednolančanog polinukleotida. Ipak, postepenim dodavanjem polinukleotida poli A nije došlo do promjene emisije kompleksa (slika D31). To sugerira da je nekovalentni kompleks spoja **2** i nukleobaze D8-111TFA bitno stabilniji od eventualnog kompleksa navedenog spoja i jednolančanog polinukleotida. Pošto poli A ima negativno nabijenu okosnicu, koja bi u principu trebala tvoriti elektrostatske interakcije s trostruko pozitivno nabijenim **2**, iz toga slijedi kako za primjećeni visoki afinitet kaliksarena prema dvolančanim AT-DNA i AU-RNA nije dovoljna elektrostatska interakcije već je nužno umetanje u utor sa značajnim hidrofobnim i van der Waalsovima interakcijama.

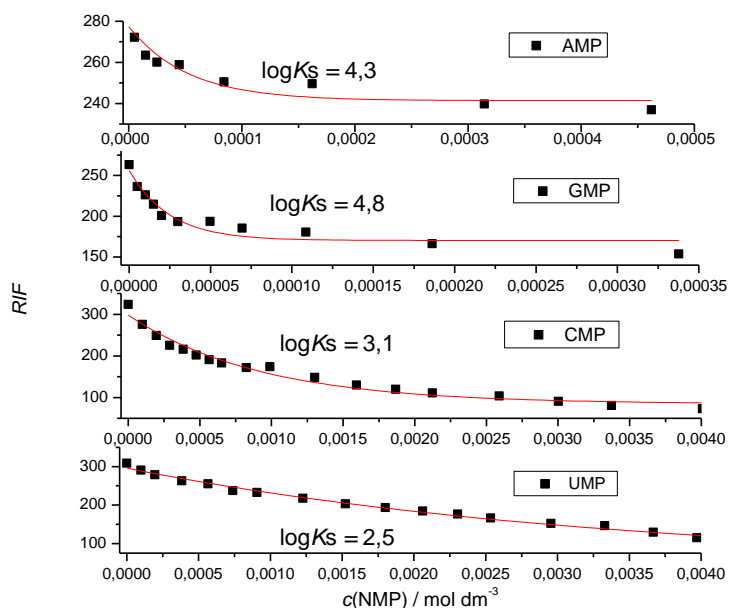
#### 4.3.2. Interakcije ispitivanih spojeva s nukleozid-monofosfatima

S ciljem što boljeg razumijevanja interakcija ispitivanih spojeva s DNA i RNA ispitane su i interakcije spojeva s nukleozid-5'-monofosfatima AMP, GMP, CMP i UMP. Struktura nukleozid-5'-monofosfata (NMP) se sastoji od purinske ili pirimidinske baze, koja bi mogla tvoriti aromatske interakcije slaganja s aromatima ispitivanih spojeva, vezane na 1'-C atom šećera riboze, te na 5'-C atom šećera vezane fosfatne skupine, koja nosi negativne naboje i s kojima bi kationski dio **1** ili **2** mogao tvoriti elektrostatske interakcije. Interakcije spojeva **1**, **2**, **3** i **4** s navedenim nukleotidima ispitane su fluorimetrijskom titracijom kako je opisano u poglavlju 3.4.2. Svi rezultati fluorimetrijskih titracija su obrađeni pomoću nelinearne regresije primjenom eksponencijalne jednadžbe prvog reda (koja odgovara nastanku kompleksa stehiometrije 1 : 1) sa svrhom određivanja vrijednosti konstante vezanja ( $\log K_s$ ). Metoda se temelji na praćenju promjene intenziteta emisije ispitivanog spoja uslijed postepenog dodavanja određenog nukleotida (slike 31–33).

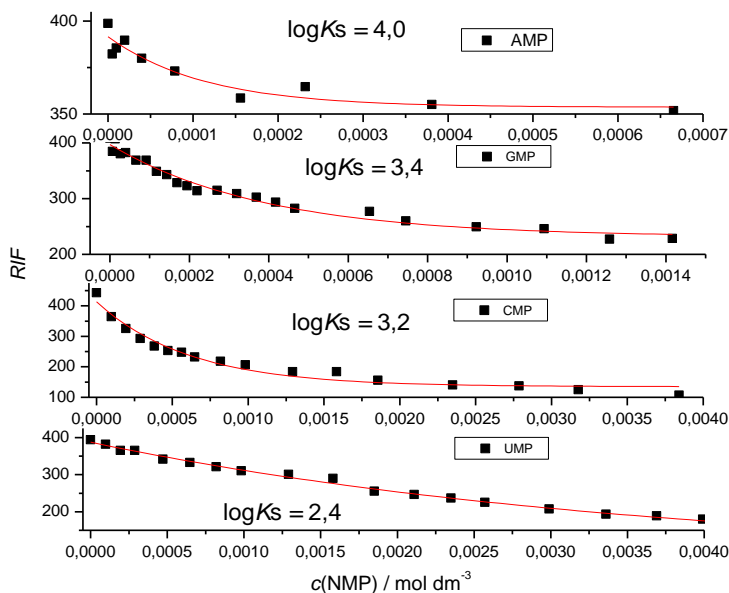
Za većinu provedenih fluorimetrijskih titracija dobivena su vrlo dobra slaganja eksperimentalnih i računskih podataka (koeficijent korelacije  $> 0,99$ ). Izračunate konstante stabilnosti nastalih kompleksa sumirane su u tablici 6, zajedno s relativnom promjenom emisije spoja po nastanku kompleksa ( $\Delta RIF$ ).



Slika 31. Lijevo: Emisijski spektri pri fluorimetrijskoj titraciji spoja **1** ( $c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 300 \text{ nm}$ ) s nukleotidom CMP ( $c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ); Desno: Emisijski spektri pri fluorimetrijskoj titraciji spoja **2** ( $c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 300 \text{ nm}$ ) s nukleotidom CMP ( $c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ). Titracije su provedene u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ).



Slika 32. Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 410 nm spoja **1** o koncentraciji nukleozid-5'-monofostata u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ). Konstante stabilnosti ( $\log K_s$ ) određene su obradom podataka fluorimetrijske titracije metodom nelinearne regresije po modelu kompleksa stehiometrije spoj: NMP = 1 : 1.



Slika 33. Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 410 nm spoja **2** o koncentraciji nukleozid-5'-monofostata u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ). Konstante stabilnosti ( $\log K_s$ ) određene su obradom podataka fluorimetrijske titracije metodom nelinearne regresije po modelu kompleksa stehiometrije spoj: NMP = 1 : 1.

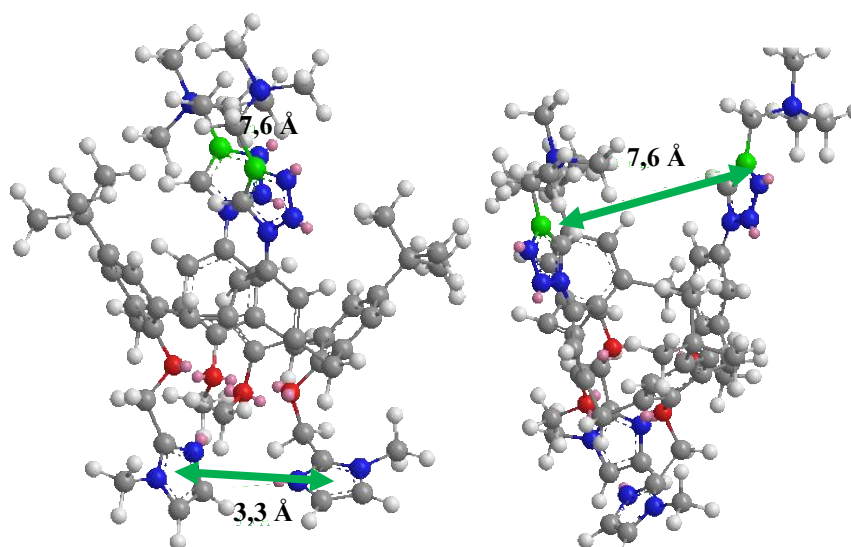
Tablica 6. Vrijednosti konstanti stabilnosti ( $\log K_s$ ) kompleksa spojeva **1**, **2**, **3** i **4** s nukleozid-monofosfatima i promjene emisije spojeva u kompleksu ( $\Delta RIF$ )<sup>a</sup> u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ).

Spoj	$\log K_s$			
	AMP	GMP	UMP	CMP
<b>1</b>	4,3 ( $\Delta RIF = 0,8$ )	4,8 ( $\Delta RIF = 0,6$ )	2,5 ( $\Delta RIF = 0,3$ )	3,1 ( $\Delta RIF = 0,4$ )
<b>2</b>	4,0 ( $\Delta RIF = 0,9$ )	3,4 ( $\Delta RIF = 0,6$ )	2,4 ( $\Delta RIF = 0,4$ )	3,2 ( $\Delta RIF = 0,2$ )
<b>3</b>	5,0 ( $\Delta RIF = 0,8$ )	4,7 ( $\Delta RIF = 0,8$ )	4,1 ( $\Delta RIF = 0,6$ )	NP <sup>b</sup>
<b>4</b>	4,7 ( $\Delta RIF = 0,6$ )	5,0 ( $\Delta RIF = 0,5$ )	5,0 ( $\Delta RIF = 0,6$ )	4,7 ( $\Delta RIF = 0,6$ )

<sup>a</sup>  $\Delta RIF = RIF (100\% \text{ kompleks}) / RIF (\text{spoj})$

<sup>b</sup> NP = premale promjene intenziteta emisije za pouzdanu obradu podataka

Analizom konstanti stabilnosti ( $\log K_s$ , tablica 6) uočljivo je kako neutralni spojevi **3** i **4** pokazuju nešto veći afinitet prema nukleotidima u usporedbi s kationskim analogima **1** i **2**, te se ujedno samo neutralni spojevi **3** i **4** ne razlikuju po afinitetu za purinske (A,G) i primidinske (U, C) baze. Promjer ispitivanih kaliksarena ne dozvoljava inkluziju nukleobaza unutar kaliksarenske šupljine, no fleksibilnost i razmak aromatskih podjedinica na oba ruba kaliksarena (slika 34) omogućuje eventualno umetanje aromatskih liganada (primjerice nukleobaza) u formi interkalandnog tipa supramolekulskog kompleksa.



Slika 34. Shematski prikaz spoja **1** s okvirnim udaljenostima između aromatskih supstituenata gornjeg i donjeg ruba (prikazano pomoću programa *Chem3D 12.0*).



