

# Simetrični poliini izvedeni iz bis-triarilamina kao fluorescentni senzori za DNA i RNA

---

Vukadinović, Nina

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:217:725000>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-21**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Nina Vukadinović

**SIMETRIČNI POLIINI IZVEDENI IZ BIS-  
TRIARILAMINA KAO FLUORESCENTNI  
SENZORI ZA DNA I RNA**

**Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2024.



Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković u Laboratoriju za biomolekularne interakcije i spektroskopiju pod mentorstvom dr. sc. Dijane Pavlović Saftić, znan. sur.. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatska zaklada za znanost (HrZZ) pod nazivom Novi peptid-oligonukleotid-kromofor konjugati za biokemijsku dijagnostiku i bioaktivnost (HrZZ IP-2022-10-9829).



## Zahvale

*Prvenstveno bih se voljela zahvaliti mentorici Dijani. Hvala Vam na strpljenju, razumijevanju i maksimalnoj posveti da se eksperimentalni dio rada odradi bez većih problema. Također jedno veliko hvala na prenesenom znanju i svakoj pomoći prilikom rada u „kontejneru“, a i prilikom pisanja rada kod kuće. Zbog Vas mi je diplomski rad bio jedno vrlo pozitivno iskustvo koje mogu pamtiti doista samo po lijepim trenucima.*

*Zahvalila bih se i cijelom laboratoriju za biomolekularne interakcije i spektroskopiju, zbog vrlo ugodne atmosfere i pomoći pri snalaženju.*

*Hvala profesorici Ivi na svakom usmjerenju i savjetu kako bi se diplomski rad mogao s vrlo malo komplikacija provesti kroz sustav i da bih došla do obrane.*

*Od srca se zahvaljujem svojoj obitelji; mami, tati i sestri, koji su mi bili najveći oslonac tijekom cijelog studija i koji su me podržavali sve ove godine. Veliko hvala i dečku Tomislavu, koji me maksimalno motivira i podržava kako za svaku odluku u životu, tako i za cijeli studij te ono što me čeka poslije. Puno vas volim i neizmjereno sam zahvalna na svojoj podršci i povjerenju kroz cijelo obrazovanje, a i poslije njega.*

*Hvala svim prijateljima, prijateljicama, kolegama i kolegicama koji su mi uljepšali studiranje i bez kojih ovo studentsko doba ne bi moglo biti lakše, a niti upola ovoliko zabavno. □*

*Moram naglasiti svoje društvo, nas 8 je jedna od ljepših stvari koja mi je proizašla iz studiranja i hvala vam na svakoj podršci tijekom rokova, ispita, učenja, hvala vam na prekrasnim putovanjima te svakoj uspomeni koja mi danas stvara toplinu oko srca. Posebno hvala Kristini i Sari, što su prve dvije kolegice koje sam upoznala, a danas ih mogu nazvati najboljim prijateljicama. Bile ste uz mene u svakom dobrom i lošem trenutku od prvog dana na fakultetu i doista sam zahvalna na svakom savjetu, podršci, zagrljaju, osmijehu, zajedničkom učenju i višesatnim kavama. Svaki dan na fakultetu (i izvan njega) je bio lakši uz vas i veselim se što budućnost nosi, jer znam da ste vi u njoj.*



# Sadržaj

<b>SAŽETAK.....</b>	<b>X</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XIII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Nukleinske kiseline.....</b>	<b>3</b>
2.1.1. <i>Struktura nukleinskih kiselina.....</i>	<i>3</i>
2.1.2. <i>Dvostruka uzvojnica DNA.....</i>	<i>5</i>
<b>2.2. Interakcije malih organskih molekula s nukleinskim kiselinama .....</b>	<b>8</b>
<b>2.3. Fluorescentni senzori .....</b>	<b>11</b>
2.3.1. <i>Poliini izvedeni iz bis-triarilamina.....</i>	<i>12</i>
<b>2.4. Metode ispitivanja nekovalentnih interakcija malih organskih molekula s nukleinskim kiselinama .....</b>	<b>15</b>
2.4.1. <i>UV/Vis apsorpcijska spektroskopija .....</i>	<i>15</i>
2.4.2. <i>Molekulska fluorescencijska spektroskopija .....</i>	<i>17</i>
2.4.3. <i>Temperaturno mekšanje.....</i>	<i>20</i>
2.4.4. <i>Spektroskopija cirkularnog dikroizma (CD).....</i>	<i>22</i>
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1. Materijali .....</b>	<b>25</b>
3.1.1. <i>Kemikalije .....</i>	<i>25</i>
3.1.2. <i>Uređaji .....</i>	<i>27</i>
<b>3.2. Spektroskopska karakterizacija spojeva .....</b>	<b>27</b>
<b>3.3. Metode.....</b>	<b>28</b>
3.3.1. <i>Fluorimetrijske titracije .....</i>	<i>28</i>
3.3.2. <i>Temperaturno mekšanje.....</i>	<i>29</i>
3.3.3. <i>CD titracije .....</i>	<i>30</i>
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>31</b>
<b>4.1. Spektroskopska karakterizacija spojeva .....</b>	<b>31</b>
<b>4.2. Interakcija spojeva s polinukleotidima .....</b>	<b>33</b>
4.2.1. <i>Fluorimetrijske titracije .....</i>	<i>33</i>
4.2.2. <i>Temperaturno mekšanje.....</i>	<i>37</i>
4.2.3. <i>CD titracije .....</i>	<i>38</i>
<b>§ 5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>42</b>



---

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	44
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	46
§ 8. DODATAK.....	XV
8.1. Dodatak poglavlju 4. 1. Spektroskopska karakterizacija spojeva.....	xv
8.2. Dodatak poglavlju 4. 2. 1. Fluorimetrijske titracije.....	xx
8.3. Dodatak poglavlju 4. 2. 2. Temperaturno mekšanje.....	xxviii
8.4. Dodatak poglavlju 4. 2. 3. CD titracije.....	xxx
§ 9. ŽIVOTOPIS .....	XXXIII





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

Diplomski rad

## SAŽETAK

### SIMETRIČNI POLIINI IZVEDENI IZ BIS-TRIARILAMINA KAO FLUORESCENTNI SENZORI ZA DNA I RNA

Nina Vukadinović

Fluorescentne probe za analitičke svrhe su ključne za napredak u gotovo svim područjima prirodnih znanosti, a vrlo često pronalaze primjenu u specifičnoj detekciji polinukleotida. U okviru ovog rada provedena je spektroskopska karakterizacija pet spojeva izvedenih iz bis-triarilamina primjenom UV/Vis i fluorescencijske spektroskopije. Ispitan je utjecaj supstituenata na afinitet i način vezanja na prirodnu DNA te sintetske molekule DNA i RNA. Obradom fluorimetrijskih titracija pomoću Scatchardove jednadžbe metodom nelinearne regresijske analize dobivene su konstante stabilnosti kompleksa proba s polinukleotidima. Eksperimenti temperaturnog mekšanja polinukleotida i titracije metodom cirkularnog dikroizma su pokazali visok afinitet spojeva prema polinukleotidima, bez značajne selektivnosti prema specifičnim sekvencama. Dodatak ovih spojeva dvolančanim molekulama obično je rezultirao slabijom (de)stabilizacijom heliksa, osim jednog spoja koji je blago stabilizirao određeni tip DNA. Dobiveni rezultati ukazuju na potencijal ovih spojeva kao fluorescentnih senzora u biološkim istraživanjima.

(48 stranica, 54 slika, 6 tablica, 50 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: bis-triarilamini, cirkularni dikroizam, DNA, fluorescentne probe, UV/Vis

Mentor: dr. sc. Dijana Pavlović Saftić, zn. sur.

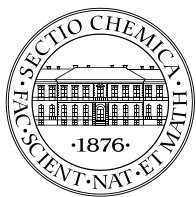
Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
  2. izv. prof. dr. sc. Đani Škalamera
  3. prof. dr. sc. Mirta Rubčić
- Zamjena: doc. dr. sc. Ivan Nemet

Datum diplomskog ispita: 16. listopada 2024.





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

Diploma Thesis

## **ABSTRACT**

Symmetrical polyynes derived from bis-triarylamine as fluorescence sensors for DNA and RNA

Nina Vukadinović

Fluorescent probes for analytical purposes are crucial for advancements in nearly all fields of natural sciences and are often used for the specific detection of polynucleotides. This study involved the spectroscopic characterization of five compounds derived from bis-triarylamines using UV/Vis and fluorescence spectroscopy. The influence of substituents on the affinity and binding mode to natural DNA and synthetic DNA and RNA molecules was investigated. Analysis of fluorimetric titrations using the Scatchard equation with nonlinear regression methods provided stability constants for the complexes with polynucleotides. Experiments on the thermal melting of polynucleotides and circular dichroism titrations demonstrated a high affinity of the compounds for polynucleotides, with no significant selectivity towards specific sequences. The addition of these compounds to double-stranded molecules generally resulted in weaker stabilization of the helix, except for one compound, which slightly stabilized a specific type of DNA. The results indicate the potential of these compounds as fluorescent sensors in biological research.

(48 pages, 54 figures, 6 tables, 50 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: bis-triarylamines, circular dichroism, DNA, fluorescent probes, UV/Vis

Mentor: dr. sc. Dijana Pavlović Saftić, Research Associate

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Reviewers:

1. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
  2. izv. prof. dr. sc. Đani Škalamera
  3. prof. dr. sc. Mirta Rubčić
- Substitute: doc. dr. sc. Ivan Nemet

Date of exam: 16th October 2024

## § 1. UVOD

Mnoge male, organske molekule koje se nekovalentno vežu na DNA i RNA imaju vrlo važnu primjenu u biokemiji, molekularnoj biologiji i medicini. Njihove nekovalentne interakcije s polinukleotidima važne su za razumijevanje mehanizama brojnih bolesti i djelovanja lijekova.<sup>1</sup> Tipovi nekovalentnih interakcija uključuju interkaliranje, vezanje u mali ili veliki utor polinukleotida i elektrostatske interakcije neutralnih ili pozitivno nabijenih molekula s fosfatnom okosnicom.<sup>2</sup>

Molekule DNA i RNA, zbog svojih ključnih funkcija u stanicama, kao što su replikacija, transkripcija i translacija, predstavljaju važne biomolekulske mete u razvoju terapija za razne bolesti, uključujući tumore, bakterijske, parazitske i virusne infekcije. Selektivno prepoznavanje sekundarnih struktura DNA, RNA i proteina vezanjem molekulskih proba ključan je dijagnostički alat. U tom području značajnu ulogu imaju fluorescentne male molekule te je od velike važnosti neprestano razvijati nove fluoroforne probe koje će biti selektivne i osjetljive prema specifičnoj biološkoj meti.<sup>3,4</sup> Fluorescentne male molekule, zbog svog aromatskog karaktera, mogu utjecati na biološku aktivnost, staničnu lokalizaciju i dinamiku biokemijskih procesa ciljanih biomolekula.

Posljednjih se godina kao posebna skupina fluorescentnih spojeva s primjenom u biološkom oslikavanju pojavljuju i triarilborani.<sup>5-7</sup> Jaka elektronakceptorska svojstva trisupstituiranog borovog atoma sterički očuvana glomaznim arilnim supstituentima čine ovu skupinu spojeva iznimno stabilnim fluoroforima čija su spektroskopska svojstva u interakcijama s polinukleotidima i proteinima detaljno istražena. Variranjem prenosnica kojima su povezane dvije borove podjedinice, dobivamo niz različitih spojeva čiji se utjecaj za primjenu u nekovalentnom fluorescentnom obilježavanju biomakromolekula tek istražuje.<sup>8</sup>

U ovom diplomskom radu, pet strukturnih analoga triarilborana pripremljenih u laboratoriju Instituta za anorgansku kemiju, Sveučilišta Julius-Maximilians u Würzburgu u Njemačkoj ispitano je spektroskopskim tehnikama dostupnima u Laboratoriju za biomolekularne interakcije i spektroskopiju na Institutu Ruđer Bošković. Spojevi se strukturno razlikuju od triarilborana po zamjeni borova atoma bočnih supstituenata atomom dušika, a



poliinska prenosnica je dodatno modificirana 2,3-dihidroindenilnim ili alifatskim motivom. Cilj rada bio je provesti spektroskopske studije primjenom neovisnih spektroskopskih metoda i utvrditi ulogu pojedine strukturne podjedinice na afinitet za ispitivane polinukleotide.

Provedena je spektroskopska karakterizacija pet spojeva izvedenih iz bis-triarilamina primjenom UV/VIS i fluorescencijske spektroskopije. Nadalje, ispitan je utjecaj supstituenata na afinitet i način vezanja na prirodnu DNA te sintetske DNA i molekule RNA. U tu svrhu, pored metode UV/Vis i fluorimetrije korištena je i spektroskopija cirkularnog dikroizma (CD). Ispitana je i selektivnost spojeva te utjecaj na stabilnost dvostruke uzvojnice polinukleotida eksperimentima temperaturnog mekšanja polinukleotida i CD titracijama. Na temelju rezultata fluorimetrijskih titracija, pomoću Scatchardove jednadžbe metodom nelinearne regresijske analize za spektroskopski aktivni kompleks, određene su konstante asocijacije ( $K_a$ ) kompleksa spojeva s različitim polinukleotidima.<sup>9</sup>

## § 2. LITERATURNI PREGLED

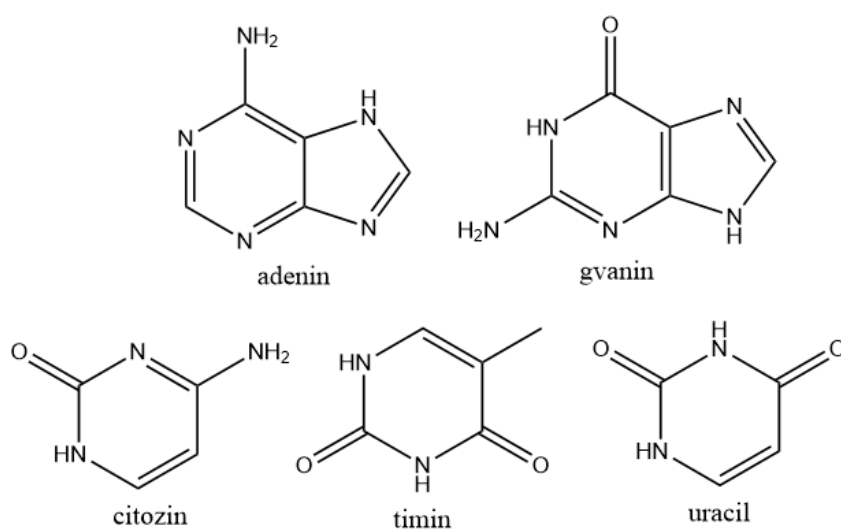
### 2.1. Nukleinske kiseline

Nukleinske kiseline su supstituirani polimeri aldopentoze riboze i nositelji genetičke informacije organizma. Razlikujemo dva glavna razreda nukleinskih kiselina, a to su ribonukleinska kiselina (RNA) i deoksiribonukleinska kiselina (DNA). DNA se nalazi u jezgri stanice i nositelj je osnovnog genetičkog koda. Molekule DNA su vrlo velike s relativnim molekulskim masama većim od 50 milijardi. RNA služi kao radna kopija pri dekodiranju stanične DNA te je mnogo manja molekula pa se lakše hidrolizira i cijepa na svoje sastavne dijelove u staničnim procesima.<sup>10</sup>

#### 2.1.1. Struktura nukleinskih kiselina

Osnovne građevne monomerne jedinice nukleinskih kiselina jesu nukleotidi, stoga se nukleinske kiseline još nazivaju i polinukleotidima. Nukleotidi su građeni od tri osnovne komponente, a to su dušična baza, šećer pentoza i fosfatni ostatak. Svaka molekula DNA i RNA sadrži po četiri monomera, koji se razlikuju po strukturi baza vezanih za ribozne jedinice.

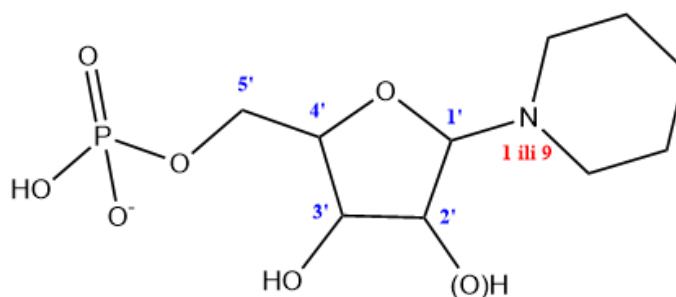
Dušične baze u sastavu nukleinskih kiselina su aromatske planarne heterocikličke strukture koje su derivati purina ili pirimidina. U strukturi molekule DNA mogu se naći adenin i gvanin kao derivati purina te citozin i timin kao derivati pirimidina. Molekulu RNA grade iste dušične baze, s iznimkom timina koji je zamijenjen uracilom.<sup>10,11</sup> Strukture spomenutih purinskih i pirimidinskih baza prikazane su na Slici 1.



Slika 1. Strukturne formule purinskih (adenin i gvanin) i pirimidinskih baza (citozin, timin i uracil)

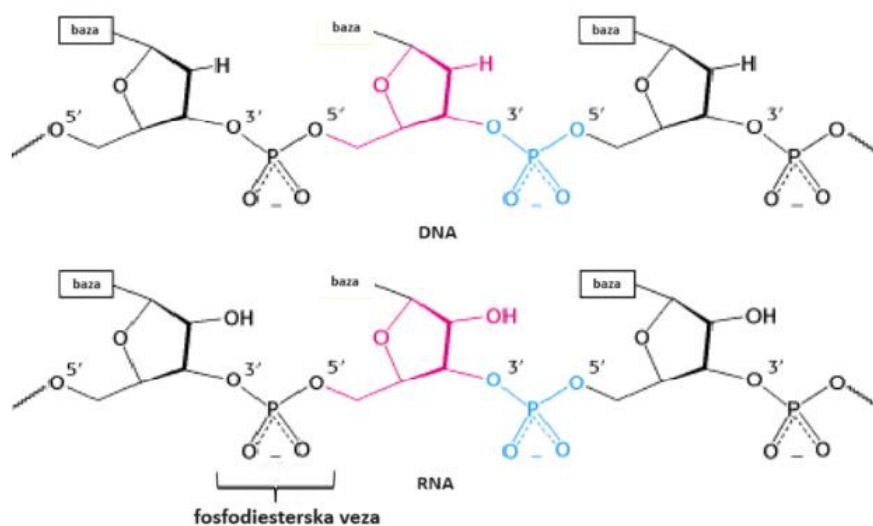
Osim po dušičnoj bazi, molekule RNA i DNA se strukturno razlikuju i po šećeru pentozu koja je osnova svakog nukleotida. Šećer u sastavu nukleotida može biti D-riboza prisutan u sastavu ribonukleinske kiseline te 2'-deoksi-D-riboza (D-riboza bez hidroksilne skupine na 2'-C atomu) u sastavu deoksiribonukleinske kiseline.

Vezivanjem heterocikličkih baza preko dušikova atoma na (deoksi)ribozu nastaju ribonukleozidi citidin, uridin, adenzin, gvanozin i deoksitimidin. Dušične baze vezane su na šećer preko atoma N-9 purina ili atoma N-1 pirimidina N- $\beta$ -glikozidnom vezom s 1'-C atomom šećera. Nukleozidne jedinice su međusobno spojene fosfatnim esterskim vezama, pri čemu je 5'-hidroksilna skupina svake jedinice esterificirana fosfornom kiselinom.<sup>11,12</sup> Fosforilirani ribonukleozid se naziva ribonukleotidom, čiji se shematski prikaz nalazi na Slici 2.



Slika 2. Shematski prikaz ribonukleotida

Dva se nukleotida međusobno povezuju fosfodiesterskom vezom između 5'-C fosfatne skupine jedne molekule nukleotida i 3'-C hidroksilne skupine druge molekule. Tako nastali niz šećera povezanih fosfodiesterskom vezom čini strukturnu okosnicu nukleinskih kiselina (Slika 3.).

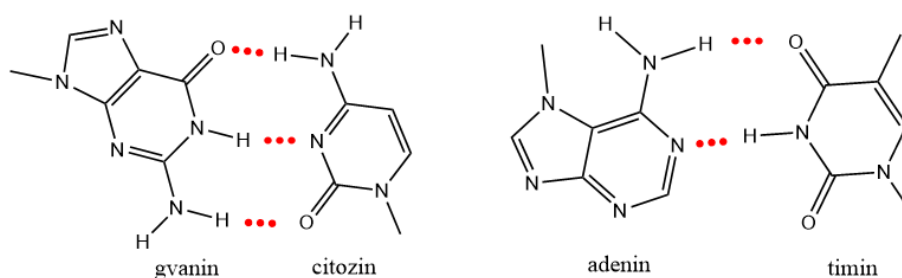


Slika 3. Prikaz fosfodiesterske veze u molekulama DNA i RNA; fosfatna skupina prikazana je plavom bojom, a šećer (2'-deoksi-D-riboza kod DNA i D-riboza kod RNA) rožom bojom. (preuzeto i prilagođeno iz ref. 10).

### 2.1.2. Dvostruka uzvojnica DNA

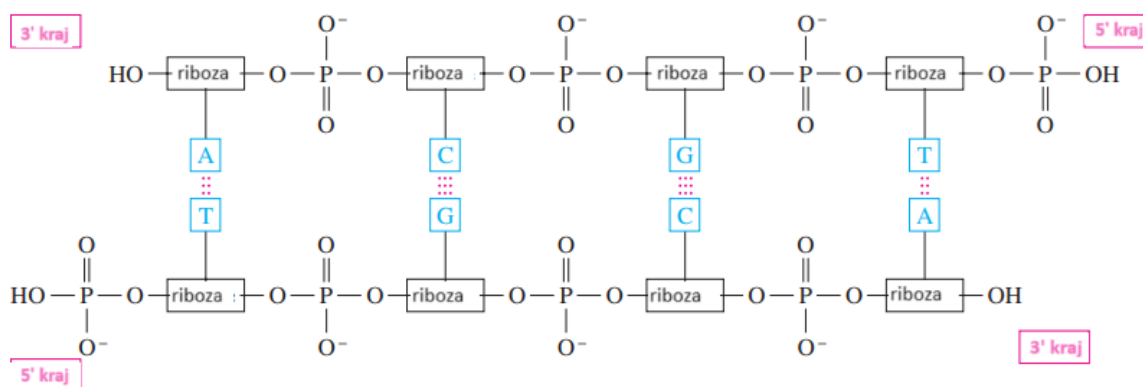
James D. Watson i Francis C. Crick su drugom polovicom dvadesetog stoljeća pomoću rendgenske strukturne analize DNA molekule odredili molekulsku strukturu i konformaciju polinukleotida. Dokazali su da se DNA sastoji od dvaju komplementarnih polinukleotidnih lanaca, koji su povezani vodikovim vezama nastalima sparivanjem baza. Određena pirimidinska baza spaja se stabilnom vodikovom vezom s jednom od dviju purinskih baza. Tako se citozin spaja s gvaninom preko triju, a timin (analogno vrijedi i za uracil u RNA) s adeninom preko dviju vodikovih veza (Slika 4). Takvo sparivanje baza je potvrdio i Erwin Chargaff, biokemičar prema kojemu je nazvano Chargaffovo pravilo: udio adenina prema timinu te gvanina naspram citozinu približno je jednak u molekulama DNA bez obzira na vrstu i organizam. Watson i Crick su otkrili kako su dva komplementarna lanca deoksiribonukleinske kiseline svijena u dvostruku uzvojnica oko iste osi, a promjer te uzvojnice je 20 Å. Jedan navoj uzvojnice sadržava 10 parova baza, a njegova je duljina 34 Å. Šećerno-fosfatna okosnica čini vertikalnu dvostruku uzvojnica, dok su heterocikličke baze usmjerene horizontalno prema

središtu. Na taj način je negativno nabijena šećerno-fosfatna okosnica izložena okolnom vodenom mediju, dok baze čine hidrofobnu unutrašnjost molekule. Negativni naboj okosnice stabilizira se elektrostatskim interakcijama s proteinima, poliaminima i metalnim ionima. Kako bi baze dodatno smanjile svoj doticaj s vodom, međusobno ostvaruju interakcije slaganja (engl. *stacking interaction*) u kojima uz  $\pi$ - $\pi$  interakcije aromatskih sustava, značajan doprinos imaju i van der Waalsove interakcije i interakcije dipol-dipol.<sup>11,13</sup>



Slika 4. Watson-Crickovi parovi baza

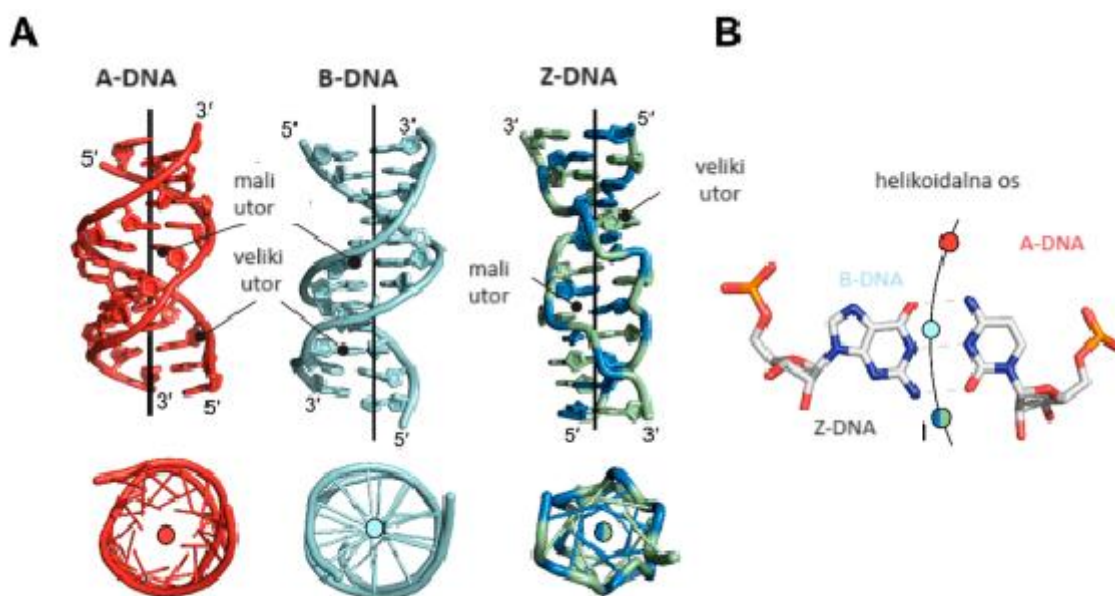
Dva su polinukleotidna lanca u molekuli DNA antiparalelna, odnosno jedan je usmjeren 3' – 5' slijeva udesno, a drugi 3' – 5' zdesna ulijevo. Dvostruka uzvojnica je desna, jer se dva polinukleotidna lanca obavijaju oko zajedničke osi stvarajući desnu uzvojnicu (Slika 5).



Slika 5. Antiparalelni lanci u molekuli DNA (preuzeto i prilagođeno iz reference 11).

Kao posljedica uvijanja antiparalelnih polinukleotidnih lanaca, DNA molekulu karakterizira postojanje velikog i malog utora u njenoj strukturi. Utori se stvaraju jer glikozidne veze u jednom baznom paru nisu u potpunosti suprotne jedna drugoj. Mali tor sadržava

pirimidinski O-2 i purinski N-3 baznog para, a veliki je utor na suprotnoj strani para. Osim veličine, utori se razlikuju po proton-donorima i proton-akceptorima koje posjeduju, a koji sudjeluju u specifičnim interakcijama s molekulama koje se vežu u utore nukleinske kiseline. Najpoznatiji strukturni oblici molekule DNA prikazani su na Slici 6.



