

Sinteza konjugata cijaninskih boja i aminokiselina i istraživanje njihovih interakcija s DNA i RNA

Slade, Jakov

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:397206>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-23**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Jakov Slade

**SINTEZA KONJUGATA CIJANINSKIH
BOJA I AMINOKISELINA I ISTRAŽIVANJE
NJIHOVIH INTERAKCIJA S DNA I RNA**

Diplomski rad

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

Zagreb, 2018.

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

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom „Višenamjensko očitavanje DNA / RNA sekundarne strukture molekularnim kemijskim senzorima“ (HRZZ-IP-2013-11-1477).

Zahvale

Hvala dr.sc. Ivi Piantanidi, na odabiru teme, usmjerenju kada bih odlutao, dvogodišnjem mentorstvu, znanju koje sam stekao i svoj volji da dođe do ovog trenutka.

Zahvaljujem se svima u labosu LBIS što su mi uvijek bili pri ruci i bili tu kad god je trebalo. Posebno hvala Tamari na beskonačnom strpljenju, prenesenom znanju i vještinama, te potrošenom vremenu na vodstvo mog diplomskog.

Hvala profesorici Snežani Miljanić na ispravcima, savjetima, uputama, i zaista velikom trudu uloženom u ovaj rad i obranu.

Hvala Miji, Filipu i Davoru, za vrijeme provedeno na faksu i mimo njega. Sumnjam da je netko bolju ekipu s faksa mogao poželjeti.

Hvala i svim Kronerima jer ste bili tu i u dobru i u zlu.

Hvala svim ljudima iz srednje, znamo se već jako dugo a niste mi ni blizu dosadili.

Mojoj Matei ogromno hvala, na strpljenju i podršci, uz beskonačnu dozu ljubavi.

Zahvaljujem se svim bakama i didama što su uvijek bili uz mene.

Hvala Marku, Nikši i Vilku jer su najbolji burazi na svijetu.

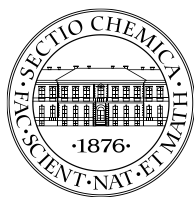
Hvala tati na strpljenju da se dođe do kraja ovoga puta i na svim vlakićima svijeta.

Na kraju posebno hvala mami na beskonačnoj podršci, guranju, svoj sreći i suzama, pomoći oko faksa i života, bez tebe ja ne bi bio ja.

Sadržaj

SAŽETAK.....	XI
ABSTRACT	XIII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Interakcije malih molekula s nukleinskim kiselinama	2
2.2. Cijaninske boje.....	4
2.3. UV/Vis spektroskopija.....	6
2.4. Fluorescencijska spektroskopija.....	7
2.4. Istraživanje vezanja malih molekula s DNA/RNA.....	9
2.5. Peptidi kao okosnice za izradu kombinatorijalnih biblioteka	10
2.6. Klik-kemija.....	11
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. Materijali	14
3.1.1. Kemikalije	14
3.1.2. Uređaji	15
3.2. Sinteza konjugata cijaninskih boja i aminokiselina.....	15
3.2.1. N-metil-2-metilmerkaptobenzotiazolov jodid 2.....	15
3.2.2. Sinteza lepidinskih derivata, 5a-c	16
3.2.3. Sinteza cijaninske boje	17
3.2.4. Sinteza azidnog derivata cijaninske boje	18
3.2.5. Klik-reakcija, sinteza konjugata cijaninske boje i DL-propargilglicina.....	18
3.2.6. Uklanjanje Boc-zaštite s N-kraja DL-propargilglicina	20
3.2.7. Zamjena protuiona	21
3.2.8. Praćenje tijeka reakcije takonoslojnom kromatografijom	23
3.3. Karakterizacija spojeva.....	23
3.3.2. Izrada baždarnog pravca za dobivanje molarne ekstinkcijskih koeficijenata	24
3.3.3. Određivanje termičke stabilnosti spojeva u otopini.....	24
3.4. Istraživanje interakcija spojeva s polinukleotidima	24
3.4.1. Fluorimetrijske titracije	25
3.4.2. Temperaturno mekšanje.....	26
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	28
4.1. Sinteza	28

4.2. Spektrofotometrijska karakterizacija spojeva	31
4.2.1. Izrada baždarnog pravca UV/Vis spektroskopijom	31
4.2.2. Temperaturna stabilnost vodenih otopina 10a-c	33
4.2.3. Intrinzična fluorescencija spojeva 10a-c	35
4.3. Interakcije polinukleotida s konjugatima cijaninskih boja i aminokiselina 10a-c.....	35
4.3.1. Fluorimetrijske titracije	35
4.3.2. Temperaturno mekšanje polinukleotida	38
4.3.3. Dodatne metode istraživanja.....	42
§ 5. ZAKLJUČAK	43
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	45
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	47
§ 8. DODATAK	XV
§ 9. ŽIVOTOPIS	XVI



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

SINTEZA KONJUGATA CIJANINSKIH BOJA I AMINOKISELINA I ISTRAŽIVANJE NJIHOVIH INTERAKCIJA S DNA I RNA

Jakov Slade

Cijaninske boje su važne fluorescentne probe za nukleinske kiseline koje pokazuju veliki afinitet za vezanje prema DNA i RNA. Sintetizirani su konjugati cijaninske boje i aminokiseline krenuvši od polaznih spojeva: benzotiazola, lepidina i DL-propargilglicina. Ključan korak sinteze je bakrom katalizirana cikloadicija azida i alkina (tzv. „klik“ reakcija). Dobivena su tri spoja s etilnim, propilnim i butilnim veznim lancem između cijaninskog i triazolnog dijela konjugata. Ispitane su interakcije dobivenih spojeva s različitim polinukleotidima, koristeći standardne spektrofotometrijske metode UV/Vis-spektroskopije, termičke denaturacije i fluorimetrije. Nove aminokiselinske boje, iako intrinzično ne-fluorescentne, daju snažan fluorimetrijski odgovor nakon vezanja na dvolančane (ds)-DNA ili (ds)-RNA, pri čemu se selektivnost u odgovoru emisije različitih polinukleotidnih sekundarnih struktura kontrolira dužinom poveznice. Novosintetizirani konjugati se različito vežu za polinukleotide različite sekundarne strukture, uz odgovarajuće različite intenzitete fluorescencijske emisije. Spektrofotometrijska ispitivanja upućuju većinom na vezanje cijaninske boje u utore DNA/RNA, no neki derivati u određene DNA/RNA interkaliraju.

(47 stranica, 27 slika, 3 tablice, 43 literaturna 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: cijaninske boje, interakcije s DNA/RNA, klik-reakcije, konjugat cijanin-aminokiselina

Mentor: dr. sc. Ivo Piantanida, znanstveni savjetnik i naslovni profesor

Neposredni voditelj: dr. sc. Tamara Šmidlehner

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

Ocjenitelji:

1. izv. prof. dr. sc. Snežana Miljanić
2. izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković
3. doc. dr. sc. Josip Požar

Zamjena: izv. prof. dr. sc. Sanda Rončević

Datum diplomskog ispita: 13. 6. 2018.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

SYNTHESIS OF CYANINE DYES-AMINO ACID CONJUGATES AND STUDY OF THEIR INTERACTIONS WITH DNA AND RNA

Jakov Slade

Cyanine dyes are important fluorescence probes for nucleic acids exhibiting high affinity for binding to DNA and RNA. Conjugates of cyanine dye and amino acid were synthesized from the starting compounds: benzothiazole, lepidine and DL-propargylglycine. The key step of synthesis is copper-catalyzed cycloaddition of azide and alkynes, a so called “click” reaction. Three compounds were obtained with the ethyl, propyl and butyl linkers between the cyanine part and the triazole part of the conjugate. The interactions of the conjugates with different polynucleotides were investigated using standard spectroscopic methods of UV/Vis spectroscopy, thermal denaturation experiments and fluorescence. Novel amino acid dyes, although intrinsically non-fluorescent, give rise to strong fluorimetric response upon binding to double-stranded (ds)-DNAs or (ds)-RNA, whereby selectivity in emission response to various polynucleotide secondary structures is controlled by linker length. Mostly, new compounds bind to the polynucleotide minor groove, while in some specific cases intercalation into DNA/RNA was observed.

(6 pages, 27 figures, 3 tables, 43 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: click reactions, cyanine-amino acid conjugate, cyanine dyes, DNA/RNA interactions

Mentor: Dr. Ivo Piantanida, Senior Scientist and Professor

Assistant mentor: Dr. Tamara Šmidlehner

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

Reviewers:

1. Dr. Snežana Miljanić, Associate Professor
2. Dr. Vesna Petrović Peroković, Associate Professor
3. Dr. Josip Požar, Assistant Professor

Substitute: Dr. Sanda Rončević, Associate Professor

Date of exam: 13. 6. 2018.

§ 1. UVOD

Organski spojevi male molekulske mase koji se ciljano vežu na nukleinske kiseline (DNA i RNA) imaju izuzetnu važnost zbog biološke, biokemijske ili medicinske primjene.¹ Prepoznavši specifičan slijed, male molekule najčešće stupaju u nekovalentne interakcije s ciljnim sljedovima DNA/RNA vežući se u mali utor DNA ili veliki utor RNA, interkaliranjem između parova baza DNA/RNA ili pak interakcijama pozitivno nabijenih molekula s negativno nabijenom okosnicom DNA/RNA.¹ Odnedavno znanstvenici kombiniraju upotrebu dva ili više nekovalentna načina vezanja koja omogućuju razvoj novih spojeva koji bi se selektivno vezali na biomolekule, uključujući i nukleinske kiseline.²

Razvoj fluorescentnih konfokalnih mikroskopa omogućio je upotrebu fluorescentnih markera za nukleinske kiseline i na taj način njihovu vizualizaciju. Među ostalim fluorescentnim markerima, danas se koriste cijaninske boje koje prema DNA i RNA pokazuju veliki afinitet.³ Cijaninske boje imaju visok molarni ekstinkcijski koeficijent te maksimum apsorpcije u vidljivom dijelu spektra, a razlikuju se po duljini polimetinskog mosta koji povezuje dva heterociklička sustava.³ U slobodnom stanju ne fluoresciraju, ali kada se vežu na DNA ili RNA emitiraju snažnu fluorescenciju uslijed zakočene rotacije oko jednostruke veze metinske skupine. Upravo ta svojstva čine cijanine vrlo pogodnima za spektrofotometrijska istraživanja interakcija s DNA i RNA.

U ovom radu, povezujući cijaninski analog tiazol-narančasto (engl. *thiazole orange*, TO) s bočnim lancem zaštićenog derivata DL-propargilglicina pomoću bakrom katalizirane cikloadicije azida i alkina (tzv. klik-reakcije), dobiveni su konjugati **10a-c** s dva kromofora u bočnom lancu aminokiseline: cijaninom i novonastalim triazolnim prstenom (produktom klik-reakcije). Interakcije novo-pripravljenih konjugata s DNA i RNA ispitane su standardnim spektrofotometrijskim metodama (UV/Vis i fluorescencijska spektroskopija, temperaturno mekšanje dvolančanih DNA ili RNA).

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Interakcije malih molekula s nukleinskim kiselinama

DNA ima važnu ulogu u biološkim procesima jer nosi nasljednu informaciju za sintezu svih proteina te tako izravno ili neizravno kontrolira strukturu i funkciju stanice. DNA ima strukturu dvostruke uzvojnice sa šećerno-fosfatnom okosnicom na vanjskoj strani molekule. Baze su smještene u unutrašnjosti molekule i orijentirane tako da se vodikove veze stvaraju između purina i pirimidina. Sparivanje baza vrlo je specifično - adenin se uvijek sparuje s timinom, a gvanin sa citozinom te su dva lanca DNA komplementarna. Za razliku od molekule DNA, molekula RNA umjesto šećera deoksiriboze sadrži ribozu, a umjesto timina pirimidinsku bazu uracil.⁴

Od otkrića strukture DNA (1953.) istražuju se interakcije s terapijski važnim malim molekulama koje pripadaju različitim vrstama lijekova, u rasponu od protutumorskih lijekova do antibiotika.² Male molekule, odnosno spojevi male molekulske mase, značajni su jer lakše prolaze kroz biološke membrane od onih veće molekulske mase. Tako kroz krvno-moždanu barijeru mogu proći samo molekule čija je molekulska masa manja od 600 Da.⁵ Male molekule se mogu vezati izravno na DNA, odnosno RNA. Takve interakcije mogu utjecati na procese koji slijede i tako djelovati na aktivnost proteina uključenih u održavanje strukture i funkcija stanice.^{1,6}

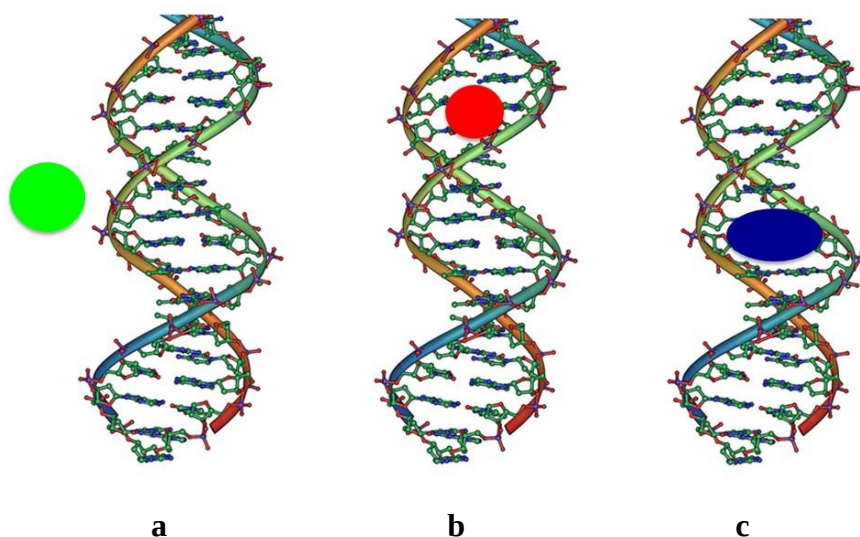
Nova saznanja o interakcijama različitih kemijskih spojeva s nukleinskim kiselinama omogućuju razjašnjenje djelovanja prirodnih i sintetskih lijekova koji se vežu na DNA/RNA, kao i kontrolu osnovnih funkcija DNA *in vivo* i *in vitro* radi primjene u dijagnostici te potencijalno genskoj terapiji.^{1,7}

Postignut je značajan napredak u razumijevanju osnovnih principa selektivnog prepoznavanja sljedova DNA. Navedena istraživanja omogućuju razvoj novih i učinkovitih lijekova usmjerenih na DNA koji mogu kontrolirati ekspresiju gena. Tako se stvaraju mogućnosti za razvoj novih pristupa liječenju različitih bolesti, uključujući i tumore.⁷

Interakcije između malih molekula i DNA mogu biti dvojake: nepovratne (npr. kovalentne veze male molekule s polinukleotidima) i ravnotežne (nekovalentne interakcije).