Vrijednosti konstanti stabilnosti  $\log K_s \gg 4$  sugeriraju nastanak interkalandnog tipa kompleksa nukleobaza-kaliksaren, gdje je nukleobaza umetnuta između dvije (**1**, **3**) ili tri (**2**, **4**) imidazolne podjedinice s kojima tvori aromatske interakcije slaganja, a u skladu s okvirnim udaljenostima između aromatskih supstituentata gornjeg i donjeg ruba (slika 34). Takav interkalandni tip kompleksa s umetnutom nukleobazom između aromatskih podjedinica je okarakteriziran ranije,<sup>46,47</sup> te uzevši u obzir strukture ispitivanih spojeva, za neutralne analoge **3** i **4** može se pretpostaviti vezno mjesto nukleobaze između imidazolnih podjedinica kaliksarena. Za kationske analoge, osim vezanja smještanjem između imidazolnih podjedinica, postoji i dodatna mogućnost vezanja između kationskih triazolnih podjedinica, te su u tijeku dodatna ispitivanja koja bi trebala utvrditi točno vezno mjesto.

Dodatak nukleotida bilo kojem spoju u pravilu gasi njegovu fluorescenciju, no detaljnom analizom efikasnosti gašenja emisije ( $\Delta RIF$ , tablica 6) vidljiva je određena selektivnost. Glavna strukturna razlika između ispitivanih kaliksarena je u tome što spojevi **1** i **2** u svojoj strukturi sadrže dva, odnosno tri pozitivna naboja, dok su spojevi **3** i **4** njihovi neutralni analozi.

Purinska baza adenin ne pokazuje određenu selektivnost prema nabijenim ili neutralnim analogima, odnosno dodatak nukleotida AMP-a rezultira sličnim vrijednostima  $\Delta RIF$  za ispitivane spojeve. Također, dobivene su i slične vrijednosti konstante stabilnosti ( $\log K_s$ ), čiji je iznos veći od 4. To pak sugerira nastanak, gore navedenog, interkalandnog tipa kompleksa nukleobaza-kaliksaren. Isti zaključak vrijedi i za purinsku bazu gvanin. Dodatak nukleotida GMP-a ispitivanim spojevima rezultira sličnim vrijednostima  $\Delta RIF$  te nije prisutna određena selektivnost baze gvanina prema nabijenim ili neutralnim analogima ispitivanih spojeva. Dobivene su vrijednosti konstanti stabilnosti veće od 4, odnosno vezanjem ispitivanih spojeva i nukleobaze gvanina nastaje interkalandni tip kompleksa. Treba spomenuti da u slučaju trikationskog kaliksarena **2** dodatak GMP-a rezultira konstantom stabilnosti u iznosu od 3,4 (< 4). Ipak, ponašanje njemu srodne purinske baze adenin, sugerira da vezanjem GMP-a i **2** također nastaje interkalandni tip kompleksa nukleobaza-kaliksaren. Značajna razlika u selektivnosti uočava se kod pirimidinskih baza (C i U) koje su u pravilu svojom veličinom manje od purinskih baza (A i G). Za kationske kaliksarene (**1** i **2**) dodatak bilo koje pirimidinske baze je rezultirao bitno jačim gašenjem fluorescencije u usporedbi s purinskim bazama. Dok je za neutralne analoge (**3** i **4**) dodatak pirimidinskih baza rezultirao sličnim vrijednostima  $\Delta RIF$  onima dobivenim dodatkom purinskih baza. Također, slične su i vrijednosti konstanti

stabilnosti. To sugerira da neutralni analozi ispitivanih spojeva ne pokazuju selektivnost između purinskih i pirimidinskih baza. Ipak, uočene razlike fluorimetrijskih odgovora kationskih analoga ukazuju na određenu selektivnost kationskih kaliksarena prema manjim pirimidinskim bazama naspram purinskih baza. Dodatak UMP-a je rezultirao veoma sličnim vrijednostima konstanti stabilnosti i  $\Delta RIF$  u slučaju oba kationska kaliksarena. Također, dodatak CMP-a je rezultirao sličnim vrijednostima konstanti stabilnosti u slučaju oba kationska kaliksarena, s nešto nižom vrijednosti  $\Delta RIF$  u slučaju trikationskog kaliksarena nego dikationskog kaliksarena. Iako su dobivene niže vrijednosti konstanti stabilnosti, dobiveni rezultati sugeriraju da u slučaju kationskih kaliksarena također nastaje interkalandni tip kompleksa kaliksaren-nukleobaza, no vjerojatno manja pirimidinska baza dublje ulazi u strukturu kaliksarena te na taj način jače utječe na njegovu emisiju.

Određivanje točnog veznog mjesta kationskih kaliksarena je izvan opsega istraživanja ovog diplomskog rada, te su u tijeku dodatna ispitivanja kojima bi se trebalo utvrditi točno vezno mjesto.

## § 5. ZAKLJUČAK

Prethodno sintetizirani spojevi kaliksarena su okarakterizirani spektrofotometrijski u biološki relevantnom vodenom mediju. Spojevi su pokazali slabu, no primjenjivu fluorescenciju koja je u korelaciji sa spojevima koji sadrže sličnu građevnu jedinicu.<sup>35</sup> To nalaže da ispitivani kaliksareni i njima strukturno slični spojevi fluoresciraju te je potrebno napraviti detaljnu fotofizikalnu karakterizaciju spojeva kako bi se objasnila uočena fluorescencija. Budući da je prethodno objavljeno da ispitivani spojevi kompleksiraju bakrove(I) ione, provedene su fluorimetrijske titracije ispitivanih spojeva s Cu(I) u svrhu istraživanja fluorescencije kaliksarena prilikom kompleksiranja nekovalentnim interakcijama. Dodatak bakrovih(I) iona rezultirao je smanjenjem fluorescencije ispitivanih kaliksarena te je izračunata konstanta stabilnosti odgovarala prethodno objavljenim rezultatima. Time je potvrđeno da je fluorescencija ispravna metoda za analizu nekovalentnih interakcija ispitivanih kaliksarena. U skladu s time, vezanje nukleotida je uzrokovalo mjerljive promjene fluorescencije, no dodatak dvolančanih polinukleotida nije rezultirao mjerljivom promjenom fluorescencije ispitivanih kaliksarena. To nalaže da je za praćenje nekovalentnih interakcija ispitivanih kaliksarena pomoću fluorescencije važan nastanak inkluzijskih kompleksa u kojima se ligand veže u kaliksarensku šupljinu.

Vezanje dotičnih kaliksarena i dvolančanih polinukleotida ispitano je metodom istiskivanja etidijevog bromida iz kompleksa s dvolančanim polinukleotidima. Kationski kaliksareni pokazali su efikasno istiskivanje etidijevog bromida iz kompleksa s dvolančanim polinukleotidima s vrijednostima parametra  $IC_{50}$  u rasponu od 0,1 do 0,8. Budući da je etidijev bromid biološki relevantan spoj<sup>48</sup>, dobiveni rezultati nalažu da su i analizirani kationski kaliksareni biološki relevantni spojevi. Nadalje, trikationski kaliksaren (**2**) pokazao je veći afinitet za ispitivane polinukleotide, nego dikationski kaliksaren (**1**). To ukazuje na značajan doprinos elektrostatskih interakcija pozitivno nabijenih dijelova male molekule s negativno nabijenom okosnicom DNA/RNA. U skladu s time, afinitet neutralnih kaliksarena (**3** i **4**) prema DNA je za dva reda veličine manji od afiniteta spojeva s pozitivnim nabojima u strukturi (**1** i **2**). To ponovo ukazuje na značaj elektrostatskih interakcija ispitivanih kaliksarena s negativno nabijenom okosnicom DNA/RNA.

Interakcije ispitivanih kaliksarena s DNA/RNA ispitane su praćenjem promjene temperature mekšanja dvolančanih polinukleotida uslijed dodatka kaliksarena. Polinukleotidi poli dAdT – poli dAdT i poli dA – poli dT s idealnim oblikom malog utora za vezanje malih molekula uobičajeno se koriste za ispitivanje vezanja molekula u mali utor DNA u usporedbi s GC-DNA, gdje je mali utor djelomično sterički blokiran. Značajna stabilizacija polinukleotida uočena je uslijed dodatka trikationskog kaliksarena (**2**) polinukleotidu poli dAdT – poli dAdT. Također, uočena stabilizacija veća je nego stabilizacija istog polinukleotida uslijed dodatka manjeg kationskog kaliksarena (**1**). Navedeno je vjerojatno posljedica tri pozitivna naboja te povoljnijeg steričkog efekta: veći spoj (**2**) efikasnije popunjava raspoloživi prostor i time učinkovitije istiskuje molekule vode (hidrofobni efekt), a moguće i da ostvaruje povoljnije van der Waalsove interakcije. Mala stabilizacija polinukleotida poli dA – poli dT uslijed dodatka kationskih kaliksarena sugerira da je mali utor navedenog polinukleotida preuzak za oba spoja (upola uži od poli dAdT – poli dAdT) te zahtjeva steričku promjenu polinukleotida. Nadalje, stabilizacija dvolančane RNA (poli A – poli U) usporediva je s poli dA – poli dT, vjerojatno zato što je širina velikog utora RNA (uobičajenog veznog mjesta malih molekula) vrlo slična širini malog utora poli dA – poli dT. Izostanak stabilizacije *ct*-DNA može se pripisati sadržaju 48% GC parova baza, gdje amino skupina gvanina u malom utoru sterički ometa vezanje malih molekula, čime je broj efikasno vezanih molekula nedovoljan da bi uzorokovao mjerljivu stabilizaciju dvolančane *ct*-DNA. Također, neutralni kaliksareni nisu utjecali na promjenu  $T_m$  polinukleotida, što dodatno naglašava značaj elektrostatskih interakcija prilikom vezanja ispitivanih kaliksarena s DNA/RNA. Nadalje, vezanje ispitivanih kationskih kaliksarena u mali utor DNA/RNA potvrđeno je i metodom cirkularnog dikroizma, odnosno metodom istiskivanja DAPI-a iz malog utora polinukleotida poli dAdT – poli dAdT. Kationski kaliksareni efikasno su istisnuli DAPI iz kompleksa s polinukleotidom čime je dodatno potvrđeno da se kationski kaliksareni uistinu vežu u mali utor DNA. U dvolančanu RNA spojevi se najvjerojatnije vežu u veliki utor, budući da je veliki utor RNA slične širine kao mali utor DNA, dok je mali utor RNA preširok i preplitak za vezanje malih molekula.

Vezanje ispitivanih kaliksarena i nukleotida AMP, GMP, CMP i UMP je ispitano fluorimetrijskim titracijama. Promjer ispitivanih kaliksarena ne dozvoljava inkluziju nukleobaza unutar kaliksarenske šupljine. Neutralni kaliksareni (**3** i **4**) pokazali su nešto veći afinitet prema nukleotidima, nego kationski kaliksareni (**1** i **2**), vjerojatno zbog veće hidrofobnosti neutralnih molekula. Strukture liganda (NMP) i receptora (kaliksaren) te moguće

vezne interakcije, kao i dobivene vrijednosti konstanti stabilnosti sugeriraju nastanak interkalandnog tipa kompleksa nukleobaza-kaliksaren, gdje je nukleobaza umetnuta između dvije (1, 3) ili tri (2, 4) imidazolne podjedinice (donji rub kaliksarena) s kojima tvori aromatske interakcije slaganja. No, za kationske kaliksarene ne može se isključiti vezanje nukleotida na kationskoj strani kaliksarena, između triazolnih jedinica, uz dodatne elektrostatske interakcije pozitivnog naboja s negativno nabijenom fosfatima nukleotida. Određivanje točnog veznog mjesta kationskih kaliksarena zahtjeva detaljnu analizu strukturno informativnijim metodama, poput spektroskopije NMR ili kristalografije, što je zbog zahtjevnosti metoda i problematične topivosti spojeva izvan opsega istraživanja ovog diplomskog rada.