Slika 6. a) Strukture A-DNA, B-DNA i Z-DNA b) Položaj helikoidalne osi obzirom na par baza G-C molekule A-, B- i Z-DNA.<sup>14</sup>

Na strukturi B-DNA, koja je najzastupljenija DNA u biološkim sustavima i pri fiziološkim uvjetima, jasno su definirani veliki i mali utor. Veliki je utor širok i plitak, a mali dubok i uzak. Struktura A-DNA također ima definirani veliki i mali utor koji su suprotnih dimenzija od B-DNA (mali utor je širok i plitak, a veliki je uzak i dubok). Uzvojnica tipa A šira je i kraća od B-uzvojnice, a ravnine njezinih parova baza nisu okomite na os uzvojnice već su nagnute u odnosu na nju.<sup>11,14,15</sup>

Oblik Z-DNA se najviše razlikuje po strukturi u odnosu na A- i B- oblik. Z-DNA formira lijevu zavojnicu uz karakterističnu cik-cak strukturu fosfodiesterske okosnice s dvanaest parova baza po okretu. Ponavljajuća jedinica je dinukleotid (alternacija purina i pirimidina). Struktura Z-DNA je izdužena i tanka sa slabo izraženim velikim utorom, dok je mali utor uzak i dubok.<sup>16,17</sup> U Tablici 1 prikazani su strukturni parametri za sva tri oblika molekule DNA.

Tablica 1. Usporedba strukturnih karakteristika oblika A-, B- i Z molekule DNA.

	A-DNA	B-DNA	Z-DNA
rotacija uzvojnice	desni	desni	lijevi
promjer uzvojnice/ Å	25,5	23,7	18,4
broj baznih parova po navoju	11	10,5	12
visinska razlika baznih parova/ Å	2,3	3,4	3,8
nagib baznog para prema osi zavojnice	19°	1°	9°
konformacija šećera	C-3' endo	C-2' endo	C-2' endo za pirimidine, C-3' za purine
konformacija glikozidne veze	anti	anti	izmjenično syn i anti
veliki utor	uzak i vrlo dubok	širok i prilično dubok	plošan
mali utor	veoma širok i plitak	uzak i prilično dubok	veoma uzak i dubok

Konformacija glikozidne veze *syn* i *anti* se odnose na orijentaciju N-glikozidne veze između baze i deoksiriboze. U *anti* položaju baza je udaljena od deoksiriboze dok je u *syn* položaju baza iznad deoksiriboze. Pirimidini mogu biti samo u *anti* orijentaciji, dok purini mogu biti i u *syn* i *anti* orijentaciji.<sup>11,13</sup>

## 2.2. Interakcije malih organskih molekula s nukleinskim kiselinama

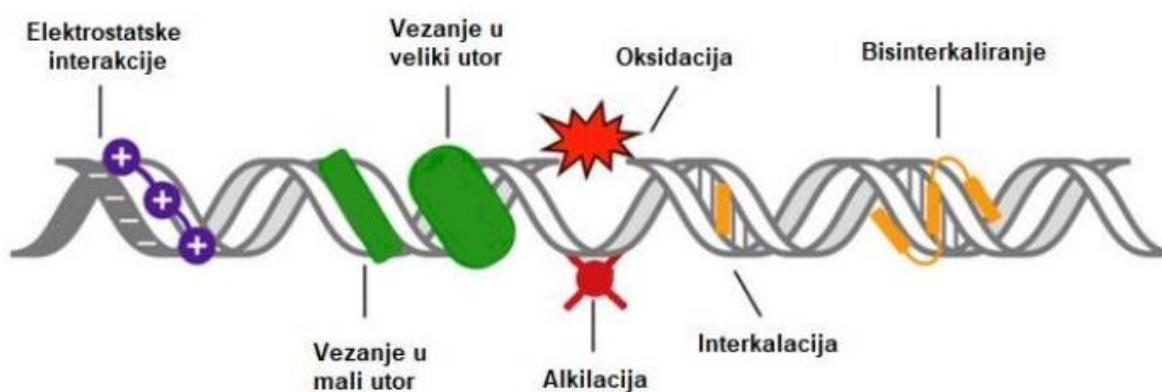
Nukleinske kiseline su izrazito važne molekule koje sudjeluju u staničnim procesima poput replikacije, transkripcije, translacije, rekombinacije i sl. Uvjet potreban za sudjelovanje u takvim procesima je strukturna fleksibilnost i dinamičnost molekule. Kako će se nukleinske kiseline ponašati ovisno o promjeni sredine i u ovisnosti o interakciji s drugim spojevima, poput malih organskih molekula, predmet je znanstvenih istraživanja današnjice. Spojevi koji se vežu na polinukleotide istražuju se zbog svojih terapijskih, antitumorskih i antibiotskih svojstva. Polinukleotidi koji se koriste u istraživanjima mogu biti prirodni i/ili sintetski.<sup>18</sup> Kao prirodni polinukleotid, vrlo često se koristi dvolančana molekula izolirana iz prsne žlijezde tele (engl. *calf-thymus* DNA, *ct*-DNA) koja se sastoji od 42 % parova baza GC i 58 % parova baza AT.<sup>19</sup>

Zbog heterogenog sastava i duljine prirodnih polinukleotida te nepoznavanja točnog redosljeda parova baza, za istraživanja se češće koriste sintetski polinukleotidi, poznatog sastava i ujednačene duljine lanaca.<sup>20</sup> U ovom su radu korišteni sljedeći sintetski polinukleotidi: dvolančani homopolinukleotidi strukture poli X – poli Y (poli rA – poli rU) i dvolančani alternirajući polinukleotidi strukture poli XY – poli XY (poli (dAdT)<sub>2</sub>, poli (dGdC)<sub>2</sub>).<sup>18,21</sup> Strukturni tip uzvojnice polinukleotida i parametri utora korištenih u ovom radu prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Oblik i dimenzije utora polinukleotida.

strukutra	oblik uzvojnice	širina utora/ Å		dubina utora/ Å	
		mali	veliki	mali	veliki
<b>ct-DNA</b>	B	5,7	11,7	7,5	8,5
<b>poli rA-poli rU</b>	A	10,9	3,8	2,8	13,5
<b>poli (dAdT)<sub>2</sub></b>	D	6,3	11,2	7,5	8,5
<b>poli (dGdC)<sub>2</sub></b>	A	9,5	13,5	7,2	10,0

Dva su osnovna načina kako će male organske molekule interagirati s polinukleotidima. Prvi način vezanja su ireverzibilne interakcije, kod kojih se stvaraju kovalentne veze s nukleinskim kiselinama, a do vezanja može doći i nekovalentnim, reverzibilnim interakcijama. Shematski prikaz ireverzibilnih i reverzibilnih interakcija nalazi se na Slici 7.



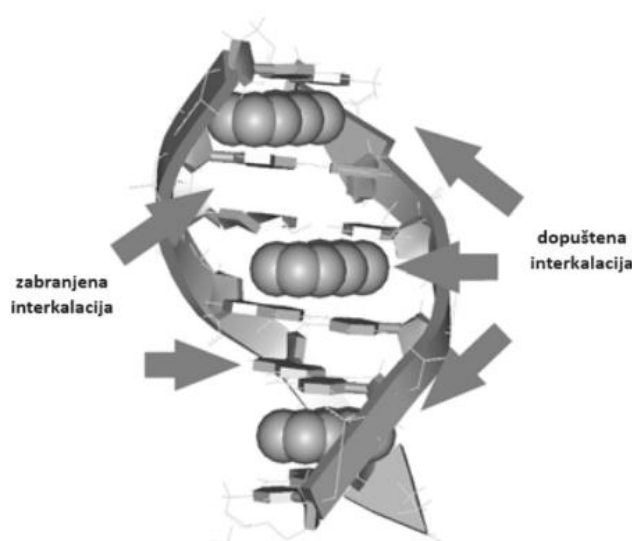
Slika 7. Shematski prikaz ireverzibilnih i reverzibilnih interakcija malih organskih molekula s polinukleotidima.<sup>21</sup>



Kovalentna interakcija je svaka vrsta interakcije u kojoj dolazi do trajne promjene strukture i funkcionalnosti polinukleotida, primjerice reakcije alkiliranja, platiniranja, metiliranja i oksidacije. Kod nekovalentnih interakcija razlikujemo tri osnovna načina vezanja: elektrostatske interakcije polikationskih spojeva s negativno nabijenim fosfatima polinukleotida, vezanje malih molekula u manji utor dvolančanih uzvojnica i interkaliranje.<sup>2,18</sup> Elektrostatske interakcije polikationskih spojeva s negativno nabijenim fosfatima polinukleotida opisuju direktnu ovisnost afiniteta o broju pozitivnih naboja male molekule. Takvi spojevi pokazuju malu ili nikakvu selektivnost vezanja s obzirom na slijed nukleotida u DNA ili RNA, što ne znači da nisu biološki važni. Primjer takve interakcije je niz pozitivno nabijenih alifatskih poliamina koji sudjeluju u biološkim procesima unutar stanice.<sup>18,20</sup>

Vezanjem malih molekula u manji utor dvolančanih uzvojnica drugi je način nekovalentne interakcije. Molekule koje se vežu u utor su najčešće izduženog, zakrivljenog, polumjesečastog oblika (engl. *crescent-shape molecules*) koji odgovara obliku utora nukleinskih kiselina. Takve molekule imaju i dodatne funkcionalne skupine (pozitivno nabijene dijelove) koje omogućuju vezanje na negativno nabijene fosfate i nastanak vodikovih veza s krajevima baza u manjem ili većem utoru. Velika većina spojeva pokazuje selektivnost prema manjem utoru dvostruke uzvojnice DNA u usporedbi s RNA, što se objašnjava oblikom dvostruke uzvojnice RNA, čiji je manji utor širi i plići i svojom veličinom ne odgovara maloj molekuli. Kod većine spojeva prevladava afinitet prema dAdT bogatim slijedovima DNA zbog steričke smetnje amino skupine gvanina, koja je usmjerena prema površini utora. Selektivnost spojeva prema vezanju ovisi o kombiniranom utjecaju vodikovih veza, van der Waalsovih i hidrofobnih te elektrostatskih interakcija s veznim mjestom polinukleotida.<sup>12,22</sup>

Treći način nekovalentne interakcije, interkalacija, jest umetanje planarne aromatske ili heteroaromatske molekule u paralelnoj orijentaciji između parova baza polinukleotida. Nastajanje takvih interkalativnih kompleksa stabilizira i ukrućuje polinukleotidni lanac te kao posljedica dolazi do produljenja uzvojnice, njenog razmatanja i deformacije. Male molekule se ne mogu interkalirati bilo gdje u polinukleotidnom lancu zbog principa “isključenja susjeda” (engl. *neighbour exclusion principle*) koji onemogućuje istovremeno vezanje između susjednih parova baza (slika 8).



Slika 8. Princip “isključenja susjeda”.<sup>2</sup>

Mehanizam interkaliranja je složen proces. Interkalator s pozitivno nabijenim dijelovima ostvaruje prvi kontakt s polinukleotidom stvarajući interakcije s negativno nabijenim fosfatima. Nakon približavanja, uspostavljanjem hidrofobnih interakcija između molekule i polinukleotida interkalator se može umetnuti između parova baza. Prijelaz molekule iz hidrofilne sredine u hidrofoban prostor između parova baza termodinamički je povoljno zbog pozitivnog doprinosa entropije, uzrokovano desolvatacijom liganda. Nakon umetanja molekule interkalatora, osim hidrofobnim interakcijama, stabilizacija između susjednih baza i interkalatora uspostavlja se i  $\pi$ - $\pi$  aromatskim interakcijama, a dijelovi molekule interkalatora mogu uspostaviti i dodatne interakcije (vodikove veze, Londonove disperzne interakcije i elektrostatske) koje stabiliziraju ili destabiliziraju nastali kompleks. Upravo te interakcije najčešći su uzrok selektivnosti (razlike u afinitetu) pojedinog interkalatora prema određenom tipu polinukleotida.<sup>23</sup>

### 2.3. Fluorescentni senzori

Fluorescentne boje ili probe su kemijski spojevi (uglavnom poliaromatski ugljikovodici ili heterocikli) koji apsorpcijom zračenja određene valne duljine emitiraju zračenje veće valne duljine, odnosno manje energije. Struktura fluorescentnih proba se najčešće sastoji od aromatskih prstenova i/ili dvostrukih konjugiranih veza. Fluorescentne probe se koriste kao kemijski senzori, odnosno kao molekularni receptori koji mogu osjetiti i precizno komunicirati

s analitom i generirati odgovor kao signal koji se može detektirati. Današnja važnost senzora jest njihova upotreba u različitim područjima prirodnih, biomedicinskih i tehničkih znanosti.<sup>17</sup>

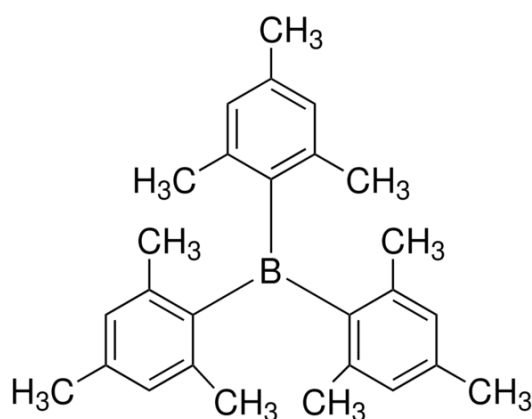
Mnoge male organske molekule su nekovalentni fluorescentni senzori za prepoznavanje polinukleotida i od izuzetnog su značaja za biomedicinsku dijagnostiku i istraživanja molekularne biologije. Međutim, uobičajene fluorescentne boje također imaju mnoge nedostatke. S obzirom na aromatski karakter i značajnu veličinu fluorofornih molekula, one vrlo često mogu utjecati na biološku aktivnost, staničnu lokalizaciju i dinamiku biokemijskih procesa ciljanih biomolekula. Stoga je od iznimne važnosti neprestano razvijati nove fluoroforne probe s ciljem što bolje diversifikacije bioloških meta.<sup>8</sup>

### 2.3.1. Poliiini izvedeni iz bis-triarilamina

Fluorescentne probe za analitičke svrhe su ključne za napredak u gotovo svim područjima prirodnih znanosti. Fluorimetrijska detekcija je daleko najintenzivnije korištena metoda za biološko oslikavanje i biokemijsku analizu. Međutim, razvoj novih proba usredotočio se na specifičan odgovor na određenu ciljnu molekulu, što u biološkim uzorcima često predstavlja problem zbog velike sličnosti ciljnih molekula (proteini, DNA, RNA, itd.).<sup>24</sup> Također, praćenje više od jedne fluorescentne boje istovremeno često predstavlja značajan izazov zbog potrebe za dodavanjem više vanjskih proba koje se moraju moći razlikovati u istom uzorku uzimajući u obzir preklapanje valnih duljina pobude i/ili emisije. Nadalje, moguće su i međusobne interakcije fluorescentnih vrsta, razlike u intenzitetu emisije, fotoosjetljivost uzorka, problemi s autofluorescencijom uzoraka koji sadrže proteine i hem, intrinzična fluorescencija nekih vrsta i dr.<sup>25</sup>

Triarilborani privukli su veliki interes zbog svojih zanimljivih elektronskih i fotofizičkih svojstava, a posljedično imaju i veliku primjenu; od linearne i nelinearne optike, kao spojevi za emisiju i elektronsku vodljivost, u uređajima OLED i kao luminiscentne probe za anione.<sup>26</sup> Tri-koordinirani borani su trigonske planarne geometrije, spadaju u Lewisove kiseline i imaju praznu  $p_z$  orbitalu, što ih čini snažnim elektron akceptorima kada su vezani na konjugirane  $\pi$ -sustave, omogućujući dizajn spojeva za prijenos naboja. Podložni su nukleofilnom napadu, čiji je rezultat ili pucanje veze ili formiranje četverostruko koordiniranih borana, u kojima bor nije više elektron-deficijentan. Kako bi se spriječio napad nukleofila poput vode, uvode se glomazni supstituenti na bor koji sterički onemogućuju pristup nukleofila boru ili se bor ugrađuje u rigidne planarne strukture.<sup>5,7</sup> Jaka elektronakceptorska svojstva

trisupstituiranog borovog atoma, sterički očuvana glomaznim arilnim supstituentima čine ovu skupinu spojeva iznimno stabilnim fluoroforima čija su spektroskopska svojstva u interakcijama s DNA/RNA i proteinima (BSA) detaljno istražena. Triarilborani su jako dobri kromofori jer tokom njihove eksitacije dolazi do apsorpcije dva fotona svjetlosti i dolazi do velike promjene u dipolnom momentu. Zbog toga su dobri kandidati za dvofotonsku fluorescentnu pobudnu mikroskopiju (engl. *two-photon excited fluorescence*, TPEF) živih stanica i tkiva. Problem takvih triarilborana jest njihova vrlo slaba topljivost u vodi pa je otežana njihova primjena u *in vivo* i *in vitro* eksperimentima. Topljivost u vodi se može poboljšati uvođenjem pozitivnih naboja, čime dolazi do povećanja Lewisove kiselosti centralnog bora. Tako se modifikacijom  $\pi$ -mosta s obzirom na broj i prirodu arilnog supstituenta vezanog za centralni atom bora može utjecati na fotofizička svojstva samog spoja.<sup>27</sup> Primjer jednog triarilborana nalazi se na Slici 9.



Slika 9. Struktura trimesitilborana.

Variranjem različitih premosnica kojima su povezane dvije borove podjedinice (tiofen, antracen, benzen<sup>6</sup>, di-<sup>5</sup>/tetra<sup>7</sup>-in, itd.) proučava se njihov utjecaj na spektroskopski odgovor i afinitet pojedinog spoja u nekovalentnoj interakciji s biomakromolekulama (DNA, RNA, proteini, itd.). Kraći poliini, poput di-/tri-/tetraina, su uobičajena klasa prirodnih spojeva te se nalaze čak i u povrću, a primjerice diini u mrkvi, celeru i peršinu i pokazuju razne biološke aktivnosti. Poliini se potencijalno mogu primijeniti kao farmaceutici ili funkcionalni spojevi. Oni mogu služiti kao molekularne žice ili kao komponente fluorescentnih boja, kao što je crveno emitirajući tetrain prikazan na Slici 10.<sup>5,28</sup>



Slika 10. Primjer tetraarilske boje koja emitira crvenu svjetlost.<sup>5,28</sup>

Različite provedene studije karakterizirale su poliinsku prenosnicu kao iznimno važnu strukturnu komponentu koja, osim što diktira orijentaciju terminalnih supstituenata zahvaljujući svom rigidnom karakteru, pruža i mogućnost proučavanja interakcija s biomakromolekulama spektroskopskom tehnikom površinski pojačanog Ramanovog raspršenja (engl. *Surface-enhanced Raman spectroscopy*, SERS). SERS je tehnika vibracijske spektroskopije koja se temelji na pojačanju Ramanovog raspršenja molekula adsorbiranih na nanostrukturiranu površinu metala. Ramanova (SERS) metoda je idealna jer koristi valne duljine u infracrvenom (IR) području, čime se ne preklapa s fluorescencijom u vidljivom području. IR zračenje dobro prodire u živo tkivo, omogućujući bezopasno zračenje i prikupljanje signala duboko u uzorku ili čak živom organizmu. Ramanova SERS metoda uspješna je metoda detekcije opisanih spojeva i tehnika je komplementarna fluorescenciji.<sup>29</sup>

U ovom radu, strukturni analozi triarilborana pripremljeni na Institutu za anorgansku kemiju u Würzburgu, proučavani su spektroskopskim tehnikama dostupnima u Laboratoriju za biomolekularne interakcije i spektroskopiju IRB-a. Korištene su UV/Vis i fluorimetrijska spektroskopija te cirkularni dikroizam. Spojevi koji su predmet ovog istraživanja strukturno se razlikuju od ranije ispitivanih boranskih derivata po tome što je borov atom bočnih supstituenata zamijenjen atomom dušika. Nadalje, poliinska prenosnica dodatno je modificirana 2,3-dihidroindenilnim ili alifatskim motivom, čime je ispitan utjecaj središnje jedinice ovih utegu-nalik štapićastih molekula (engl. *rod-like dumbbell structures*).<sup>30</sup>

## 2.4. Metode ispitivanja nekovalentnih interakcija malih organskih molekula s nukleinskim kiselinama

U daljnjem tekstu detaljnije će biti opisane metode korištene u eksperimentalnom dijelu ovog diplomskog rada: UV/Vis i fluorescencijska spektroskopija, promjena temperature „mekšanja“ dvostruke uzvojnice nakon vezanja ispitivanog spoja i spektroskopija cirkularnog dikroizma.

### 2.4.1. UV/Vis apsorpcijska spektroskopija

Spektroskopija je znanost koja se bavi proučavanjem interakcije elektromagnetskog zračenja i tvari. Mjereno svojstvo je valna duljina i intenzitet elektromagnetskog zračenja koju analit apsorbira ili emitira. Ovisno o valnoj duljini zračenja, dolazi do različitih promjena u atomu ili molekuli na kvantnoj razini. Zračenje se iz izvora usmjerava na uzorak koji može apsorbirati, raspršiti ili reflektirati svjetlo. Ukoliko uzorak emitira zračenje, izvor zračenja je sam uzorak. Zračenje iz izvora putuje prema monokromatoru, koji propušta samo jednu valnu duljinu, prolazi kroz uzorak i nakon toga ide prema detektoru koji zatim primljeno zračenje pretvara u signal, koji se u konačnici zapisuje kao spektar.<sup>31</sup>

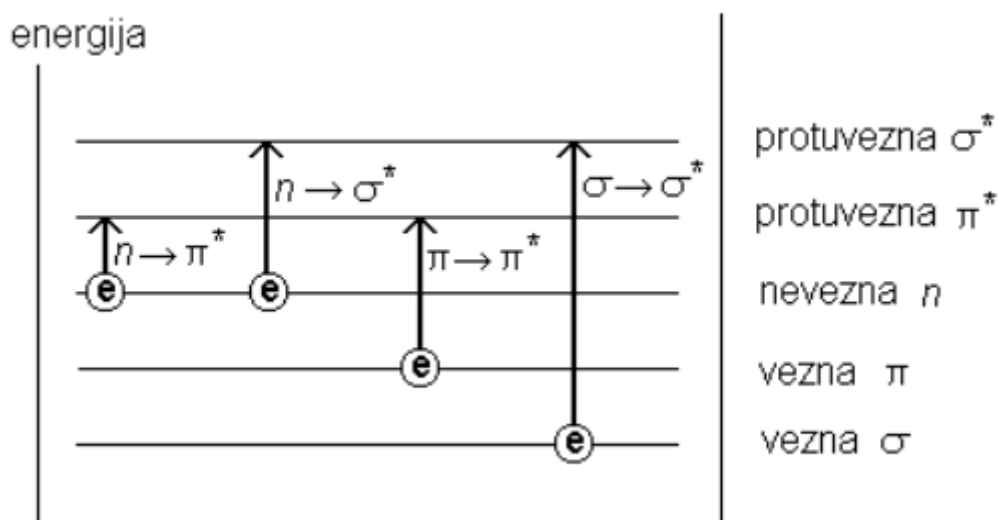
Ultraljubičasta i vidljiva apsorpcijska (UV/Vis) spektroskopija se temelji na apsorpciji ultraljubičastog (engl. *ultraviolet*, UV; 200–380 nm) i vidljivog (engl. *visible*, Vis; 380–800 nm) zračenja. Glavna primjena molekulske spektroskopije je u kvantitativnoj analizi zbog svoje osjetljivosti i jednostavnosti. Apsorpcijom upadnog UV ili vidljivog zračenja dolazi do prijelaza elektrona u molekuli, što uzrokuje smanjenje intenziteta propuštenog zračenja i stvaranje apsorpcijskih spektara. Omjer intenziteta upadnog zračenja ( $I_0$ ) i intenziteta zračenja nakon prolaska kroz uzorak ( $I$ ) naziva se transmitancija ( $T$ ).<sup>32</sup> Apsorbancija analita s njegovom koncentracijom je izravno povezana Lambert-Beerovim zakonom (1) koji vrijedi samo za zračenje određene valne duljine i niske koncentracije.

$$(1) A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon bc,$$

gdje  $A$  predstavlja apsorbanciju uzorka pri definiranoj valnoj duljini,  $\epsilon$  molarnu apsorptivnost ili molarni apsorpcijski koeficijent ( $\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ ),  $b$  duljinu optičkog puta izraženu u cm i  $c$  molarnu koncentraciju ispitivanog spoja izraženu u  $\text{mol dm}^{-3}$ . Molarni apsorpcijski koeficijent veličina je karakteristična za svaki spoj i predstavlja mjeru efikasnosti elektronskog prijelaza.<sup>33</sup>

Funkcionalna skupina u molekuli koja je odgovorna za apsorpciju zračenja naziva se kromofor. Kromofori su uglavnom nezasićene organske skupine (koje sadrže dvostruke i/ili trostruke veze i aromatske sustave) čiji se elektroni mogu pobuditi UV i vidljivim zračenjem.

Pobuda elektrona vodi elektronskom prijelazu iz popunjene vezne molekulske orbitale u osnovnom energetsom stanju ( $\sigma$ ,  $\pi$ ,  $n$ ) u antiveznu molekulsku orbitalu više energije ( $\sigma^*$ ,  $\pi^*$ ). Elektronske prijelaze možemo klasificirati prema tipu orbitala čija se populacija mijenja prilikom apsorpcije zračenja, pa su tako mogući  $\sigma \rightarrow \sigma^*$ ,  $\sigma \rightarrow \pi^*$ ,  $\pi \rightarrow \sigma^*$ ,  $\pi \rightarrow \pi^*$ ,  $n \rightarrow \pi^*$  i  $n \rightarrow \sigma^*$  prijelazi. Oznaka  $\pi \rightarrow \pi^*$  znači da je elektron prešao iz vezne  $\pi$  orbitale u protuveznu  $\pi^*$  orbitalu.<sup>34</sup> Mogući prijelazi elektrona između molekulskih orbitala prikazani su na Slici 11.