Ravnotežne, nekovalentne interakcije najčešće uključuju nastajanje termodinamički stabilnog kompleksa male molekule s polinukleotidom iako u nekim slučajevima i kinetički najpovoljniji kompleksi bitno utječu na odvijanje procesa.¹

Tri su glavna tipa nekovalentnih interakcija između malih molekula i DNA/RNA: elektrostatske interakcije, vezanje u mali utor DNA/RNA i interkalacija u DNA/RNA.^{1,6,8}



Slika 1. Načini vezanja malih molekula na polinukleotide: a) elektrostatske interakcije, b) vezanje u mali utor DNA, c) interkalacija u DNA.

Elektrostatske interakcije nastaju između negativno nabijenih fosfata polinukleotida molekule DNA i pozitivno nabijenih polikationskih spojeva (slika 1a). Afinitet vezanja direktno ovisi o broju pozitivnih naboja male molekule. Ovi spojevi ne pokazuju selektivnost vezanja s obzirom na slijed nukleotida u DNA ili RNA. Tako se, na primjer, vežu alifatski poliamini (npr. spermin), koji sudjeluju u biološkim procesima stanice.¹

Male molekule se mogu vezati u mali ili u veliki utor nukleinskih kiselina (slika 1b). Vezanje u utor DNA/RNA uključuje vodikove veze malih molekula s bazama nukleinskih kiselina ili van der Waalove interakcije.⁶ To je izuzetno važno jer se na ovom tipu vezanja temelji djelovanje mnogih antibiotika i protutumorskih lijekova koji se vežu u mali utor DNA. Ovi spojevi imaju konveksni oblik molekule koji odgovara konkavnom obliku utora dvostrukih uzvojnica DNA i RNA, a raspored pozitivnih naboja u molekuli spoja omogućuje interakcije s negativno nabijenim fosfatima nukleinske kiseline.¹

Neke male molekule se interkaliraju, tj. umeću između parova baza DNA/RNA (slika

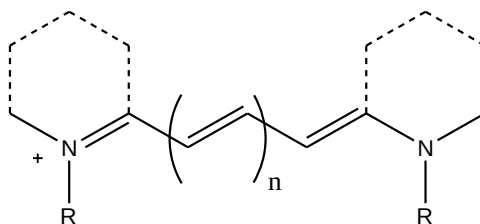
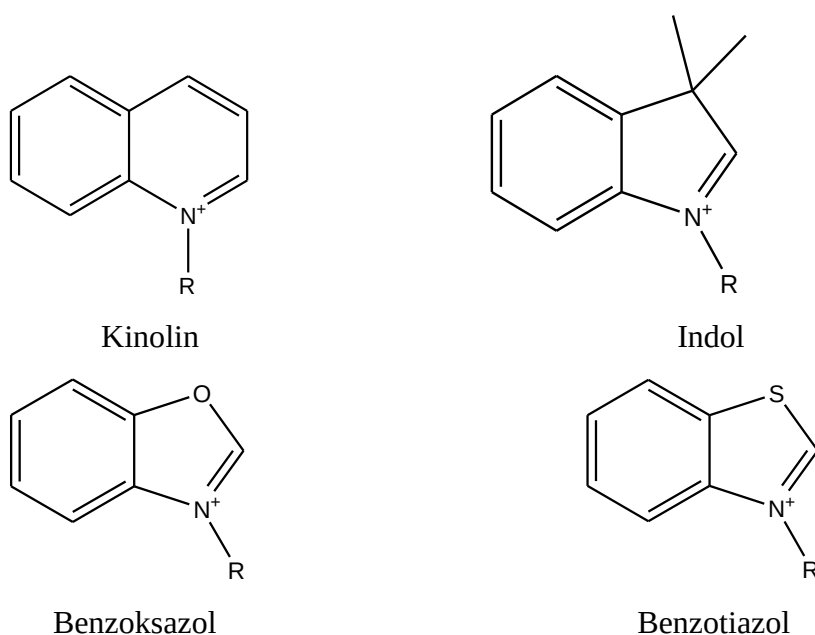
1c).⁹ Naime, dvolančani i neki jednolančani polinukleotidi u vodenim otopinama stvaraju dobro organizirane stabilne helikalne strukture. Te strukture su posljedica dinamičkog ravnotežnog procesa pri kojem se površina kontinuirano mijenja i baze se povremeno razmiču. Ukoliko se u otopini nalaze planarne aromatske molekule, zbog ravnoteže unutar lanca polinukleotida dolazi do njihovog umetanja, odnosno interkalacije između parova baza. To umetanje stabilizira i ukrućuje polinukleotidni lanac te dolazi do produljenja uzvojnice, njenog “odvijanja” i deformacije.¹

Navedeni načini vezanja značajni su za interakcije malih molekula s DNA/RNA. Nekoliko istraživanja pokazalo je da se neke male molekule vežu za jednu nukleinsku kiselinu na više načina. To svojstvo miješanog vezanja može se povezati s njihovim mehanizmom djelovanja i terapijskim učinkom.¹⁰

2.2. Cijaninske boje

Povijesno, cijaninske boje pojavile su se još prije 150 godina, s prvom potvrđenom sintezom plave krutine 1856. godine.¹¹ Široko se primjenjuju u osvjetljavanju fotografija u boji, kao fluorescentni markeri biomolekula, npr. proteina i nukleinskih kiselina, te kao osjetljive probe za praćenje svojstava u okolišu kao što su viskoznost ili polarnost.¹² U sintetskim laboratorijima sintetizirane su cijaninske boje koje apsorbiraju u području valnih duljina od 400 do 1000 nm,¹³ topive su u širokom spektru organskih otapala i vodi, te posjeduju reaktivne skupine koje omogućuju povezivanje s drugim molekulama.¹⁴

Cijaninske boje u svojoj strukturi sadrže polimetinski most koji odvaja dva N-atoma u odvojenim podjedinicama molekule (slika 2). Polimetinski most sadrži neparan broj ugljikovih atoma, povezanih hiperkonjugacijom, te je stoga pozitivni naboj delokaliziran rezonancijom preko oba dušikova atoma. Mogu sadržavati 1, 3, 5, ili čak 7 C-atoma u polimetinskom mostu, te se nazivaju cijanin (1), karbocijanin (3), dikarbocijanin (5), odnosno trikarbocijanin (7).³ Neki od primjera podjedinica cijaninskih boja su: kinolin, indol, benzoksazol, benzotiazol (slika 3).

Slika 2. Općenita strukturna formula cijaninske boje ($n = 0, 1, 2, 3$).Slika 3. Strukture podjedinica cijaninskih boja: kationi kinolina, indola, benzoksazola i benzotiazola.³

Dušikovi atomi u cijaninskim bojama uglavnom su dio aromatskog sustava te su većinom alkilirani. Upotrebom različitih supstituenata na različitim mjestima u sustavu postižu se željena svojstva, npr. bolja topljivost u vodi, agregacija (može biti poželjno i nepoželjno svojstvo), te se mogu mijenjati elektronska svojstva kromofora. Cijaninske boje također se dijele na simetrične i asimetrične. Simetrične sadrže dva identična heterociklička sustava povezana na istim mjestima u sustavu, a asimetrične cijaninske boje sadrže različite heterocikličke sustave, ili iste sustave povezane na različitim mjestima.³

Kao i sve male molekule, cijaninske boje mogu se vezati na polinukleotide na više načina, a najzastupljeniji su interkalacija i vezanje u mali utor dvostruke uzvojnice. Vezanje u mali utor uzrokuje manju deformaciju dvostruke uzvojnice od interkaliranja.

Oba planarna heterociklička dijela molekule imaju tendenciju interkaliranja, dok fleksibilni polimetinski most omogućuje uvijanje potrebno da slijedi zakrivljenost malog utora. Malim promjenama strukture cijaninske boje ili slijeda DNA mogu se mijenjati načini vezanja, i to svojstvo daje nebrojene mogućnosti organskim kemičarima za sintezu i izučavanje novih i drugačijih struktura, svojstava i funkcionalnosti cijaninskih boja te mogućnosti vezanja na DNA i RNA.³

U vodenoj otopini cijaninske boje ne pokazuju emisiju fluorescence. Razlog toj pojavi je brzi neradijativni povratak iz pobuđenog stanja kroz torzijsko gibanje u polimetinskom mostu koji spaja dva heterociklička prstena.¹⁵ Kada je cijaninska boja nekovalentno vezana na DNA, dolazi do ograničenja ove konformacijske mobilnosti, te posljedično do jake fluorescencijske relaksacije iz pobuđenog stanja.¹⁶

2.3. UV/Vis spektroskopija

Ultraljubičasta-vidljiva spektroskopija (engl. *ultraviolet-visible spectroscopy*, UV/Vis) je apsorpcijska spektroskopija u ultraljubičastom i vidljivom dijelu spektra. Uslijed pobude vanjskih elektrona atoma i molekula u UV/Vis području elektromagnetskog zračenja (100–800 nm) dolazi do prijelaza elektrona iz osnovnog (nižeg) u jedno od pobuđenih (viših) elektronskih stanja. Osnovne značajke UV/Vis spektroskopije su široka primjenjivost, velika osjetljivost, visoka selektivnost, dobra točnost, jednostavnost i prikladnost.¹⁷

Molekule koje sadrže π -elektrone ili nevezujuće elektrone (n-elektroni) mogu apsorbirati energiju u obliku ultraljubičaste ili vidljive svjetlosti kako bi potaknuli te elektrone na prijelaze u protuvezne molekulske orbitale. Što je lakše pobuditi elektrone (niži energetski razmak između molekularnih orbitala), to je veća valna duljina svjetlosti koju molekula apsorbira. Postoje četiri moguće vrste prijelaza (π - π^* , n- π^* , σ - σ^* i n- σ^*), a odgovarajuća energija elektronskog prijelaza prati niz: σ - $\sigma^* > n$ - $\sigma^* > \pi$ - $\pi^* > n$ - π^* .¹⁷

UV/Vis spektroskopija rutinski se koristi u analitičkoj kemiji za kvantitativno određivanje različitih analita, kao što su prijelazni metalni ioni, visoko konjugirani organski spojevi i biološke makromolekule, kao i za istraživanje interakcija malih molekula s DNA.

Spektrofotometrijska analiza se obično provodi u otopinama, ali se također mogu proučavati tvari u krutom i plinovitom stanju.

Organski spojevi, posebno oni s visokim stupnjem konjugacije, apsorbiraju svjetlost u UV ili vidljivom području elektromagnetnog spektra. Pritom se kao otapalo koristi voda, za spojeve topljive u vodi, ili neko od pogodnih organskih otapala. Većina organskih otapala apsorbira u UV/Vis području, pa se često koristi etanol zbog slabe apsorpcije pri većini valnih duljina. Polarnost i pH otapala mogu utjecati na apsorpcijski spektar organskog spoja. Na primjer, tirozin povećava maksimum apsorpcije i molarni ekstinkcijski koeficijent kada se pH povećava od 6 do 13 ili kada se polarnost otapala smanjuje.^{17,18}

UV/Vis spektrofotometar je uređaj koji mjeri omjer intenziteta zračenja koje prolazi kroz uzorak (I) i intenziteta upadnog zračenja (I_0). Omjer I/I_0 naziva se propusnost ili transmitancija (engl. *transmittance*), i obično se izražava kao postotak (% T). Apsorbancija, A , u odnosu je prema propusnosti prema sljedećem izrazu:

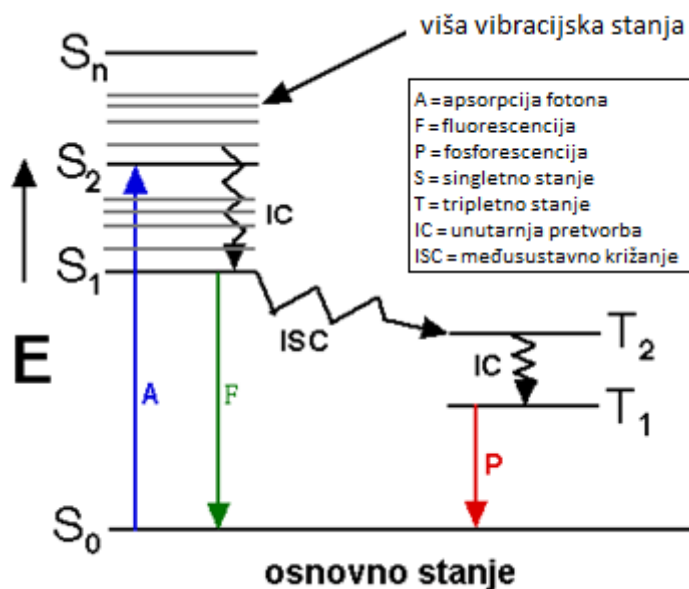
$$A = -\log (\%T/100\%)$$

2.4. Flouescencijska spektroskopija

Fluorescencijska spektroskopija je analitička metoda kojom se molekule kromofora pobuđuju elektromagnetskim zračenjem u UV/Vis području te povratkom u osnovno stanje emitiraju zračenje. Fluorescencija je važan istraživački alat u mnogim područjima analitičke znanosti, zbog svoje visoke osjetljivosti i selektivnosti. Emisijski spektar daje informaciju za kvantitativne i kvalitativne analize.¹⁷ Fluorescencijska spektroskopija može biti za do osam redova veličine osjetljivija od apsorpcijske (UV/Vis) spektroskopije zbog efekta Stokesovog pomaka. Fluorescencijska spektroskopija se koristi u biokemijskim, medicinskim i kemijskim istraživanjima te se njom istražuju struktura, dinamika i interakcije molekula u otopini, krutom ili rjeđe plinovitom stanju.

Apsorpcijom zračenja molekula prelazi iz osnovnog u jedno od pobuđenih singletnih elektronskih stanja. Vrlo brzom vibracijskom relaksacijom molekula prelazi u osnovno vibracijsko stanje istog pobuđenog elektronskog stanja, iz kojeg neradijativnim putem „unutarnjom pretvorbom“ prelazi u najniže pobuđeno elektronsko stanje ili može međusustavnim križanjem prijeći u stanje različitog multipliciteta (tripletno stanje). Iz prvog pobuđenog singletnog stanja molekula se vraća u osnovno elektronsko stanje procesom

fluorescencije, dok se iz tripletnog stanja procesom fosforescencije vraća u isto osnovno stanje. Dakle, pri fluorescenciji ne dolazi do promjene multipliciteta stanja, dok se pri fosforescenciji on mijenja. Oba navedena procesa zajednički nazivamo luminiscencijom. Ovi procesi prikazani su na slici 4, prikazu dijagrama po Jablonskom.¹⁸



Slika 4. Dijagram po Jablonskom.