Neutralni kaliksareni ne razlikuju se po afinitetu prema purinskim (A i G) i pirimidinskih bazama (U i C), dok kationski kaliksareni za red veličine jače vežu purinske nukleobaze, vjerojatno zbog njihove veće aromatske površine. No, gašenje fluorescencije kationskih analoga je značajno izraženije po dodatku manjih, pirimidinskih nukleotida, što sugerira da manja pirimidinska baza dublje ulazi u strukturu kaliksarena i time više utječe na neradijativnu relaksaciju pobuđenog stanja kaliksarenskog fluorofora.

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

**1** 11,23-di-*tert*-butil-26,28-dimetoksi-25,27-di-[(1-metilimidazol-2-il)metoksi]-5,17-di-[4-(*N,N,N*-trimetilaminometil)-1,2,3-triazol-1-il]kaliks[4]aren

**2** – 11,23,34-tri-*tert*-butil-37,39,41-trimetoksi-36,38,40-di-[(1-metilimidazol-2-il)metoksi]-5,17,28-tri-[4-(*N,N,N*-trimetilaminometil)-1,2,3-triazol-1-il]kaliks[6]aren

**3** – 5,17-diamino-11,23-di-*tert*-butil-26,28-dimetoksi-25,27-di-[(1-metilimidazol-2-il)metoksi]kaliks[4]aren

**4** – 5,17,28-triamino-11,23,34-tri-*tert*-butil-37,39,41-trimetoksi-36,38,40-tri-[(1-metilimidazol-2-il)metoksi]kaliks[6]aren

A – purinska baza adenin

A – apsorbancija

C – pirimidinska baza citozin

CD – cirkularni dikroizam

*ct*-DNA – deoksiribonukleinska kiselina iz timusa teleta

D8-111TFA – fluorescentna nukleobaza

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol

$\Delta RIF$  – relativna promjena emisije ispitivanog spoja po nastanku kompleksa s određenim nukleotidom,  $RIF$  (100% kompleks) /  $RIF$ (spoj)

DMSO – dimetil-sulfoksid

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

EtBr – etidijev bromid

G – purinska baza gvanin

$IC_{50}$  – [EtBr]/[ispitivani spoj] u trenutku kada je 50% etidijevog bromida istisnuto iz kompleksa s polinukleotidom

ICD – inducirani cirkularni dikroizam

$RIF$  – relativni intenzitet fluorescencije

$\log K_s$  – konstanta vezanja

NMP – nukleozid-monofosfat

poli A – poli U - dvostruka uzvojnica homopolimera adenilata i uridilata

poli dA – poli dT – dvostruka uzvojnica homopolimera deoksiadenilata i deoksitimidilata

poli dAdT – poli dAdT – dvostruka uzvojnica heteropolimera alternirajućih deoksiadenilata i deoksitimidilata

poli dGdC – poli dGdC – dvostruka uzvojnica heteropolimera alternirajućih deoksigvanilata i deoksicitidilata

$r$  – [ispitivani spoj]/[polinukleotid] ili [DAPI]/[ispitivani spoj] u trenutku kada je 50% DAPI-a istisnuto iz nastalog kompleksa

RNA – ribonukleinska kiselina

$T_m$  – temperatura mekšanja

U – pirimidinska baza uracil

UV/Vis – ultraljubičasto/vidljivo elektromagnetsko zračenje

## § 7. LITERATURNI IZVORI

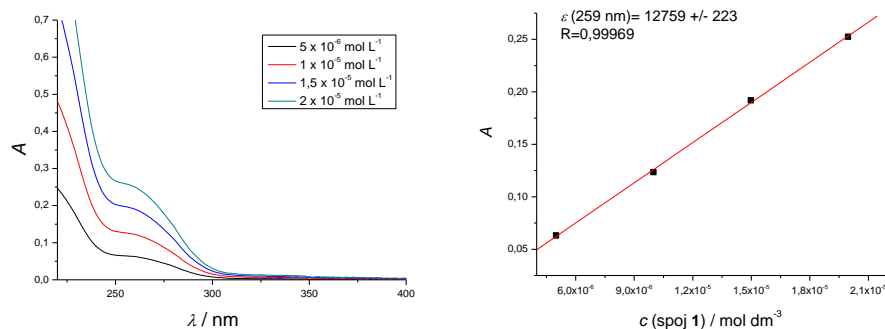
1. R. B. Silverman, *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, Elsevier Academic Press, New York, 2004.
2. M. Demeunynck, C. Bailly, W. D. Wilson, *Small Molecule DNA and RNA Binders: From Synthesis to Nucleic Acid Complexes*, John Wiley & Sons, Weinheim, 2004.
3. L. Baldini, A. Casnati, F. Sansone, *Eur. J. Org. Chem.* (2020) 5056–5069.
4. R. Ludwig, *Microchim. Acta* **152** (2005) 1–19.
5. V. Bagnacani, V. Franceschi, M. Bassi, M. Lomazzi, G. Donofrio, F. Sansone, A. Casnati, R. Ungaro, *Nat. Commun.* **4** (2013) 1–7.
6. M. Lomazzi, V. Franceschi, V. Bagnacani, C. A. Vezzoni, G. Donofrio, A. Casnati, F. Sansone, *Eur. J. Org. Chem.* (2021) 4076–4087.
7. W. Hu, C. Blecking, M. Kralj, L. Suman, I. Piantanida, T. Schrader, *Chem. Eur. J.* **18** (2012) 3589–3597.
8. A. Maurin, S. Varatharajan, B. Colasson, O. Reinaud, *Org. Lett.* **16** (2014) 5426–5429.
9. O. Bistri, B. Colasson, O. Reinaud, *Chem. Sci.* **3** (2012) 811–818.
10. L. Baldini, F. Sansone, A. Casnati, R. Ungaro, u P. A. Gale, J. W. Steed (ur.), Vol. 3, *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials*, John Wiley & Sons, Hoboken, 2012, str. 863–893.
11. J. W. Steed, J. L. Atwood, *Supramolecular Chemistry*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2009, str. 1–45, 197–207, 592–597, 708–710.
12. M. Giuliani, I. Morbioli, F. Sansone, A. Casnati, *Chem. Commun.* **51** (2015) 14140–14159.
13. D. A. Tan, M. Mocerino, u P. Neri, J. L. Sessler, M. Wang (ur.), *Calixarenes and Beyond*, Springer Nature, New York, 2016, str. 235–253.
14. A. Casnati, M. Fabbi, N. Pelizzi, A. Pochini, F. Sansone, R. Ungaro, E. Di Modugno, G. Tarzia, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **6** (1996) 2699–2704.
15. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 107–117, 651–655, 783–788.
16. <https://www.yourgenome.org/stories/the-discovery-of-dna> (datum pristupa 16. svibnja 2021.)



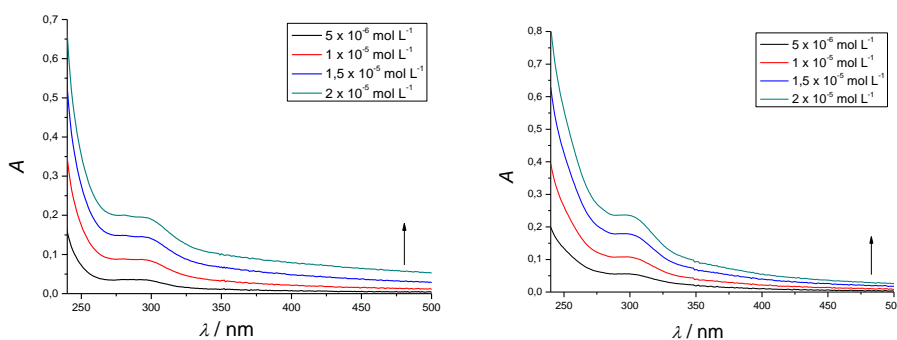
17. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, Springer Nature, New York, 2005, str. 273–305.
18. K. Nakamoto, M. Tsuboi, G. D. Strahan, *Meth. Biochem. Anal.* **51** (2008), 1–366.
19. S. C. Harvey, M. Prabhakaran, *J. Am. Chem. Soc.* **108** (1986), 6128–6136.
20. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1962/summary/> (datum pristupa 17. svibnja 2021.)
21. R. Franklin, R. Gosling, *Nature* **171** (1953) 740–741.
22. J. García-Ramos, R. Galindo-Murillo, F. Cortés-Guzmán, L. Ruiz-Azuara, *J. Mex. Chem. Soc.* **57** (2013) 160–174.
23. I. Piantanida, *Kem. Ind.* **52** (2003) 545–552.
24. <https://www.indiamart.com/proddetail/nucleic-acid-stain-dna-isolation-kit-8711909330.html> (datum pristupa 16. svibnja 2021.)
25. H. Ihmels, D. Otto, *Top. Curr. Chem.* **258** (2005) 161–204.
26. P. Herzyk, S. Neidle, J. M. Goodfellow, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **10** (1992) 97–139.
27. A. Ouameur, H. A. Tajmir-Riahi, *J. Biol. Chem.* **279** (2004) 42041–42054.
28. S. U. Rehman, T. Sarwar, M. A. Husain, H. M. Ishqi, M. Tabish, *Arch. Biochem. Biophys.* **576** (2015) 49–60.
29. D. Harvey, *Modern Analytical Chemistry*, McGraw-Hill, New York, 2000, str. 368–412.
30. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Brooks/Cole, Cengage Learning, Belmont, 2004, str 784–824, 825–836.
31. H. F. Gilbert, *Basic Concepts in Biochemistry A Student's Survival Guide*, McGraw-Hill, New York, 2000, str. 35–40.
32. V. González-Ruiz, A. I. Olives, M. A. Martín, P. Ribelles, M. T. Ramos, J. C. Menéndez, u M. A. Komorowska, S. Olsztyńska-Janus (ur.), *Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies*, InTech, Rijeka, 2011, str. 65–90.
33. G. Scatchard, *Ann. NY Acad. Sci.* **51** (1949) 660–672.
34. A. Bose, *J. Lumin* **169** (2016) 220–226.
35. T. Šmidlehner, I. Piantanida, G. Pescitelli, *Beilstein J. Org. Chem.* **14** (2018) 84–105.
36. M. Čehić, Cirkularni dikroizam, *Microsoft Office PowerPoint Presentation*, 2016, [https://www.pmf.unizg.hr/\\_download/repository/Mirsada\\_Cehic\\_CD\\_Seminar\\_FKMM.pdf](https://www.pmf.unizg.hr/_download/repository/Mirsada_Cehic_CD_Seminar_FKMM.pdf)