Slika 11. Prijelazi elektrona između molekulskih orbitala.<sup>35</sup>

Najmanju energiju koju je potrebno uložiti imaju  $\pi \rightarrow \pi^*$  i  $n \rightarrow \pi^*$  prijelazi. Za takve prijelaze potrebna je nezasićena skupina u molekuli s  $\pi$  elektronima, koji nisu jako vezani pa ih se može pobuditi zračenjem čija je valna duljina u području od 200 do 800 nm. U organskim molekulama najčešći su  $\pi \rightarrow \pi^*$  i  $n \rightarrow \pi^*$  prijelazi budući da upravo tim prijelazima odgovara energija UV i Vis zračenja.<sup>34,35</sup>

Valna duljina apsorpcije specifična je za svaki kromofor, ali prisutnost konjugiranih sustava, auksokroma ili otapala može utjecati na položaj i intenzitet apsorpcijskog maksimuma. To može rezultirati povećanjem (hiperkromni efekt) ili smanjenjem (hipokromni efekt) intenziteta apsorpcijskog maksimuma, kao i pomicanjem apsorpcijskog maksimuma prema većim (batokromni efekt) ili manjim (hipsokromni efekt) valnim duljinama.<sup>34</sup>

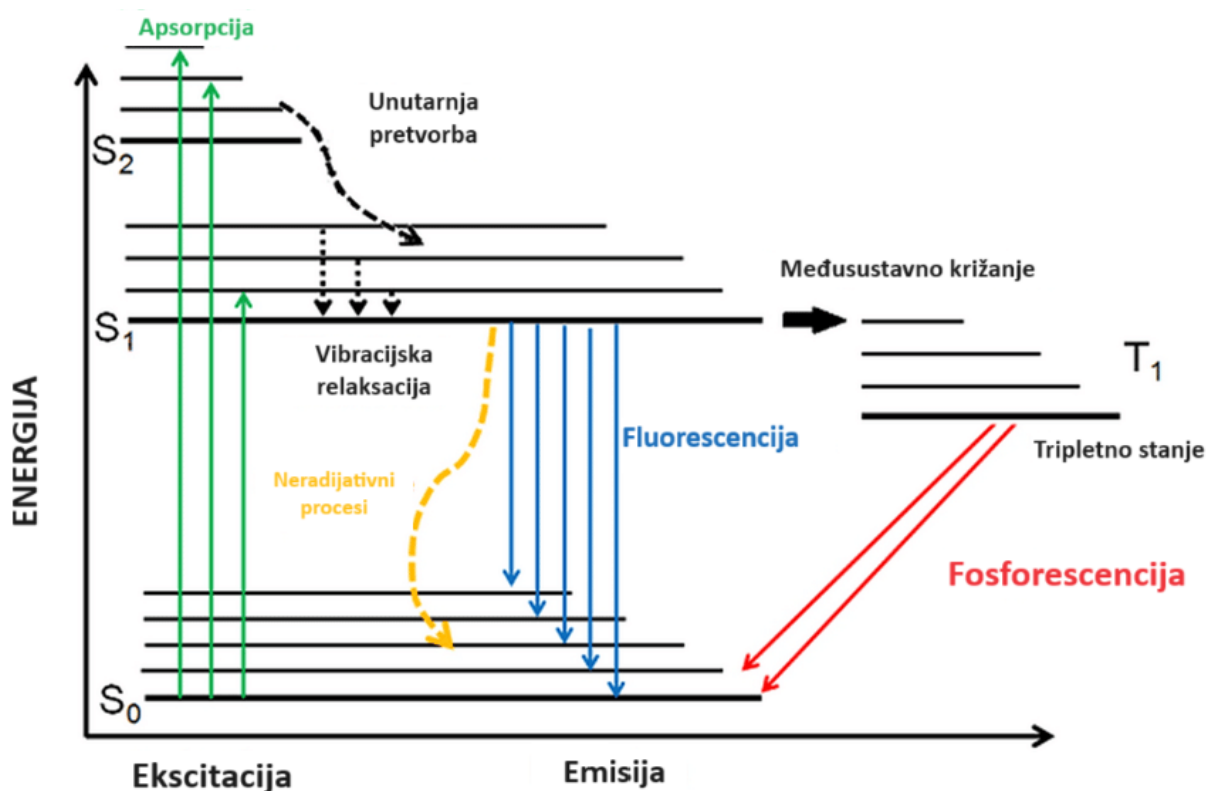
Zbog linearnog odnosa između apsorpcije i koncentracije tvari unutar određenog koncentracijskog područja, te brojnih anorganskih, organskih i biokemijskih vrsta koje apsorbiraju UV ili Vis zračenje, UV/Vis apsorpcijska spektroskopija široko se koristi u

kemijskim i kliničkim laboratorijima za kvantitativne analize. Osjetljivost ove metode omogućava detekciju tvari pri niskim koncentracijama ( $1 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>). Metoda je umjereno selektivna jer se preklapanje širokih apsorpcijskih maksimuma može zakomplicirati izravnu analizu smjesa. Ipak, s odvojenim apsorpcijskim vrpama karakterističnim za pojedine molekule i zahvaljujući aditivnosti vrijednosti apsorpcije svih vrsta u sustavu, moguće je istovremeno odrediti više sastojaka u smjesi. Analiza spektra elektromagnetskog zračenja provodi se spektrofotometrom koji mjeri apsorpciju u ovisnosti o valnoj duljini. Sastoji se od izvora zračenja (lampa ili žarulja), filtera (monokromatora), kivete s uzorkom, detektora i računala. Kada svjetlo prođe kroz otopinu, dio zračenja se apsorbira, a dio prolazi kroz otopinu. Spektrofotometrom se mjeri neapsorbirano zračenje koje je prošlo kroz analizirani uzorak i uspoređuje ga s intenzitetom ulazne svjetlosti. Rezultat je UV/Vis spektar koji sadrži jednostavne ili složene vrpce zbog energijskih prijelaza različitih rotacijskih i vibracijskih energijskih nivoa.<sup>32</sup>

#### 2.4.2. Fluorescencijska spektroskopija

Fluorescencijska spektroskopija je metoda molekulske spektroskopije koja se temelji na emisiji zračenja. Kada se molekula pobudi UV ili vidljivim zračenjem u više elektronsko stanje, slijede procesi otpuštanja energije koji vraćaju molekulu u osnovno elektronsko stanje. Relaksacija ili povratak u osnovno stanje se može odvijati radijativnim i neradijativnim procesima. Većina molekula prolazi kroz vibracijsku relaksaciju, unutarnju pretvorbu i međusustavno križanje, pri čemu se gubi energija bez emisije zračenja, jer su takvi neradijativni procesi najbrži. Radijativni deaktivacijski proces tijekom kojeg molekula emitira zračenje pri prijelazu između stanja istog multipliciteta naziva se fluorescencija. Zbog učestalosti unutarnje pretvorbe, fluorescencija se pojavljuje pri jednoj specifičnoj valnoj duljini, iz prvog pobuđenog elektronskog stanja, neovisno o valnoj duljini pobude.<sup>33</sup> Sama struktura spoja će utjecati na mogućnost fluorescencije. Općenito vrijedi da rigidne strukture pogoduju pojavi fluorescencije jer otežavaju neradijativnu relaksaciju, odnosno pružaju dovoljno vremena da se dogodi fluorescencija. Osim fluorescencije, može doći i do fosforescencije, međusustavnog prijelaza tijekom kojeg dolazi do promjene spina pobuđenog elektrona što rezultira promjenom multipliciteta.<sup>31,33</sup> Energijske razine i prijelaze najbolje opisuje dijagram Jablonskog, prikazan na Slici 12.





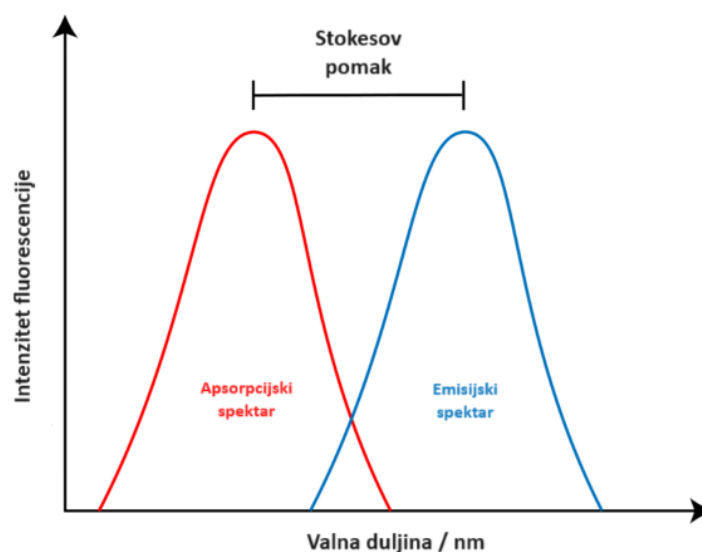
Slika 12. Dijagram energijskih razina i prijelaza.

Pri određenim valnim duljinama pobude i emisije, intenzitet emitiranog zračenja ( $F$ ) proporcionalan je koncentraciji ( $c$ ) prema jednadžbi (2):

$$(2) F = K I_0 c l \varepsilon \Phi$$

gdje  $K$  predstavlja konstantu instrumenta,  $I_0$  intenzitet pobudnog zračenja,  $c$  molarnu koncentraciju tvari u otopini izraženu u  $\text{mol dm}^{-3}$ ,  $l$  duljinu puta zračenja izraženu u  $\text{cm}$ ,  $\varepsilon$  molarni ekstinkcijski koeficijent izražen u  $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{cm}^{-1}$  i  $\Phi$  kvantni prinos. Budući da intenzitet fluorescencije izravno ovisi o snazi pobudnog zračenja, fluorescencijska spektroskopija je osjetljivija metoda od apsorpcijske spektroskopije i omogućava detekciju analita pri vrlo niskim koncentracijama (reda veličine  $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ ). Zahvaljujući svojoj osjetljivosti i selektivnosti, razvijene su brojne kvantitativne fluorimetrijske metode koje se primjenjuju u analizi prehrambenih i farmaceutskih proizvoda, bioloških uzoraka i uzoraka iz okoliša.<sup>35,36</sup>

Pobudni i emisijski spektri su karakteristični za molekule koje fluoresciraju, što čini fluorescencijsku spektroskopiju selektivnom metodom. Pobudni spektar prikazuje ovisnost fluorescencije o valnoj duljini pobude te se snima pri definiranoj valnoj duljini emisije i konstantnim širinama pukotine, dok emisijski spektar prikazuje ovisnost fluorescencije uzorka o valnoj duljini emisije, a snima se pri valnoj duljini pobude. Emisijski spektar je karakterističan za svaku tvar i neovisan je o valnoj duljini pobude.<sup>37</sup> Spektri pokazuju zrcalnu simetriju prikazanu na Slici 13.



Slika 13. Shematski prikaz pobudnog i emisijskog spektra (preuzeto i prilagođeno iz ref. 37).

Stokesov pomak ( $\Delta\lambda$ ) se pojavljuje kod emisijskih i apsorpcijskih spektara, gdje je emitirana energija manja od pobudne i emisija se obavlja na većoj valnoj duljini nego pobuda te se može izračunati kao razlika između valne duljine emisije u odnosu na valnu duljinu pobude ( $\Delta\lambda = \lambda_{Em} - \lambda_{Abs}$ ). Fluorescencijski pobudni i emisijski spektri snimaju se pomoću spektrofluorimetra koji sadrži dva monokromatora. Uređaj usmjerava zračenje iz izvora kroz primarni monokromator, koji propušta pobudno zračenje (maksimum apsorpcije) do uzorka. Uzorak nakon pobude emitira zračenje u svim smjerovima, ali se ono emitirano pod pravim kutem razlaže sekundarnim monokromatorom i detektira fotomultiplikatorom. Kako bi se umanjile fluktuacije snage zračenja izvora, koriste se dvosnopni spektrofluorimetri, pri čemu se snaga referentnog snopa zračenja prigušivačem smanjuje na razinu snage fluorescencijskog zračenja. Za mjerenje fluorescencijskih spektara koriste se kvarcne kivete.

Fluorimetrijska titracija je analitička metoda koja se koristi za određivanje koncentracije tvari na temelju njihove fluorescencije. Ova tehnika temelji se na interakciji između fluorofora (tvari koje emitiraju svjetlost nakon apsorpcije svjetlosti) i analita. Prati se promjena emisijskog spektra nakon što se u otopinu doda polinukleotid. Pomoću fluorimetrijske titracije može se odrediti konstanta asocijacije ( $K_a$ ), koja nam govori o stabilnosti nastalog kompleksa i utjecaju male organske molekule na biomakromolekulu. Konstanta asocijacije nastalog kompleksa SP stoga se može prikazati prema jednadžbi (3):

$$(3) K_a = \frac{[SP]}{[S] \cdot [P]}$$

gdje [S] predstavlja koncentraciju spoja, [P] predstavlja koncentraciju polinukleotida, a [SP] koncentraciju nastalog kompleksa. Izračun konstante asocijacije se temelji na Scatchardovoj jednadžbi, izvedenoj iz Langmuirove izoterme (4):

$$(4) r/c_{vs} = K_a \cdot (r_{vs} - r),$$

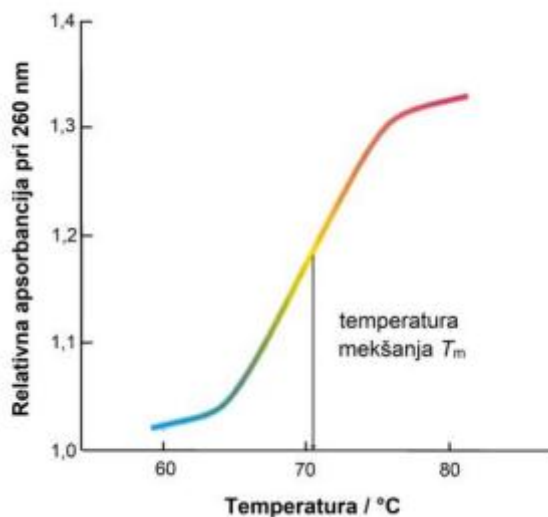
pri čemu  $r$  predstavlja omjer koncentracija spoja i polinukleotida,  $c_{vs}$  predstavlja ravnotežnu koncentraciju vezanog spoja,  $r_{vs}$  je omjer koncentracija vezanog spoja i polinukleotida, a  $K_a$  je konstanta asocijacije kompleksa polinukleotida i spoja.<sup>9</sup>

#### 2.4.3. Temperaturno mekšanje

Temperaturno mekšanje je važan koncept u proučavanju biomakromolekula, osobito DNA i dvolančanih RNA. Ovaj proces se odnosi na promjenu sekundarne strukture polinukleotida povećanjem temperature. Zagrije li se temperatura otopine koja sadrži polinukleotid, primjerice DNA, iznad određene temperature, DNA će se denaturirati. Pojedini lanci se odvajaju i zauzimaju strukturu nasumičnog klupka.<sup>38</sup>

Denaturacijom molekule mijenja se i njena apsorpcija, stoga se za praćenje temperaturnog mekšanja koriste spektroskopske metode, poput UV/Vis i fluorescencijske spektroskopije. Ove metode omogućuju mjerenje apsorpcije ili relativnog intenziteta fluorescencije pri različitim temperaturama. Kada se DNA denaturira, baze postaju razmjerno pokretne i dolazi do hiperkromnog efekta, a apsorpcija poraste za otprilike 40 % na svim valnim duljinama u ultraljubičastom dijelu spektra. Denaturacija je kooperativan proces, što

znači da razdvajanje uzvojnice na jednom mjesto destabilizira ostatak uzvojnice i potiče daljnju denaturaciju. Karakteristična temperatura u središnjoj točki krivulje, kada je 50 % strukture denaturirano, naziva se temperatura mekšanja ( $T_m$ ) i mjera je stabilnosti uzvojnice DNA.<sup>39</sup> Krivulja denaturacije prikazuje ovisnost relativne apsorbancije pri 260 nm (apsorpcija baza) o temperaturi (Slika 14).



Slika 14. Denaturacijska krivulja polinukleotida.<sup>38</sup>

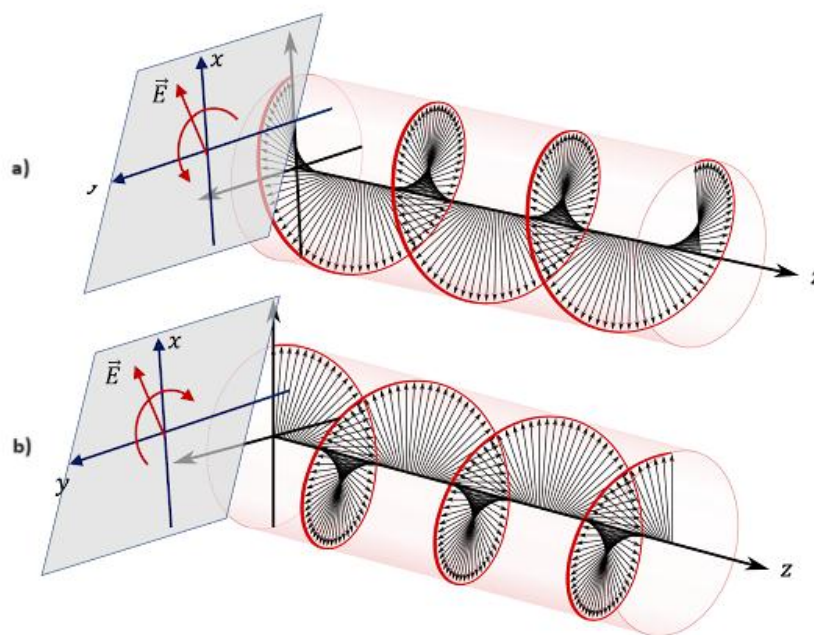
Temperatura mekšanja karakteristična je za svaki polinukleotid, a na vrijednost utječe nekoliko čimbenika. Budući da su GC parovi stabilizirani trima vodikovim vezama, a AT parovi samo s dvije, polinukleotidi s većim udjelom GC parova baza bit će stabilniji od onih s većim udjelom AT parova baza. Također, povećanjem ionske jakosti otopine polinukleotida raste temperatura mekšanja. Veća ionska jakost otopine znači veću dielektričnu konstantu otapala zbog koje će se stabilizirati negativni naboji na fosfatnoj okosnici. Ekstremno visoke vrijednosti pH dovode do pucanja vodikovih veza među bazama što destabilizira uzvojnica pa su lužine prikladne za denaturaciju DNA, jer ne narušavaju njenu kovalentnu strukturu, dok dovode do hidrolize RNA. Na stabilnost uzvojnice polinukleotida utječe i vezanje malih organskih molekula. Interakcija polinukleotida s malom molekulom, ovisno o načinu interakcije, može stabilizirati ili destabilizirati uzvojnica polinukleotida.<sup>11,38</sup> Kako bi se odredio učinak na stabilnost uzvojnice mjeri se vrijednost temperatura mekšanja samog polinukleotida i polinukleotida u kompleksu s malom molekulom ( $\Delta T_m$ ). Pozitivna vrijednost  $\Delta T_m$  ukazuje na stabilizaciju polinukleotida pri interakciji s molekulom dok negativna vrijednost  $\Delta T_m$  ukazuje na destabilizaciju polinukleotida. Osim utjecaja na stabilnost, takav eksperiment pruža informaciju

i o selektivnosti samog spoja prema sastavu i strukturnim značajkama pojedinih polinukleotida.<sup>40</sup> Interkalativni način vezanja stabilizira dvostruku uzvojnica i daje pozitivne vrijednosti  $\Delta T_m$ . U slučaju kada ispitivani spoj s polinukleotidom tvori više različitih tipova kompleksa javlja se karakteristična višefazna denaturacijska krivulja.<sup>41</sup>

#### 2.4.4. Spektroskopija cirkularnog dikroizma (CD)

Cirkularni dikroizam (skraćeno CD) je spektroskopska metoda koja daje informacije o kiralnosti molekule. Koristi se kod proučavanja i kvantifikacije optički aktivnih spojeva i njihovih interakcija. Kiralne ili asimetrične molekule različito apsorbiraju lijevo i desno polarizirano zračenje. Informacije iz CD spektra omogućuju identifikaciju kiralnih spojeva, predviđanje sekundarnih struktura proteina i drugih bioloških makromolekula, te praćenje procesa vezivanja liganda. CD pronalazi primjenu u znanosti, farmaceutskoj industriji (za praćenje razvoja kiralnih lijekova) i medicini rada (za praćenje izloženosti populacije toksičnim tvarima).<sup>42</sup>

Elektromagnetsko zračenje se sastoji od oscilirajućeg magnetskog i električnog polja čiji su vektori okomiti jedan na drugi i na smjer širenja zračenja. Polarizirano zračenje karakterizira pojava nesimetrične oscilacije električnog i magnetnog polja. U slučaju linearno polarizirane svjetlosti magnituda oscilira, a smjer vektora je konstantan za razliku od cirkularne gdje je magnituda konstantna, a vektor oscilira. Kod cirkularne polarizirane svjetlosti vektor električnog i magnetskog polja rotira oko osi duž koje se širi uz konstantni intenzitet, a ovisno o smjeru rotacije razlikujemo lijevu i desnu cirkularno polariziranu svjetlost, koje promatramo kao dvije različite komponente. Ukoliko električni vektor rotira u smjeru kazaljke na satu, riječ je o desno polariziranom zračenju (engl. *Right-handed Circularly Polarized (R-CP) light*), a kada rotira u smjeru suprotnom od kazaljke na satu, govori se o lijevo polariziranom zračenju (engl. *Left-handed Circularly Polarized (L-CP) light*).<sup>43</sup> (Slika 15).



Slika 15. a) Lijevo i b) desno cirkularno polarizirano svjetlo (preuzeto i prilagođeno iz ref. 43).

Polarizirano elektromagnetsko zračenje je kiralno, odakle se javlja različita apsorpcija lijevog i desnog polariziranog zračenja kod kiralnih molekula. Kod optički neaktivnih tvari dolazi do jednake apsorpcije lijeve i desne komponente polarizirane svjetlosti. Razlika u apsorpciji lijevog i desnog polariziranog svjetla kod kiralnih molekula može se mjeriti i kvantificirati prema Beer-Lambertovom zakonu (5):

$$(5) \Delta A = (A_L - A_R) = (\varepsilon_L - \varepsilon_R) \cdot c \cdot l,$$

pri čemu je razlika u molarnoj apsorptivnosti ( $\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$ ) molarni cirkularni dikroizam. Molarni cirkularni dikroizam ovisi o valnoj duljini i konformaciji molekule koja apsorbira zračenje.<sup>42,44</sup> Cirkularni dikroizam mjeri se pomoću CD spektrometra koji se sastoji od izvora zračenja, monokromatora, fotoelastičnog modulatora, držača uzorka i detektora. Zračenje koje izlazi iz izvora je linearno polarizirano, a monokromator propušta samo jednu valnu duljinu koja prolazi kroz fotoelastični modulator koji svjetlost pretvara u cirkularnu. Cirkularno polarizirano svjetlo naizmjenično prolazi kroz uzorak, a razliku u apsorpciji R-CP i L-CP detektira detektor.

Elektronski cirkularni dikroizam (ECD) se vrlo često koristi u identifikaciji strukture proteina i polinukleotida. Iako su nukleotidne baze same po sebi akiralne, nukleozidi i derivati nukleotida su optički aktivni i pokazuju mali signal u CD spektru. Njihovim spajanjem u dvostruku uzvojnica nastaje helikalna sekundarna struktura koja je gotovo okomita na baze i pokazuje izrazitu optičku aktivnost. Zbog optičke aktivnosti kiralne helikoidalne osi, signali u ECD spektru su veći u odnosu na signal pojedinačnih nukleotida nastali kao posljedica takozvanog mehanizma spregnutih oscilatora ili ekscitonskog sprezanja između različitih  $\pi \rightarrow \pi^*$  prijelaza redovito raspoređenih kromofora. Optička svojstva i ECD spektri određenih sekvenci DNA ili RNA stoga su snažno ovisni o sekundarnoj strukturi polinukleotida, za razliku od uobičajenih UV/Vis spektra istih uzoraka.<sup>44,45</sup>

CD signal se pojavljuje u području valnih duljina od 180 do 300 nm u kojemu UV/Vis zračenje apsorbiraju molekule DNA i RNA. U području pri  $\lambda > 300$  nm, prate se spektralne promjene spektra liganda u kompleksu s polinukleotidom, jer iznad 300 nm molekule DNA i RNA ne apsorbiraju zračenje. Vezanjem akiralnog liganda na polinukleotid dolazi do nastanka induciranog cirkularnog dikroizma (engl. *induced circular dichroism*, ICD), pri valnoj duljini apsorpcije kromofora liganda. Male organske molekule su često akiralne ili se nalaze u racemičnoj smjesi zbog čega su optički neaktivne. Nastali ICD signal je posljedica sprege električnih prijelaznih momenata polinukleotida i organske molekule (liganda) pri čemu dolazi do nastanka rezultantnog prijelaznog momenta koji je paralelan s vektorom električnog polja cirkularne polarizirane svjetlosti. Na temelju ICD signala u navedenim spektralnim područjima, moguće je odrediti tip interakcije polinukleotida i male molekule te mijenja li se struktura molekule nakon vezanja na polinukleotid.<sup>44</sup> Slabi ICD signal negativnog predznaka u usporedbi s intenzitetom CD signala DNA/RNA ukazuje na interkalativni način vezanja. Slabi ICD signal pozitivnog predznaka ukazuje na vezanje liganda u utor s labavom orijentacijom u odnosu na DNA os ili interkalativno vezanje s prijelaznim momentom liganda orijentiranim okomito na dugu os susjednih parova baza. Jaki ICD signal je obično pozitivan, a ukazuje na vezanje liganda u mali utor DNA ili dvolančane RNA.<sup>42,44</sup>

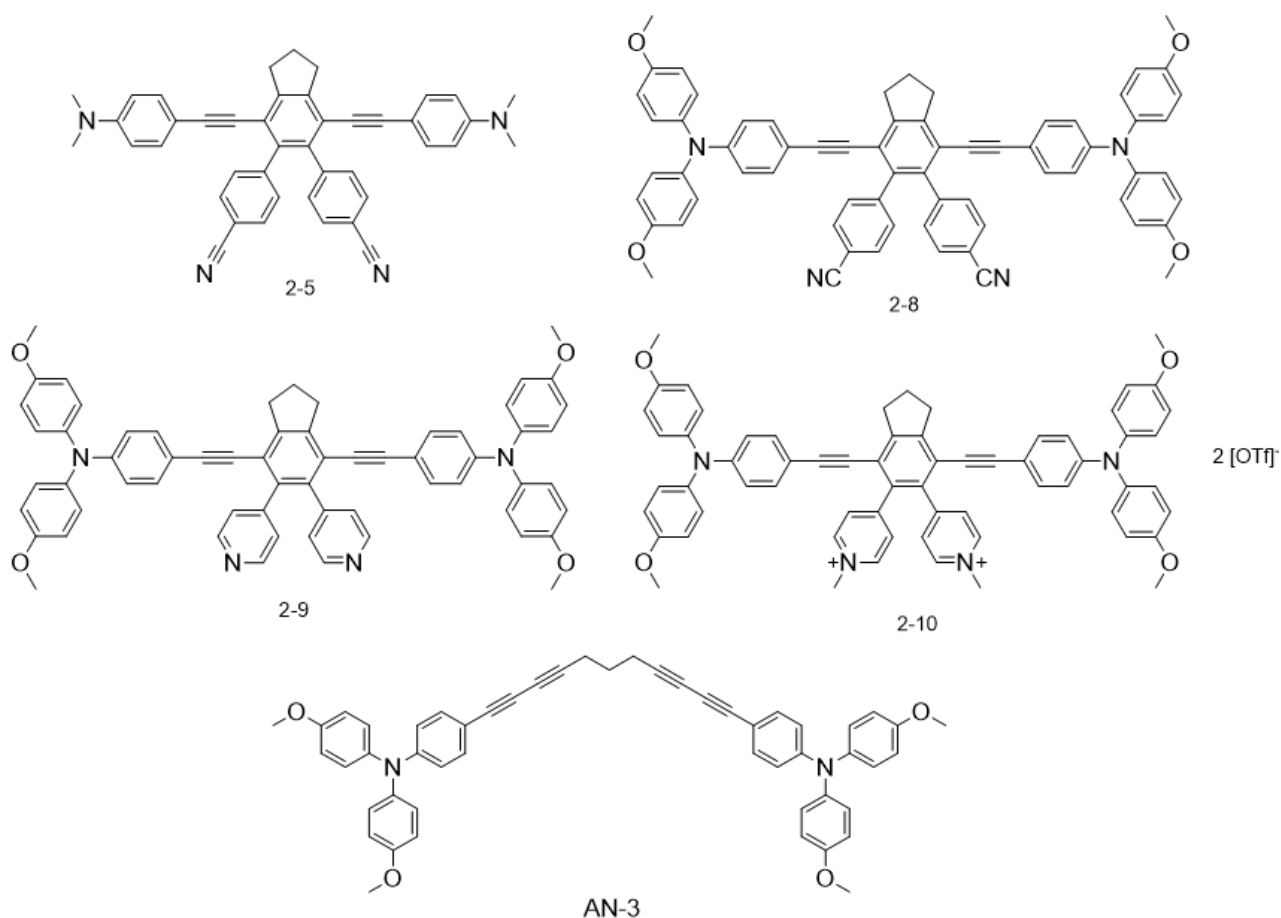
## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Kemikalije

U svrhu ovoga rada korišteno je pet fluorescentnih proba: 4,4'-{4,7-bis[(4-(dimetilamino)fenil)etinil]-2,3-dihidro-*1H*-inden-5,6-diil}dibenzonitril (**2-5**), 4,4'-{4,7-bis[(4-(bis(4-metoksifenil)amino)fenil)etinil]-2,3-dihidro-*1H*-inden-5,6-diil}dibenzonitril (**2-8**), 4,4'-{[5,6-di(piridin-4-il)-2,3-dihidro-*1H*-inden-4,7-diil]bis(etin-2,1-diil)}bis[N,N-bis(4-metoksifenil)anilin] (**2-9**), 4,4'-{4,7-bis[[4-(bis(4-metoksifenil)amino)fenil]etinil]-2,3-dihidro-*1H*-inden-5,6-diil}bis(1-metilpiridin-1-ium) ditriflat (**2-10**) i 4,4'-(undeka-1,3,8,10-tetra-1,11-diil)bis[N,N-bis(4-metoksifenil)anilin] (**AN-3**). Spojevi su sintetizirani u laboratoriju prof. dr. sc. Todda B. Mardera i suradnika, na Institutu za anorgansku kemiju, Sveučilišta Julius-Maximilians u Würzburgu, Würzburg, Njemačka.<sup>30</sup> Njihove su strukture prikazane na Slici 16.