Kako se elektroni molekula mogu vratiti u bilo koji od nekoliko vibracijskih stanja u osnovnom stanju, emitirani fotoni će imati različite energije, a time i frekvencije dajući vrpcu emitiranog zračenja. Zbog pojave zvane Stokesov pomak sve linije emisijskog zračenja imat će nešto veću valnu duljinu i manju energiju od pobudnih linija.¹⁷ Pojam kvantnog iskorištenja (engl. *quantum yield*) opisuje koliko je energije pobude vraćeno kroz energiju fluorescencije (emisije). Uz visoko kvantno iskorištenje i značajni Stokesov pomak prema većim valnim duljinama, intenzitet emisije će višestruko porasti s obzirom na intenzitet ulaznog svjetla na valnoj duljini pobude, što ujedno rezultira izrazitom osjetljivošću fluorescencije kao metode.

2.4. Istraživanje vezanja malih molekula s DNA/RNA

Kako bi se dobio uvid u načine interakcija malih molekula (cijaninskih boja) s DNA, moguće je koristiti nekoliko metoda.¹⁹ Višedimenzijska NMR spektrometrija i kristalografija X-zrakama daju uvid u komplekse DNA-male molekule na razini atoma. Čak i jednodimenzijska NMR spektrometrija može upućivati na određen način vezanja male molekule na DNA/RNA.¹

Spektrofotometrijske metode i hidrodinamički pokusi pružaju neizravne informacije koji podržavaju ili opovrgavaju razne načine vezanja. Najčešće korištene spektrofotometrijske metode su UV/Vis, fluorescencija, cirkularni dikroizam (CD) i linearni dikroizam (LD).

Vezanje male molekule s DNA/RNA može dovesti do promjene apsorpcijskog maksimuma, i/ili ekstincijskog koeficijenta kromofora u interakciji. Iako su te informacije nedovoljne da bi se otkrio način vezanja, mogu se odrediti ravnotežne konstante vezanja na temelju koncentracijske ovisnosti opaženih pomaka u spektru.

Detekcija DNA važna je za genetska testiranja, kliničku dijagnostiku i analizu mikročipova. Fluorescencija je danas najčešći oblik detekcije specifičnih sekvenci DNA. Fluorescencijsku oznaku nose ili DNA ili marker koji se veže za DNA. Kada dođe do hibridizacije, odnosno vezanja s DNA, mijenja se valna duljina fluorescencije, čiji se intenzitet može mjeriti.²⁰

2.4.1. Interakcije između fluorescentne boje tiazol-narančasto i DNA

Boja tiazol-narančasto (TO) ne fluorescira u vodenoj otopini, no po vezanju na dvolančanu molekulu DNA poljavljuje se izraziti emisijski spektar TO. Ovo svojstvo omogućuje upotrebu boje TO (kao i svih ostalih cijaninskih analoga) kao markera (ds)DNA, koji „upale“ (engl. *light-up*) fluorescenciju tek u prisustvu mete. Obzirom na laku dostupnost, fluorescencijski markeri imaju značajnu i široku komercijalnu upotrebu.²¹

Između velikog broja primjena takvog svojstva, jedan od primjera bazira se na hibridizaciji DNA s komplementarnom peptidnom nukleinskom kiselinom (PNA), koja ima kovalentno vezan TO.²² Peptidna nukleinska kiselina sastoji se od istih baza kao molekula DNA, ali ima peptidnu okosnicu umjesto fosfatno-šećerne okosnice. Boja TO je kovalentno vezana na jednolančanu PNA, te ne fluorescira jer za interkaliranje treba dvolančanu uzvojnica. Tek hibridizacijom PNA s komplementarnom DNA nastaje dvolančana uzvojnica, što dovodi do interkaliranja TO i jake fluorescencije. Problem u tim eksperimentima je izvjestan afinitet boje

TO za jednolančanu molekulu PNA, najvjerojatnije zbog kombinacije djelomičnog slaganja sa susjednim nukleobazama i hidrofobnog učinka, a to može dovesti do značajne pozadinske fluorescencije.²³

2.5. Peptidi kao okosnice za izradu kombinatorijalnih biblioteka

Kombinatorijalna sinteza omogućuje brzu pripravu velikog broja molekula. Osnovni princip kombinatorijalne kemije je priprema biblioteka (knjižnica) s velikim brojem spojeva te potom prepoznavanje željenih spojeva. Kombinatorijalna kemija danas ima ogroman značaj u farmaceutskoj industriji. U potrazi za aktivnim spojem, istraživači stvaraju biblioteke različitih, ali srodnih spojeva.²⁴

Kombinatorijalne biblioteke mogu pokrivati širok raspon linearnih ili makrocikličkih kemijskih molekula: peptida, nepeptidnih oligomera, peptidomimetika, malih molekula i prirodnih organskih molekula sličnih proizvodu.²⁴

Peptidi aktivno i dinamično utječu na budućnost znanstvenih otkrića u granama kemije, biokemije, lijekova i moderne medicine. Lako se sintetiziraju u većim količinama, te se kemijskim modifikacijama može mijenjati njihov afinitet, naboj, hidrofobnost, stabilnost i topljivost te se također mogu optimizirati za upotrebu *in vivo*. Biološki polужivot peptida odgovara polужivotu radionuklida koji se koriste u klinici, što ih čini atraktivnim probama za molekularno biooslikavanje.²⁵

Peptidne biblioteke, koje se sastoje od nekoliko tisuća do desetaka milijuna različitih peptida, mogu se proizvesti kombinacijom biološkog i sintetičkog pristupa. Peptidna biblioteka sadrži veliki broj peptida koji imaju raznolike kombinacije aminokiselina. Proizvodnjom velikog broja peptida, koji se međusobno razlikuju u sastavu aminokiselina, moguće je utvrditi kako redosljed aminokiselina utječe na vezivanje peptida na receptor.²⁶

U svrhu generiranja peptida s različitim preklapanjima prirodnih proteina koristi se jednostavna i ekonomična metoda peptidne biblioteke prikaza faga. Ova biološka metoda ograničena je međutim na peptide koji sadrže samo L-aminokiseline. Kao alternativa može se koristiti ugradnja neprirodnih aminokiselina u peptide da bi se postigao učinkovitiji peptid. Sintetske kombinatorijalne biblioteke mogu primiti D-aminokiseline, neprirodne aminokiseline, pa čak i organske dijelove, zbog čega su ovi pristupi vrlo prilagodljivi. Sintetske metode uključuju metodu paralelne biblioteke koja se prostorno može adresirati, metodu kombinatorijalne biblioteke koja zahtijeva dekonvoluciju (rastavljanje), metodu

kombinatorijalne biblioteke jedna-kuglica, jedan-spoj (engl. *one-bead, one-compound*, OBOC), kemijske mikročipove koje kodiraju peptidne nukleinske kiseline i metodu sintetske biblioteke koja zahtijeva kromatografsku selekciju.^{26,27}

Razvijene su različite metode za probir ovih kombinatorijalnih biblioteka. Na primjer, biblioteke peptida prikaza faga mogu se pretražiti prema sposobnosti vezanja faga na jedinstvene imobilizirane ciljne proteine ili cijele stanice, peptidne mikroploče mogu se pretražiti prema njihovoj sposobnosti interakcije s fluorescentnim proteinima, metode koje zahtijevaju rastavljanje mogu se pretražiti standardnim testovima, i biblioteke OBOC mogu se pretražiti vezanjem na kuglice, funkcionalnim testovima ili biokemijskim testovima.

Razvoj novih tehnika za probir (engl. *screening*) i sintezu peptida može dovesti do značajnih pomaka u razvoju i istraživanju lijekova. Izazov je povoljno i učinkovito stvarati tisuće, pa čak i milijune peptida, kako bi ih se moglo koristiti u studijama vezanja.²⁶

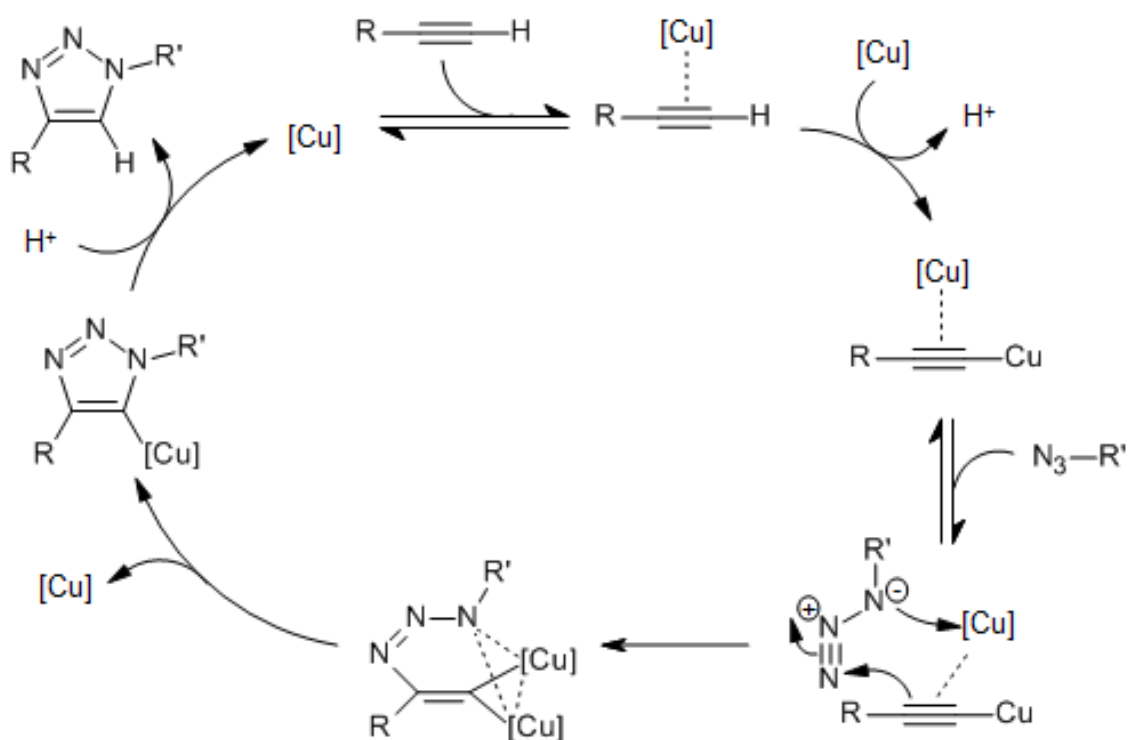
Nadalje, različiti prirodni peptidi mogu se koristiti za prijenos tvari u stanicu, npr. reproduktivni peptidni hormoni se koriste za ciljanje tumorskih stanica zbog velike ekspresije njihovih receptora na mnogim tumorskim stanicama. Danas se koristeći peptidne biblioteke odabiru peptidi koji se vežu na specifične vrste stanica.²⁵

2.6. Klik-kemija

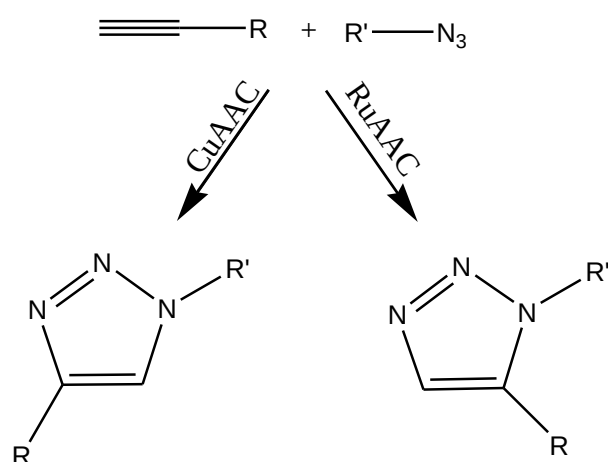
„Klik-kemija“ relativno je novi pojam u kemiji, no koristi se za otprije poznate reakcije. Pojam „klik“ ne označava određenu vrstu reakcija, nego se odnosi na svojstva koja opisuju klik: brza reakcija, jednostavna, modularna, široko primjenjiva, s velikim prinosom, po potrebi regioselektivna ili stereoselektivna, kojom nastaje nereaktivan produkt koji se lako pročišćava. Između ostalog koristi se za vezanje supstrata na biomolekule te se u nekim kombinacijama može provesti u vodi. Pristup spajanju malih dijelova molekula razrađen u klik-kemiji oponaša način spajanja spojeva u prirodi. Pojam klik-reakcije predložio je K. Barry Sharpless,²⁸ dobitnik Nobelove nagrade za kemiju 2001. za kiralno kataliziranu oksidaciju (Sharplessova epoksidacija, Sharplessova asimetrična dehidroksilacija, Sharplessova oksaminacija).

Otkrivene su brojne reakcije koje zadovoljavaju sve ili većinu kriterija koji definiraju klik-reakciju, uključujući nukleofilne reakcije otvaranja prstena s epoksidima, aziridinskim i aziridiniumnim ionima, formiranje ureje, oksima i hidrazona putem nonaldol-karbonilne kemije te oksidacijske i Michaelove dodatke dvostrukim vezama ugljik-ugljik.

A)



B)



Slika 5. A) Mehanizam bakrom katalizirane reakcije cikloadicije alkina i azida (CuAAC), preuzeto iz Boren i suradnici.²⁹ B) Produkti bakrom i rutenijem katalizirane cikloadicije.