37. N. Berova, K. Nakanishi, R. W. Woody, *Circular Dichroism Principles and Applications*; John Wiley & Sons, New York, 2000, str. 34–71.
38. N. C. Garbett, P. A. Ragazzon, J. B. Chaires, *Nat. Protoc.* **2** (2007) 3166–3172.
39. C. R. Cantor, P. R. Schimmel, *Biophysical Chemistry*, W.H. Freeman and Company, San Francisco, 1980.
40. M. Egli, W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer-Verlag, New York, 1983.
41. Z. Ban, J. Matic, B. Zinic, A. F. Fuchtbauer, L. M. Wilhelmsson, I. Piantanida, *Molecules* **25** (2020) 1–18.
42. E. N. Zaitsev, S. C. Kowalczykowski, *Nucleic Acids Res.* **26** (1998) 650–654.
43. D. Ghosh, S. Rhodes, K. Hawkins, D. Winder, A. Atkinson, W. Ming, C. Padgett, J. Orvis, K. Aikena, S. Landge, *New J. Chem.* **39** (2015) 295–303.
44. D. L. Boger, B. E. Fink, M. P. Hedrick, *J. Am. Chem. Soc.* **122** (2000) 6382–6394.
45. E. N. Zaitsev, S. C. Kowalczykowski, *Nucleic Acids Res.* **26** (1998) 650–654.
46. I. Piantanida, B. S. Palm, P. Cudic, M. Zinic, H. J. Schneider, *Tetrahedron Lett.* **60** (2004) 6225–6231.
47. I. Piantanida, B. S. Palm, P. Cudic, M. Zinic, H. J. Schneider, *Tetrahedron Lett.* **42** (2001) 6779–6783.
48. I. Boibessot, C. M. Turner, D. G. Watson, E. Goldie, G. Connel, A. McIntosh, M. H. Grant, G. G. Skellern, *Acta Trop.* **84** (2002) 219–228.

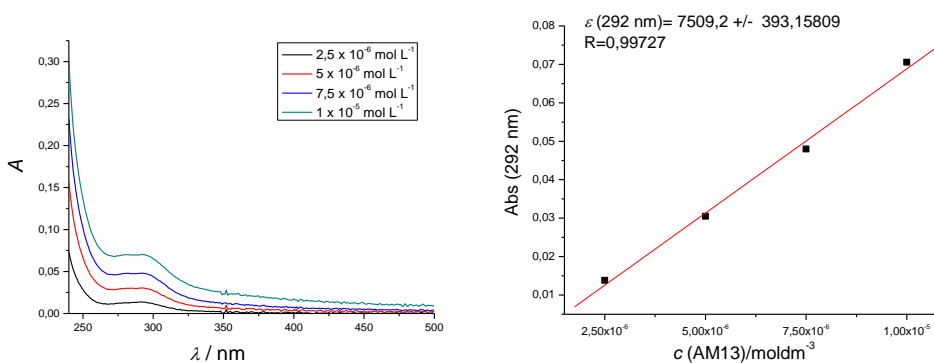
## § 8. DODATAK



Slika D1. Lijevo: UV/Vis spektri spoja **1** u koncentracijskom rasponu od  $5 \times 10^{-6}$  do  $2 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> snimljeni u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05$  mol L<sup>-1</sup>) uz  $\phi(\text{DMSO}) < 0,1\%$ ; Desno: Ovisnost apsorbancije o koncentraciji spoja **1** pri 259 nm.

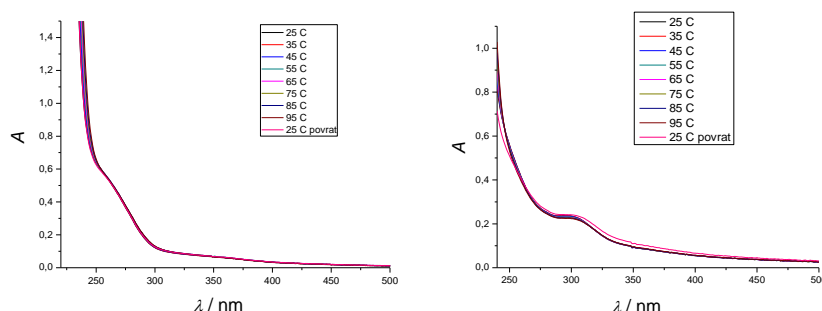


Slika D2. UV/Vis spektri spoja **3** (lijevo) i **4** (desno) u koncentracijskom rasponu od  $5 \times 10^{-6}$  do  $2 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> snimljen u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05$  mol L<sup>-1</sup>) uz  $\phi(\text{DMSO}) < 0,1\%$ .

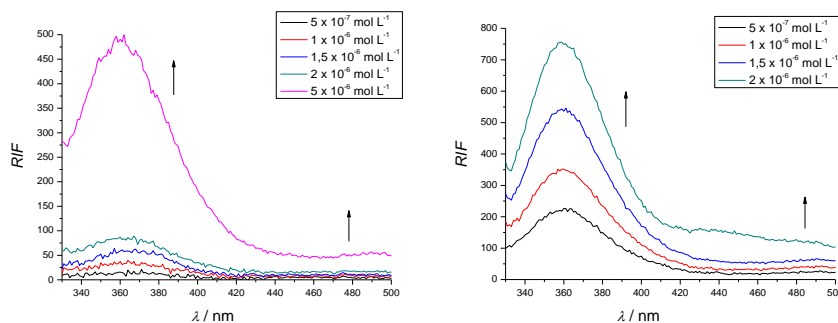


Slika D3. Lijevo: UV/Vis spektri spoja **3** u koncentracijskom rasponu od  $2,5 \times 10^{-6}$  do  $1 \times 10^{-5}$

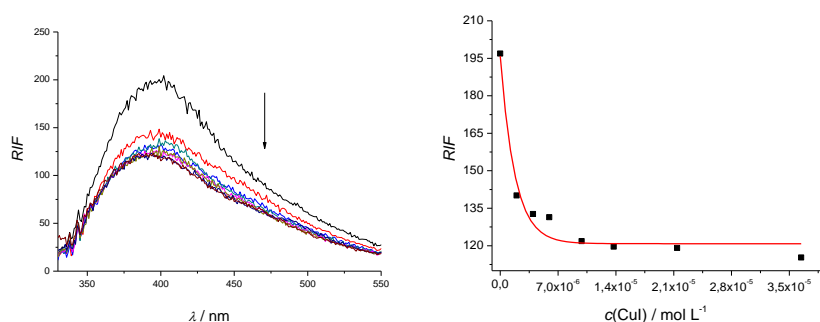
$5 \text{ mol L}^{-1}$  snimljeni u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) uz  $\varphi(\text{DMSO}) < 0,1\%$ ; Desno: Ovisnost apsorbancije o koncentraciji spoja **3** pri 292 nm.



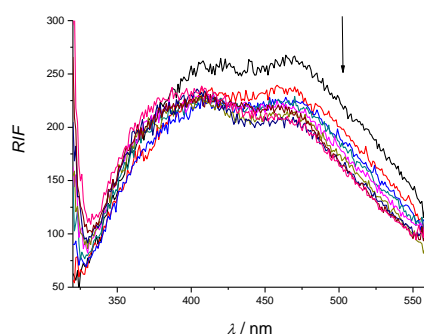
Slika D4. Utjecaj temperature na apsorpciju spoja **2** (lijevo;  $c = 2,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) i spoja **3** (desno;  $c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) u temperaturnom rasponu od  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  do  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ , uz  $\varphi(\text{DMSO}) < 0,1\%$ .



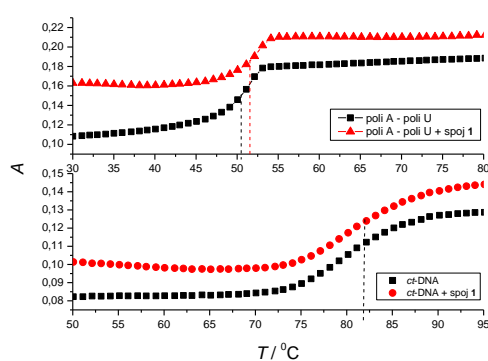
Slika D5. Lijevo: Spektri fluorescencije spoja **3** snimljeni u koncentracijskom rasponu od  $5 \times 10^{-7}$  do  $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ; Desno: Spektri fluorescencije spoja **4** snimljeni u koncentracijskom rasponu od  $5 \times 10^{-7}$  do  $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . Spektri su snimljeni u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) pri valnoj duljini pobude 300 nm.



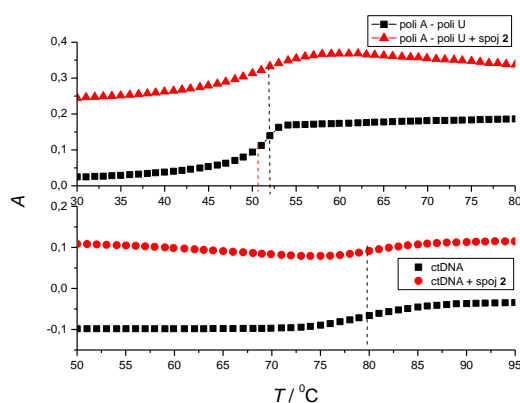
Slika D6. Lijevo: Emisijski spektri pri fuorimetrijskoj titraciji spoja **1** ( $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) s CuI snimljeni u redestiliranoj vodi pri valnoj duljini pobude 300 nm; Desno: Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 400 nm o koncentraciji CuI.



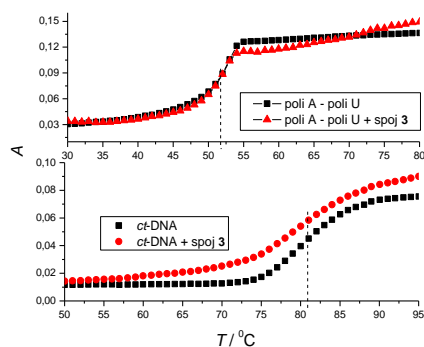
Slika D7. Emisijski spektri pri fluorimetrijskoj titraciji spoja **2** ( $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) s CuI snimljeni u redestiliranoj vodi pri valnoj duljini pobude 300 nm.



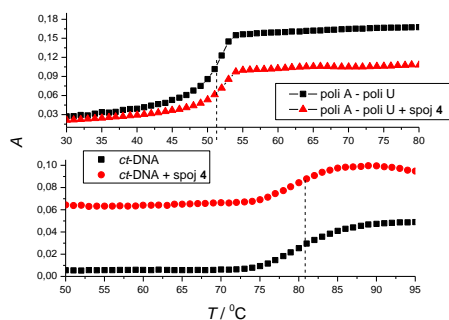
Slika D8. Krivulje temperature mekšanja polinukleotida poli A – poli U i *ct*-DNA ( $c(\text{polinukleotid}) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $r_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]} = 0,3$ ) snimljene u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) nakon dodatka spoja **1**. Greška u vrijednostima  $\Delta T_m$  iznosi  $\pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ .



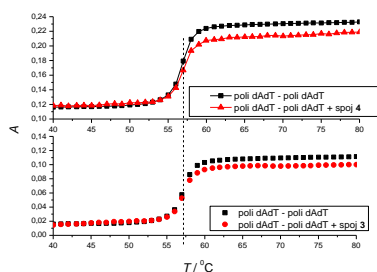
Slika D9. Krivulje temperature mekšanja polinukleotida poli A – poli U i *ct*-DNA ( $c(\text{polinukleotid}) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $r_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]} = 0,3$ ) snimljene u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) nakon dodatka spoja **2**. Greška u vrijednostima  $\Delta T_m$  iznosi  $\pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ .



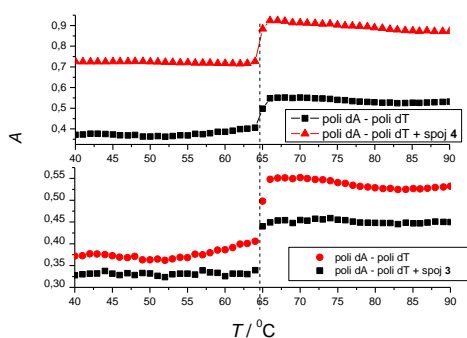
Slika D10. Krivulje temperature mekšanja polinukleotida poli A – poli U i *ct*-DNA ( $c(\text{polinukleotid}) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $r_{[\text{spoj}]} / [\text{polinukleotid}] = 0,3$ ) snimljene u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) nakon dodatka spoja **3**. Greška u vrijednostima  $\Delta T_m$  iznosi  $\pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ .



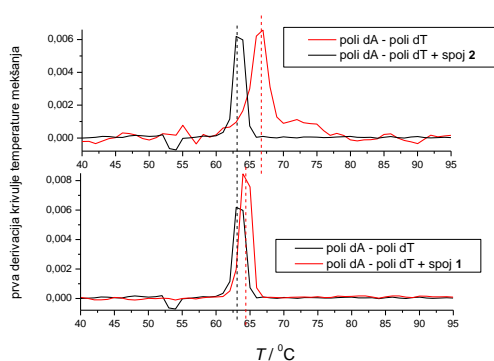
Slika D11. Krivulje temperature mekšanja polinukleotida poli A – poli U i *ct*-DNA ( $c(\text{polinukleotid}) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $r_{[\text{spoj}]} / [\text{polinukleotid}] = 0,3$ ) snimljene u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) nakon dodatka spoja **4**. Greška u vrijednostima  $\Delta T_m$  iznosi  $\pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ .



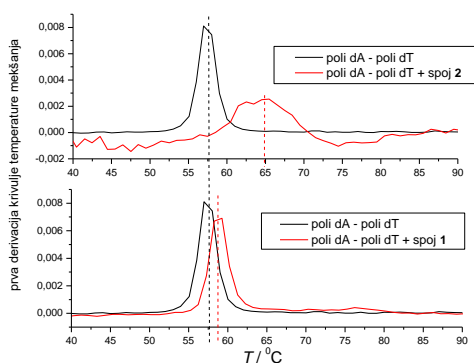
Slika D12. Krivulje temperature mekšanja polinukleotida poli dAdT – poli dAdT ( $c(\text{polinukleotid}) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $r_{[\text{spoj}]} / [\text{polinukleotid}] = 0,3$ ) snimljene u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) nakon dodatka spoja **3** i spoja **4**. Greška u vrijednostima  $\Delta T_m$  iznosi  $\pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ .



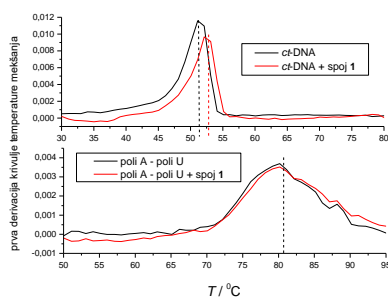
Slika D13. Krivulje temperature mekšanja polinukleotida poli dA – poli dT ( $c(\text{polinukleotid}) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $r_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]} = 0,3$ ) snimljene u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) nakon dodatka spoja **3** i spoja **4**. Greška u vrijednostima  $\Delta T_m$  iznosi  $\pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ .



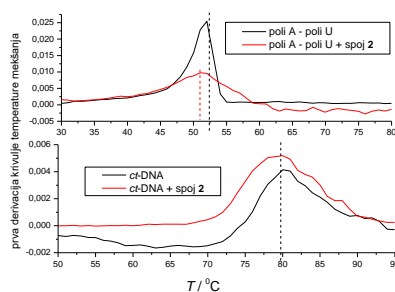
Slika D14. Prve derivacije krivulje temperature mekšanja polinukleotida poli dA – poli dT ( $c(\text{polinukleotid}) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $r_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]} = 0,3$ ) snimljene u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) nakon dodatka spoja **1** i spoja **2**. Greška u vrijednostima  $\Delta T_m$  iznosi  $\pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ .



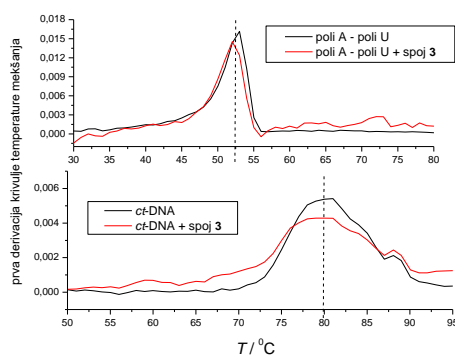
Slika D15. Prve derivacije krivulje temperature mekšanja polinukleotida poli dAdT – poli dAdT ( $c(\text{polinukleotid}) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $r_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]} = 0,3$ ) snimljene u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) nakon dodatka spoja **1** i spoja **2**. Greška u vrijednostima  $\Delta T_m$  iznosi  $\pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ .



Slika D16. Prve derivacije krivulje temperature mekšanja polinukleotida poli A – poli U i *ct*-DNA ( $c(\text{polinukleotid}) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $r_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]} = 0,3$ ) snimljene u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) nakon dodatka spoja **1**. Greška u vrijednostima  $\Delta T_m$  iznosi  $\pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ .

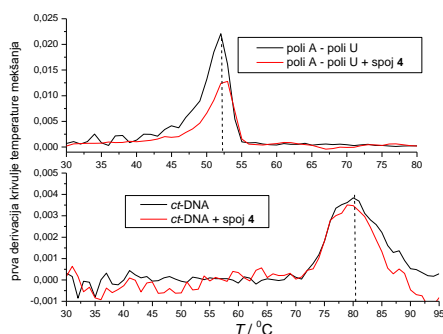


Slika D17. Prve derivacije krivulje temperature mekšanja polinukleotida poli A – poli U i *ct*-DNA ( $c(\text{polinukleotid}) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $r_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]} = 0,3$ ) snimljene u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) nakon dodatka spoja **2**. Greška u vrijednostima  $\Delta T_m$  iznosi  $\pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ .

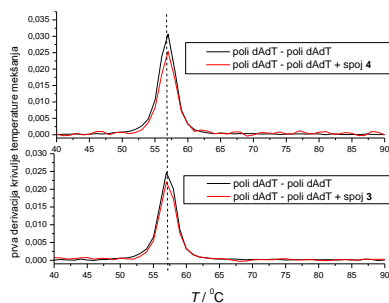


Slika D18. Prve derivacije krivulje temperature mekšanja polinukleotida poli A – poli U i *ct*-DNA ( $c(\text{polinukleotid}) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $r_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]} = 0,3$ ) snimljene u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) nakon dodatka spoja **3**. Greška u vrijednostima  $\Delta T_m$  iznosi  $\pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ .

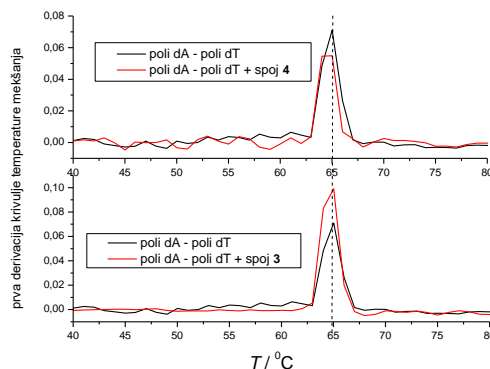




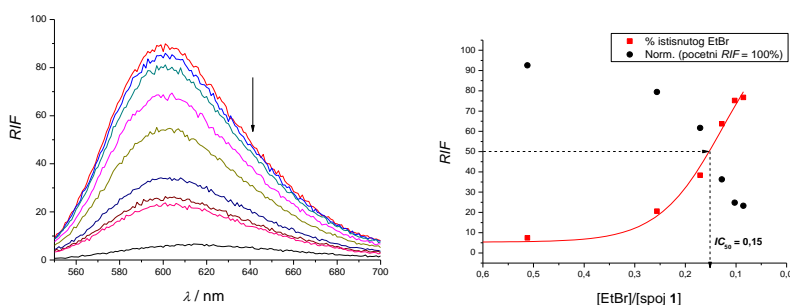
Slika D19. Prve derivacije krivulje temperature mekšanja polinukleotida poli A – poli U i *ct*-DNA ( $c(\text{polinukleotid}) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $r_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]} = 0,3$ ) snimljene u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) nakon dodatka spoja **4**. Greška u vrijednostima  $\Delta T_m$  iznosi  $\pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ .



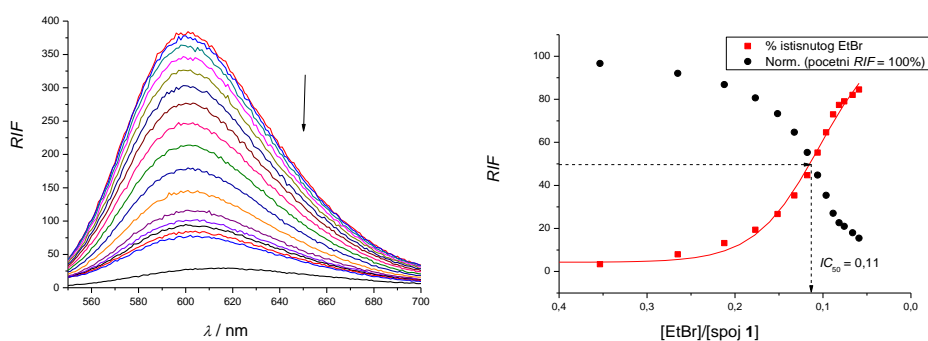
Slika D20. Prve derivacije krivulje temperature mekšanja polinukleotida poli dAdT – poli dAdT ( $c(\text{polinukleotid}) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $r_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]} = 0,3$ ) snimljene u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) nakon dodatka spoja **3** i **4**. Greška u vrijednostima  $\Delta T_m$  iznosi  $\pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ .



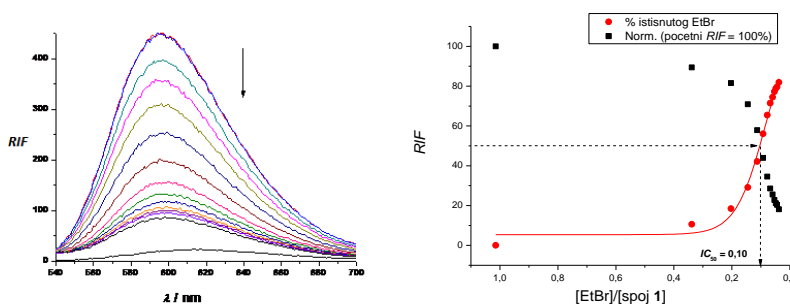
Slika D21. Prve derivacije krivulje temperature mekšanja polinukleotida poli dA – poli dT ( $c(\text{polinukleotid}) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $r_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]} = 0,3$ ) snimljene u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) nakon dodatka spoja **3** i **4**. Greška u vrijednostima  $\Delta T_m$  iznosi  $\pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ .



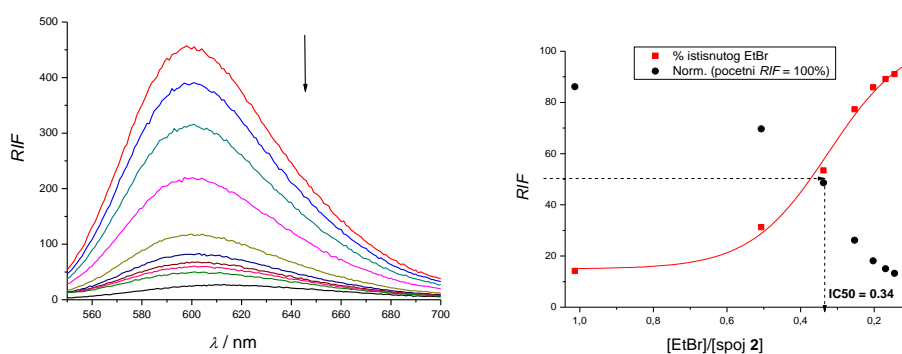
Slika D22. Lijevo: Emisijski spektri pri istiskivanju etidijevog bromida ( $c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 520 \text{ nm}$ ) nakon vezanja s polinukleotidom *ct*-DNA ( $c = 5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), sa spojem **1** u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ); Desno: Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 600 nm o omjeru koncentracije EtBr i spoja **1**.



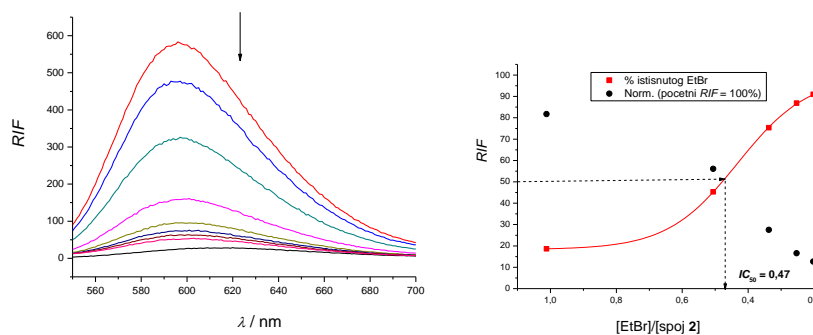
Slika D23. Lijevo: Emisijski spektri pri istiskivanju etidijevog bromida ( $c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 520 \text{ nm}$ ) nakon vezanja s polinukleotidom poli dGdC – poli dGdC ( $c = 5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), sa spojem **1** u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ); Desno: Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 600 nm o omjeru koncentracije EtBr i spoja **1**.



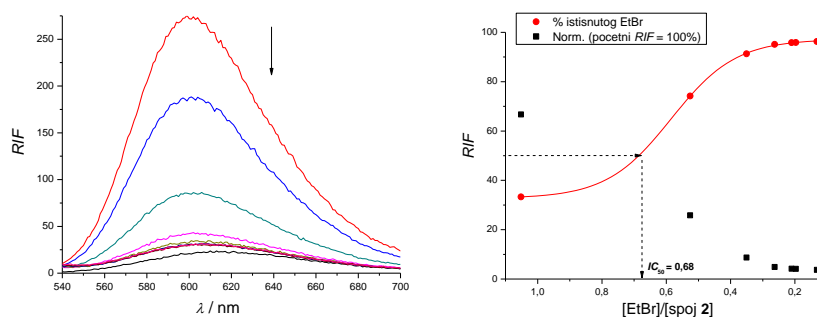
Slika D24. Lijevo: Emisijski spektri pri istiskivanju etidijevog bromida ( $c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 520 \text{ nm}$ ) nakon vezanja s polinukleotidom poli dAdT – poli dAdT ( $c = 5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), sa spojem **1** u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ); Desno: Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 600 nm o omjeru koncentracije EtBr i spoja **1**.



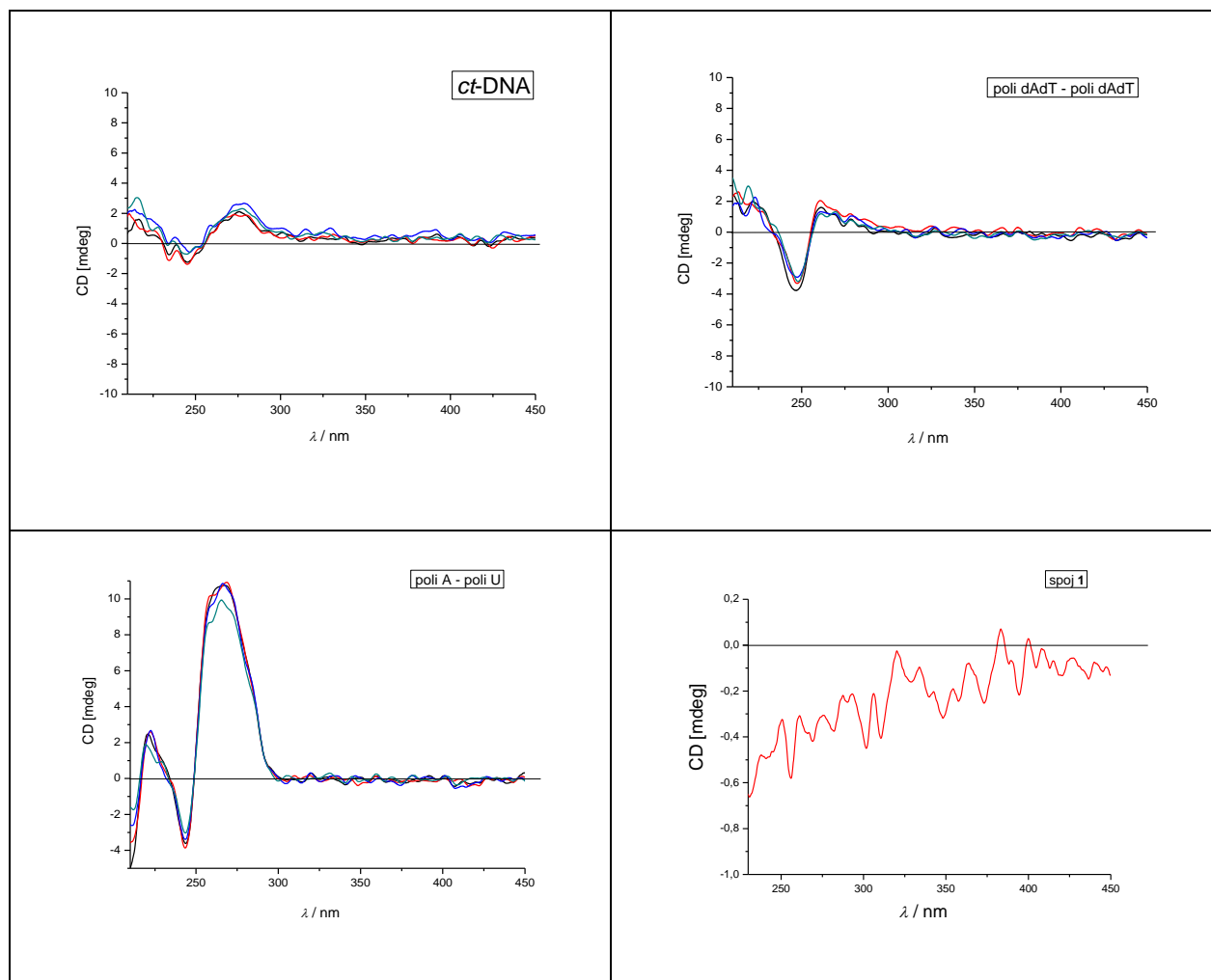
Slika D25. Lijevo: Emisijski spektri pri istiskivanju etidijevog bromida ( $c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 520 \text{ nm}$ ) nakon vezanja s polinukleotidom *ct*-DNA ( $c = 5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), sa spojem **2** u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ); Desno: Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 600 nm o omjeru koncentracije EtBr i spoja **2**.



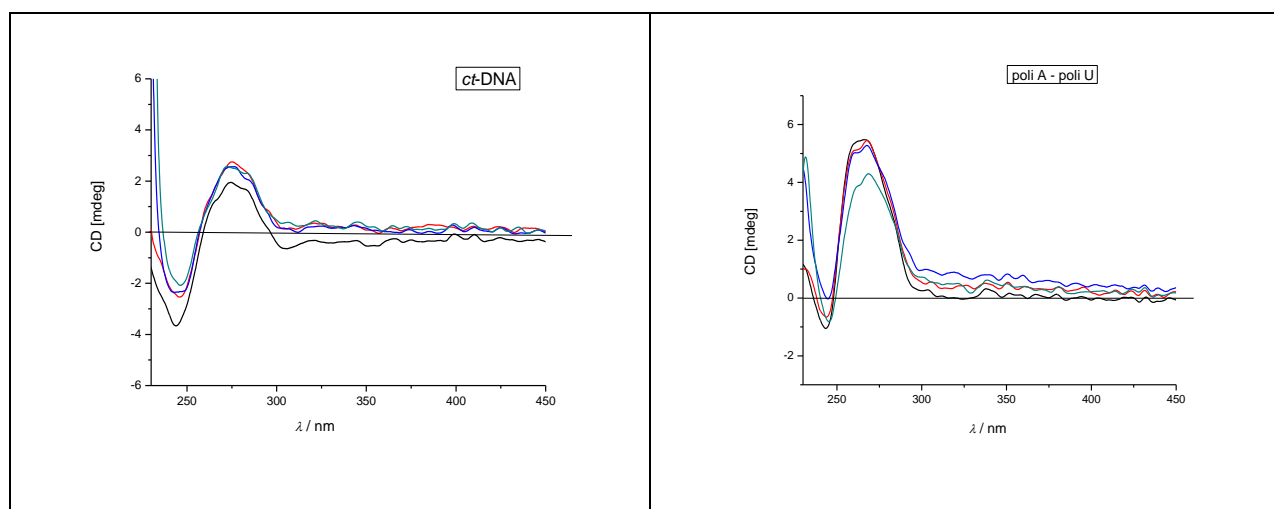
Slika D26. Lijevo: Emisijski spektri pri istiskivanju etidijevog bromida ( $c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 520 \text{ nm}$ ) nakon vezanja s polinukleotidom poli dAdT – poli dAdT ( $c = 5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), sa spojem **2** u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ); Desno: Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 600 nm o omjeru koncentracije EtBr i spoja **2**.