Slika 16. Strukture spojeva **2-5**, **2-8**, **2-9**, **2-10** i **AN-3**.

Ispitivani spojevi su praškaste krutine. Za daljnju primjenu u istraživanjima pripremljene su otopine spojeva koncentracije od  $2,5 \times 10^{-3}$  do  $1 \times 10^{-2}$  mol dm<sup>-3</sup> otapanjem svakog uzorka spoja u dimetilsulfoksidu (DMSO). Dobivene otopine su žute (**2-5**, **2-9**, **2-10**), narančaste (**2-8**) i smeđe (**AN-3**). Sve otopine su čuvane u hladnjaku na temperaturi od +4 °C.

U istraživanju su korišteni komercijalno dostupni polinukleotidi: dvolančani (engl. *double-stranded*, ds) (poli dAdT - poli dAdT, poli dGdC – poli dGdC, poli rA - poli rU) i dvolančana prirodna DNA iz prsne žlijezde teleta (eng. *calf thymus*) *ct*-DNA (Sigma-Aldrich). Polinukleotidi su otopljeni u puferu natrijeva kakodilata (u nastavku Na-kakodilat;  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>, pH = 7) prema uputama proizvođača. Otopina *ct*-DNA je dodatno sonicirana i filtrirana preko filtra veličine pora 0,45 μm kako bi se uklonili veći lanci DNA i dobila što homogenija otopina.<sup>46</sup> Koncentracije polinukleotida određene su spektrofotometrijski

mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini maksimuma apsorpcije prema podacima proizvođača, a izražene su kao koncentracije fosfata.<sup>47</sup> Otopine su čuvane u zamrzivaču na  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.1.2. Uređaji

- Spektrofotometar Varian Cary Bio 100 s internom kontrolom temperature i automatskim držačem 12 kiveta (Agilent Technologies, SAD)
- Fluorimetar Varian Cary Eclipse s automatskim držačem 4 kivete (Agilent Technologies, SAD)
- Spektrometar JASCO J-815 CD
- Analitička vaga Mettler Toledo

## 3.2. Spektroskopska karakterizacija spojeva

Prije istraživanja interakcije spojeva s polinukleotidima snimljeni su UV/Vis spektri spojeva korištenjem programa spektrofotometra *Scan UV/Vis*. Sva spektroskopska mjerenja provedena su u puferu Na-kakodilata ( $\text{pH} = 7$ ), a korištene su kvarcne kivete duljine optičkog puta 1 cm. Pripremljeno je pet kiveta, svaka za jedan spoj analoga bis-triarilborana i u svaku kivetu je dodano 1 mL Na-kakodilatnog pufera ( $I = 0,05\text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ ). Prvo je snimljen spektar samog pufera kako bi se omogućila korekcija bazne linije. U odgovarajuću kivetu je dodan alikvot pojedinog spoja ( $c = 5 \times 10^{-4}\text{ mol dm}^{-3}$ ) tako da su dobivene otopine u koncentracijskom rasponu od  $1 \times 10^{-6}$  do  $4 \times 10^{-6}\text{ mol dm}^{-3}$ . Za svaki je dodatak snimljen UV/Vis spektar, koji je u programu automatski korigiran obzirom na baznu liniju. Svi dobiveni podaci obrađeni su programom *OriginPro 7.5*.

Poslije spektroskopske analize, kivete s uzorcima su pohranjene u hladnjaku. Nakon tri dana ponovno su snimljeni spektri uzoraka ( $t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) kako bi se provjerila njihova stabilnost i eventualne promjene u apsorpcijskim maksimumima. Također je ispitana i termička stabilnost. Fluorescencijski spektri ispitivanih spojeva ( $c = 4 \times 10^{-6}\text{ mol dm}^{-3}$ ) snimljeni su pri temperaturama 25, 35, 55, 70 i  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  u kvarcnoj kiveti od 10,00 mL optičkog puta zračenja od 1 cm. Nakon hlađenja ponovno je snimljen fluorescencijski spektar pri  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Fluorescencijski spektri su korigirani za baznu liniju pufera.

### 3.3. Metode

#### 3.3.1. Fluorimetrijske titracije

Fluorescencijska mjerenja provedena su na fluorimetru s termostatom Varian Cary Eclipse. Spektri su snimljeni pri 25 °C i rasponu valnih duljina od 350 do 700 nm. Za svaki je ispitivani spoj emisijski spektar snimljen pri valnoj duljini pobude koja odgovara maksimumu apsorbancije samog spoja. Odabir širine pukotina je izabran snimanjem emisijskog spektra samih spojeva i spojeva s polinukleotidima pri različitim širinama pukotina, a odabrana je ona koja je dala najbolji odziv instrumenta.

Fluorimetrijske titracije su provedene dodatkom alikvota vodene otopine polinukleotida u kivetu s otopinom proučavane fluorescentne boje. U fluorimetrijsku kivetu optičkog puta 1 cm dodana su 2 mL kakodilatnog pufera. Najprije je snimljena bazna linija, odnosno spektar pufera natrijeva kakodilata ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ ). Zatim se dodaje alikvot pojedinog spoja tako da je konačna koncentracija spoja u reakcijskoj smjesi bila  $5 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$  i snima se spektar samog spoja. Nakon toga slijedi titracija polinukleotidom. Dodani su alikvoti vodene otopine polinukleotida, počevši od omjera  $r_{\text{[spoj]}/\text{[polinukleotid]}} = 1$  dok se nije postiglo zasićenje, odnosno kada daljnjim dodatkom polinukleotida ne dolazi do promjene intenziteta fluorescencije. Nakon svakog dodanog alikvota pričekava se dvije minute prije snimanja kako bi se postigla ravnoteža u reakcijskoj smjesi.

Podaci fluorimetrijskih titracija ispitivanih spojeva s polinukleotidima obrađeni su nelinearnom regresijom po Scatchardovoj jednadžbi i dobivene su konstante vezanja ( $K_a$ ).<sup>9</sup> Svaki spektar korigiran je obzirom na baznu liniju, a volumeni su korigirani za razrjeđenje uslijed dodatka polinukleotida. Dobiveni spektri obrađeni su u programu *OriginPro 7.5*.

Scatchardova izoterma vezanja u slučaju spektroskopski aktivnog kompleksa može se prikazati izrazom (6):

$$(6) \quad I = I_0 + ((I_{\text{lim}} - I_0)/(2 \times c)) \times (c + r \times cs + \frac{1}{K_a} - ((c + r \times cs + \frac{1}{K_a})^2 - (4 \times r \times c \times cs)^{1/2}),$$

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

### 3.3.2. Temperaturno mekšanje

Temperature mekšanja određene su korištenjem programa *Thermal* na UV/Vis spektrofotometru Varian Cary 100 Bio. U 7 kvarcnih kiveta ( $b = 1$  cm), stavljen je 1 mL odgovarajućeg kakodilatnog pufera. Prva kiveta se koristi za snimanje pozadine. U preostalih 6 kiveta dodaje se određeni volumen polinukleotida, koji ovise o apsorbanciji izmjerenoj za svaku kivetu prije dodatka spojeva. Pomoću programa je očitana apsorbancija pufera i apsorbancija pufera s polinukleotidom. Stvarna koncentracija polinukleotida u otopini i volumeni spojeva koje je potrebno dodati da bi se postigli različiti omjeri spojeva i polinukleotida izračunaju se pomoću izmjerenih apsorbancija otopina polinukleotida pri valnoj duljini maksimuma apsorpcije i pomoću molarnih ekstinkcijskih koeficijenata (Tablica 3).

Tablica 3. Molarni ekstincijski koeficijenti  $\varepsilon$  dvolančanih polinukleotida i pripadne valne duljine maksimuma apsorpcije  $\lambda_{max}$ .

polinukleotid	$\varepsilon / \text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$	$\lambda_{max} / \text{nm}$
ct-DNA	6600	260
poli rA-poli rU	6000	260
poli (dAdT) <sub>2</sub>	6600	262
poli (dGdC) <sub>2</sub>	8400	254

Dvije kivete sadrže otopinu čistog polinukleotida i služe kao kontrolne kivete, dok dvije kivete sadržavaju otopine ispitivanog spoja i polinukleotida tako da je  $r_{\text{[spoj]}/\text{[polinukleotid]}} = 0,1$  ili  $0,3$ . Za preostale dvije kivete vrijedi isti postupak, ali sa drugom fluorescentnom bojom. Metoda omogućava analizu više spojeva odjednom, ali s istim polinukleotidom. U programu *Thermal* postavljeni su parametri zagrijavanja: uzorak je zagrijavan postupno u temperaturnom rasponu od 25 do 95 °C brzinom od 1 °C min<sup>-1</sup> uz očitavanje vrijednosti apsorpcije svakih 0,5 °C. Rezultati se prikazuju grafički u programu *OriginPro 7.5*. Kao rezultat se dobiju krivulje sigmoidalnog oblika. Svaka krivulja je normalizirana, a temperature mekšanja određene su očitavanjem točki maksimuma prve derivacije sigmoidalnih krivulja. Sve temperature mekšanja su prosjek dvaju mjerenja.

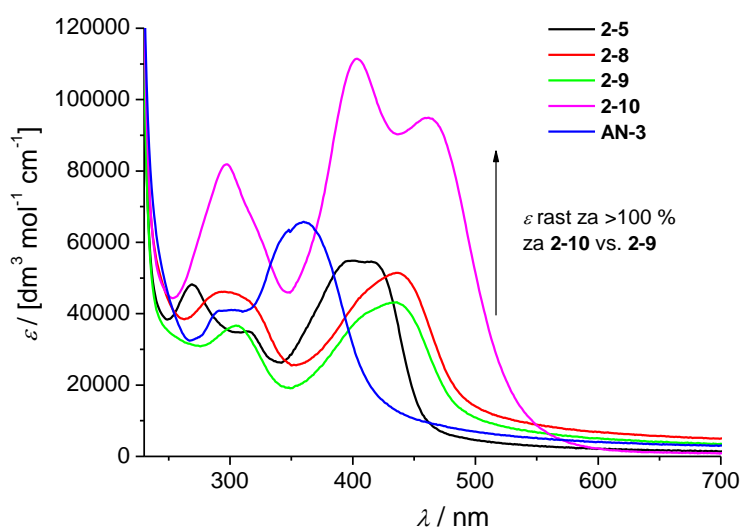
### 3.3.3. CD titracije

Sve CD titracije provedene su na spektrometru JASCO J-815 CD pri sobnoj temperaturi uz konstantan protok dušika. Mjerenja su provedena u kvarcnim fluorimetrijskim/CD kivetama duljine optičkog puta 1 cm. Najprije se snimi bazna linija, što je spektar pufera natrijeva kakodilata ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ ). Zatim se snima spektar odabranog polinukleotida, tako da je koncentracija polinukleotida u otopini 2 mL pufera  $c = 3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ . Na kraju slijedi dodatak alikvota vodenih otopina spojeva ( $c = 8 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u zadanim molarnim omjerima spoja i polinukleotida ( $r = 0,1, 0,3 \text{ i } 0,5$ ). Svi spektri su snimani uz standardnu osjetljivost instrumenta i brzinu skeniranja  $200 \text{ nm min}^{-1}$ . Snimljeni CD spektar nakon svakog dodatka korigiran je obzirom na baznu liniju, a dobiveni spektri su obrađeni programom *OriginPro 7.5*.

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

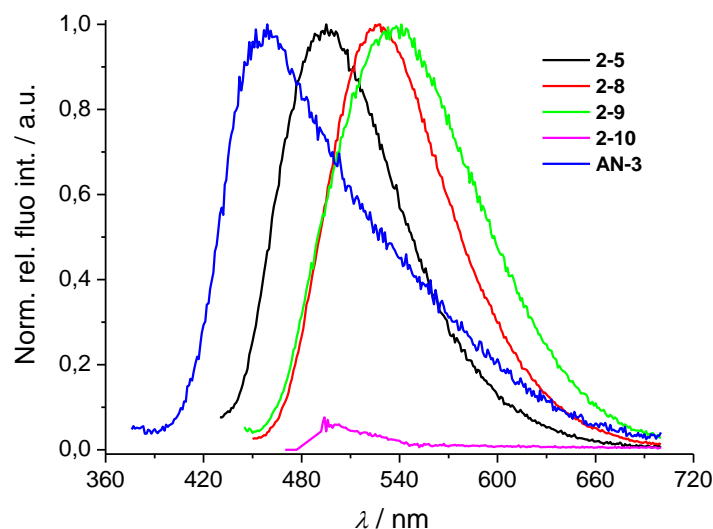
### 4.1. Spektroskopska karakterizacija spojeva

Svi spojevi su otopljeni u DMSO u rasponu koncentracija od 2,5 do 10 mmol dm<sup>-3</sup>. Pripravljene otopine su čuvane u hladnjaku na +4 °C, a alikvoti korišteni u eksperimentima su čuvani na +25 °C. Nije uočeno vidljivo taloženje u radnim otopinama. UV/Vis spektri u vodenoj otopini (Slika 17) su pokazali linearnu ovisnost koncentracije o apsorbanciji fluorescentne boje do  $c = 4 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>.



Slika 17. Usporedba UV/Vis spektara fluorescentnih boja (Na-kakodilatni pufer,  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>, pH = 7,0).

Detaljna analiza UV/Vis spektra pokazuje značajan utjecaj centralne 2,3-dihidro-1*H*-indenilne jezgre molekule na konačni oblik spektra. U tom smislu, apsorpcijski spektri derivata **2-5**, **2-8** i **2-9** se ne razlikuju značajno, dok boja **AN-3**, koja nema arilnu centralnu jedinicu, pokazuje izražen hipsokromni pomak apsorpcijskog maksimuma ( $\Delta\lambda > 40$  nm) u odnosu na **2-5**, **2-8** i **2-9**. U usporedbi s ostalim proučavanim spojevima, najveća razlika u obliku i intenzitetu spektra uočena je za derivat **2-10** koji je strukturno najbliži derivatu **2-9**, ali se razlikuje samo po naboju dušika piridilnog supstituenta (prikazano na Slici 16). On pokazuje najveću apsorptivnost i puno bolje razlučene spektralne vrpce u odnosu na strukturni analog **2-9**. Fluorescentna emisija svih proučavanih boja slijedi trend uočen za UV/Vis apsorpcijske maksimume (Slika 18).



Slika 18. Fluorescencijski spektri spojeva ( $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ , Na-kakodilatni pufer  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ ).

Ona je izrazito ovisna o temperaturi u rasponu od 25 do 95 °C. Spektri pokazuju hipokromni efekt pri zagrijavanju svih proučavanih boja i hipsokromni efekt u slučajevima **2-5** i **2-8**. Dodatno, što se tiče reproducibilnosti pri reverzibilnom hlađenju otopina uzoraka, spojevi **2-8** i **2-9** pokazali su izvrsnu reproducibilnost, dok su spojevi **2-5** i **AN-3** pokazali nepovratno potisnute emisijske spektre. Derivat **2-10** je neočekivano pokazao zanemarivu fluorescentnu emisiju čak i pri koncentracijama dva reda veličine većima od ostalih proučavanih boja. Svi ispitani derivati posjeduju intrinzičnu emisiju (**2-5**, **2-8**, **2-9** i **AN-3**) i pokazuju izvanredne Stokesove pomake maksimuma ( $\Delta\lambda$ ) u rasponu od 77 do 102 nm (Tablica 4), ovisno o korištenim kromoforima kao građevnim blokovima.

Tablica 4. Spektrofotometrijski podaci vodenih otopina spojeva (Na-kakodilat pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ ).

spoj	$\max \lambda_{\text{Abs}} / [\text{nm}]$ ( $\epsilon \times 10^4 / [\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}]$ )	$\max \lambda_{\text{Em}}$ [nm]	$^a \Delta\lambda$ [nm]
<b>2-5</b>	418 (5,56)	495	77
<b>2-8</b>	436 (5,25)	527	91
<b>2-9</b>	435 (4,25)	537	102
<b>2-10</b>	462 (8,92)	<sup>b</sup> -	/
<b>AN-3</b>	360 (6,49)	459	99

$$^a \Delta\lambda = \lambda_{Em}^{max} - \lambda_{Abs}^{max}$$

<sup>b</sup> Spoj ne posjeduje intrinzičnu fluorescenciju.

Dobivene vrijednosti impliciraju isključivi utjecaj visoko konjugiranog aril/tri-aril supstituenta na ukupnu konjugaciju molekule u pobuđenom stanju, što općenito pomiče emisijske maksimume prema većim valnim duljinama. Emisijski intenzitet svih boja bio je proporcionalan koncentraciji u rasponu od  $5 \times 10^{-7}$  do  $2 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>, što ukazuje na odsutnost bilo kakve agregacije boja.

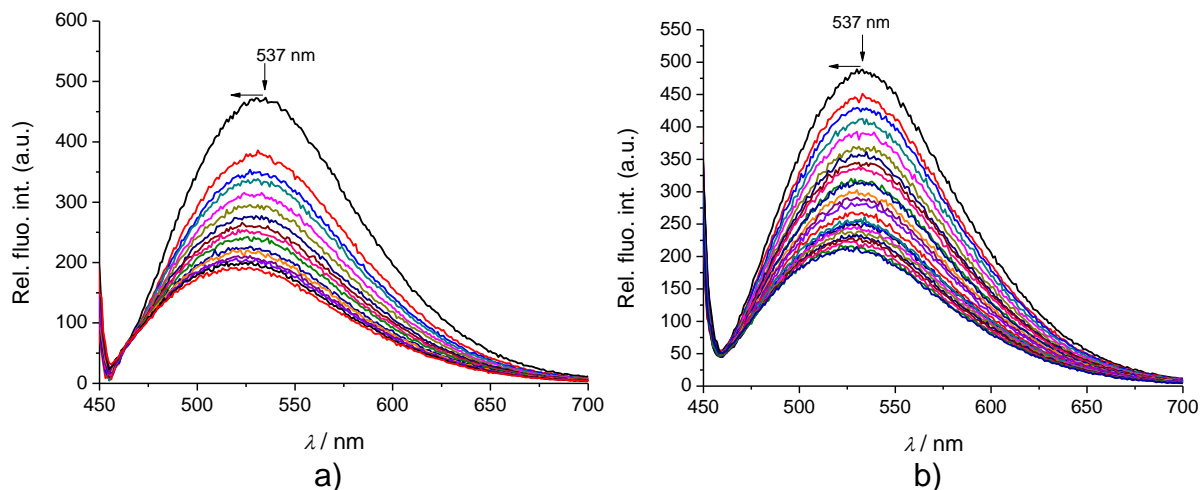
Pomoću Beer–Lambertovog zakona iz baždarnih dijagrama spojeva izračunat je molarni apsorpcijski koeficijent ( $\epsilon$ ) svakog spoja pri valnoj duljini maksimuma apsorpcije ( $\lambda_{max}$ ) i prikazan u Tablici 4.

## 4.2. Interakcija spojeva s polinukleotidima

### 4.2.1. Fluorimetrijske titracije

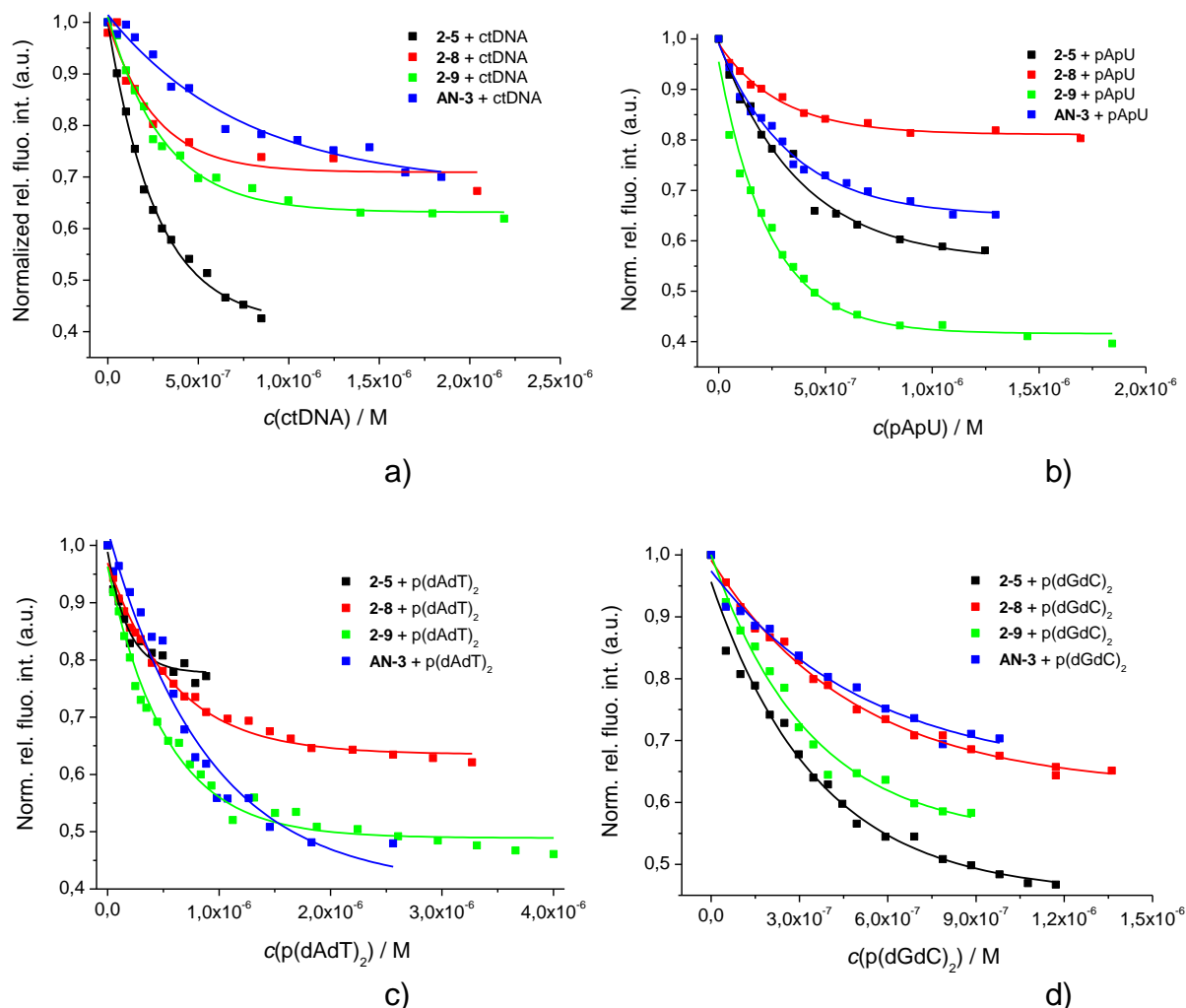
Afinitet vezanja ispitivanih spojeva prema različitim polinukleotidima određen je pomoću fluorimetrijskih titracija. Snažna emisija i povoljan Stokesov pomak emisijskih maksimuma omogućili su provođenje fluorimetrijskih titracija proučavanih boja s dvolančanim DNA i RNA pri vrlo niskim koncentracijama (50 nmol dm<sup>-3</sup>). Emisijski odgovor predstavlja vezanje neovisne molekule spoja na dvolančani polinukleotid. Općenito, dodavanje bilo koje dvolančane DNA ili RNA proučavanim bojama rezultiralo je izraženim hipokromnim i hipsokromnim pomacima emisijskih maksimuma. Svi fluorescencijski spektri su snimljeni pri valnoj duljini pobude pojedinog spoja ( $\lambda_{exc}$ ), a intenziteti su očitavani pri valnoj duljini emisije ( $\lambda_{em}$ ). Primjer fluorescencijske titracije spoja **2-9** s pApU i poli(dAdT)<sub>2</sub> prikazana je na Slici 19.





Slika 19. Promjene u fluorescencijskom spektru spoja **2-9** tijekom titracije s: a) pApU, i b) poli(dAdT)<sub>2</sub> ( $c = 5,0 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ , Na-kakodilat pufer  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH = 7,  $\lambda_{\text{exc}} = 435 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 537 \text{ nm}$ )

U većini fluorimetrijskih titracija prisutnost točke u kojoj ne dolazi do promjene apsorbancije (izozbestična točka) ukazuje na nastajanje samo jedne dominantne vrste kompleksa boja/polinukleotid. Podaci titracije obrađeni su nelinearnim postupkom prilagođavanja Scatchardovoj jednadžbi, što je rezultiralo dobivanjem konstanti vezanja ( $K_a$ ).<sup>9,48</sup> Iako je emisija svake proučavane boje bez iznimke gašena od strane svih ispitanih dvolančanih DNA/RNA (Slika 20), postoje određene razlike u afinitetu spojeva prema polinukleotidima opažene između proučavanih struktura.



Slika 20. Normalizirani fluorescentni intenziteti spojeva **2-5**, **2-8**, **2-9** i **AN-3** tijekom titracije s polinukleotidima: a) *ct*-DNA; b) pApU; c)  $p(dAdT)_2$  i d)  $p(dGdC)_2$  ( $c(\text{boja}) = 5 \times 10^{-8}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ , Na-kakodilat pufer  $I = 0,05$  mol  $\text{dm}^{-3}$ , pH = 7).