Uvođenjem klik-kemije, vraćene su u fokus dobro poznate Huisgenove reakcije 1,3-cikloadicije alkina (acetilena) i azida (Rolf Huisgen, njemački kemičar) iz 1961. Sama Huisgenova reakcija svojim svojstvima ne spada pod stroge odredbe klik-kemije, zbog odvijanja u žestokim

uvjetima kao i nastanka produkta bez određene regioselektivnosti (nastanak 1,4- i 1,5-produkata), no otkrićem katalizirane Huisgenove reakcije bakrovim(I) solima postiže se željena regioselektivnost (1,4-), uz ubrzanje reakcije (10^7 – 10^8) bez potrebe za žestokim reakcijskim uvjetima. Sama bakrom katalizirana reakcija (engl. *Cu azide alkyne cycloaddition*, CuAAC) postala je sinonim za klik-reakciju, kao njen najpoznatiji predstavnik. CuAAC također je biokompatibilna (kao i u sintezi provedenoj u ovom radu), nije toliko ovisna o vrsti korištenog otapala, te u usporedbi s drugim metalima kataliziranim reakcijama upotreba CuAAC je jeftina i jednostavna za upotrebu. Kao izvor bakra(I) koriste se soli bakra(II) koje se mogu reducirati, ili disproporcioniranjem s bakrom(0) daju bakar(I). Mehanizam ove katalizirane reakcije uključuje nastajanje šesteročlanog kompleksa gdje je jedan atom bakra dio prstena, a drugi ima ulogu stabilizirajućeg liganda (slika 5A).³⁰

Ispitivanjem upotrebe različitih metalnih katalizatora otkriveno je da kompleksi pentametilciklopentadienil rutenijeva klorida (Cp^*RuCl) dovode da nastajanja 1,5-disupstituiranog triazolnog prstena u istoj reakciji (slika 5B). Također reakcijom rutenijem katalizirane azid alkin cikloadicije (RuAAC) može reagirati unutarnji alkin (ne terminalni) dajući potpuno supstituirane triazole.³¹

Primjeri drugih klik-reakcija su hidrotiolacija alkena, hidroazidacija alkena, Diels-Alderova reakcija, [4+1] cikloadicija izocijanida i tetrazina, nukleofilna supstitucija na epokside i aziridine.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

5% otopina joda u acetonu; jod, p.a., Kemika, Hrvatska

Aceton, u laboratoriju destilirano otapalo, Eci d.o.o., Hrvatska

Aloks, aluminijev oksid, Sigma Aldrich, SAD

Bakrena žica 1×1 cm

Bakrov suflat, u obliku 1 M vodene otopine, p.a. Kemika, Hrvatska

Dibrometan, p.a., Merck, Njemačka

Dibromopropan, p.a., Merck, Njemačka

Diklormetan, Kefo, Slovenija

Dimetiformamid, DMF, p.a., Fisher Chemical, SAD

Dimetilsulfoksid, DMSO, p.a., Alfa, Njemačka

DNA iz timusa goveda (*calf thymus* DNA, ct-DNA), Sigma Aldrich, SAD

Kalijev jodid, p.a., Kemika, Hrvatska

Kalijev karbonat, p.a., Kemika, Hrvatska

Lepidin, p.a., Sigma Aldrich, SAD

DL-propargilglicin, p.a., Alfa, Njemačka

Metanol, Kefo, Slovenija

Metil-jodid, p.a., Fluka, SAD

N,N-diizopropiletilamin, DIPEA, p.a., Sigma Aldrich, SAD

Natrijev azid, p.a., Fluka, SAD

Natrijev kakodilatni pufer, pH=7,0; $I = 0,05$ M; natrijev kakodilat, p.a., Sigma Aldrich, SAD

poli dGdC - poli dGdC (poli (dGdC)₂), Sigma Aldrich, SAD

poli dAdT - poli dAdT (poli (dAdT)₂), Sigma Aldrich, SAD

poli A – poli U (pApU), Sigma Aldrich, SAD

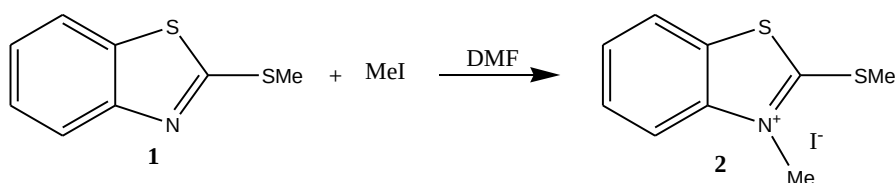
Trifluorooctena kiselina, TFA, p.a., Alfa, Njemačka

3.1.2. Uredaji

- mikrovalni reaktor Microwave Syntesis Reactor Monowave 300 (Anton Paar, SAD)
- UV/Vis spektrometar Aligent Technologies Varian Cary 100 Bio (Agilent Technologies, SAD)
- UV svjetiljka
- fluorimetar Agilent Technologies Varian Cary Eclipse (Agilent Technologies, SAD)
- magnetska mješalica IKA Ret C (Ika, USA)
- analitička vaga (Mettler Toledo, USA)
- infracrveni (IR) spektrometar (ABB Bomem MB102)
- vakuumaska crpka
- rotacijski uparivač Buchi 111 Rotavapor (Donaulab, Slovenija)
- eksikator
- sonikator Branson 150 (Emerson, USA)
- UV/Vis spektrofotometar NanoDrop Thermo Scientific Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- NMR spektrometri Bruker AV600 i Bruker AV300 (Bruker, SAD)
- maseni spektrometar MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems, SAD)

3.2. Sinteza konjugata cijaninskih boja i aminokiselina

3.2.1. *N*-metil-2-metilmerkaptobenzotiazolov jodid 2



Slika 6. Spoj 2, dobiven reakcijom spoja 1 s metil-jodidom.

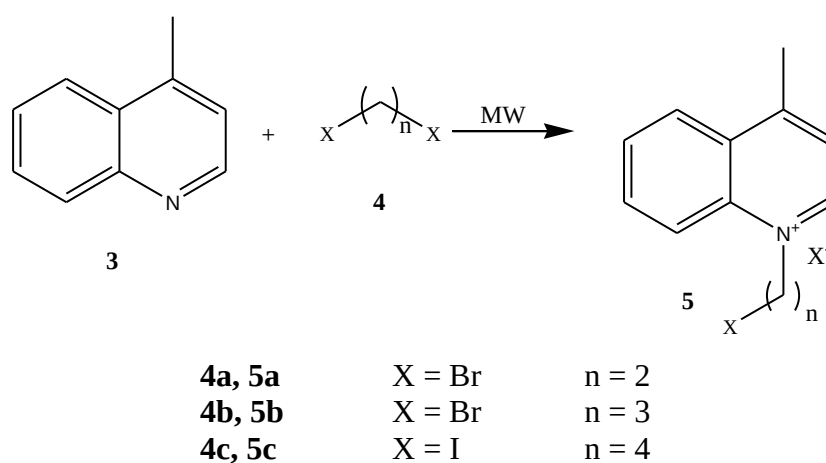
Kao polazni spoj korišten je spoj 1 dobiven metiliranjem merkaptobenzotiazola, kupovne kemikalije, te je ovu metilaciju provela dr.sc. Tamara Šmidlehner.

Spoj **1**, 2-metilmerkaptobenzotiazol, (200 mg , $1,1 \times 10^{-3} \text{ mol}$) metilira se metil-jodidom ($0,273 \text{ cm}^3$, $4,4 \times 10^{-3} \text{ mol}$) uz dimetiiformamid (DMF, 1 cm^3) kao otapalo, te se miješa na magnetskoj miješalici preko noći pri 70°C . Sljedeći se dan u reakcijsku smjesu doda malo etera za taloženje spoja, dobiveni talog profiltrira preko Büchnerovog lijevka, ispere eterom te posuši. Kao produkt nastaje spoj **2** (slika 6).

Iskorištenje reakcije je 57 %.

TLC: R_f (diklormetan/metanol 20/1) = 0,13

3.2.2. Sinteza lepidinskih derivata, **5a-c**



Slika 7. Reakcija lepidina **3** s dihalogenalkanom **4a-c**, nastaju lepidinski derivati, **5a-c**.

U paralelnoj sintezi se u mikrovalnoj epruveti lepidinu **3** ($0,185 \text{ cm}^3$, $1,4 \times 10^{-3} \text{ mol}$) doda dibrometan, **4a** (1 cm^3 , $1,6 \times 10^{-2} \text{ mol}$) te se stavi u mikrovalnu miješalicu zagrijanu pri 140°C tijekom 20 minuta, reakcija je prikazana na slici 7. Dobivena suspenzija otopi se u metanolu i prebaci u okruglu tikvicu, upari, istaloži eterom, te prekontrolira koristeći TLC. Manji alikvot otopine otopljene u 5 cm^3 metanola uzima se za daljnju reakciju, a ostatak produkta **5a** se upari, zamota u alufoliju (zaštita od raspada uzrokovanog svjetlom) i pohrani u eksikatoru.

Iskorištenje reakcije je 83 %.

TLC: R_f (diklormetan/metanol 20/1) = 0,16

Za sintezu spoja **5b** u tikvicu se stavi lepidin **3** ($0,185 \text{ cm}^3$, $1,4 \times 10^{-3} \text{ mol}$) te se doda dibromopropan **4b** ($0,653 \text{ cm}^3$, $5,6 \times 10^{-3} \text{ mol}$) i miješa na magnetnoj miješalici pri 130°C tijekom 2 sata (slika 7). Preko noći je ugašeno grijanje, te je sljedeći dan nastavljeno

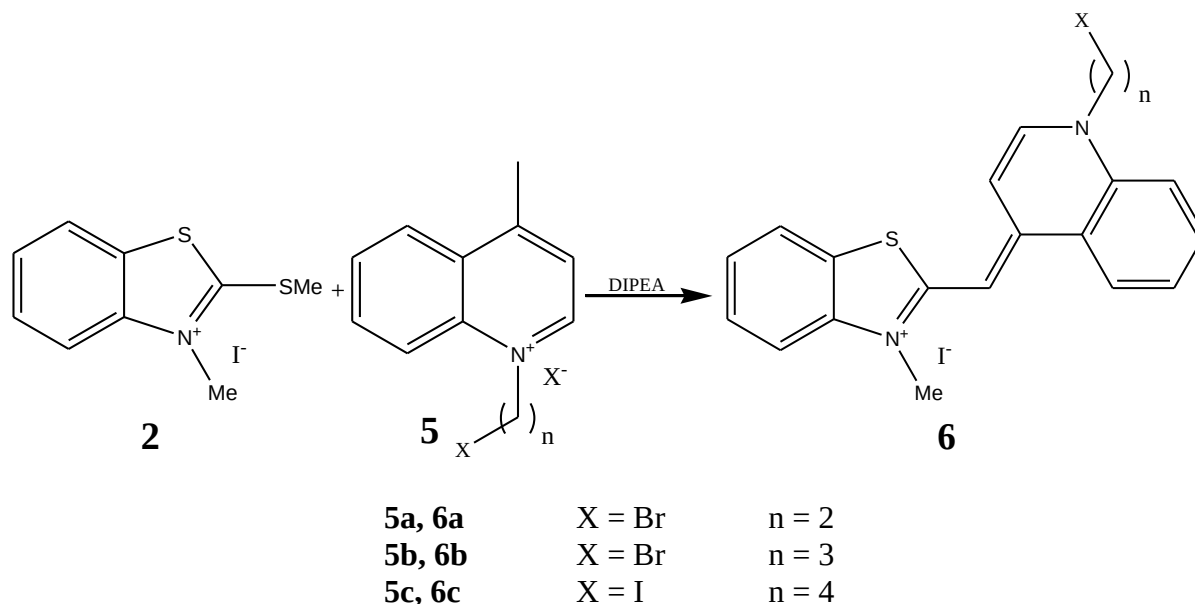
zagrijavanje još 4 sata pri 70 °C. Reakcijska smjesa prekrystalizira se iz etera. Spoj **5b** se posuši na rotacijskom uparivaču i na vakuum crpki, te se pohrani u eksikatoru zaštićen od svjetlosti. Iskorištenje reakcije je 74 %.

TLC: R_f (diklormetan/metanol 20/1) = 0,24

^1H NMR spoj **5b** (300 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C, TMS) δ /ppm 9,40 (d, J = 6,1 Hz, 1H, Ar); 8,57 (t, 2H, Ar); 8,28 (t, 1H, Ar); 8,07 (d, J = 29,8 Hz, 2H, Ar); 5,11 (t, 2H, CH₂); 3,68 (t, 2H, CH₂); 3,01 (s, 3H, CH₃); 2,57 (m, 2H, CH₂).

Spoj **5c** unaprijed je priređen po istome postupku kao i **5a** i **5b** te za njega nisu priloženi podaci o karakterizaciji spoja.

3.2.3. Sinteza cijaninske boje



Slika 8. Reakcijom derivata benzotiazola **2** i lepidinskih derivata **5a-c**, nastaju cijaninske boje **6a-c**.

U epruvetu s čepom stavi se spoj **2** ($3,2 \times 10^{-4}$ mol) te se doda lepidinski derivat **5a-c** ($3,2 \times 10^{-4}$ mol) u krutom stanju ili otopljen u metanolu. U reakcijsku smjesu doda se *N,N*-diizopropiletilamin (DIPEA, $3,16 \times 10^{-4}$ mol, 0,055 cm³), oba spoja i DIPEA u ekvimolarnim količinama. Reakcija se odvija preko noći na magnetnoj miješalici pri sobnoj temperaturi. Nakon 24 sata smjesa se profiltrira i pročisti prekrystalizacijom iz etera, uparavanjem, dekantiranjem te taloženjem eterom u hladnjaku. Dobije se cijaninska boja **6a-c** (slika 8).

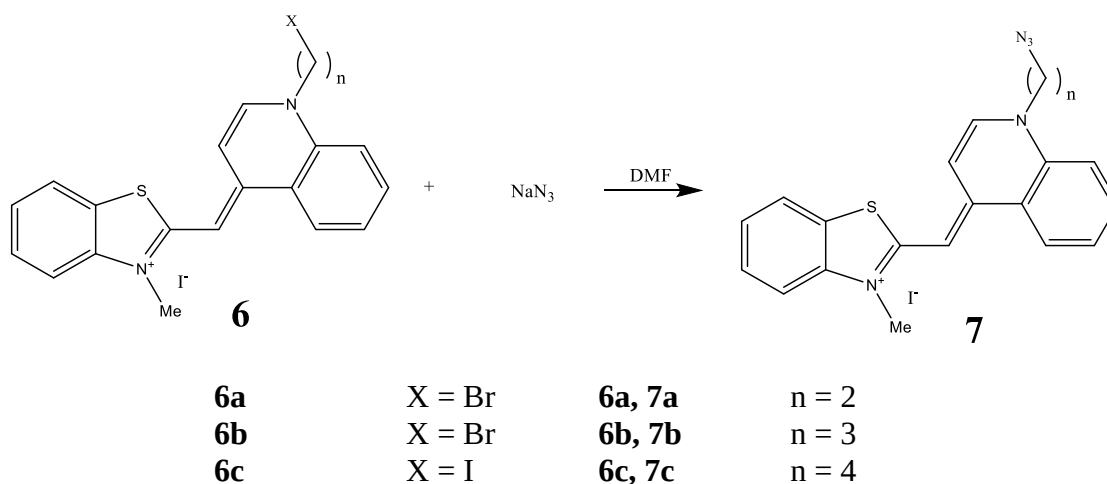
TLC: R_f (**6a**, kloroform/metanol/octena kiselina 86/13/1) = 0,49

R_f (**6b**, kloroform/metanol/octena kiselina 86/13/1) = 0,50

R_f (**6c**, kloroform/metanol/octena kiselina 86/13/1) = 0,58

^1H NMR spoja **6c** (300 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C, TMS) δ /ppm 8,80 (d, J = 8,3 Hz, 1H, Ar); 8,62 (d, J = 7,3 Hz, 1H, Ar); 8,17 (d, J = 8,6 Hz, 1H, Ar); 8,06 (d, J = 7,9 Hz, 1H, Ar); 8,00 (t, J = 15,3 Hz, 1H, Ar); 7,83–7,73 (m, J = 28,6 Hz, 2H, Ar); 7,62 (t, 1H, Ar); 7,41 (m, J = 26,6 Hz, 2H, Ar); 6,94 (s, 1H, CH); 4,63 (t, J = 6,7 Hz, 2H, CH₂); 4,03 (s, 3H, N⁺-CH₃); 3,35 (d, 2H, CH₂); 2,03–1,82 (m, 4H, 2 x CH₂).