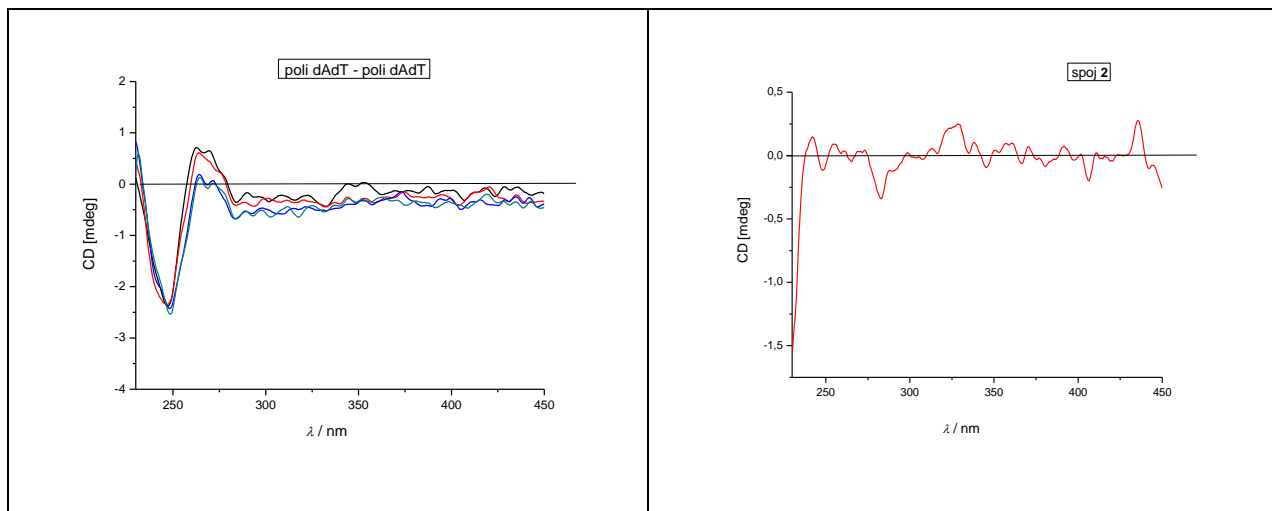


Slika D27. Lijevo: Emisijski spektri pri istiskivanju etidijevog bromida ( $c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 520 \text{ nm}$ ) nakon vezanja s polinukleotidom poli dGdC – poli dGdC ( $c = 5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ), sa spojem **2** u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ); Desno: Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri 600 nm o omjeru koncentracije EtBr i spoja **2**.

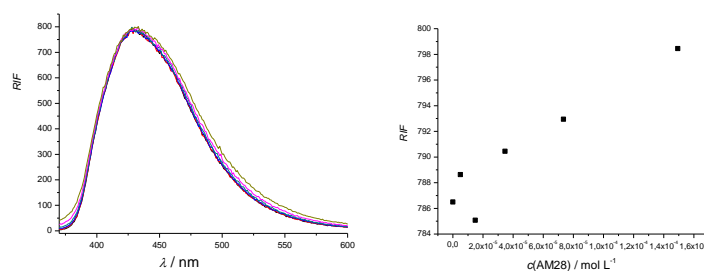


Slika D28. CD spektri polinukleotida *ct*-DNA, poli dAdT – poli dAdT i poli A – poli U ( $c(\text{polinukleotid}) = 2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) nakon dodatka spoja **1** ( $r_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]} = 0,1; 0,3; 0,6$ ) te CD spektar spoja **1** ( $c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ). Svi spektri snimljeni su u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ).

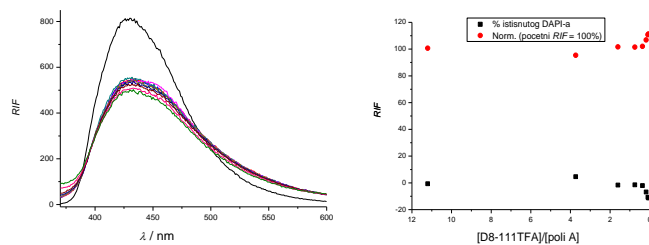




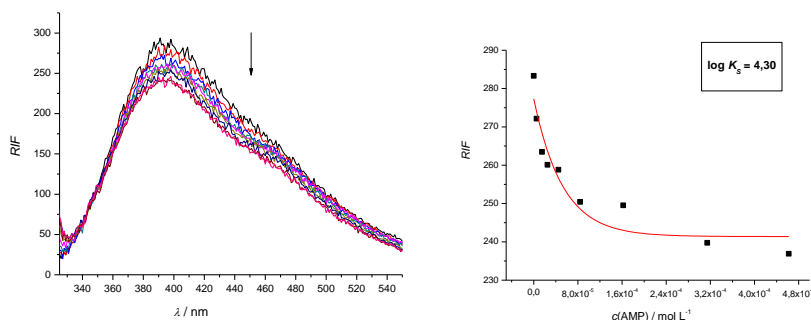
Slika D29. CD spektri polinukleotida *ct*-DNA, poli dAdT – poli dAdT i poli A – poli U ( $c(\text{polinukleotid}) = 2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) nakon dodatka spoja **2** ( $r_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]} = 0,1; 0,3; 0,6$ ) te CD spektar spoja **2** ( $c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ). Svi spektri snimljeni su u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ).



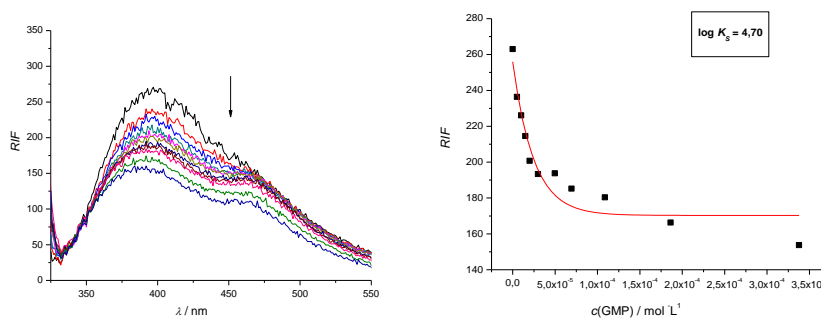
Slika D30. Lijevo: Emisijski spektri pri fluorimetrijskoj titraciji D8-111TFA ( $c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$ ) sa spojem **1** ( $c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ). Desno: Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri valnoj duljini 430 nm o koncentraciji spoja **1**.



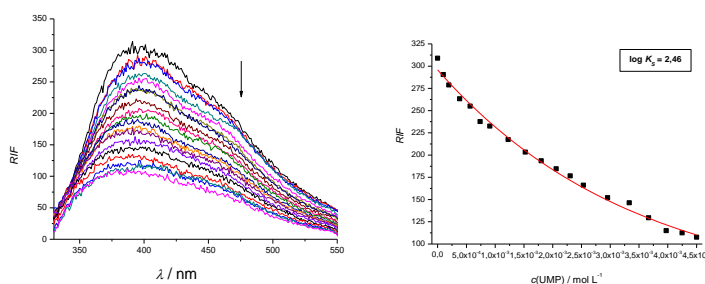
Slika D31. Lijevo: Emisijski spektri pri fluorimetrijskoj titraciji D8-111TFA ( $c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$ ) jednolančanim polinukleotidom poli A nakon vezanja sa spojem **2** ( $c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ). Desno: Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije pri valnoj duljini 430 nm o koncentraciji polinukleotida poli A.



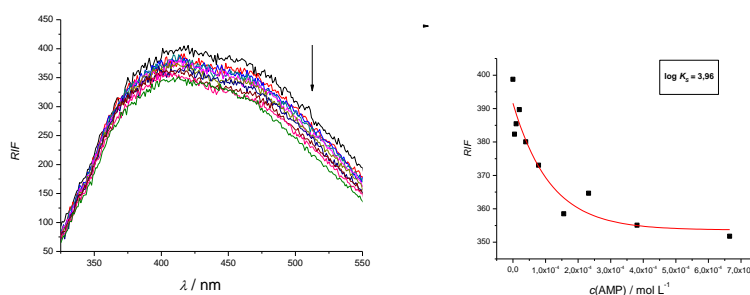
Slika D32. Lijevo: Emisijski spektri pri fluorimetrijskoj titraciji spoja **1** ( $c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 300 \text{ nm}$ ) s nukleotidom AMP ( $c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) u puferu natrijeva kakovilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ); Desno: Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije o koncentraciji AMP-a pri valnoj duljini 400 nm.



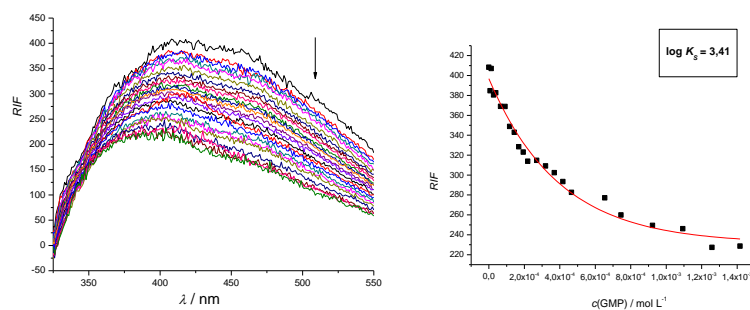
Slika D33. Lijevo: Emisijski spektri pri fluorimetrijskoj titraciji spoja **1** ( $c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 300 \text{ nm}$ ) s nukleotidom GMP ( $c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) u puferu natrijeva kakovilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ); Desno: Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije o koncentraciji GMP-a pri valnoj duljini 400 nm.