Monoaril-supstituirani derivat **2-5** pokazao je nešto viši afinitet prema *ct*-DNA i poli(dGdC)<sub>2</sub>, što je vidljivo smanjenjem emisije za više od 50 % (Slika 20a i 20d), dok je triaril-supstituirani derivat **2-9** pokazao nešto veću selektivnost prema pApU i poli(dAdT)<sub>2</sub> sekvencama ( $\geq 50$  % smanjenja emisije) (Slika 20b i 20c).

U konačnici, slične i izuzetno visoke vrijednosti konstanti asocijacije ( $\log K_a \geq 7-8$ ) dobivene fluorimetrijskim titracijama za sve proučavane dvolančane polinukleotide sugeriraju općenito visok afinitet testiranih boja bez značajne preferencije prema bilo kojoj specifičnoj sekvenci. Dobivene vrijednosti konstanti asocijacije  $K_a$  i omjera  $r$  [vezani spoj]/[polinukleotid] prikazani su u Tablici 5.

Tablica 5. Konstante asocijacije ( $^a\log K_a$ ) i efikasnost gašenja emisije ( $^b\Delta Int$ ) kompleksa spojeva s polinukleotidima, izračunate obradom spektara fluorimetrijskih titracija po Scatchardovoj jednadžbi u Na-kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ ).

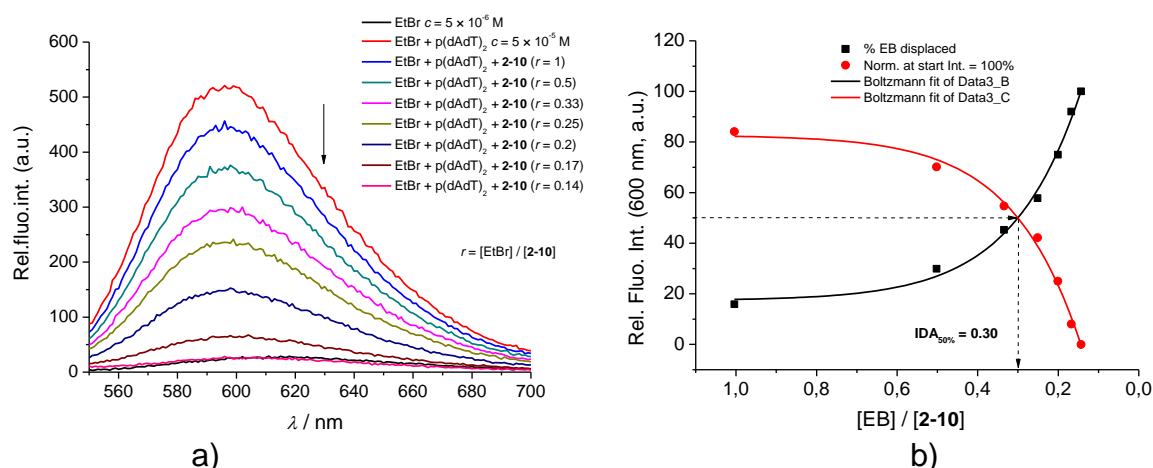
Spoj	$^a\log K_s (^b\Delta Int)$			
	ct-DNA	pApU	p(dAdT) <sub>2</sub>	p(dGdC) <sub>2</sub>
<b>2-5</b>	7,7 (0,43)	7,4 (0,58)	8,1 (0,76)	7,4 (0,46)
<b>2-8</b>	8,1 (0,68)	7,7 (0,80)	7,2 (0,58)	7,2 (0,63)
<b>2-9</b>	7,7 (0,62)	7,9 (0,40)	7,3 (0,42)	7,5 (0,57)
<b>2-10</b>	/	/	/	/
<b>AN-3</b>	6,9 (0,70)	7,5 (0,65)	6,8 (0,46)	7,1 (0,69)

<sup>a</sup> Obrada podataka titracije pomoću Scatchardove jednadžbe dala je vrijednosti omjera  $r_{[\text{vezani spoj}]/[\text{polinukleotid}]} = 0,1-0,3$ , za lakšu usporedbu sve vrijednosti  $\log K_a$  postavljene su na  $n = 0,2$ . Koeficijenti korelacije iznose  $> 0,99$  za većinu izračunatih  $K_a$

<sup>b</sup>  $\Delta Int = Int_{(100\% \text{ complex})} / Int_0$

#### 4.2.1.1. Metoda istiskivanja

Visoke konstante vezanja za komplekse boja/polinukleotida u slučaju **2-5**, **2-8**, **2-9** i **AN-3** potaknule su na daljnje istraživanje potencijala **2-10**, čija je sposobnost emisije gotovo potpuno potisnuta samo malom strukturnom promjenom u usporedbi s **2-9**. Naime, ovi strukturni analozi razlikuju se samo u naboju dušika piridilnog supstituenta; u spoju **2-9** dušik je neutralan, dok je kod **2-10** kvaterniziran. Niska emisija spoja **2-10** prilikom vezanja na dvolančane DNA/RNA proširila je istraživanje i usmjerila ka primjeni alternativne metodologije istiskivanja poznatog indikatora (IDA, engl. *Indicator Displacement Assay*). Etidijev bromid (EtBr), često korišten interkalator, pri interkaliranju između parova baza DNA emitira svjetlost pri valnoj duljini od 520 nm. Pri nekovalentnom vezanju drugih molekula na DNA, dolazi do istiskivanja etidijevog bromida iz DNA i, posljedično, gašenje njegove fluorescencije. Izračunate vrijednosti IDA<sub>50%</sub> predstavljaju omjer koncentracije etidijevog bromida i koncentracije ispitivanog spoja kada je 50 % etidijevog bromida istisnuto iz kompleksa s polinukleotidom. Što je vrijednost parametra IDA<sub>50%</sub> veća, spoj je učinkovitije istisnuo etidijev bromid.<sup>49</sup> Za istiskivanje etidijeva bromida pripremljen je visoko emisijski EtBr/polinukleotid kompleks, a dodatkom spoja **2-10** pratilo se smanjenje emisije etidijeva bromida, odnosno njegovo istiskivanje iz kompleksa (Slika 21a).



Slika 21. Promjene u fluorescencijskom spektru etidijeva bromida ( $c = 5 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>,  $\lambda_{\text{exc}} = 520$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 600$  nm) iz kompleksa p(dAdT)<sub>2</sub> ( $c = 5 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>) nakon dodavanja spoja **2-10**. Snimljeno u Na-kakodilatnom puferu ( $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>, pH = 7).

Dobiveni rezultati pokazuju sposobnost derivata **2-10** da istisne EtBr iz p(dAdT)<sub>2</sub>, ali s obzirom na izračunatu vrijednost  $\text{IDA}_{50\%}$  ( $\text{IDA}_{50\%} = [\text{EtBr}] / [2-10]$ ) (Slika 21b), afinitet boje prema AT-DNA sekvenci je znatno niži od samog EtBr-a. Imajući u vidu da je EtBr poznat kao interkalator koji je uspješno zamijenjen s **2-10**, čiji način vezanja nije razjašnjen, provela su se dodatna ispitivanja i s 4',6'-diamidino-2-fenilindolom (DAPI). DAPI je tipična mala organska molekula koja se veže u mali utor molekule DNA, a visoko je selektivan za mali utor AT-DNA.<sup>50</sup> Kao metoda neovisna o fluorescenciji odabran je cirkularni dikroizam, a rezultati su opisani u poglavlju 4.2.3. CD titracije.

#### 4.2.2. Temperaturno mekšanje

Eksperimenti temperaturne denaturacije pružaju informacije o toplinskoj stabilnosti heliksa dvolančanog polinukleotida kao funkciji interakcije s dodanim malim molekulama. Razlika između  $T_m$  vrijednosti slobodnog dvolančanog polinukleotida i kompleksa s malom molekulom ( $\Delta T_m$  vrijednost) važan je faktor u karakterizaciji interakcija između male molekule i dvolančanih polinukleotida. Na primjer, umjerena do jaka stabilizacija ( $\Delta T_m > 5$  °C) podržava izraženu interkalaciju ili vezanje u mali utor. Suprotno tome, slaba ili zanemariva stabilizacija ( $\Delta T_m = 0-5$  °C) sugerira proces vezanja koji je uglavnom vođen hidrofobnim efektom praćenim slabim vodikovim vezama i/ili elektrostatskim interakcijama obično isključujući klasičnu interkalaciju kao način vezanja.<sup>41</sup> Tablica 6 prikazuje dobivene vrijednosti promjene

temperature mekšanja uslijed nastanka kompleksa između spojeva i polinukleotida pri omjerima  $r_{\text{[spoj]}/\text{[polinukleotid]}} = 0,1$  ili  $0,3$ .

Tablica 6.  $\Delta T_m$  vrijednosti<sup>a</sup> (°C) za dvolančane DNA/RNA dodatkom spojeva u omjeru  $r_{\text{[spoj]}/\text{[polinukleotid]}} = 0,1$  ili  $0,3$  u Na-kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ ).

Spoj	ct-DNA	pApU
<b>2-5</b>	-0,7 <sup>d</sup>	-0,6 <sup>d</sup>
<b>2-8</b>	-0,2 <sup>d</sup>	+0,1 <sup>d</sup>
<b>2-9</b>	-0,7 <sup>d</sup>	+0,4 <sup>d</sup>
<b>2-10</b>	-0,5 <sup>c</sup>	+0,3 <sup>c</sup>
<b>AN-3</b>	+0,9 <sup>d</sup>	-0,1 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Greška u  $\Delta T_m$ :  $\pm 0,5^\circ\text{C}$ ;

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

<sup>c</sup>  $r = 0,1$ .

<sup>d</sup>  $r = 0,3$ .

Dodavanje proučavanih boja dvolančanim DNA ili RNA polinukleotidima uglavnom je rezultiralo slabom (de)stabilizacijom dvolančanog heliksa. Detaljna analiza rezultata otkrila je nešto jači, ali još uvijek slab utjecaj **AN-3** na toplinsku stabilnost ct-DNA u usporedbi s ostalim proučavanim spojevima. Dodatno, to je jedini spoj koji uzrokuje određenu stabilizaciju ct-DNA ( $\Delta T_m = +0,9 \text{ }^\circ\text{C}$ ), dok su ostali proučavani derivati pokazali slabu destabilizaciju ( $\Delta T_m = -0,5 - -0,7 \text{ }^\circ\text{C}$ ) bez iznimke. To se može pripisati učinku strukturne rigidnosti bis-diinskih podjedinica spoja **AN-3**, čime je omogućeno njegovo potencijalno umetanje između parova baza. Općenito, ponašanje proučavanih boja u interakciji s dvolančanim polinukleotidima pokazuje koherentnu diferencijaciju između ds-DNA i ds-RNA. Jedino derivat **2-5** ne razlikuje dvolančane polinukleotide DNA/RNA. To je u dobrom slaganju s većinom rezultata u CD eksperimentima, koji nisu pokazali inducirane (ICD) vrpce u području  $> 300 \text{ nm}$ , i samo slabo izražene promjene helikalne strukture dvolančanih DNA/RNA, što će biti opisano u nastavku.

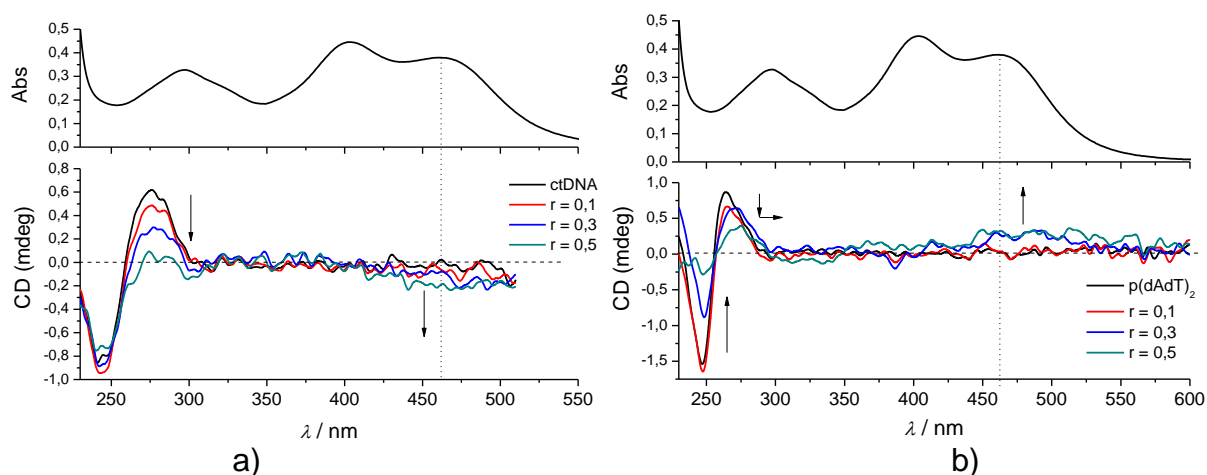
#### 4.2.3. CD titracije

Kako bi se detaljnije istražilo vezanje boja za dvolančane DNA/RNA, koristila se spektroskopija cirkularnog dikroizma (CD) kao koristan analitički alat u istraživanju vezanja malih molekula za kiralne makromolekule. Male molekule mogu promijeniti helikalnu kiralnost dvolančanih DNA/RNA pri vezanju, što se očituje kao promjena u spektralnom području  $\lambda <$

300 nm. S druge strane, akiralne molekule mogu pri vezanju za kiralnu DNA/RNA steći induciranu kiralnost, što se očituje kao inducirani (I)CD signal(i) u području apsorpcijske vrpce male molekule. Sve ove promjene pružaju informacije o načinu vezanja (interkalacija, aglomeracija, vezanje u utore, itd.) za polinukleotide.<sup>42,44</sup>

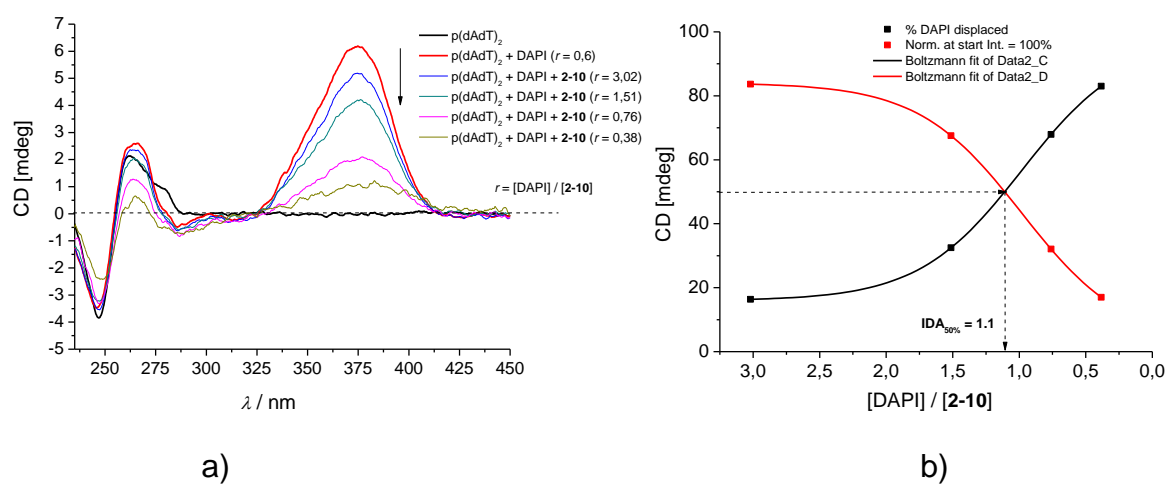
Proučavani spojevi su akiralni te tako ne ometaju praćenje CD spektralnih svojstava istraživanih polinukleotida. Nadalje, ispitivani spojevi nisu uzrokovali značajnu promjenu u CD spektrima polinukleotida (spektralno područje  $\lambda < 300$  nm) potvrđujući očuvanu helikalnost DNA/RNA. Također, nisu opaženi inducirani (I)CD signali pri  $\lambda < 300$  nm. Ovi rezultati su u skladu s neznatnim termalnim (de)stabilizacijskim efektima ( $\Delta T_m < 1$  °C) prikazanim u Tablici 6. Međutim, visoke vrijednosti fluorimetrijskih konstanti vezanja ( $\log K_a \geq 7-8$ ) sugeriraju visok afinitet proučavanih spojeva prema DNA i RNA. S obzirom na izduženu strukturu istraživanih molekula s dvije simetrične podjedinice ograničene fleksibilnosti zbog diinskih mostova, vrlo je vjerojatno da proučavane molekule s ispitanim polinukleotidima ostvaruju elektrostatske interakcije duž kiralne osi polinukleotida. Iako u manjoj mjeri, djelomično umetanje aromatskih dijelova molekule u utore DNA/RNA ili između parova baza nije isključeno, no to ne mijenja značajno helikalnost DNA/RNA i ne utječe na termalnu stabilnost proučavanih polinukleotida.

Samo je dodatak spoja **2-10** dvolančanim DNA/RNA pokazao snažnu destabilizaciju helikalnih struktura. Dodatno, pojava induciranih (I)CD signala s negativnim predznakom u interakciji s *ct*-DNA te pozitivnim u kompleksu s p(dAdT)<sub>2</sub> opažena je pri oko 430–500 nm. CD spektri spoja **2-10** s ctDNA i p(dAdT)<sub>2</sub> prikazani su na Slici 22.



Slika 22. CD titracija: a) ct-DNA ( $c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) i b)  $p(\text{dAdT})_2$  ( $c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) sa spojem **2-10** pri različitim molarnim omjerima  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  snimljena u Na-kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ ).

Kako bi se razjasnio način vezanja kationskog derivata **2-10**, proveden je dodatni eksperiment istiskivanja boje DAPI koja se, poznato, veže u mali utor sekvence AT-DNA. DAPI se za mali utor AT-DNA veže s visokom afinitetom, što rezultira snažnim pozitivnim ICD signalom pri oko 375 nm. Ako se kationski derivat **2-10** također veže za mali utor DNA, trebao bi učinkovito istisnuti DAPI, ali ako se veže za veliki utor, ICD signal spoja DAPI bi trebao ostati nepromijenjen.<sup>49,50</sup> Dodatak spoja **2-10** vrlo je učinkovito istisnulo DAPI, što je praćeno nestankom ICD signala spoja DAPI, prikazano na Slici 22a. Međutim, dobivena  $\text{IDA}_{50\%}$  vrijednost sugerira gotovo identičan afinitet derivata **2-10** za mali utor AT-DNA kao i DAPI ( $\text{IDA}_{50\%} = [\text{DAPI}] / [2-10] = 1,1$ ) (Slika 22b). Zbog različitih načina vezanja EtBr, koji je interkalator i molekule DAPI koja se veže u malom utoru DNA, međusobna usporedba  $\text{IDA}_{50\%}$  vrijednosti dobivenih iz ova dva nezavisna eksperimenta sugerira vezanje u utoru kao prevladavajući način interakcije spoja **2-10** s AT-DNA. Međutim, sposobnost spoja **2-10** da se interkalira između AT-baznih parova očito se ne može isključiti. Ipak, uzimajući u obzir sve CD rezultate za spoj **2-10**, određena sklonost prema AT-sekvenci sigurno postoji.



Slika 23. Metoda istiskivanja molekule DAPI ( $c = 1,2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) sa spojem **2-10** nakon vezanja na p(dAdT)<sub>2</sub> ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ), snimljeno u Na-kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH = 7)



## § 5. ZAKLJUČAK

Pet spojeva poliina izvedenih iz *bis*-triarilamina, **2-5**, **2-8**, **2-9**, **2-10** i **AN-3** spektroskopski su okarakterizirana i ispitan je njihov utjecaj na dvolančane polinukleotide DNA i RNA. U ispitivanom koncentracijskom rasponu kod svih je vodenih otopina spojeva prisutna linearna ovisnost apsorbancije o koncentraciji. Analiza UV/Vis spektra pokazuje značajan utjecaj centralne 2,3-dihidro-*1H*-indenilne jezgre molekule na ukupni oblik spektra, a najveću apsorptivnost i diferencijaciju spektralnih vrpca pokazao je derivat **2-10**. Fluorescentna emisija svih proučavanih boja je izrazito ovisna o temperaturi u rasponu od 25 do 95 °C. U spektrima je uočen hipokromni efekt pri zagrijavanju svih proučavanih boja i hipsokromni efekt u slučajevima spojeva **2-5** i **2-8**. Emisijski intenzitet svih boja bio je proporcionalan koncentraciji u rasponu od  $5 \times 10^{-7}$  do  $2 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>.

Interakcije boja s različitim (prirodnim i sintetskim) polinukleotidima istražene su spektrofotometrijskim metodama (UV/Vis spektrofotometrija, fluorimetrija i CD spektrofotometrija). Fluorimetrijskim titracijama utvrđen je vrlo visok afinitet spojeva prema polinukleotidima ( $\log K_a = 6,8\text{--}8,1$ ). Dodatkom ispitivanih boja dvolančanim DNA/RNA rezultiralo je izraženim hipokromnim i hipsokromnim pomacima emisijskih maksimuma istraživanih boja, bez značajne preferencije prema bilo kojoj specifičnoj sekvenci.

Eksperimentima temperaturnog mekšanja uočeno je da dodavanje proučavanih boja dvolančanim polinukleotidima DNA ili RNA uglavnom rezultira slabom (de)stabilizacijom dvolančanog heliksa. Jedini spoj koji uzrokuje određenu stabilizaciju *ct*-DNA jest **AN-3** ( $\Delta T_m = +0,9$  °C), dok su ostali derivati pokazali slabu destabilizaciju ( $\Delta T_m = -0,5$  –  $-0,7$  °C).

Dodatak bilo koje proučavane boje dvolančanim DNA ili RNA nije uzrokovalo značajnu promjenu u CD spektrima polinukleotida (spektralno područje  $\lambda < 300$  nm), što potvrđuje očuvanu helikalnost DNA/RNA. Inducirani CD signali nisu opaženi pri  $\lambda < 300$  nm. Ovi rezultati su u skladu s neznatnim termalnim (de)stabilizacijskim efektima ( $\Delta T_m < 1$  °C).

Jedino je dodatak spoja **2-10** dvolančanim DNA/RNA uzrokovao snažnu destabilizaciju dvostrukih helikalnih struktura. Pojava jasnih i slabih ICD signala s negativnim predznakom u interakciji s *ct*-DNA te pozitivnim u kompleksu s p(dAdT)<sub>2</sub> opažena je u rasponu  $\lambda = 430\text{--}500$  nm. Dodatno, metodom istiskivanja s drugom malom molekulom potvrđena je sposobnost

spoja **2-10** da se interkalira između AT-baznih parova (sa slabijim afinitetom u odnosu na EtBr), ali i veže u male utore AT-DNA sekvence (s podjednakim afinitetom kao i DAPI).

Zbog visokih vrijednosti fluorimetrijskih konstanti vezanja, može se zaključiti kako postoji visok afinitet proučavanih spojeva prema dvolančanim polinukleotidima DNA i RNA bez izražene selektivnosti. Zbog izdužene rigidne strukture s dvije simetrične podjedinice, vrlo je vjerojatno da postoji interakcija proučavane molekule s polinukleotidima dominantno na vanjskoj površini ostvarujući elektrostatske interakcije duž kiralne osi polinukleotida. Djelomično umetanje aromatskih dijelova molekule u utore DNA/RNA ili između parova baza nije isključeno, iako je izraženo u značajno manjoj mjeri.

Na temelju objedinjenih spektroskopskih studija možemo zaključiti da ispitivani spojevi imaju potencijal primjene kao fluorescentni senzori, a njihov biološki potencijal također će biti ispitan u nastavku istraživanja.