3.2.4. Sinteza azidnog derivata cijaninske boje



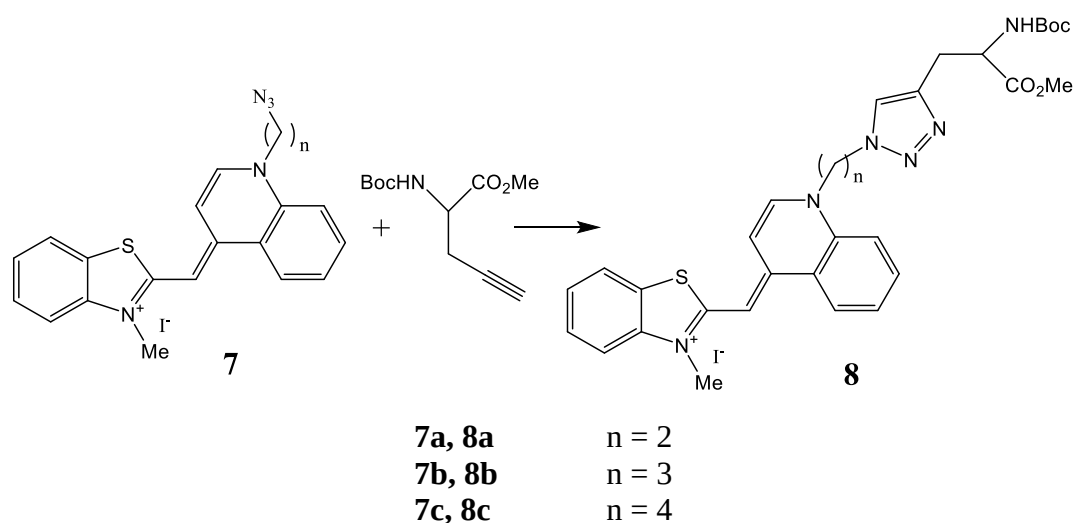
Slika 9. Zamjenom halogenog atoma spojeva **6a-c** s azidom nastaju spojevi **7a-c**.

Cijaninska boja **6a-c** (103 mg, $1,7 \times 10^{-4}$ mol) otopi se u DMF-u (1,4 cm³), te se dodaju dva ekvivalenta anorganskog azida, NaN₃ (22,3 mg, $3,43 \times 10^{-4}$ mol). Na magnetskoj miješalici se miješa preko noći pri sobnoj temperaturi te se dobiju spojevi **7a-c** (slika 9).

3.2.5. Klik-reakcija, sinteza konjugata cijaninske boje i DL-propargilglicina

Spoj **7a-c** otopi se u DMF-u (0,5 cm³), doda se potpuno zaštićena aminokiselina DL-propargilglicin, kupovna kemikalija, racemična smjesa (1,1 ekvivalent), te vodena otopina

CuSO_4 (1 mol dm^{-3} , 0,2 ekvivalenta). Doda se i prethodno aktivirana bakrena žica (mreža, $1 \times 1 \text{ cm}$, tretirana s 5 %-tnom otopinom joda u acetonu, te potom isprana s HCl/aceton 50/50). Reakcijska smjesa se zagrijava do 60°C (za spoj **7c** reakcija je provedena paralelno i na sobnoj temperaturi) uz miješanje na magnetnoj miješalici preko noći. Uz prećenje tijeka reakcije na TLC pločici, dodatna provjera provedena je snimanjem IR spektara reakcijske smjese, u kojima su postepeno nestajale vrpce polaznih spojeva (NaN_3 , DL-propargilglicin). U reakciji nastaju klik-produkti, spojevi **8a-c** (slika 10).



Slika 10. Klik-reakcijom nastaju konjugati cijaninske boje i DL-propargilglicina **8a-c**.

Reakcijska smjesa spoja **8a-c** upari se na rotacijskom uparivaču, te otopi u malom volumenu metanola. Otopina se profiltrira preko stupca aloksa i ispere metanolom, te se pročišćavanje provede više puta. Filtrat se upari na rotacijskom uparivaču i stavi na sušenje. Smjesa se prekrizalizira iz metanola i etera (ako je potrebno više puta).

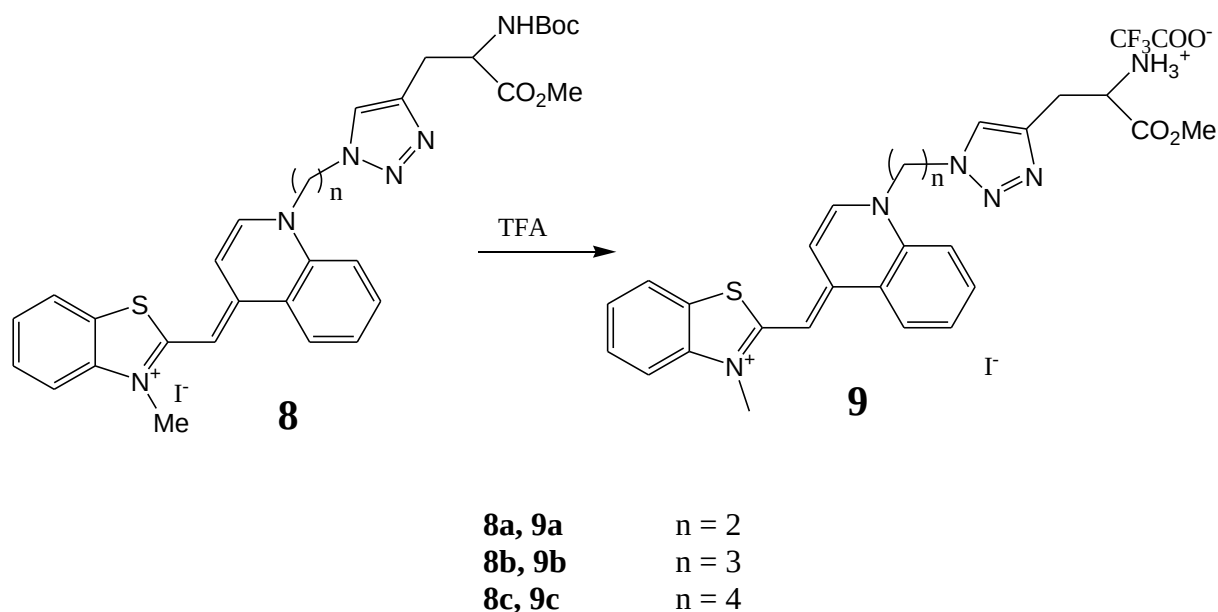
Iskorištenje reakcije je 56–81 %.

TLC: R_f (**8a**, diklormetan/metanol 20/1) = 0,45

R_f (**8b**, diklormetan/metanol 20/1) = 0,67

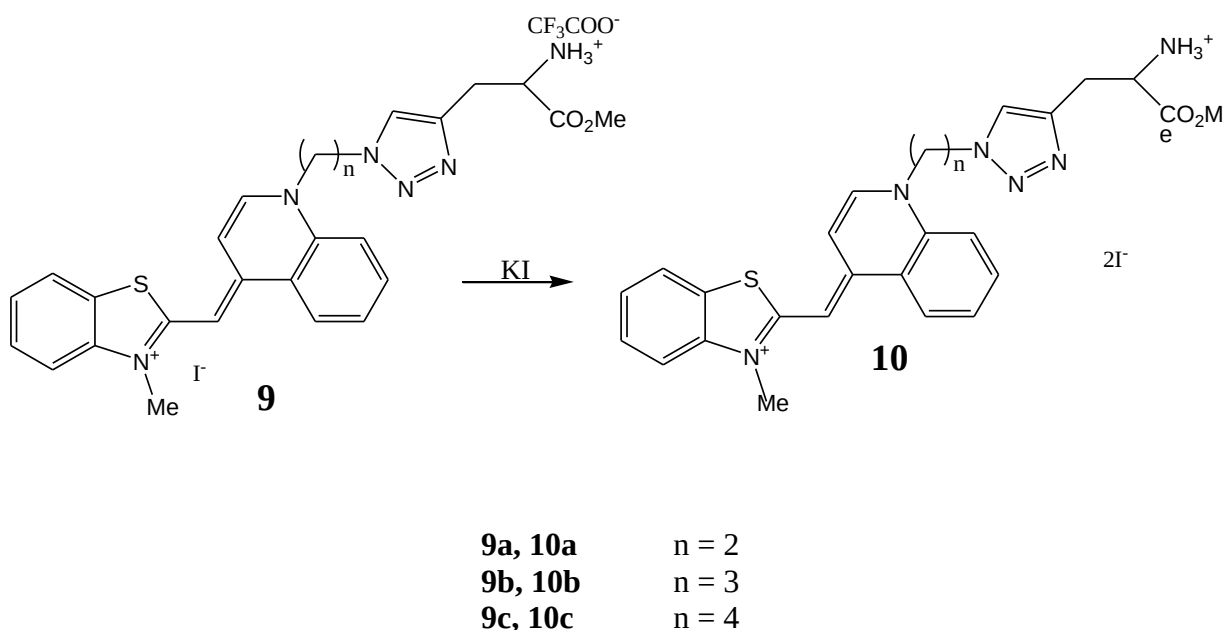
R_f (**8c**, diklormetan/metanol 20/1) = 0,51 (sobna temperatura); 0,40 (60°C)

3.2.6. Uklanjanje Boc-zaštite s N-kraja DL-propargilglicina

Slika 11. Produkti **9a-c** nakon uklanjanja Boc-zaštite.

Produkti klik-reakcije **8a-c** (39, 96 i 27 mg) otope se u diklormetanu (1–5 cm³) uz dodatak 100 cm³ (500 cm³ za **8b**) trifluoroctene kiseline, TFA. Smjesa se miješa na magnetskoj miješalici tijekom 2 sata pri sobnoj temperaturi. Potom se iz reakcijske smjese s malo vode ukloni ostatak kiseline, tri puta se ispere s MeOH i tri puta s dikormetanom te se svaki puta upari. Spojevi **9a-c** osuše se na vakuumskoj crpki (slika 11).

3.2.7. Zamjena protuiona

Slika 12. Konačni produkti sinteze, **10a-c**, nastali izmjenom aniona.

Nakon sušenja spojevi **9a-c** otope se u metanolu (2–5 cm³), doda se kalijev jodid (2 ekvivalenta) zbog zamjene TFA aniona, te miješa na magnetskoj miješalici preko noći pri sobnoj temperaturi. Sljedeći dan otopina se upari, otopi u malo vode, profiltrira preko Büchnerovog lijevka, ponovno upari, te prekrizalizira iz etera da bi se dobili spojevi **10a-c** (slika 12). Iskorištenje reakcije sva 3 spoja je 10 %.

Spoj 10a 2-[[1-{3-[4-(-azanimil-3-metoksi-3-oksopropil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]etil}-1,4-dihidrokinolin-4-iliden]metil]-3-metil-1,3-benzotiazol-3-ij dijodid.

¹ H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, 25 °C, TMS) δ /ppm 8,81–8,71 (m, 1H, Ar); 8,54 (dd, $J = 13,4$; 8,6 Hz, 1H, Ar); 8,15 (dd, $J = 12,4$; 8,8 Hz, 1H, Ar), 8,07–7,89 (m, 4H, Ar+NH₃⁺); 7,75 (dd, $J = 20,5$; 7,6 Hz, 3H, Ar); 7,61 (dd, $J = 15,7$; 7,7 Hz, 1H, Ar); 7,43 (dt, $J = 14,9$; 7,5 Hz, 1H, Ar); 7,35–7,28 (m, 1H, Ar); 7,14 (d, $J = 7,1$ Hz, 1H, Ar); 6,91 (s, 1H, CH); 5,06 (d, $J = 28,8$ Hz, 1H, CH); 4,89 (d, $J = 5,8$ Hz, 1H, CH); 4,77 (t, $J = 5,3$ Hz, 1H, C*H); 4,01 (s, 3H, N⁺-CH₃); 3,94–3,89 (m, 2H, CH₂); 3,69 (dd, $J = 13,6$, 6.1 Hz, 2H, CH₂); 3,57 (s, 3H, CO₂CH₃).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6 , 25°C, TMS) δ /ppm 160,3; 148,3; 144,4; 140,2; 136,7; 134,6; 133,0; 127,9; 126,5; 125,6; 124,4; 123,8; 122,7; 117,7; 113,7; 112,9; 107,3; 89,6; 88,4; 78,3; 53,2; 52,6; 51,8; 48,9; 33,8; 27,9.

HRMS (MALDI-TOF/TOF): izračunat za $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}^{2+}$ $[\text{M}-\text{H}]^+$: 487,1916; nađeno: 487,1910.

Spoj 10b 2-([1-{3-[4-(-azanimil-3-metoksi-3-oksopropil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]propil}-1,4-dihidrokinolin-4-iliden]metil)-3-metil-1,3-benzotiazol-3-ij dijodid.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C, TMS) δ /ppm 8,82 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H, Ar); 8,56 (dd, $J = 14,3$; 7,0 Hz, 1H, Ar); 8,41 (bs, 3H, NH_3^+); 8,09 (dd, $J = 21,2$; 8,3 Hz, 2H, Ar); 8,00 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H, Ar+C-H); 7,83 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, Ar); 7,77 (t, $J = 7,5$ Hz, 1H, Ar); 7,64 (t, $J = 8,2$ Hz, 1H, Ar); 7,45 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H, Ar); 7,39 (d, $J = 6,6$ Hz, 1H, Ar); 6,96 (s, 1H, CH); 4,73–4,61 (m, 2H, CH_2); 4,54 (dd, $J = 11,6$; 9,0 Hz, 2H, CH_2); 4,38 (d, $J = 16,2$ Hz, 1H, C^*H); 4,05 (s, 3H, N^+-CH_3); 3,71 (s, 3H, CO_2CH_3); 3,23–3,09 (m, 2H, CH_2); 2,45 (dd, $J = 13,4$; 5,7 Hz, 2H, CH_2).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6 , 25°C, TMS) δ /ppm 160,83 (s); 149,14 (s); 144,79 (s); 140,98 (s); 137,51 (s); 133,80 (s); 128,74 (s); 126,44 (d, $J = 9,1$ Hz); 125,14 (s); 124,77 (s); 124,41 (s); 123,41 (s); 118,38 (s); 113,64 (s); 108,37 (s); 88,84 (s); 53,40 (s); 47,93 (s); 47,13 (s); 46,21 (s); 34,42 (s); 9,09 (s).

HRMS (MALDI-TOF/TOF): izračunat za $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}^{2+}$ $[\text{M}-\text{H}]^+$: 501,2073; nađeno: 501,2061.