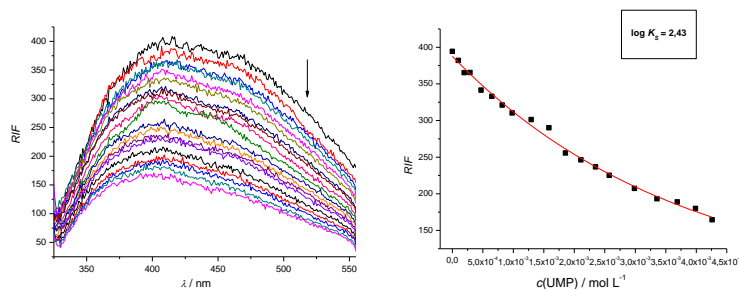
Slika D34. Lijevo: Emisijski spektri pri fluorimetrijskoj titraciji spoja **1** ( $c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 300 \text{ nm}$ ) s nukleotidom UMP ( $c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) u puferu natrijeva kakovilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ); Desno: Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije o koncentraciji UMP-a pri valnoj duljini 400 nm.



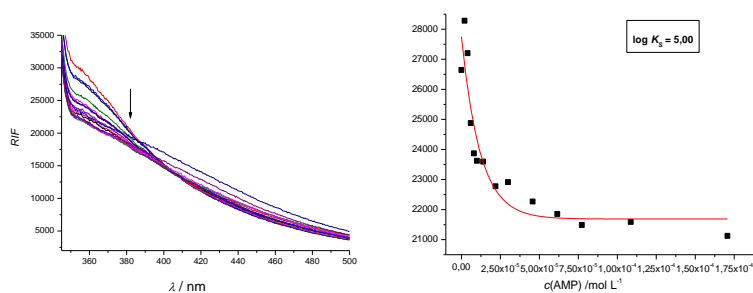
Slika D35. Lijevo: Emisijski spektri pri fluorimetrijskoj titraciji spoja **2** ( $c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 300 \text{ nm}$ ) s nukleotidom AMP ( $c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ); Desno: Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije o koncentraciji AMP-a pri valnoj duljini 413 nm.



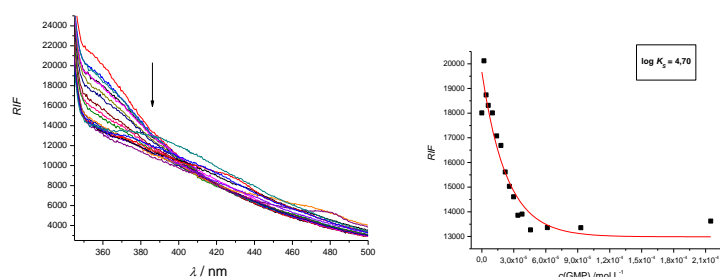
Slika D36. Lijevo: Emisijski spektri pri fluorimetrijskoj titraciji spoja **2** ( $c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 300 \text{ nm}$ ) s nukleotidom GMP ( $c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ); Desno: Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije o koncentraciji GMP-a pri valnoj duljini 409 nm.



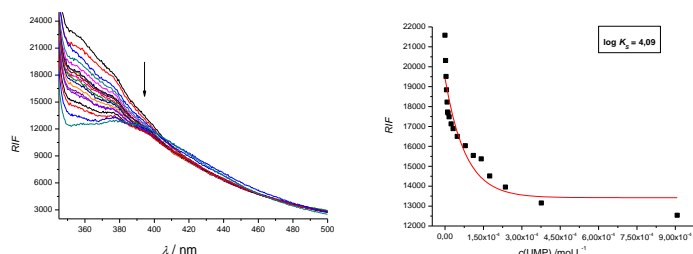
Slika D37. Lijevo: Emisijski spektri pri fluorimetrijskoj titraciji spoja **2** ( $c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 300 \text{ nm}$ ) s nukleotidom UMP ( $c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ); Desno: Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije o koncentraciji UMP-a pri valnoj duljini 410 nm.



Slika D38. Lijevo: Emisijski spektri pri fluorimetrijskoj titraciji spoja **3** ( $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 300 \text{ nm}$ ) s nukleotidom AMP ( $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ); Desno: Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije o koncentraciji AMP-a pri valnoj duljini 360 nm.

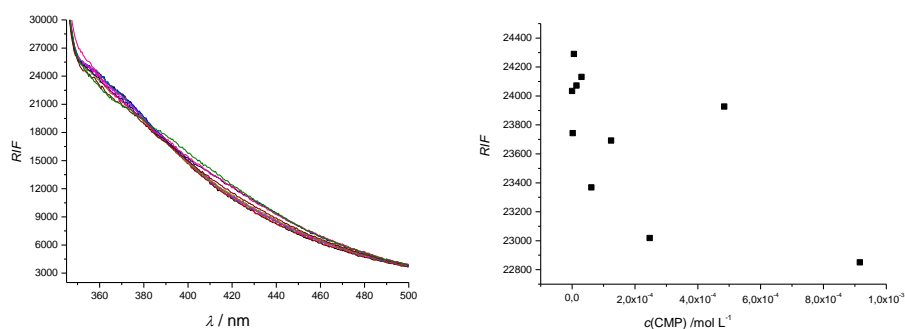


Slika D39. Lijevo: Emisijski spektri pri fluorimetrijskoj titraciji spoja **3** ( $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 300 \text{ nm}$ ) s nukleotidom GMP ( $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ); Desno: Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije o koncentraciji GMP-a pri valnoj duljini 360 nm.

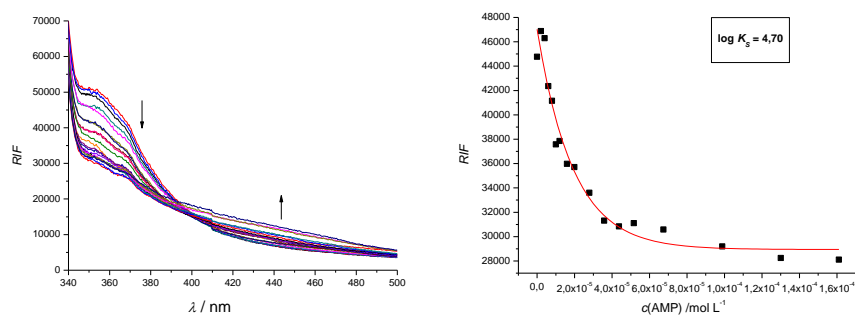


Slika D40. Lijevo: Emisijski spektri pri fluorimetrijskoj titraciji spoja **3** ( $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 300 \text{ nm}$ ) s nukleotidom UMP ( $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ); Desno: Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije o koncentraciji UMP-a pri valnoj duljini 360 nm.

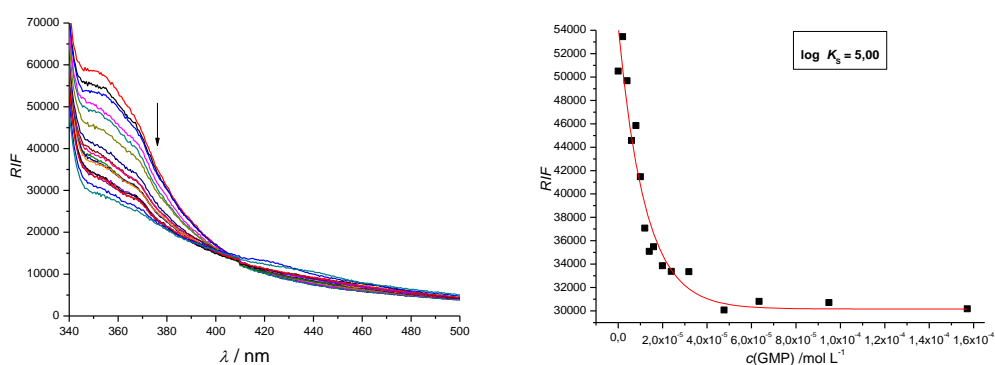




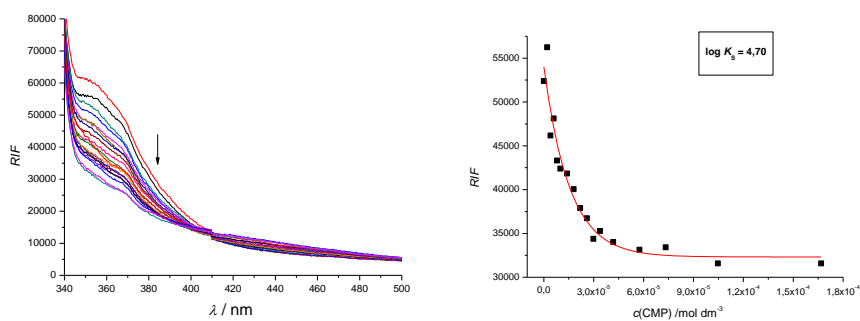
Slika D41. Lijevo: Emisijski spektri pri fluorimetrijskoj titraciji spoja **3** ( $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 300 \text{ nm}$ ) s nukleotidom CMP ( $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ); Desno: Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije o koncentraciji CMP-a pri valnoj duljini 360 nm.



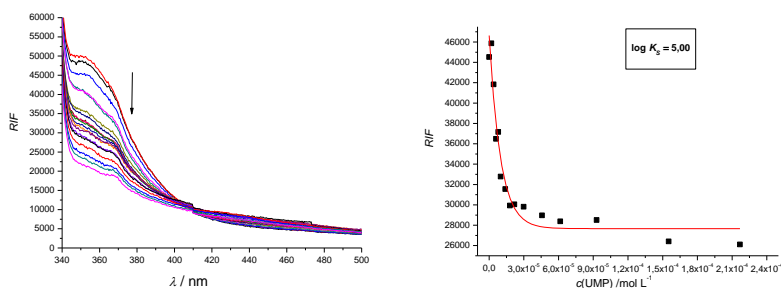
Slika D42. Lijevo: Emisijski spektri pri fluorimetrijskoj titraciji spoja **4** ( $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 300 \text{ nm}$ ) s nukleotidom AMP ( $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ); Desno: Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije o koncentraciji AMP-a pri valnoj duljini 360 nm.



Slika D43. Lijevo: Emisijski spektri pri fluorimetrijskoj titraciji spoja **4** ( $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 300 \text{ nm}$ ) s nukleotidom GMP ( $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ); Desno: Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije o koncentraciji GMP-a pri valnoj duljini 360 nm.



Slika D44. Lijevo: Emisijski spektri pri fluorimetrijskoj titraciji spoja **4** ( $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 300 \text{ nm}$ ) s nukleotidom CMP ( $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ); Desno: Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije o koncentraciji CMP-a pri valnoj duljini 360 nm.



Slika D45. Lijevo: Emisijski spektri pri fluorimetrijskoj titraciji spoja **4** ( $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{ex}} = 300 \text{ nm}$ ) s nukleotidom UMP ( $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) u puferu natrijeva kakodilata (pH 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ); Desno: Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije o koncentraciji UMP-a pri valnoj duljini 360 nm.

## § 9. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Ena Otković

Datum rođenja: 11. siječnja 1995.

Mjesto rođenja: Zagreb

### Obrazovanje

2001–2009 Osnovna škola Vladimira Nazora Daruvar

2009–2013 Gimnazija Daruvar

2013–2019 Preddiplomski studij kemije, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2019– Diplomski studij kemije, smjer: analitička kemija i biokemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2015 i 2017 Otvoreni dan Kemijskog odsjeka (Dan i noć na PMF-u)