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

**2-5** - 4,4'-{4,7-bis[(4-(dimetilamino)fenil)etinil]-2,3-dihidro-*IH*-inden-5,6-diil}dibenzonitril

**2-8** - 4,4'-{4,7-bis[(4-(bis(4-metoksifenil)amino)fenil)etinil]-2,3-dihidro-*IH*-inden-5,6-diil}dibenzonitril

**2-9** - 4,4'-{[5,6-di(piridin-4-il)-2,3-dihidro-*IH*-inden-4,7-diil]bis(etin-2,1-diil)}bis[N,N-bis(4-metoksifenil)anilin]

**2-10** - 4,4'-{4,7-bis[[4-(bis(4-metoksifenil)amino)fenil]etinil]-2,3-dihidro-*IH*-inden-5,6-diil}bis(1-metilpiridin-1-ium) ditriflat

**A** – apsorbancija

**AN-3** - 4,4'-(undeka-1,3,8,10-tetrain-1,11-diil)bis[N,N-bis(4-metoksifenil)anilin]

**AT** - adenin-timin bogato područje

**b** – duljina optičkog puta

**c** - množinska koncentracija

**CD** – cirkularni dikroizam

**ct-DNA** - DNA iz prsne žlijezde teleta (engl. *calf thymus* DNA)

**DAPI** – 4',6'-diamidino-2-fenilindol

**DMSO** – dimetilsulfoksid

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

**ds** – dvolančani polinukleotid (engl. *double-stried*)

$\epsilon$  – molarni ekstinkcijski koeficijent

**EtBr** – etidijev bromid

**GC** – gvanin-citozin bogato područje

**h** – Planckova konstanta ( $6,626 \times 10^{-34}$  J s)

$I$  – intenzitet

**ICD** – inducirani cirkularni dikroizam (engl. *induced circular dichroism*)

**IDA<sub>50%</sub>** – test istiskivanja indikatora (engl. *Indicator Displacement Assay*)

**K<sub>a</sub>** – konstanta asocijacije tj. konstanta stabilnosti kompleksa (engl. *K<sub>s</sub>; stability constant*)

$\lambda$  – valna duljina

**L-CP** – lijevo cirkularno polarizirana svjetlost (engl. *left circular polarised light*)

**M** – skraćena mjerna jedinica množinske koncentracije; mol dm<sup>-3</sup>

**poli(dAdT)<sub>2</sub>** – alternirajući polinukleotid AT parova baza

**poli(dGdC)<sub>2</sub>** – alternirajući polinukleotid GC parova baza

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

$r$  – omjer koncentracije spoja i polinukleotida

**R-CP** – desno cirkularno polarizirana svjetlost (engl. *right circular polarised light*)

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

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

$T_m$  – temperatura mekšanja

$\Delta T_m$  – promjena temperature mekšanja

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

$\psi$  – kut eliptičnosti (engl. *degree of ellipticity*)

## § 7. LITERATURNI IZVORI

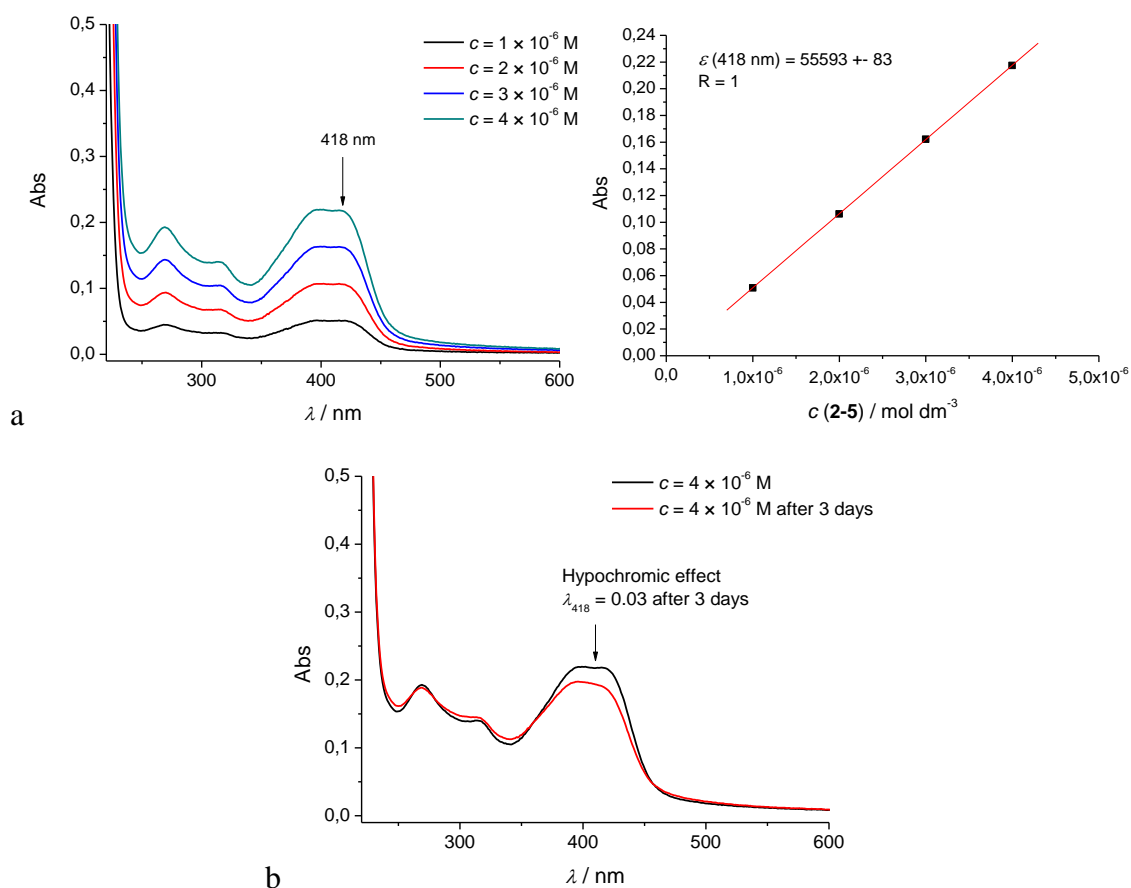
1. E. Trinquet, G. Mathis, *Fluorescence Technologies for the Investigation of Chemical Libraries*, 2006.
2. I. Piantanida, *Kem. u Ind. Chem. Chem. Eng.* **52** (2003) 545–552.
3. L.H. Hurley, *Nat. Rev. Cancer* **2** (2002) 188–200.
4. J.B. Chaires, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8** (1998) 314–320.
5. H. Amini, Ž. Ban, M. Ferger, S. Lorenzen, F. Rauch, A. Friedrich, I. Crnolatac, A. Kendel, S. Miljanić, I. Piantanida, T.B. Marder, *Chem. - A Eur. J.* **26** (2020) 6017–6028.
6. M. Ferger, C. Roger, E. Köster, F. Rauch, S. Lorenzen, I. Krummenacher, A. Friedrich, M. Koščak, D. Nestić, H. Braunschweig, C. Lambert, I. Piantanida, T.B. Marder, *Chem. - A Eur. J.* **28** (2022).
7. M. Ferger, Ž. Ban, I. Krošl, S. Tomić, L. Dietrich, S. Lorenzen, F. Rauch, D. Sieh, A. Friedrich, S. Griesbeck, A. Kendel, S. Miljanić, I. Piantanida, T.B. Marder, *Chem. - A Eur. J.* **27** (2021) 5142–5159.
8. D. Pavlović Saftić, R. Ricker, P. Mentzel, J. Krebs, H. Amini, S. Lorenzen, N. Schopper, A. Kendel, S. Miljanić, J. Morvan, M. Mauduit, Y. Trolez, I. Piantanida, T.B. Marder, *Microchem. J.* **196** (2024) 1–13.
9. G. Scatchard, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **51** (1949) 660–672.
10. L.G. Wade, *Organic Chemistry*, 8<sup>th</sup> ed., Pearson Education, Inc., 2013.
11. J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, 5<sup>th</sup> ur., W. H. Freeman and Company, New York, 2017.
12. S. Neidle, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Elsevier Inc., London, 2008.
13. D.L. Nelson, M.M. Cox, A. Lehninger, *Principles of Biochemistry*, W.H. Freeman & Company, New York, 2008.
14. J.B. Krall, P.J. Nichols, M.A. Henen, Q. Vicens, (2023).
15. S. Neidle, *Principles of Nucleic Acid Structure*, London, 2008.
16. A. Rich, *Gene* **135** (1993) 99–109.
17. D. Wu, A.C. Sedgwick, T. Gunlaugsson, E.U. Akkaya, J. Yoon, T.D. James, *Chem. Soc. Rev.* **46** (2017) 7105–7123.
18. S.K.R. Gowda, B.B. Mathew, C.N. Sudhamani, H.S. Naik Bhojya, *Biomed. Biotechnol.*

- 2 (2014) 1–9.
19. S. Arnott, R. Chandrasekaran, R.P. Millane, H.S. Park, *J. Mol. Biol.* **188** (1986) 631–640.
  20. S. Bhattacharya, A. Paul, (2012).
  21. N.Z. Fantoni, T. Brown, A. Kellett, *ChemBioChem* **22** (2021) 2184–2205.
  22. A.A. Almaqwashi, T. Paramanathan, I. Rouzina, M.C. Williams, *Nucleic Acids Res.* **44** (2016) 3971–3988.
  23. M. Karimi Goftar, N.M. Kor, Z.M. Kor, *Int. J. Adv. Biol. Biomed. Res.* **2** (2014) 811–822.
  24. T. Terai, T. Nagano, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **12** (2008) 515–521.
  25. M. Vendrell, D. Zhai, J.C. Er, Y. Chang, *Chem. Rev* **2012** (2011).
  26. G. Turkoglu, M.E. Cinar, T. Ozturk, *Molecules* **22** (2017).
  27. <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2022/mh/d1mh00696g> (datum pristupa 29. lipnja 2024.)
  28. Z. Zhao, H. Su, P. Zhang, Y. Cai, R.T.K. Kwok, Y. Chen, Z. He, X. Gu, X. He, H.H.Y. Sung, I.D. Willimas, J.W.Y. Lam, Z. Zhang, B.Z. Tang, *J. Mater. Chem. B* **5** (2017) 1650–1657.
  29. S.D. Hudson, G. Chumanov, *Anal. Bioanal. Chem.* **394** (2009) 679–686.
  30. R. Ricker, *Synthesis, Group 10 Metal-Catalyzed Cyclization Reactions and Hydroboration of Polyynes*, 2022.
  31. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Cengage Learning, 2006.
  32. I. Odak, I. Škorić, *Organska Fotokemija – Principi i Primjena*, 2017.
  33. N. Galić, S. Miljanić, in: *Prirodoslovno-matematički fakultet*, Zagreb, 2018.
  34. D.L. Pavia, G.M. Lampman, G.S. Kriz, *Introduction to Spectroscopy*, Brooks/Cole Thomson Learning, 2001.
  35. T.G. Kraljević, *Nastavni Tekst* (2015) 1–13.
  36. P. Novak, T. Jednačak, in: T.V. TIVA (Ed.), *Varaždin*, 2013, pp. 74–77.
  37. [Fluorescence - LearnHaem | Haematology Made Simple](#) (datum pristupa 30. lipnja 2024.)
  38. *Interna Skripta Za Praktikum Biokemije*, Zagreb, 2019.
  39. H.F. Gilbert, in: McGraw-Hill (Ed.), *New York*, 2000, pp. 37–38.

40. J.L. Mergny, L. Lacroix, *Oligonucleotides* **13** (2003) 515–537.
41. W.D. Wilson, L. Ratmeyer, M. Zhao, L. Strekowski, D. Boykin, *Biochemistry* **32** (1993) 4098–4104.
42. M. Eriksson, B. Nordén, *Methods Enzymol.* **340** (2001) 68–98.
43. <https://www.physicsbootcamp.org/section-polarization-of-light.html> (datum pristupa 21. lipnja 2024.)
44. T. Šmidlehner, I. Piantanida, G. Pescitelli, *Beilstein J. Org. Chem.* **14** (2017) 84–105.
45. R.W. Woody, *Methods Enzymol.* **246** (1995) 34–71.
46. J.B. Chaires, N. Dattagupta, D.M. Crothers, in: 21st ed., 1982, pp. 3933–3940.
47. J. Gershberg, M. Radić Stojković, M. Škugor, S. Tomić, T.H. Rehm, S. Rehm, C.R. Saha-Möller, I. Piantanida, F. Würthner, *Chem. - A Eur. J.* **21** (2015) 7886–7895.
48. J.F. Pique, *Lect. Notes Comput. Sci. (Including Subser. Lect. Notes Artif. Intell. Lect. Notes Bioinformatics)* **637 LNCS** (1992) 330–343.
49. N. Holmgaard List, J. Knoops, J. Rubio-Magnieto, J. Idé, D. Beljonne, P. Norman, M. Surin, M. Linares, *J. Am. Chem. Soc.* **139** (2017) 14947–14953.
50. J. Kapuscinski, *Biotech. Histochem.* **70** (1995) 220–233.

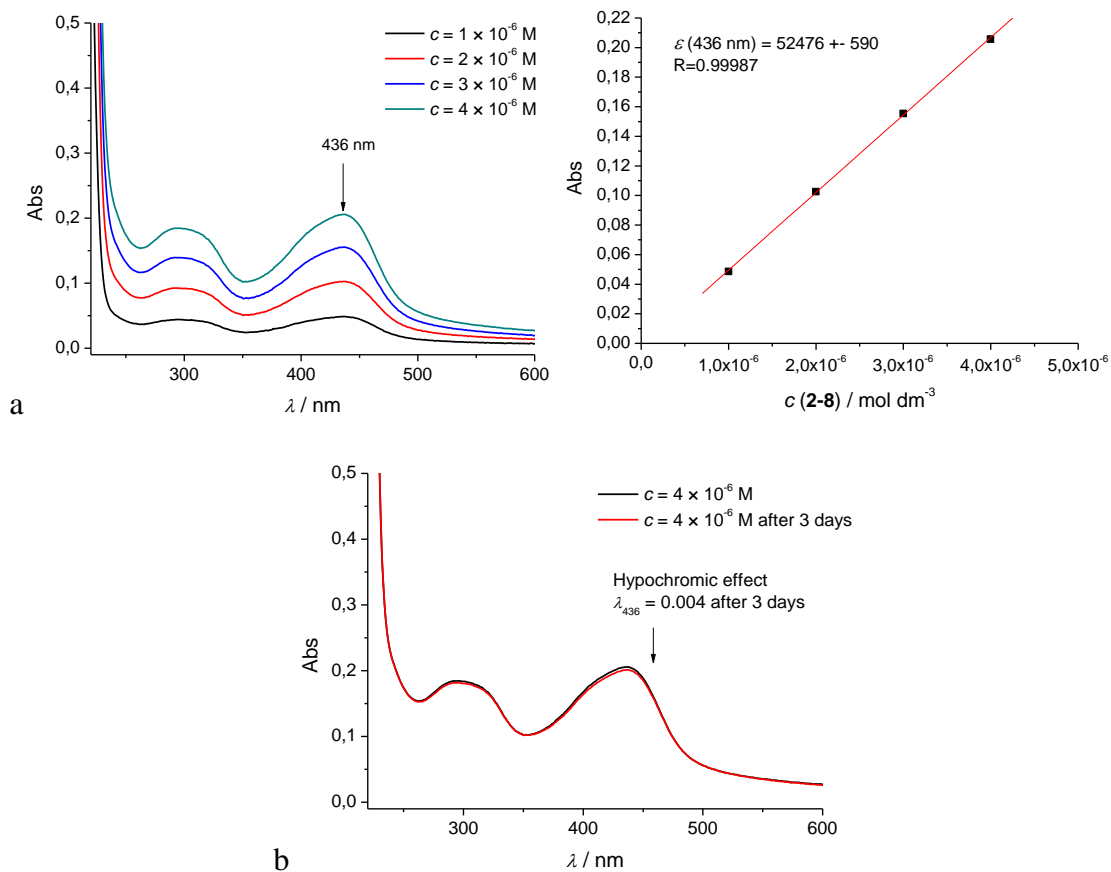
## § 8. DODATAK

### 8.1. Dodatak poglavlju 4. 1. Spektroskopska karakterizacija spojeva

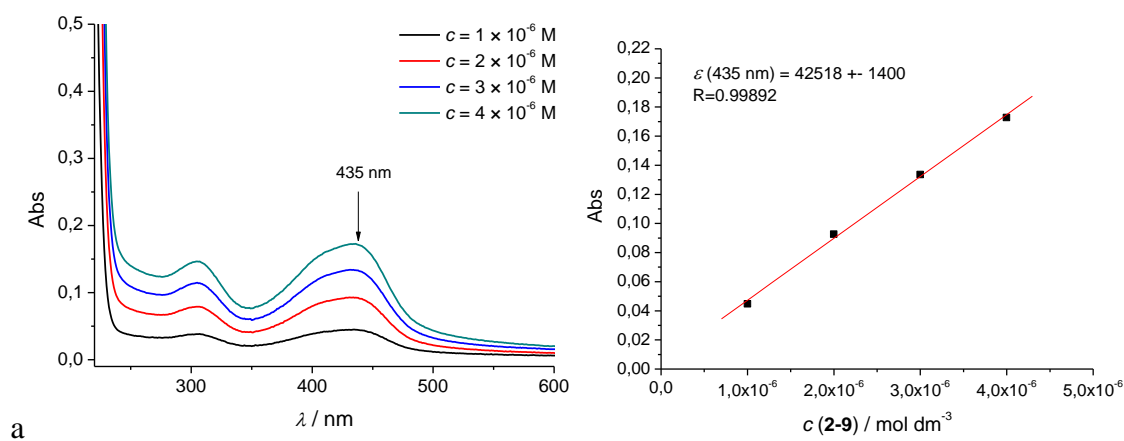


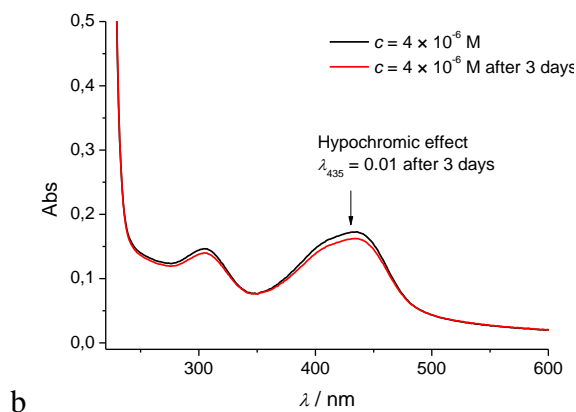
Slika D1. a) ovisnost apsorbancije o koncentraciji spoja **2-5** ( $1 \times 10^{-6} - 4 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) i b) vremenska stabilnost spoja **2-5** u Na-kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ )



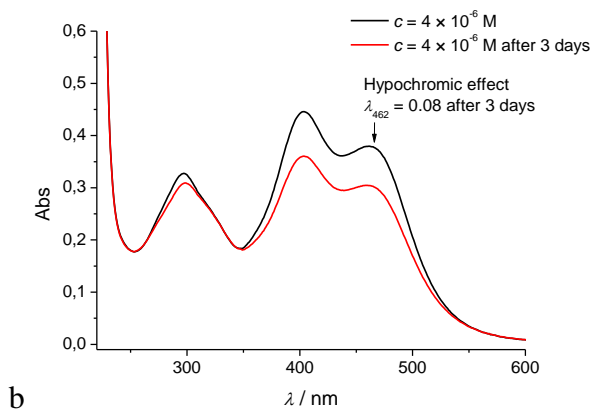
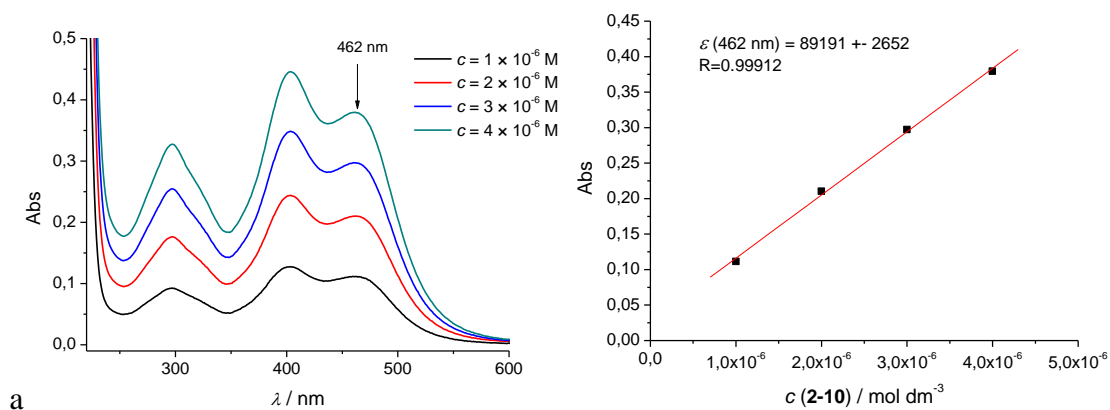


Slika D2. a) ovisnost apsorbancije o koncentraciji spoja **2-8** ( $1 \times 10^{-6} - 4 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) i b) vremenska stabilnost spoja **2-8** u Na-kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ )

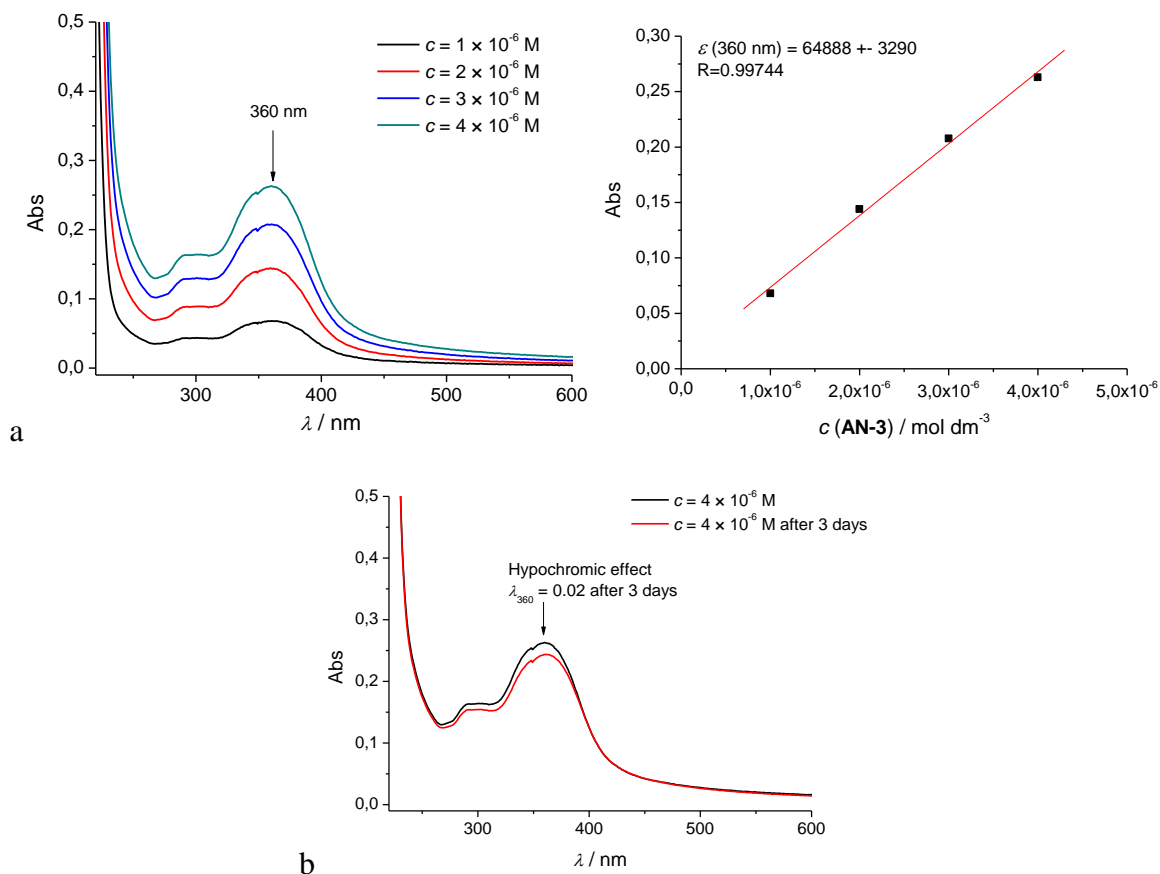




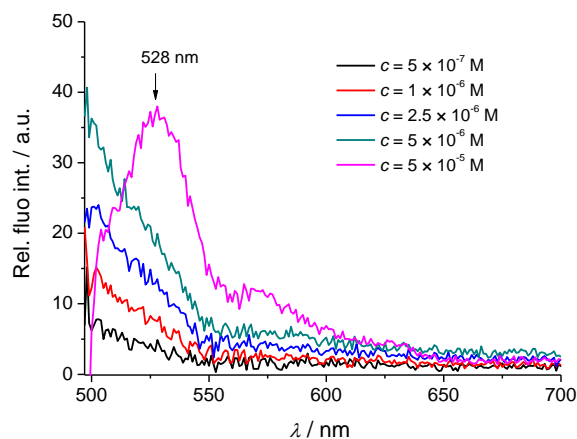
Slika D3. a) ovisnost apsorbancije o koncentraciji spoja **2-9** ( $1 \times 10^{-6} - 4 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) i b) vremenska stabilnost spoja u Na-kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ )



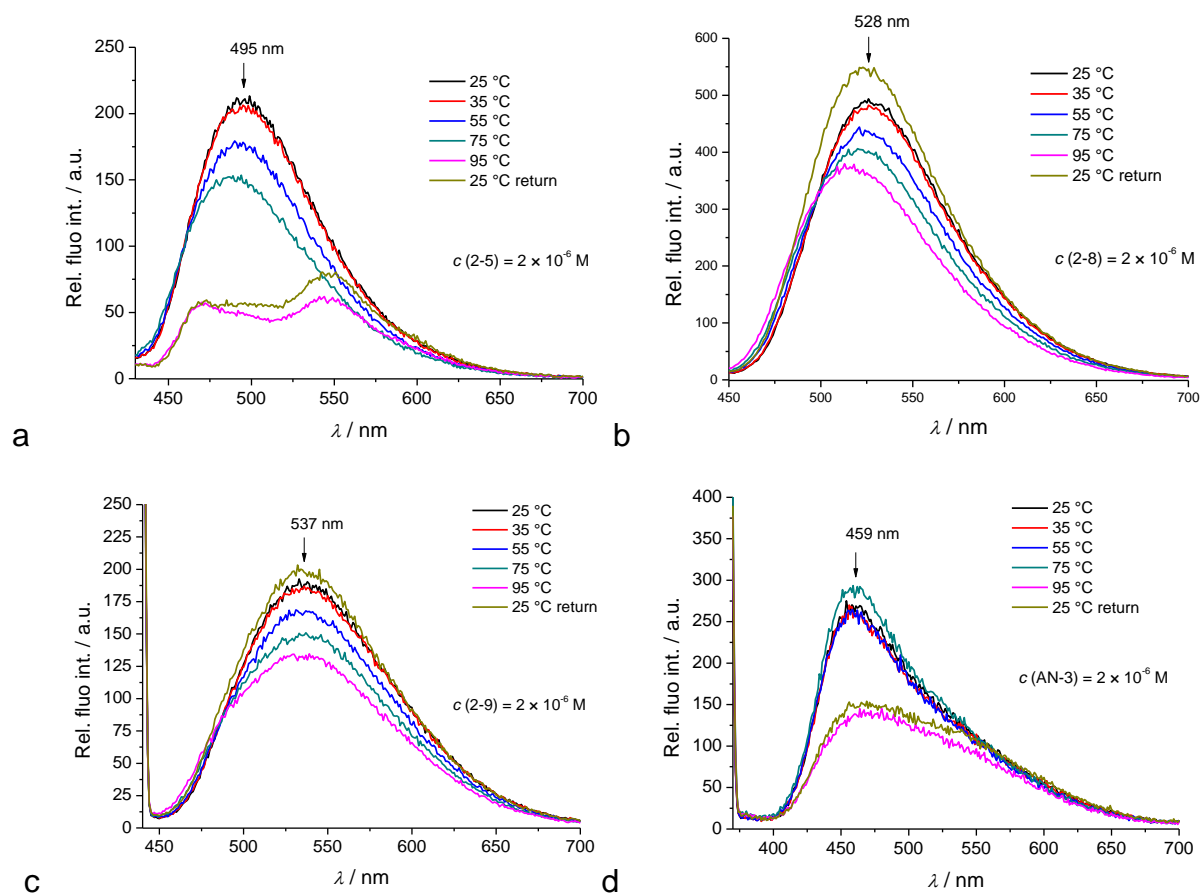
Slika D4. a) ovisnost apsorbancije o koncentraciji spoja **2-10** ( $1 \times 10^{-6} - 4 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) i b) vremenska stabilnost spoja u Na-kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ )



Slika D5. a) ovisnost apsorbancije o koncentraciji spoja **AN-3** ( $1 \times 10^{-6} - 4 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) i b) vremenska stabilnost spoja u Na-kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ )

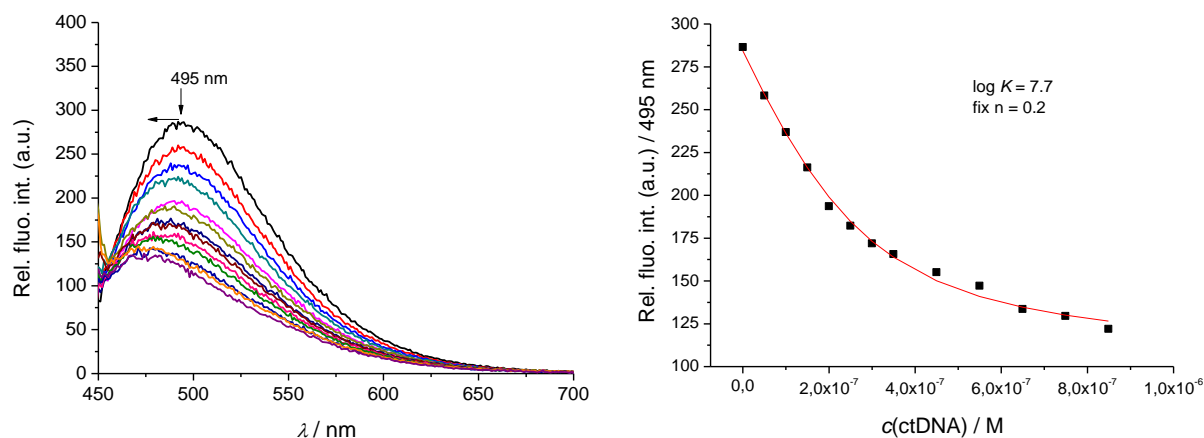


Slika D6. Ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji spoja **2-10** ( $5 \times 10^{-7} - 5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u Na-kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ )

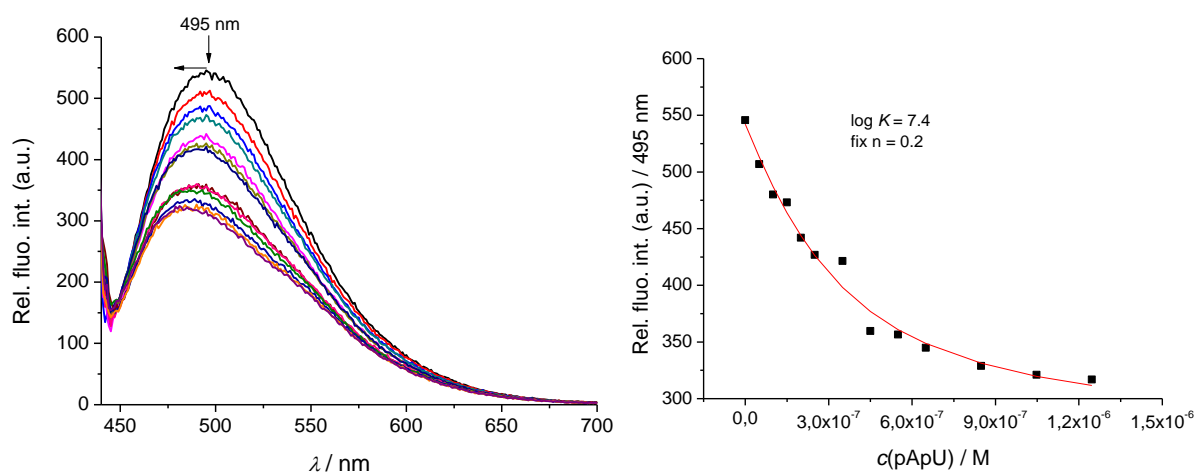


Slika D7. Temperaturna ovisnost fluorescencijskog spektra spoja: a) **2-5** ( $\lambda_{\text{exc}} = 418 \text{ nm}$ ), b) **2-8** ( $\lambda_{\text{exc}} = 436 \text{ nm}$ ), c) **2-9** ( $\lambda_{\text{exc}} = 435 \text{ nm}$ ) i d) **AN-3** ( $\lambda_{\text{exc}} = 360 \text{ nm}$ ) snimljenog u Natrij-kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ )

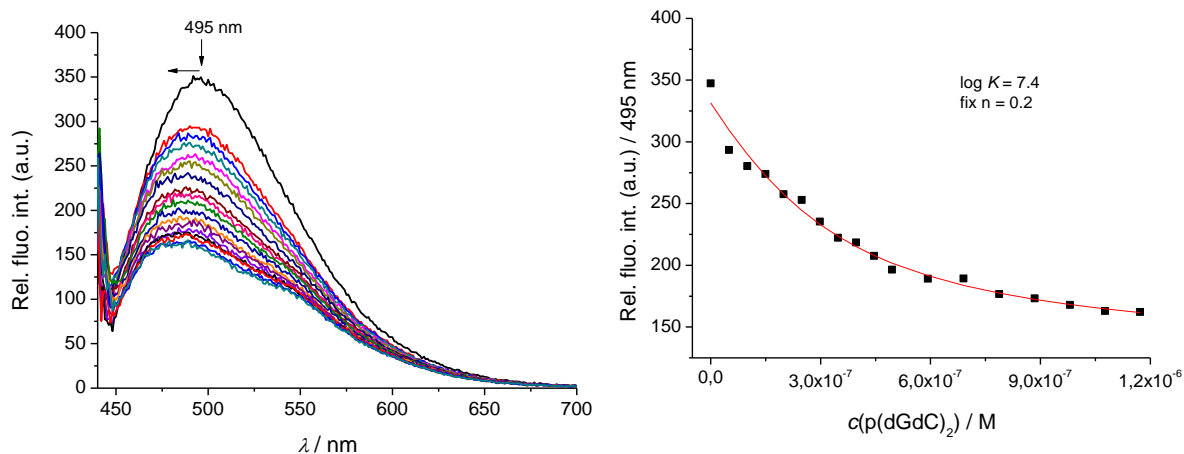
## 8.2. Dodatak poglavlju 4. 2. 1. Fluorimetrijske titracije



Slika D8. a) Promjene u fluorescencijskom spektru spoja **2-5** ( $c = 5 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 418 \text{ nm}$ ) tijekom titracije s **ct-DNA** ( $c = 5 \times 10^{-8} - 8,5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ), pukotina: 20-20; b) Ovisnost intenziteta fluorescencije spoja **2-5** pri valnoj duljini emisije  $\lambda_{\text{max}} = 495 \text{ nm}$  o koncentraciji  $c(\text{ct-DNA})$  u Na-kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ )

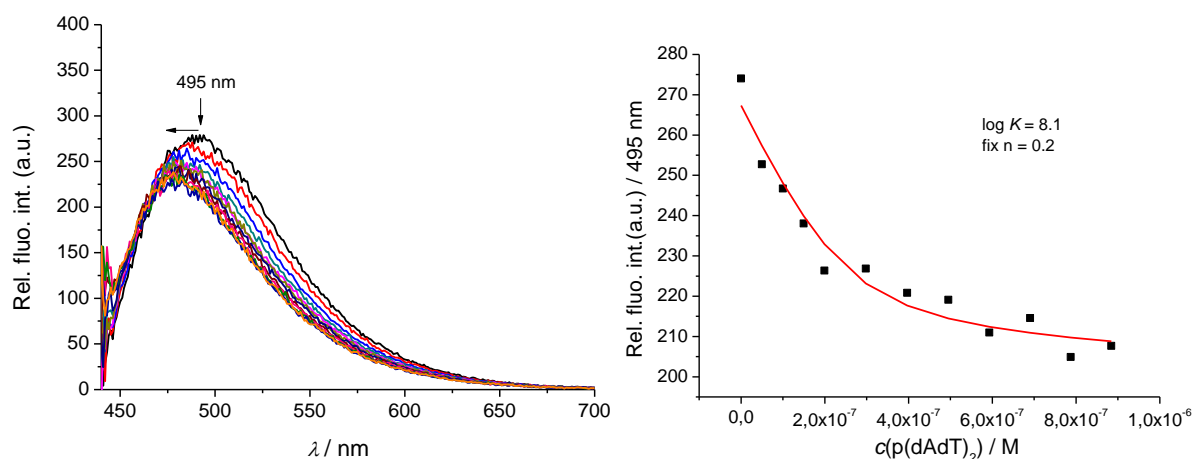


Slika D9. a) Promjene u fluorescencijskom spektru spoja **2-5** ( $c = 5 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 418 \text{ nm}$ ) tijekom titracije s **pApU** ( $c = 5 \times 10^{-8} - 1,3 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ), pukotina: 20-20; b) Ovisnost intenziteta fluorescencije spoja **2-5** pri valnoj duljini emisije  $\lambda_{\text{max}} = 495 \text{ nm}$  o koncentraciji  $c(\text{pApU})$  u Na-kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ )



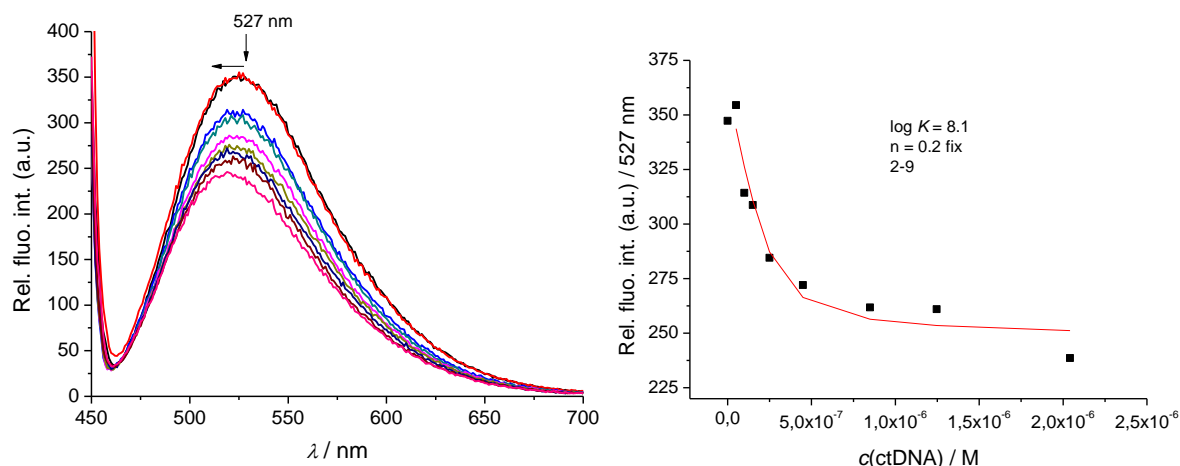
Slika D10. a) Promjene u fluorescencijskom spektru spoja **2-5** ( $c = 5 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 418 \text{ nm}$ ) tijekom titracije s **poli(dGdC)<sub>2</sub>** ( $c = 5 \times 10^{-8} - 1,2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ), pukotina: 20-20;

b) Ovisnost intenziteta fluorescencije spoja **2-5** pri valnoj duljini emisije  $\lambda_{\text{max}} = 495 \text{ nm}$  o koncentraciji  $c(\text{poli(dGdC)}_2)$  u Na-kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ )

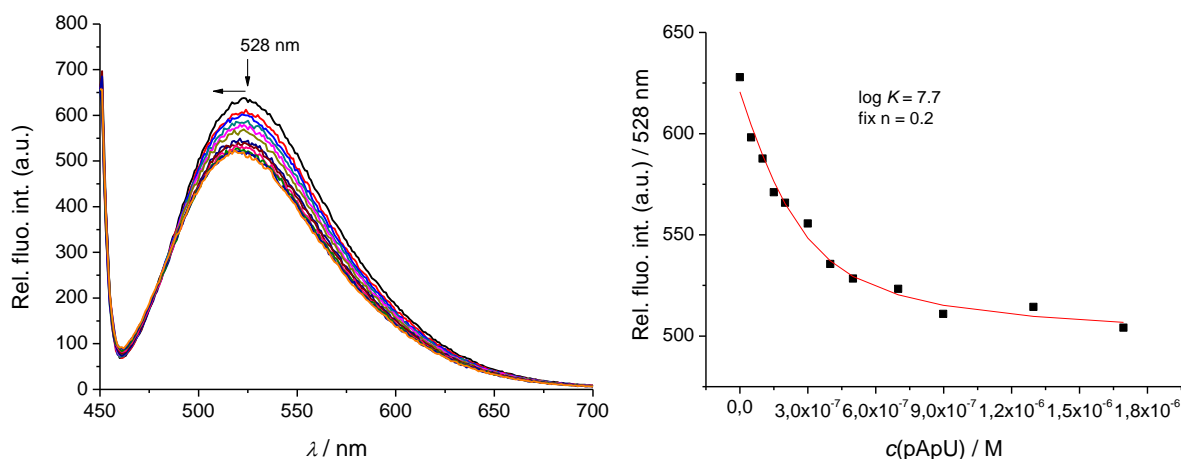


Slika D11. a) Promjene u fluorescencijskom spektru spoja **2-5** ( $c = 5 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 418 \text{ nm}$ ) tijekom titracije s **poli(dAdT)<sub>2</sub>** ( $c = 5 \times 10^{-8} - 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ), pukotina: 20-20;

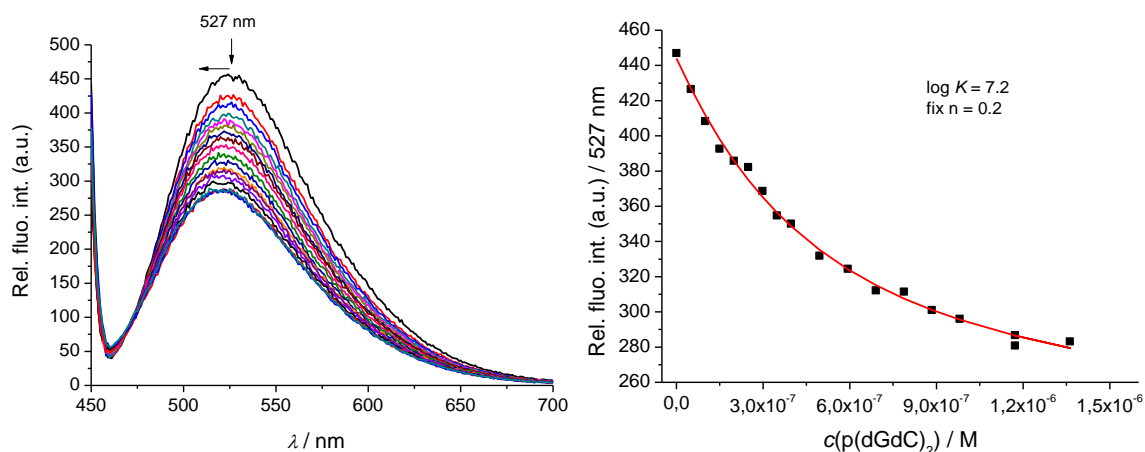
b) Ovisnost intenziteta fluorescencije spoja **2-5** pri valnoj duljini emisije  $\lambda_{\text{max}} = 495 \text{ nm}$  o koncentraciji  $c(\text{poli(dAdT)}_2)$  u Na-kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ )



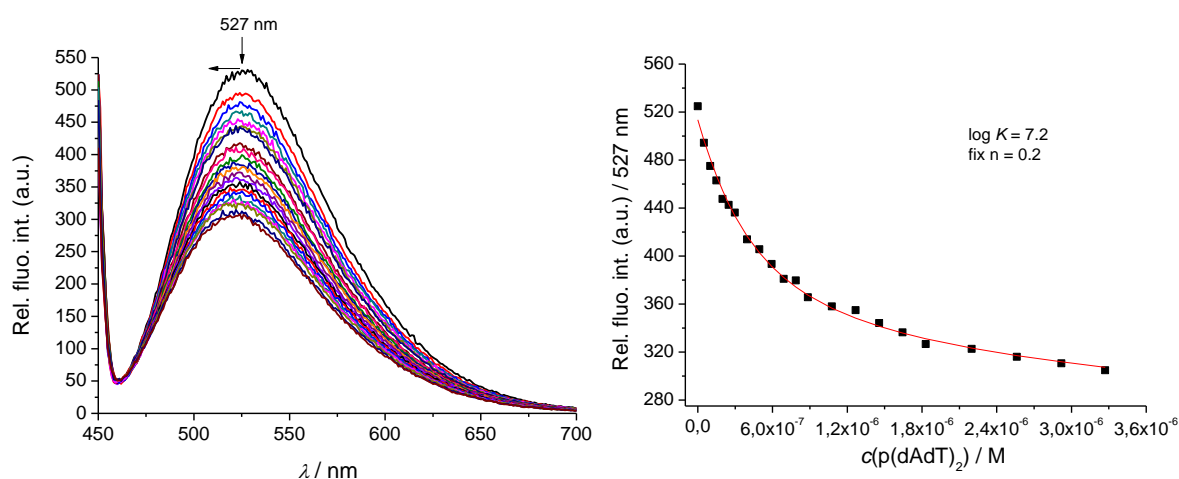
Slika D12. a) Promjene u fluorescencijskom spektru spoja **2-8** ( $c = 5 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 436 \text{ nm}$ ) tijekom titracije s *ct*-DNA ( $c = 5 \times 10^{-8} - 2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ), pukotina: 10-20; b) Ovisnost intenziteta fluorescencije spoja **2-8** pri valnoj duljini emisije  $\lambda_{\text{max}} = 527 \text{ nm}$  o koncentraciji  $c(\text{ct-DNA})$  u Na-kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ )



Slika D13. a) Promjene u fluorescencijskom spektru spoja **2-8** ( $c = 5 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 436 \text{ nm}$ ) tijekom titracije s pApU ( $c = 5 \times 10^{-8} - 2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ), pukotina: 10-20; b) Ovisnost intenziteta fluorescencije spoja **2-8** pri valnoj duljini emisije  $\lambda_{\text{max}} = 528 \text{ nm}$  o koncentraciji  $c(\text{pApU})$  u Na-kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ )

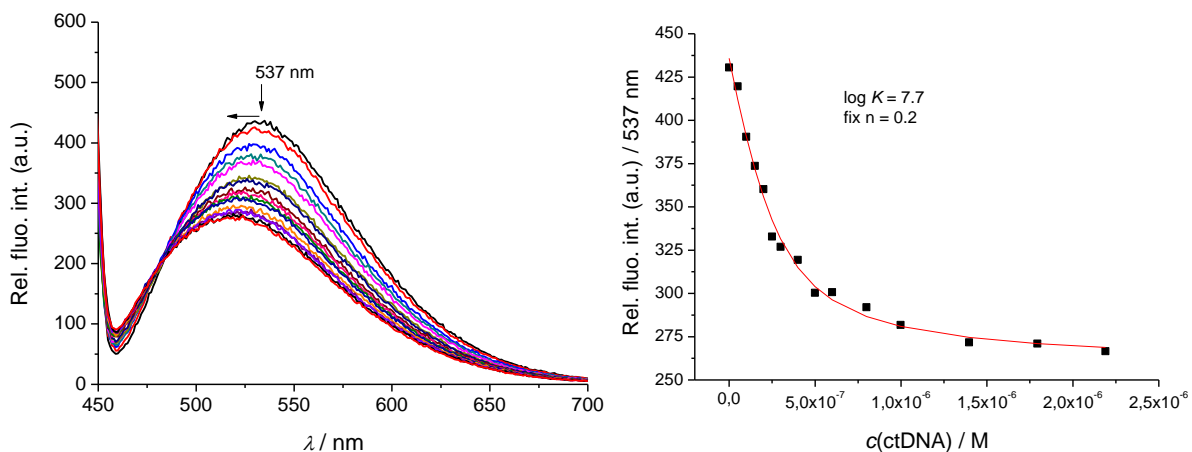


Slika D14. a) Promjene u fluorescencijskom spektru spoja **2-8** ( $c = 5 \times 10^{-8}$  M,  $\lambda_{\text{exc}} = 436$  nm) tijekom titracije s **poli(dGdC)<sub>2</sub>** ( $c = 5 \times 10^{-8} - 1,2 \times 10^{-6}$  M), pukotina: 10-20; b) Ovisnost intenziteta fluorescencije spoja **2-8** pri valnoj duljini emisije  $\lambda_{\text{max}} = 527$  nm o koncentraciji  $c(\text{poli(dGdC)}_2)$  u Na-kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,0)

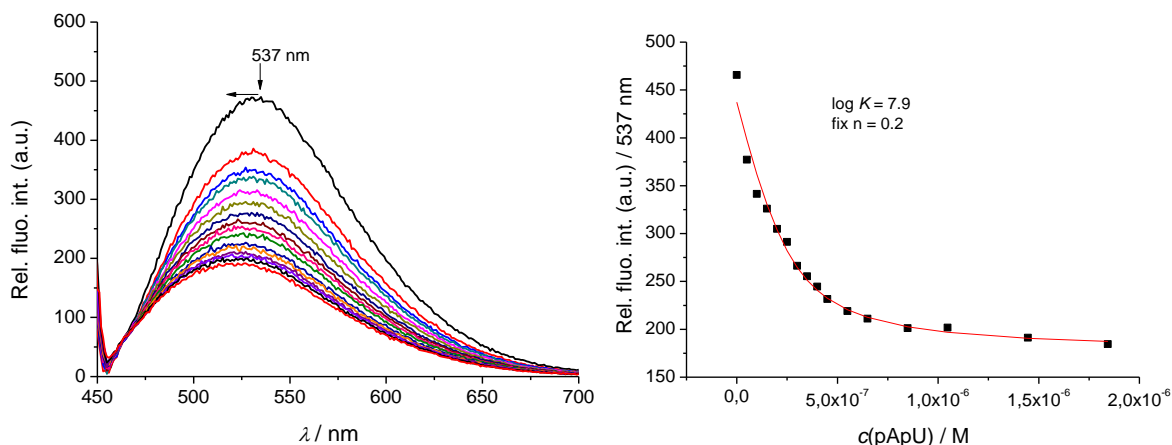


Slika D15. a) Promjene u fluorescencijskom spektru spoja **2-8** ( $c = 5 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 436$  nm) tijekom titracije s **poli(dAdT)<sub>2</sub>** ( $c = 5 \times 10^{-8} - 3,3 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ), pukotina: 10-20; b) Ovisnost intenziteta fluorescencije spoja **2-8** pri valnoj duljini emisije  $\lambda_{\text{max}} = 527$  nm o koncentraciji  $c(\text{poli(dAdT)}_2)$  u Na-kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH = 7)

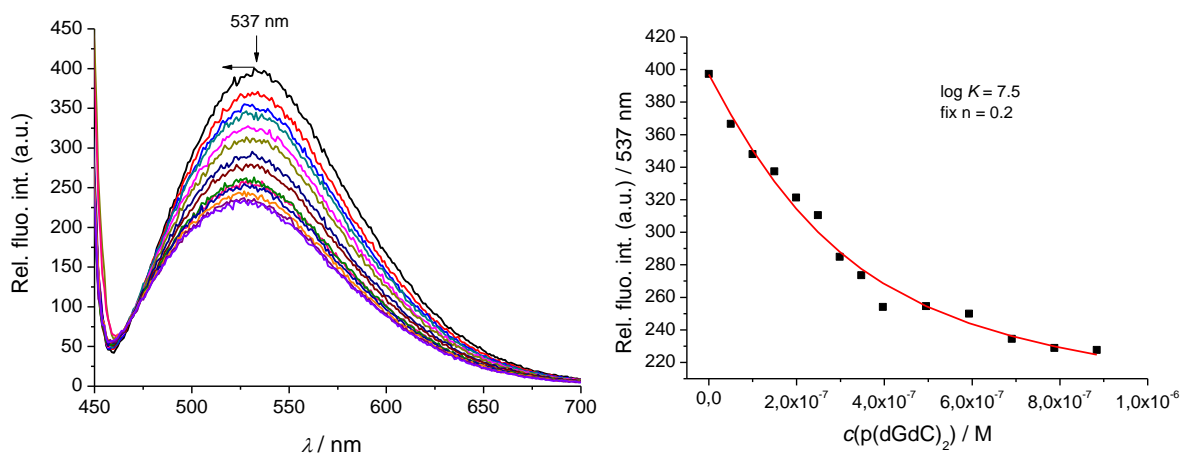




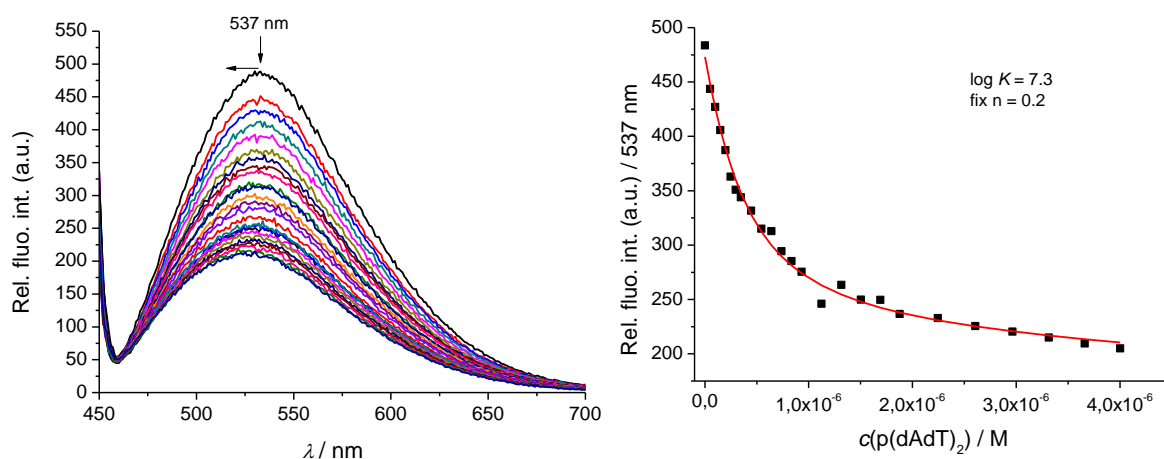
Slika D16. a) Promjene u fluorescencijskom spektru spoja **2-9** ( $c = 5 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 435 \text{ nm}$ ) tijekom titracije s **ctDNA** ( $c = 5 \times 10^{-8} - 2,2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ), pukotina: 10-20; b) Ovisnost intenziteta fluorescencije spoja **2-9** pri valnoj duljini emisije  $\lambda_{\text{max}} = 537 \text{ nm}$  o koncentraciji  $c(\text{ctDNA})$  u Na-kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ )



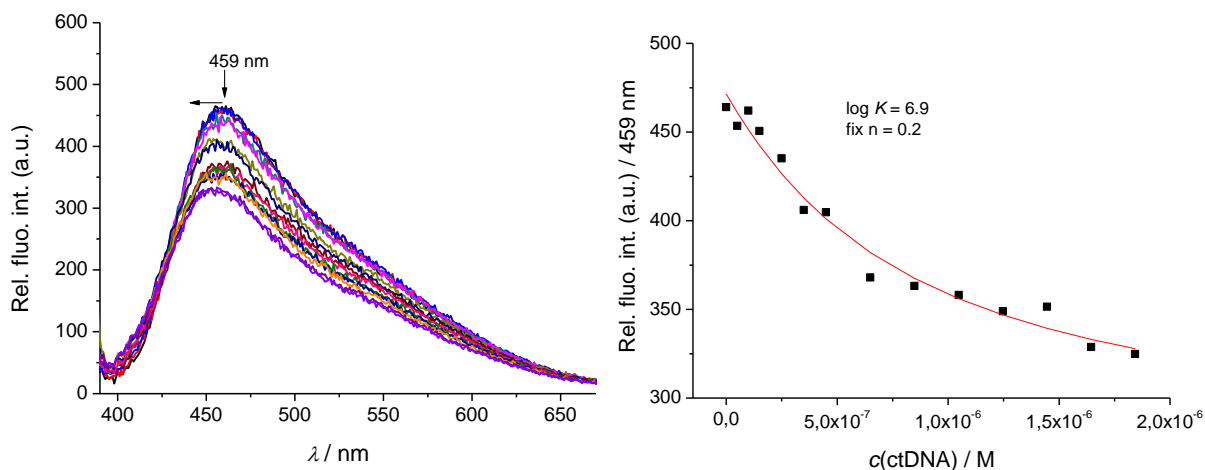
Slika D17. a) Promjene u fluorescencijskom spektru spoja **2-9** ( $c = 5 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 435 \text{ nm}$ ) tijekom titracije s **pApU** ( $c = 5 \times 10^{-8} - 1,8 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ), pukotina: 10-20; b) Ovisnost intenziteta fluorescencije spoja **2-9** pri valnoj duljini emisije  $\lambda_{\text{max}} = 537 \text{ nm}$  o koncentraciji  $c(\text{pApU})$  u Na-kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ )



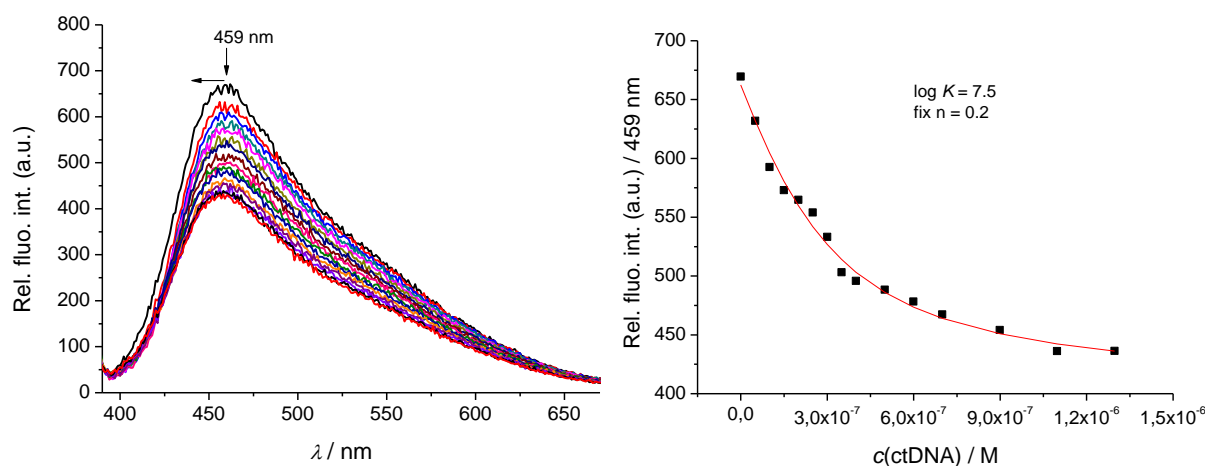
Slika D18. a) Promjene u fluorescencijskom spektru spoja **2-9** ( $c = 5 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 435 \text{ nm}$ ) tijekom titracije s **poli(dGdC)<sub>2</sub>** ( $c = 5 \times 10^{-8} - 8,9 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ), pukotina: 10-20;  
 b) Ovisnost intenziteta fluorescencije spoja **2-9** pri valnoj duljini emisije  $\lambda_{\text{max}} = 537 \text{ nm}$  o koncentraciji  $c(\text{poli(dGdC)}_2)$  u Na-kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH = 7)