Spoj 10c 2-([1-{3-[4-(-azanimil-3-metoksi-3-oksopropil)-1H-1,2,3-triazol-1-il]butil}-1,4-dihidrokinolin-4-iliden]metil)-3-metil-1,3-benzotiazol-3-ij dijodid.

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C, TMS) δ /ppm 8,79 (dd, $J = 12,6$; 9,2 Hz, 1H, Ar); 8,59 (dd, $J = 18,9$; 6,8 Hz, 1H, Ar); 8,36 (bs, 3H, NH_3^+); 8,19–8,12 (m, 1H, Ar); 8,01 (ddd, $J = 23,9$; 14,2; 9,0 Hz, 2H, Ar); 7,77 (ddd, $J = 17,2$; 9,3; 6,2 Hz, 2H, Ar); 7,66–7,58 (m, 2H, Ar+CH); 7,46–7,33 (m, 2H, Ar); 6,94 (s, 1H, CH); 4,63 (d, $J = 5,4$ Hz, 2H, CH_2); 4,41 (d, $J = 6,4$ Hz, 2H, CH_2); 4,03 (m, 4H, $\text{CH}_3+\text{C}^*\text{H}$); 3,69 (s, 3H, CO_2CH_3); 3,17 (dd, $J = 13,3$; 7,7 Hz, 2H, CH_2); 1,95–1,79 (m, 4H, CH_2).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C, TMS) δ /ppm 160,19 (s, CO_2CH_3); 148,56 (s, qC); 144,28 (s, CH-Ar); 140,48 (s, qC); 136,98 (s, qC); 133,27 (s, CH-Ar); 128,19 (s, CH-

Ar); 126,80 (s, CH-Ar); 125,87 (s, CH-Ar); 124,56 (s, CH-Ar); 124,22 (s, qC); 123,87 (s, qC); 122,90 (s, CH-Ar); 118,09 (s, CH-Ar); 113,09 (s, CH-Ar); 107,83 (s, CH-Ar); 88,22 (s, CH-Cy); 53,38 (d, $J = 7,3$ Hz, CH₂); 52,88 (s, CO₂CH₃); 48,74 (s, CH₂); 33,91 (s, C*H); 26,81 (s, CH₂); 26,11 (s, CH₂); 25,80 (s, CH₂).

HRMS (MALDI-TOF/TOF): izračunat za C₂₈H₃₂N₆O₂S²⁺ [M-H]⁺: 515,2229; nađeno: 515,2241.

3.2.8. Praćenje tijeka reakcije takonoslojnom kromatografijom

Tijek većine sintetskih reakcija prati se tankoslojnom kromatografijom (engl. *thin layer chromatography*, TLC), koja se provodi na pločicama silikagela *DC-plastikfolien Kieselgel 60 F254*, a vizualizacija razvoja kromatografske pločice prati se pod UV-svjetiljkom pri 254 i 365 nm, te u parama joda (po potrebi). Kao standardi u kromatografskim reakcijama upotrebljavaju se unaprijed priređene otopine različitih reaktanata otopljenih u metanolu. Tankoslojnom kromatografijom određujemo faktor zadržavanja. Faktor zadržavanja (engl. *retention factor*, R_f) je veličina koja označava omjer udaljenosti središta mrlje do koje je došla neka tvar i udaljenosti fronte otapala od točke nanošenja uzorka.

R_f vrijednost karakteristična je za dani spoj za određenu stacionarnu i mobilnu fazu. Usporedba R_f vrijednosti može pomoći pri identifikaciji nepoznatih spojeva.

3.3. Karakterizacija spojeva

3.3.1. NMR i HRMS

Novodobiveni spojevi potvrđeni su NMR spektroskopijom i HRMS masenom spektrometrijom. NMR spektri snimljeni su na Bruker AV600 i Bruker AV300 spektrometrima, s time da su ¹H jezgre snimane pri 600, 400 ili 300 MHz, dok su ¹³C jezgre snimane pri 15,92 ili 75,47 MHz. Uzorci su otopljeni u DMSO, a kemijski su pomaci izraženi u dijelovima na milijun (ppm), dok je kao unutarnji standard korišten tetrametilsilan (TMS). Konstante sprege J izražene su u hercima (Hz), dok su signali označeni kao s (singlet), d (dublet), t (triplet), m (multiplet), bs (široki singlet, engl. *broad singlet*).

HRMS analiza spojeva provodi se na masenom spektrometru MALDI-TOF radeći u refleksijskom modu. Maseni spektri sakupljeni su iz tri spektra, uz 400 impulsa lasera po

spektru. Kalibrirajući spektri i spektri spojeva prikupljeni su u pozitivnom modu. Korištena je unutarnja kalibracija korištenjem matricom potpomognute ionizacije (koristi se monomerna, dimerna i trimerna CHCA, α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina, kao matrica u MALDI masenoj spektroskopiji) s azitromicinom i angiotensinom II otopljenim u CHCA u masenom rasponu m/z 190,0499 do 749,5157 ili 1046,5417. Uzorci su pripremljeni miješanjem 0,001 cm³ otopine uzorka u metanolu s 0,005 cm³ zasićene otopine α -cijano-4-hidroksicimetne kiseline (10 mg/cm³) i unutarnjih kalibranata (0,1 mg/cm³) otopljenih u 50 % acetonitrilu/0,1 % TFA.

3.3.2. Izrada baždarnog pravca za dobivanje molarnih ekstinkcijskih koeficijenata

Sva spektrofotometrijska mjerenja izvedena su u vodenim otopinama natrijevog kakodilatnog pufera, pH = 7,00, $I = 0,05$ M. Mjerenja UV/Vis spektrofotometrije provedena su pomoću spektrometra Varian Cary 100 Bio, a fluorescentna mjerenja pomoću fluorimetra Agilent Cary Eclipse. Za sva mjerenja su se koristile kvarcne kivete (optičkog puta 1 cm).

Ishodne otopine spojeva priređene su otapanjem spoja u DMSO i pohranjene pri +8 °C. Snimljeni su UV/Vis spektri spojeva za izradu baždarnog pravca kako bi izračunali molarni ekstinkcijski koeficijent svakog spoja pri određenom apsorpcijskom maksimumu. Snimljeno je po 5 spektara svakog spoja u području koncentracija $2 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³. Svaka dva tjedna priređene su nove otopine spojeva u DMSO, približne koncentracije 1×10^{-3} mol dm⁻³ te im je određena točna koncentracija pomoću prvotno određenog molarnog ekstinkcijskog koeficijenta.

3.3.3. Određivanje termičke stabilnosti spojeva u otopini

Za svaku boju snimljeni su UV/Vis spektri pri koncentraciji od 1×10^{-5} mol dm⁻³ zagrijavanjem do 90 °C i potom hlađenjem na sobnu temperaturu.

3.4. Istraživanje interakcija spojeva s polinukleotidima

U istraživanjima su korišteni sljedeći polinukleotidi: DNA iz timusa goveda (*calf thymus DNA*, ct-DNA, Sigma Aldrich, SAD), te sintetski polinukleotidi: poli dGdC – poli dGdC (poli (dGdC)₂), poli dAdT – poli dAdT (poli (dAdT)₂), te poli A – poli U (pApU), svi proizvođača Sigma Aldrich, SAD. Otopine polinukleotida određenih koncentracija unaprijed su

pripremljene, a neposredno prije izvođenja eksperimenta svakom polinukleotidu spektrofotometrijski je određena točna koncentracija. Svi polinukleotidi su dvolančane molekule DNA, odnosno RNA, a sintetski polinukleotidi sadrže više od 100 parova baza, koji osiguravaju više veznih mjesta duž dvostruke zavojnice.

3.4.1. Fluorimetrijske titracije

Sve fluorimetrijske titracije rađene su na instrumentu Agilent Cary Eclipse, u vodenoj otopini s kakodilatnim puferom ($\text{pH} = 7$, $I = 0,05 \text{ M}$), u kvarcnim kivetama optičkog puta 1 cm s 2 cm^3 uzorka. Uzorak se pobuđuje pri valnoj duljini maksimuma cijaninske boje iz UV/Vis spektra, s tim da se koristi maksimum pri valnoj duljini $> 300 \text{ nm}$ kako bi se izbjeglo područje apsorpcije DNA/RNA. Koncentracija cijaninske boje u kiveti je bila $5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$. Ishodne otopine polinukleotida bile su koncentracije $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. Alikvoti ishodnih otopina polinukleotida su dodavani u kivetu s otopinom cijaninske boje, počevši od ekvimolarnog omjera $r_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]} = 1$ te je za svaki dodatak snimljen fluorescencijski spektar cijaninske boje. Sakupljeno je dvadesetak točaka titracije, do omjera $r_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]}$ kod kojeg više ne dolazi do značajnijeg povećanja fluorescencije s novim dodatkom polinukleotida.

Pri računanju konstante stabilnosti, K_s , kompleksa ispitivanog spoja s DNA/RNA koristi se Scatchardova jednadžba,³² izvedena iz Langmuirove izoterme (jednadžbe 1 i 2), koja omogućuje istovremeno računanje konstante stabilnosti K_s i omjera n [vezani spoj]/[polinukleotid] nekom od metoda nelinearne regresije.

Scatchardova izoterma vezanja u slučaju spektrofotometrijski aktivnog kompleksa može se prikazati izrazom:

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

dok se Scatchardova izoterma vezanja u slučaju spektroskopski neaktivnog kompleksa može prikazati izrazom:

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

gdje je c koncentracija ispitivanog spoja u otopini, c_s koncentracija polinukleotida, n omjer koncentracije vezanog spoja i polinukleotida ($n_{[\text{vezani spoj}]/[\text{poli XY}]}$), I_0 spektrofotometrijski odgovor čistog spoja, I spektrofotometrijski odgovor nakon dodatka određene količine supstrata, I_{lim} spektrofotometrijski odgovor kompleksa kada više nema slobodnog spoja u otopini i K_s konstanta stabilnosti kompleksa.

3.4.2. Temperaturno mekšanje

Za eksperimente temperaturnog mekšanja polinukleotida stabiliziranih konjugatima cijaninskih boja korišten je spektrometar UV/Vis Varian Cary 100 Bio i program *Thermal*. Mjeren je utjecaj ispitivanih spojeva na stabilizaciju temperaturnog mekšanja ct-DNA, p(dAdT)₂ te pApU, dok je polinukleotid p(dGdC)₂ izostavljen jer je njegova točka mekšanja previsoka (> 95 °C). Zagrijavanjem polinukleotida dolazi do denaturacije, tj. razdvajanja dvostruke uzvojnice na dva jednolančana polinukleotida. Temperatura mekšanja (T_m) je temperatura pri kojoj je približno pola dvolančane uzvojnice denaturirano, a karakteristična je za svaki dvolančani polinukleotid ovisno o sekundarnoj strukturi i tipu nukleobaza. Za određivanje temperature mekšanja koristi se UV/Vis spektroskopija, gdje se razdvajanje polinukleotida prati mjerenjem rezultirajućeg hiperkromnog efekta (obično pri 260 nm) u ovisnosti o temperaturi otopine.³³

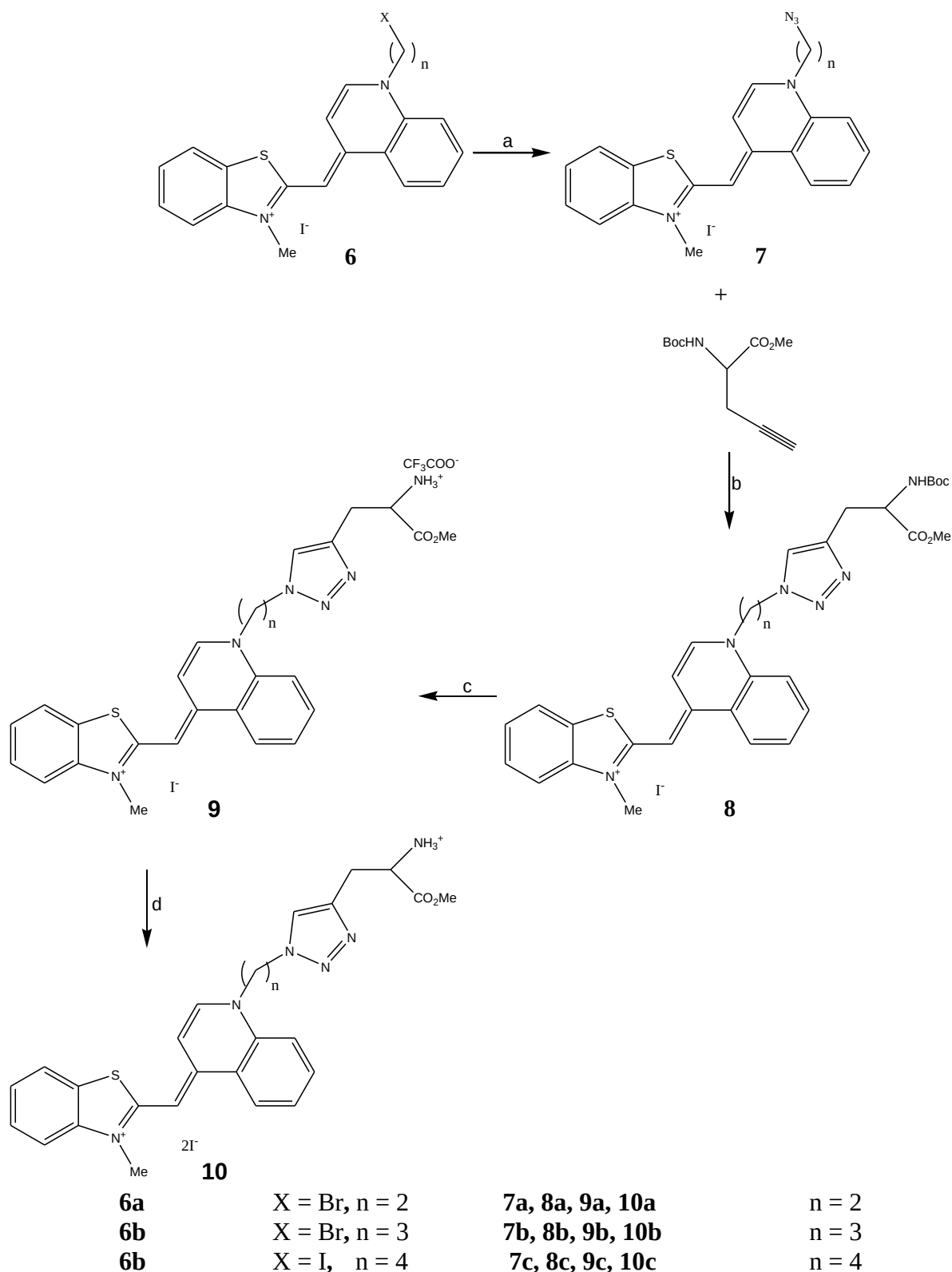
Pripremi se parni broj do najviše 12 (ograničenje uređaja) kvarcnih UV/Vis kiveta od 1 cm³ (optički put je 1 cm) s prislonjenim teflonskim čepom. U svaku kivetu stavi se 1 cm³ pufera (natrijev kakodilatni pufer, $I = 0,05$ M, pH = 7,0). Koristeći program *Simple reads* očitaju se apsorbancije pufera pri 260 nm ($A_{260\text{ nm}}$) i rezultati koriste kao nulta vrijednost otopine. Potom se u svaku kivetu doda izračunati alikvot otopine polinukleotida tako da koncentracije polinukleotida u kiveti budu 2×10^{-5} mol dm⁻³, nakon čega se ponovno očita apsorbancija radi provjere koncentracije polinukleotida pomoću literaturno poznatih molarnih ekstinkcijskih koeficijenata. Sva se mjerenja rade u duplikatu: u dvije kivete ostaju samo otopine polinukleotida, a u sljedeće parove kiveta dodaju se ispitivani spojevi u omjerima $r_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]} = 0,1$ i $0,2$. U programu *Thermal* podese se parametri zagrijavanja: zagrijava se postupno do 98 °C brzinom od 1 °C/min uz očitavanje vrijednosti $A_{260\text{ nm}}$ svakih 0,5 °C. Dobiveni rezultati prikazuju se grafički kao krivulje ovisnosti apsorbancije $A_{260\text{ nm}}$ o temperaturi, koje su sigmoidalnog oblika (jednostrukog ili višestrukog). Vrijednosti T_m su točke infleksije sigmoidalnih krivulja određene prvom derivacijom krivulje (točka maksimuma) i grafički

provjerene metodom tangenti. Vrijednosti ΔT_m izračunate su oduzimanjem vrijednosti T_m slobodne nukleinske kiseline od vrijednosti T_m kompleksa. Svaka ovdje određena vrijednost ΔT_m bila je prosjek najmanje dva mjerenja. Pogreška ΔT_m je $\pm 0,5$ °C.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Sinteza

Detalji sintetskih postupaka i karakterizacija spojeva opisani su u eksperimentalnom dijelu (poglavlje 3.2). Priprava polaznih spojeva **2a-c** - **6a-c** izvedena je po neznatno modificiranim postupcima objavljenim ranije.³⁴⁻³⁶ Spojevi **7a-c** - **10a-c** su nove, do sada nepoznate molekule te je osim pune karakterizacije i opisa njihove sinteze dobro opisati i neke detalje postupka priprave (slika 13) radi lakše ponovljivosti pokusa.



Slika 13. Dio sinteze proveden u sklopu ovog diplomskog rada, koji nije prethodno poznat u literaturi. Reagensi i uvjeti: (a) NaN₃, DMF, sobna temperatura, 24 h, (b) DL-propargilglicin,

aktivirana bakrena žica, 1 M CuSO₄, sobna temperatura, 24 h, (c) TFA, DCM, sobna temperatura, 2 h, (d) izmjena TFA aniona i jodida pomoću KI (aq).

Polazne cijaninske boje **6a-c** otapaju se u DMF-u dajući žarko crveno obojenje (slika 13). Otopina reagira s bijelom krutinom anorganskog azida (oprez pri rukovanju, azidi su eksplozivne vrste) dajući crvenu otopinu spojeva **7a-c** (poglavlje 3.2.5.), koji su polazni spojevi za provedbu klik-reakcije.

Za klik-reakciju CuAAC-tipa koristi se bakar, no u sklopu šireg istraživanja dr. sc. T. Šmidlehner je utvrdila kako primjena praškastog CuI (najčešće korišten katalizator za CuAAC) uzrokuje probleme pri filtriranju reakcijske smjese preko celita zbog svojstva cijaninskih boja da se adsorbiraju na celit ili silika-gel, čime dolazi do značajnog gubitka produkta. Zato je dr. sc. T. Šmidlehner primjenila bakrenu žicu kao katalizator, koja se po završetku reakcije izvadi iz reakcijske smjese bez potrebe filtriranja preko celita.

Bakrena žica treba se aktivirati prije upotrebe prema sljedećem postupku: uroni se u 5 %-tnu otopinu joda u acetonu 10 minuta, zatim u otopinu HCl/aceton 50/50 tijekom 10 minuta, ispere se u acetonu 10 minuta, te suši na vakuumskoj crpki tijekom 2 sata. Nakon aktivacije bakar je izrazito sjajan.

Spojeve **7a-c** treba otopiti u minimalnom volumenu DMF-a radi kasnijeg lakšeg odvajanja i čišćenja produkata. U nastalu grimizno crvenu otopinu doda se aminokiselina DL-propargilglicin u malom suvišku (do 10 %), pošto je to uljasta prozirna tekućina. U reakcijsku se otopinu doda komadić aktivirane bakrene žice i otopina CuSO₄. Kontrola reakcije provodi se tankoslojnom kromatografijom i dodatno snimanjem IR spektara reakcijske smjese. Naime, IR vrpce polaznog azida pri 2094 cm⁻¹ i vrpca C≡C veze polazne aminokiseline pri 2123 cm⁻¹, postepeno se smanjuju tijekom reakcije, te potpuni nestanak vrpce azida upućuje na potpunu konverziju polaznog reaktanta **6a-c**. Mehanizam reakcije slijedi shemu prikazanu na slici 5 u poglavlju 2.6.

Za obradu reakcijske smjese koristi se stupac u koji se stavi aloks (aluminijev oksid, Al₂O₃, bijeli prah, 2–3 cm visine) kroz koji se propuste otopine spojeva **8a-c** iz reakcijske tikvice. Na aloksu zaostaje talog crvenog bakrovog kompleksa, a postupak filtracije se provede više puta preko istoga stupca aloksa kako bi se filtrat što bolje pročistio. Filtrat je crvena otopina, koja uparavanjem daje crvenkasti talog. MS analizom potvrđeni su produkti, **8a-c**.

Radi bolje topljivosti u vodi potrebno je ukloniti Boc-zaštitnu skupinu s amino-skupine spojeva **8a-c**, što je postignuto uobičajenim postupkom s trifluorocetenom kiselinom te su

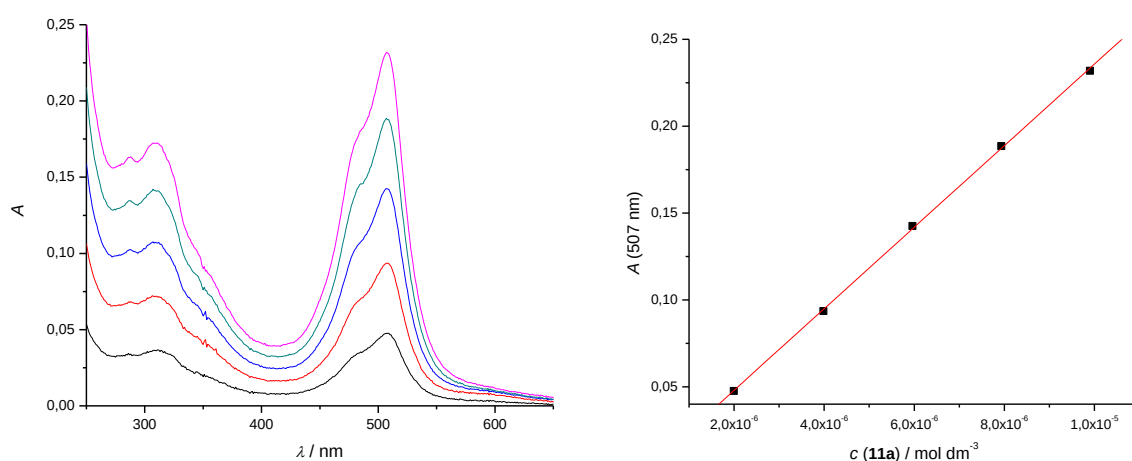
dobiveni dikationi **9a-c** kao talozi izrazito crvene boje. No navedeni dikationi su mješovitog tipa (jodid i CF_3COO^-) te je radi bolje definiranosti strukture spojeva bilo potrebno osigurati samo jedan tip aniona. To je postignuto dodatkom značajnog suviška otopine kalijevog jodida u otopinu spojeva **9a-c**, koji je izmjenio CF_3COO^- dajući **10a-c**, konačne produkte sinteze (slika 13). Od svih stupnjeva sinteze do najvećeg gubitka u iskorištenju došlo je u zadnjem koraku, pri filtraciji (iskorištenje 10 %), no dobivena količina je bila dovoljna za provođenje planiranih istraživanja interakcija s DNA/RNA. Po potrebi je moguće provesti dodatnu optimizaciju svih stupnjeva sinteze.

4.2. Spektrofotometrijska karakterizacija spojeva

4.2.1. Izrada baždarnog pravca UV/Vis spektroskopijom

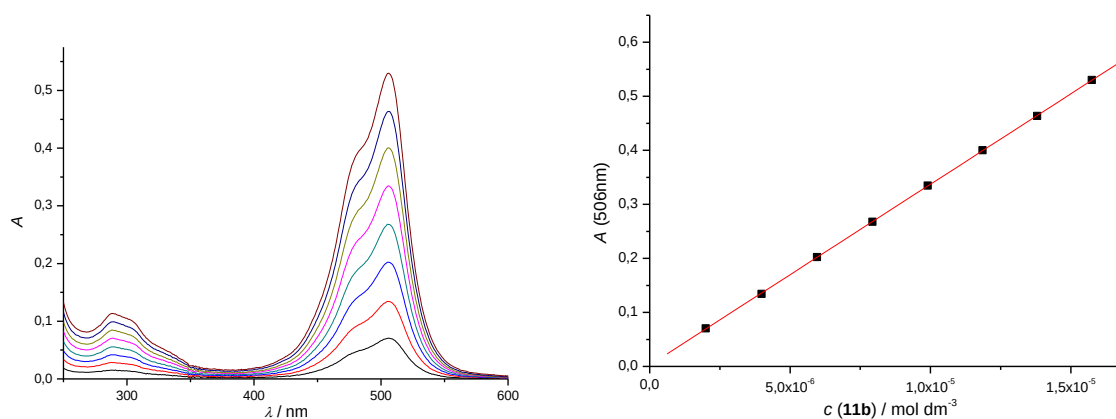
Da bi utvrdili odgovarajuće uvjete za istraživanje interakcija novosintetiziranih konjugata cijanina s aminokiselinom (**10a-c**) s dvolančanim polinukleotidima koristili smo spektrofotometrijske metode UV/Vis i fluorescenciju. No, prije analiza, proveli smo UV/Vis karakterizaciju spojeva u vodenoj otopini (slike 14, 15, 16) prema propisu u poglavlju 3.3.1. U eksperimentalnim uvjetima, u intervalu od $2\text{--}10 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ apsorbancija spojeva **10a-c** bila je proporcionalna njihovoj koncentraciji.

UV/Vis spektri spojeva imaju po dva apsorpcijska maksimuma (triazolni kromofor 288–311 nm, cijaninski kromofor 505–507 nm), za koje su određeni molarni ekstincijski koeficijenti (tablica 1) koji odgovaraju literaturnim vrijednostima za cijaninske boje. Pri najnižoj koncentraciji ($2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) uočen je tipičan maksimum za monomere pri valnoj duljini 505–507 nm. Povećanje koncentracije prema $1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ pratilo je linearno povećanje apsorbancije. No kod spoja **10c** (slika 16), povećanjem koncentracije se pojavljuje novi maksimum pri nešto nižoj valnoj duljini (480 nm) koji ukazuje na formiranje agregata cijanina.^{3,40}



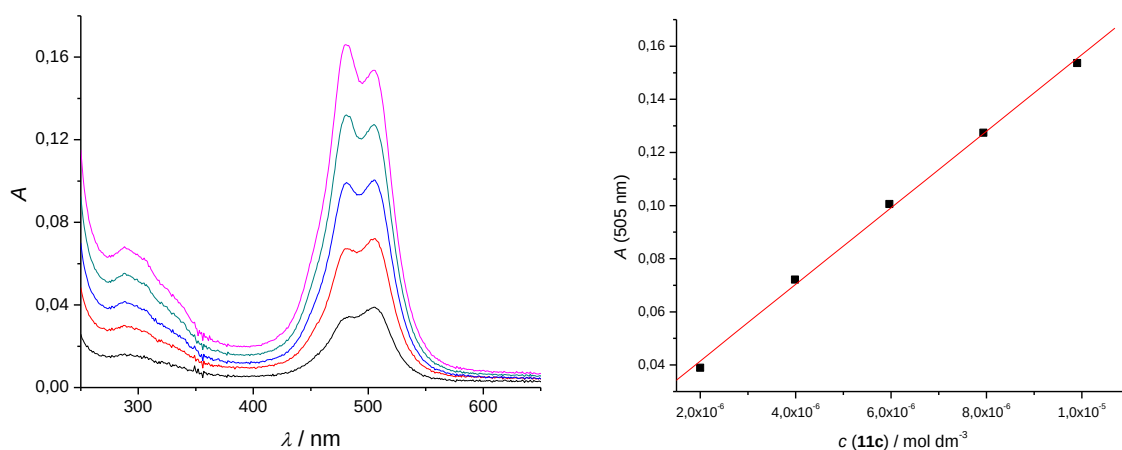
Slika 14. Lijevo: koncentracijska ovisnost UV/Vis spektara spoja **10a** u području $2\text{--}10 \times 10^{-6}$ mol dm⁻³ pri pH = 7, u kakodilatnom puferu, $I = 50$ mM, snimila dr. sc. T. Šmidlehner.

Desno: Ovisnost apsorbancije spoja **10a** o koncentraciji pri 507 nm.



Slika 15. Lijevo: koncentracijska ovisnost UV/Vis spektara spoja **10b** u području $2\text{--}15 \times 10^{-6}$ mol dm⁻³ pri pH = 7, u kakodilatnom puferu, $I = 50$ mM, snimila dr. sc. T. Šmidlehner.

Desno: Ovisnost apsorbancije spoja **10b** o koncentraciji pri 506 nm.



Slika 16. Lijevo: koncentracijska ovisnost UV/Vis spektara spoja **10c** u području $2\text{--}10 \times 10^{-6}$ mol dm⁻³ pri pH = 7, u kakodilatnom puferu, $I = 50$ mM, snimila dr. sc. T. Šmidlehner.