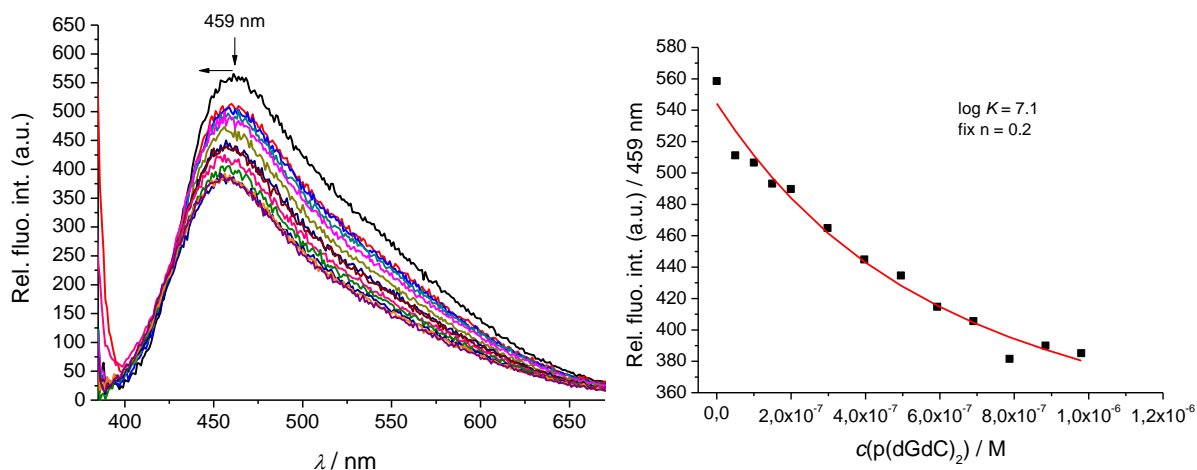
Slika D19. a) Promjene u fluorescencijskom spektru spoja **2-9** ( $c = 5 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 435 \text{ nm}$ ) tijekom titracije s **poli(dAdT)<sub>2</sub>** ( $c = 5 \times 10^{-8} - 4,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ), pukotina: 10-20;  
 b) Ovisnost intenziteta fluorescencije spoja **2-9** pri valnoj duljini emisije  $\lambda_{\text{max}} = 537 \text{ nm}$  o koncentraciji  $c(\text{poli(dAdT)}_2)$  u Na-kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH = 7)



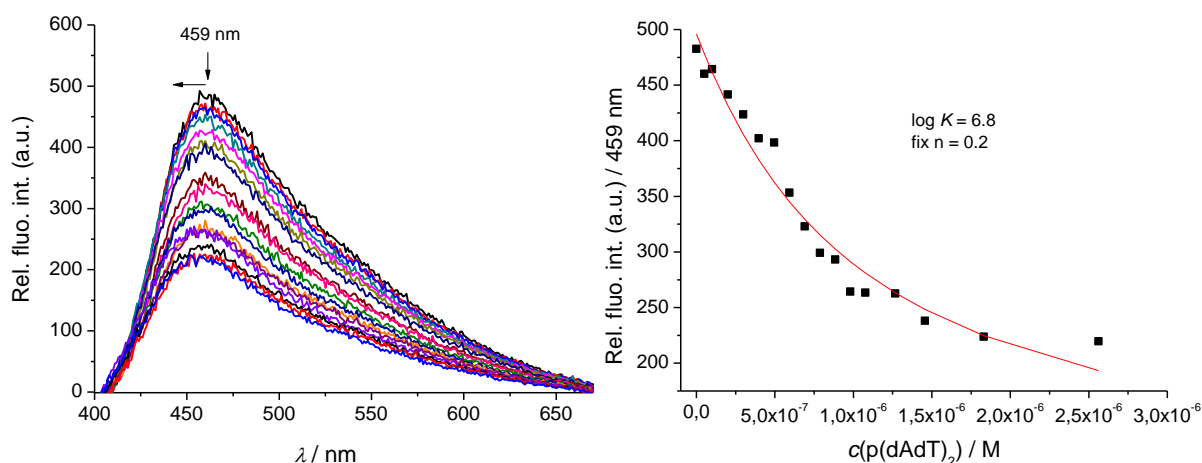
Slika D20. a) Promjene u fluorescencijskom spektru spoja **AN-3** ( $c = 5 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 360 \text{ nm}$ ) tijekom titracije s **ctDNA** ( $c = 5 \times 10^{-8} - 1,8 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ), pukotina: 20-20; b) Ovisnost intenziteta fluorescencije spoja **AN-3** pri valnoj duljini emisije  $\lambda_{\text{max}} = 459 \text{ nm}$  o koncentraciji  $c(\text{ct-DNA})$  u Na-kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ )



Slika D21. a) Promjene u fluorescencijskom spektru spoja **AN-3** ( $c = 5 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 360 \text{ nm}$ ) tijekom titracije s **pApU** ( $c = 5 \times 10^{-8} - 1,3 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ), pukotina: 20-20; b) Ovisnost intenziteta fluorescencije spoja **AN-3** pri valnoj duljini emisije  $\lambda_{\text{max}} = 459 \text{ nm}$  o koncentraciji  $c(\text{pApU})$  u Na-kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ )

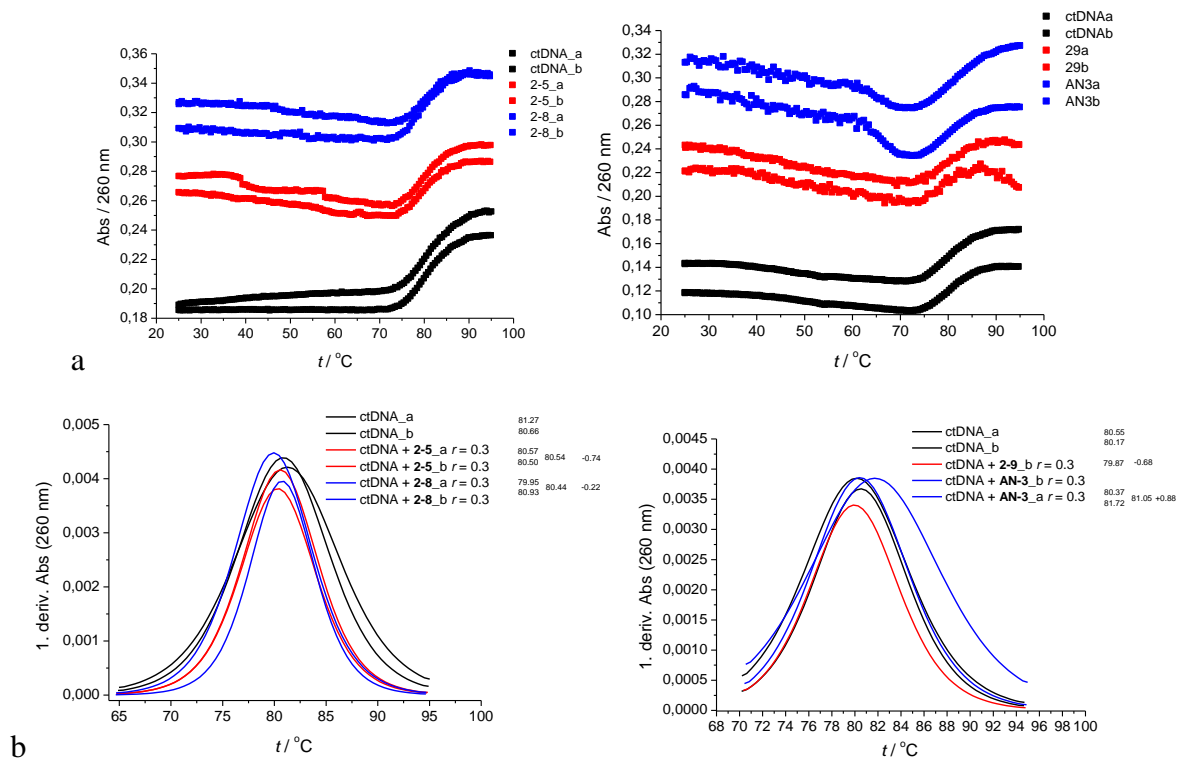


Slika D22. a) Promjene u fluorescencijskom spektru spoja **AN-3** ( $c = 5 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 360 \text{ nm}$ ) tijekom titracije s **poli(dGdC)<sub>2</sub>** ( $c = 5 \times 10^{-8} - 9,8 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ), pukotina: 20-20; b) Ovisnost intenziteta fluorescencije spoja **AN-3** pri valnoj duljini emisije  $\lambda_{\text{max}} = 459 \text{ nm}$  o koncentraciji  $c(\text{poli(dGdC)}_2)$  u Na-kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ )

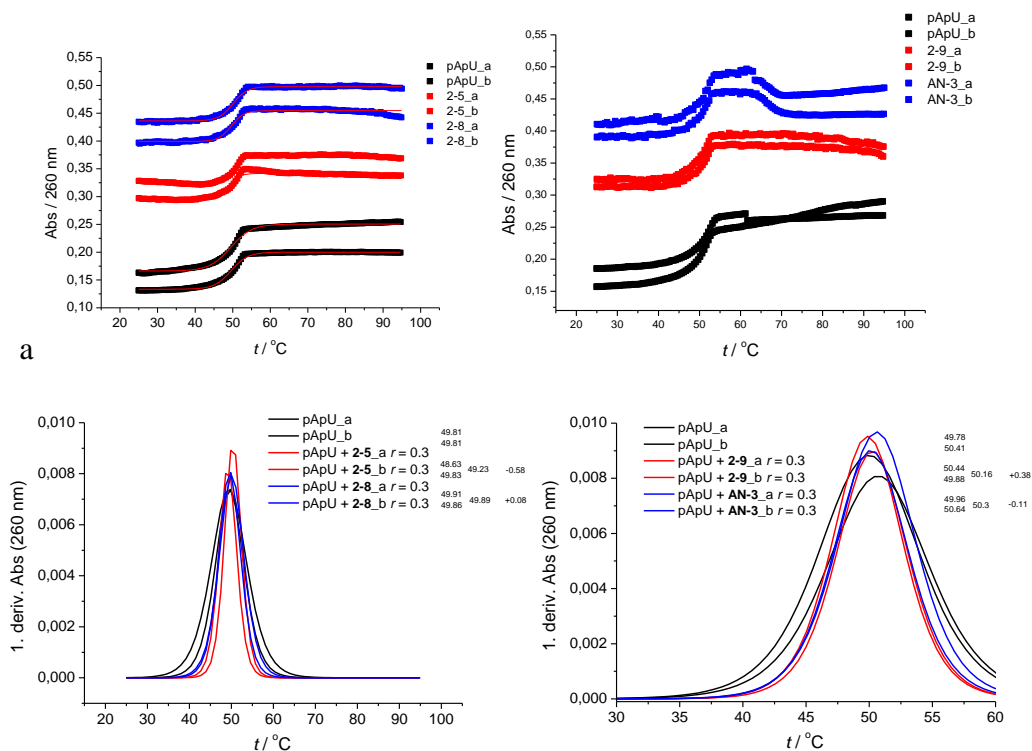


Slika D23. a) Promjene u fluorescencijskom spektru spoja **AN-3** ( $c = 5 \times 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 360 \text{ nm}$ ) tijekom titracije s **poli(dAdT)<sub>2</sub>** ( $c = 5 \times 10^{-8} - 2,6 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ), pukotina: 20-20; b) Ovisnost intenziteta fluorescencije spoja **AN-3** pri valnoj duljini emisije  $\lambda_{\text{max}} = 459 \text{ nm}$  o koncentraciji  $c(\text{poli(dAdT)}_2)$  u Na-kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7,0$ )

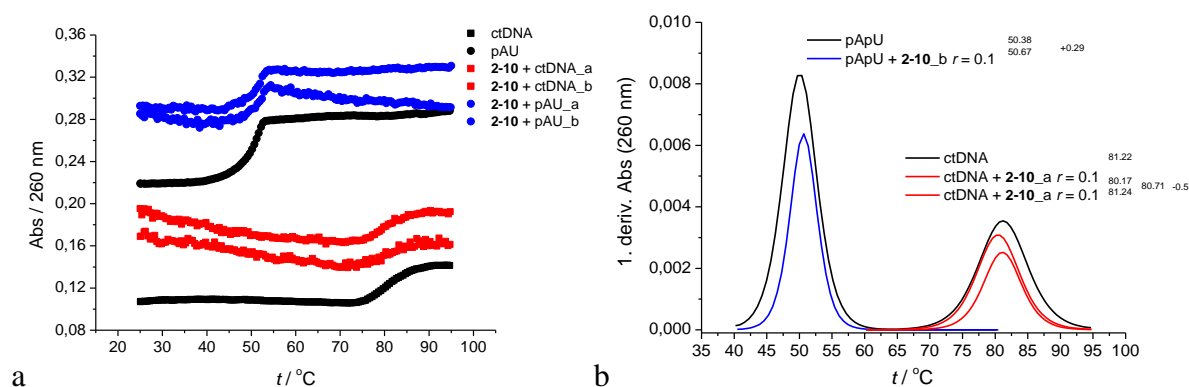
## 8.3. Dodatak poglavlju 4. 2. 2. Temperaturno mekšanje



Slika D24. a) krivulja mekšanja *ct*-DNA uz dodatak spojeva **2-5**, **2-8**, **2-9** i **AN-3** u omjeru  $r_{\text{ [spoj]}/[\text{polinukleotid}]} = 0,3$  u Na-kakodilatnom puferu ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7,0$ ) i b) prva derivacija denuracijske krivulje *ct*-DNA

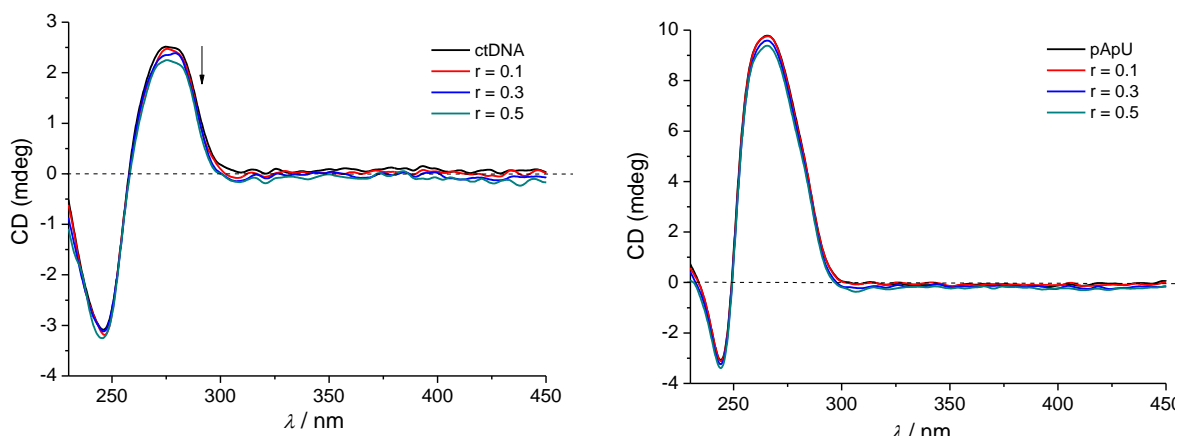


Slika D25. a) krivulja mekšanja **poli A-poli U** uz dodatak spojeva **2-5, 2-8, 2-9** i **AN-3** u omjeru  $r$  [spoj]/[polinukleotid] = 0,3 u puferu natrijeva kakodilata ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH= 7,0) i b) prva derivacija denaturacijske krivulje **poli A-poli U**

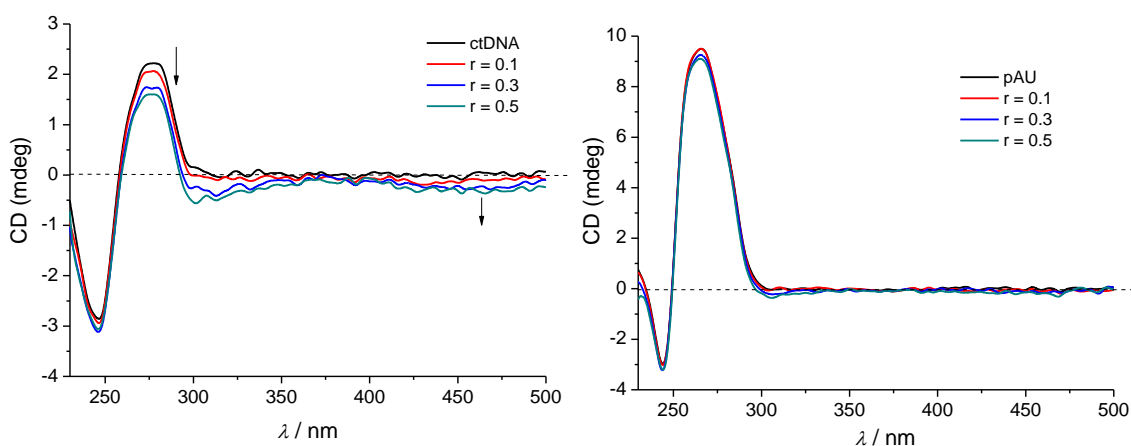


Slika D26. a) krivulje mekšanja **poli A-poli U** i **ct-DNA** uz dodatak spoja **2-10** u omjeru  $r$  [spoj]/[polinukleotid] = 0,1 u puferu natrijeva kakodilata ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH= 7,0) i b) prva derivacija denaturacijskih krivulja **poli A-poli U** i **ct-DNA**

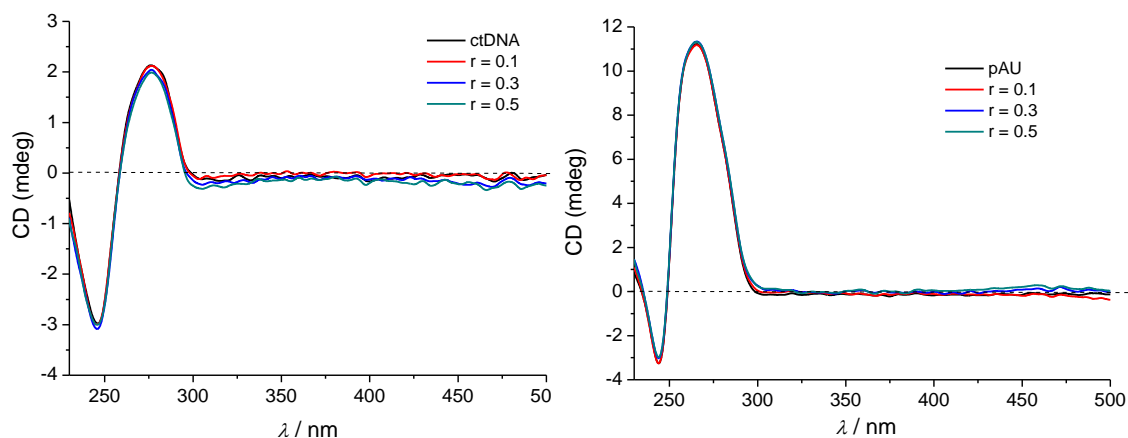
## 8.4. Dodatak poglavlju 4. 2. 3. CD titracije



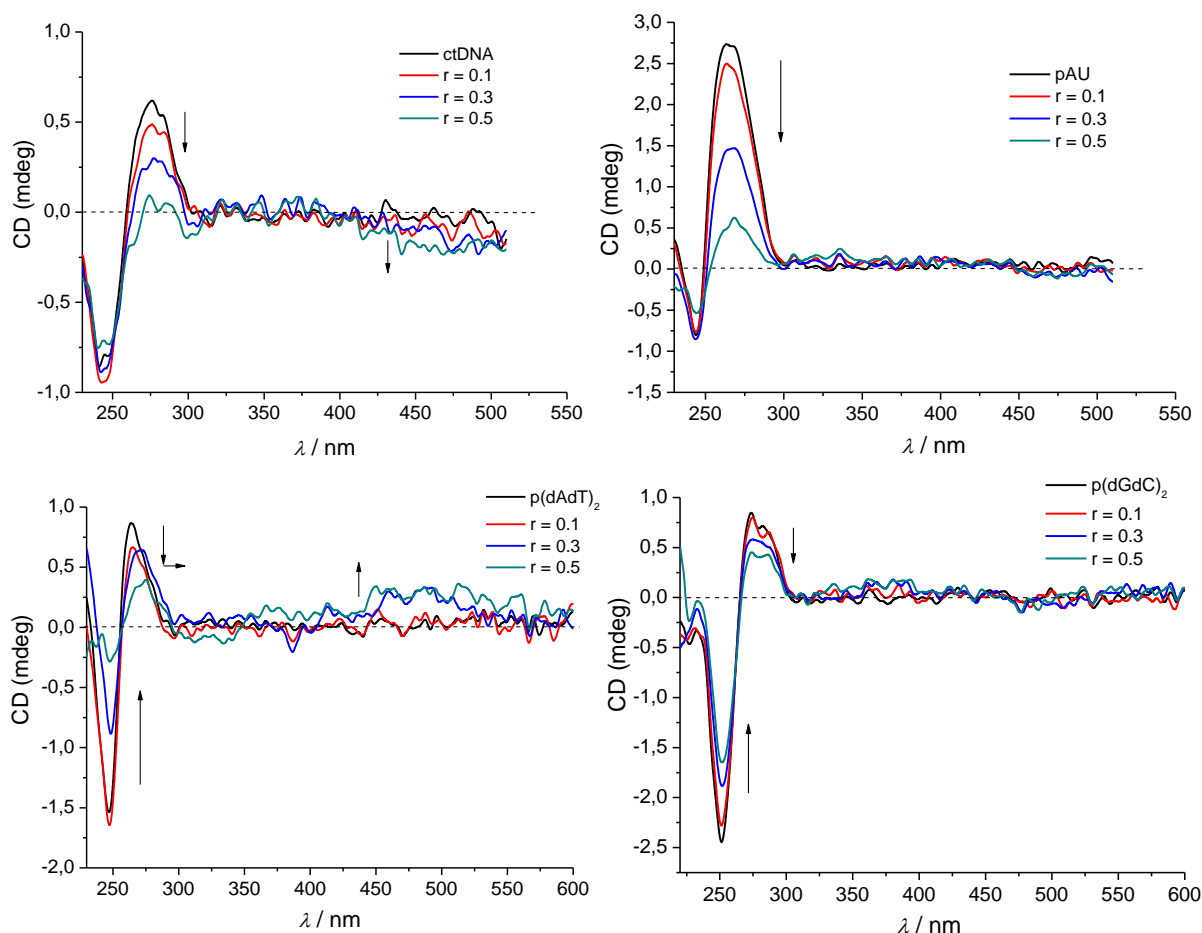
Slika D27. CD titracija *ct*-DNA ( $c = 3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) i poli A – poli U ( $c = 3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s **2-5** u molarnim omjerima  $r_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]} = 0,1, 0,3 \text{ i } 0,5$  u puferu natrijeva kakodilata ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7,0$ )



Slika D28. CD titracija *ct*-DNA ( $c = 3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ), i poli A – poli U ( $c = 3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s **2-8** u molarnim omjerima  $r_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]} = 0,1, 0,3 \text{ i } 0,5$  u puferu natrijeva kakodilata ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7,0$ )

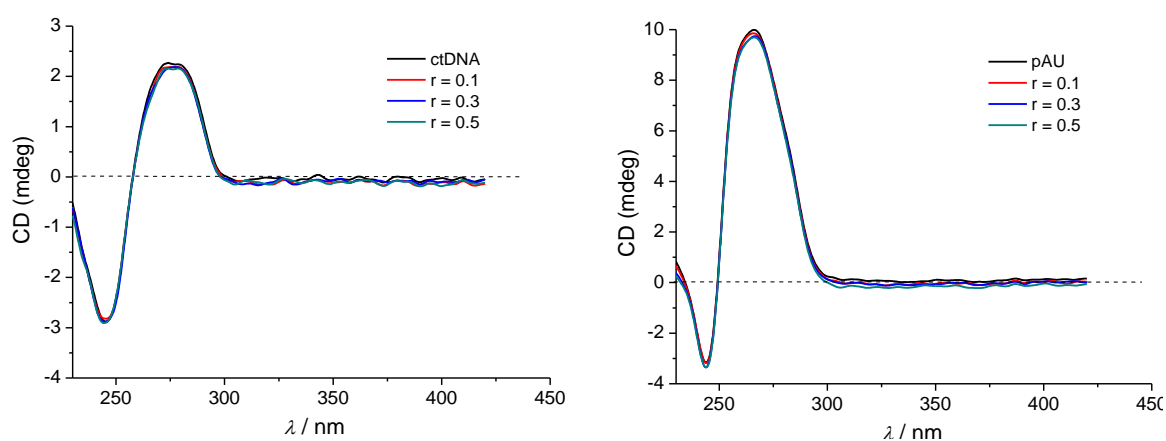


Slika D29. CD titracija *ct*-DNA ( $c = 3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ), i poli A – poli U ( $c = 3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s **2-9** u molarnim omjerima  $r_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]} = 0,1, 0,3 \text{ i } 0,5$  u puferu natrijeva kakodilata ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7,0$ )



Slika D30. CD titracija *ct*-DNA, poli A – poli U,  $\text{p}(\text{dAdT})_2$ , i  $\text{p}(\text{dGdC})_2$  ( $c_{\text{poli}} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s **2-10** u molarnim omjerima  $r_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]} = 0,1, 0,3 \text{ i } 0,5$  u puferu natrijeva kakodilata ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7,0$ )





Slika D31. CD titracija *ct*-DNA ( $c = 3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ), i poli A – poli U ( $c = 3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s AN-3 u molarnim omjerima  $r_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]} = 0,1, 0,3$  i  $0,5$  u puferu natrijeva kakodilata ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7,0$ )

## § 9. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Nina Vukadinović

Datum rođenja: 3. lipnja 1999.

Mjesto rođenja: Zagreb

### Obrazovanje

2007.–2014. I. Osnovna škola Dugave, Zagreb

2014.–2018. VII. Gimnazija, Zagreb

2018.–2022. Preddiplomski studij Kemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

2022. – Diplomski studij kemije, smjer: Analitička kemija i organska kemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2018.–2023. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka (Dan i noć na PMF-u)

2022.–2023. Smotra Sveučilišta u Zagrebu

2020.–2024. Znanstvene čarolije (Volonterski projekt Hrvatskog kemijskog društva)