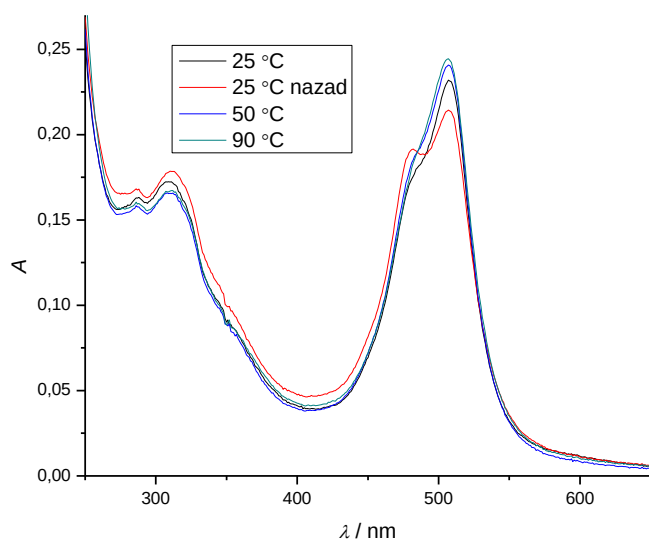
Desno: Ovisnost apsorbancije spoja **10c** o koncentraciji pri 505 nm.

Tablica 1. Molarni ekstincijski koeficijenti spojeva **10a-c** dobiveni iz podataka sa slika 15–17.

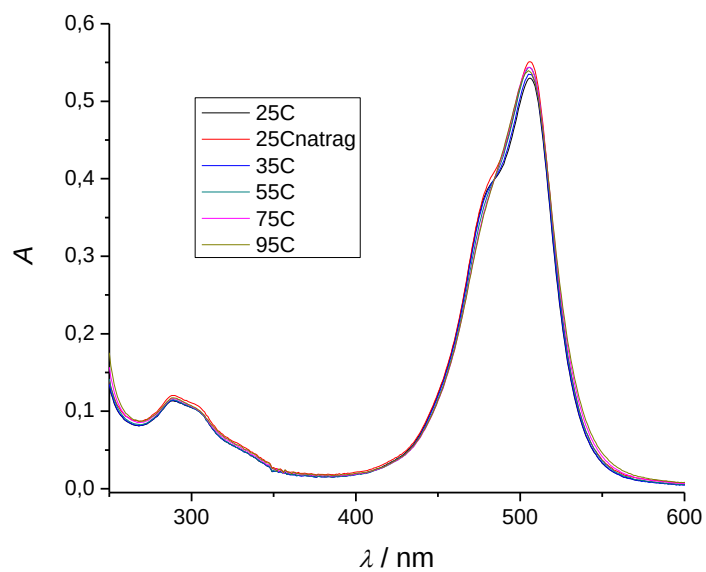
	Kromofor	$\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$	$\varepsilon \times 10^3 / \text{mmol}^{-1} \text{cm}^2$
10a	Cijanin	507	23,46
	Triazol	311	17,28
10b	Cijanin	506	33,47
	Triazol	288	7,17
10c	Cijanin	505	14,41
	Triazol	288	6,53

4.2.2. Temperaturna stabilnost vodenih otopina **10a-c**

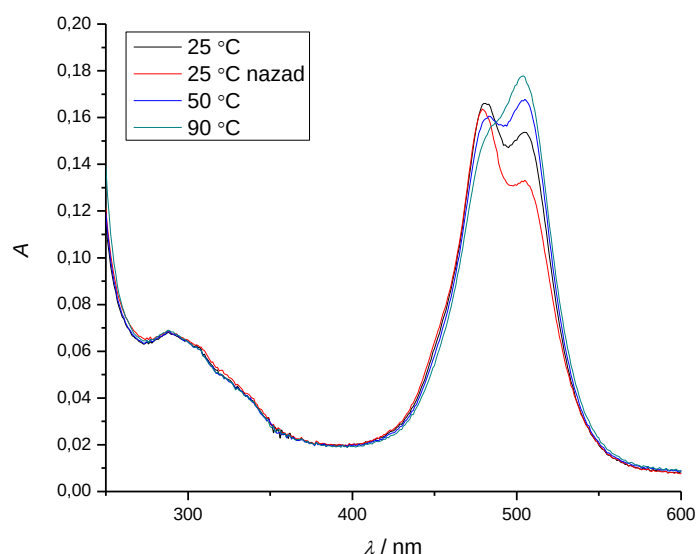
UV/Vis spektri spojeva snimljeni su pri najvišoj koncentraciji korištenoj za izradu baždarnog dijagrama (slike 17, 18, 19) uz promjenu temperature. Za spoj **10b** povišenjem temperature do 90 °C ne dolazi do promjene apsorbancije (slika 18), kod spoja **10a** promjene su zanemarive (slika 17), no kod spoja **10c** povišenje temperature uzrokuje značajnu promjenu UV/Vis spektra (slika 19), s time da spektar pri 90 °C po obliku odgovara UV/Vis spektru pri najnižoj koncentraciji **10c** (slika 16), dok maksimum pri 480 nm, pripisan agregiranju, zagrijavanjem nestaje. UV/Vis eksperimenti ukazuju kako duljina prenosnice utječe na sposobnost agregiranja cijaninskog kromofora, koja je najizraženija kod najdulje i time najfleksibilnije prenosnice (**10c**).



Slika 17. Ovisnost UV/Vis spektra spoja **10a** o temperaturi (1×10^{-5} mol dm $^{-3}$) pri pH = 7, u kakodilatnom puferu, $I = 50$ mM, snimila dr. sc. T. Šmidlehner.



Slika 18. Ovisnost UV/Vis spektra spoja **10b** o temperaturi (1×10^{-5} mol dm $^{-3}$) pri pH = 7, u kakodilatnom puferu, $I = 50$ mM, snimila dr. sc. T. Šmidlehner.



Slika 19. Ovisnost UV/Vis spektra spoja **10c** o temperaturi (1×10^{-5} mol dm $^{-3}$) pri pH = 7, u kakodilatnom puferu, $I = 50$ mM, snimila dr. sc. T. Šmidlehner.

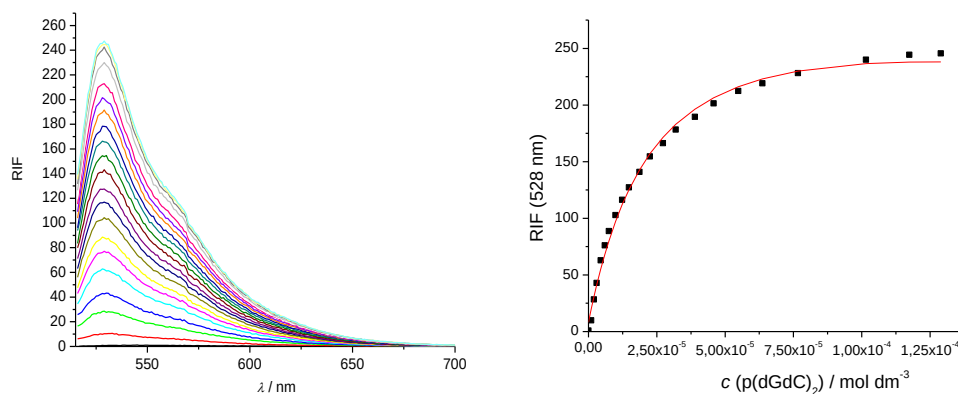
4.2.3. Intrinzična fluorescencija spojeva **10a-c**

Konjugati aminokiseline i cijaninskih boja **10a-c** pokazuju zanemarivu intrinzičnu fluorescenciju¹⁵ u usporedbi s fluorescencijom emitiranom pobudom kompleksa polinukleotid-spoj (vidi 4.3).

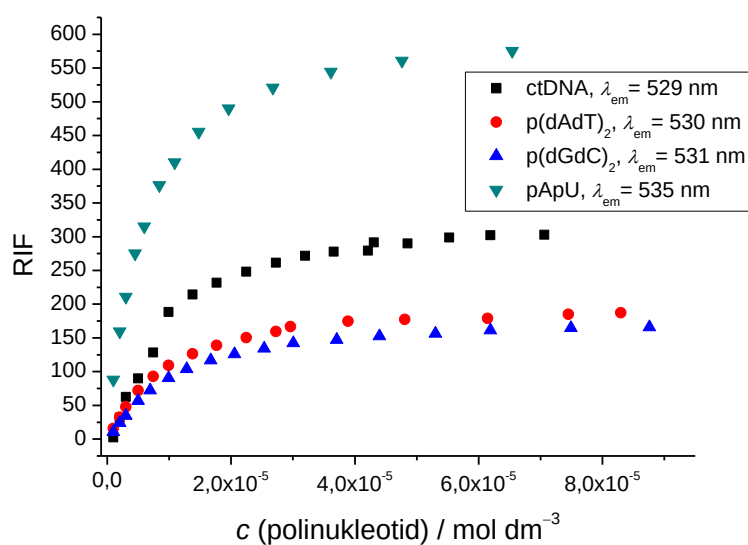
4.3. Interakcije polinukleotida s konjugatima cijaninskih boja i aminokiselina **10a-c**

4.3.1. Fluorimetrijske titracije

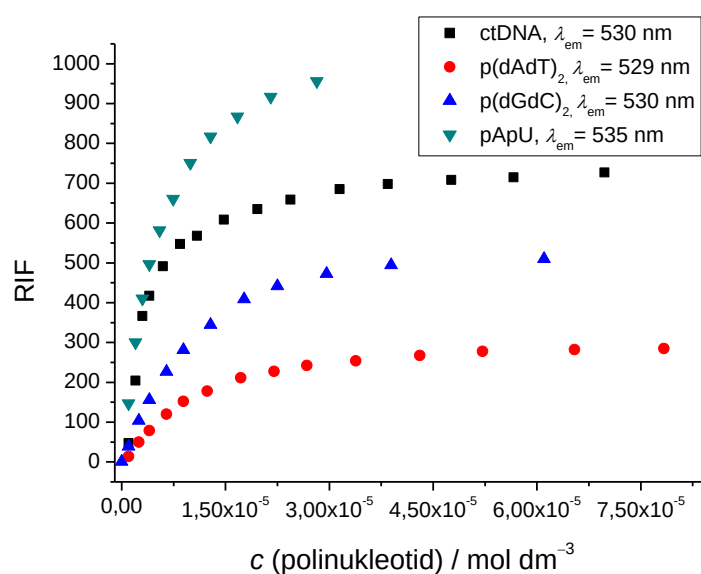
Kao što je navedeno u poglavlju 4.2.3., sami konjugati cijaninske boje i aminokiseline **10a-c** ne fluoresciraju. Već prvim dodatkom polinukleotida dolazi do pojave jake fluorescencije zbog mehanizma relaksacije cijaninskih boja navedenog u poglavlju 2.2.¹⁵ Također, eksperimenti su provedeni pri niskoj koncentraciji konjugata (5×10^{-7} mol dm $^{-3}$), pri kojoj nije dolazilo do agregacije spojeva. Na slici 20 prikazan je fluorescencijski spektar titracije konjugata **10c** polinukleotidom p(dGdC)₂, te obrada podataka promjene fluorescencije s dodatkom polinukleotida na maksimumu emisije pri 528 nm Scatchardovom jednadžbom.



Slika 20. Promjene u fluorescencijskom spektru **10c** ($c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$) tijekom titracije s $p(dGdC)_2$, uz pobudu pri $\lambda_{\text{exc}} = 507 \text{ nm}$. Desno: ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji polinukleotida ($\lambda_{\text{em}} = 528 \text{ nm}$). Izmjereno pri pH 7, u kakodilatnom puferu, $I = 50 \text{ mM}$.

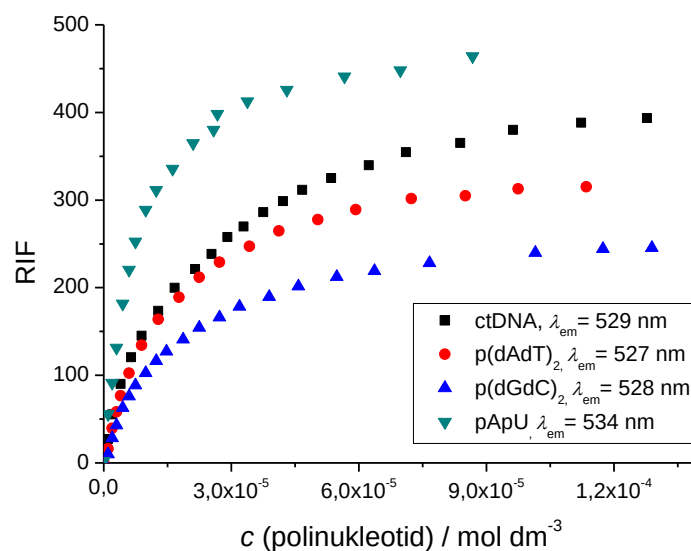


Slika 21. Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije (RIF) o koncentraciji polinukleotida tijekom titracije spoja **10a** s polinukleotidima ($\lambda_{\text{exc}} = 507 \text{ nm}$, $c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$). Izmjereno pri pH 7, u kakodilatnom puferu, $I = 50 \text{ mM}$.



Slika 22. Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije (RIF) o koncentraciji polinukleotida tijekom titracije spoja **10b** s polinukleotidima ($\lambda_{\text{exc}} = 506 \text{ nm}$, $c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$).

Izmjereno pri pH 7, u kakodilatnom puferu, $I = 50 \text{ mM}$.



Slika 23. Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije (RIF) o koncentraciji polinukleotida tijekom titracije spoja **10c** s polinukleotidima ($\lambda_{\text{exc}} = 505 \text{ nm}$, $c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$).

Izmjereno pri pH 7, u kakodilatnom puferu, $I = 50 \text{ mM}$.

Rezultati (slike 21, 22, 23) ukazuju kako intenzitet emisije cijaninskih kromofora uvelike ovisi o sekundarnoj strukturi polinukleotida. Za sva tri konjugata (**10a-c**) najveći porast fluorescencije vidljiv je titracijom s pApU, a najmanji za p(dGdC)₂, dok je p(dAdT)₂ između navedenih krajnosti. Rezultati fluorimetrijskih titracija obrađeni po Scatchardovoj jednadžbi³² dali su konstantu vezanja **10a-c** s polinukleotidima (tablica 2), kao i relativni intenzitet emisije kompleksa **10a-c** s polinukleotidom.

Tablica 2. Konstante vezanja ($\log K_s$)^a i fluorimetrijska svojstva (I_{lim})^b kompleksa spojeva **10a-c** s polinukleotidima, izračunate obradom spektara fluorimetrijskih titracija po Scatchardu,³² pri pH = 7, u natrijevom kakodilatnom puferu, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$.

		ctDNA	p(dAdT) ₂	p(dGdC) ₂	pApU
10a	K_s	5,9	6,1	6,0	6,3
	I_{lim}	360	220	200	640
10b	K_s	6,8	6,1	6,1	6,6
	I_{lim}	750	340	630	1070
10c	K_s	5,8	5,8	5,8	6,2
	I_{lim}	540	400	320	521

^aObrada podataka titracije pomoću Scatchardove jednadžbe dala je vrijednosti omjera n (vezana boja) / (polinukleotid) = 0,1–0,3, da bi se lakše uspoređivale sve vrijednosti $\log K_s$ ponovno izračunate za $n = 0,1$. Koeficijenti korelacije bili su $> 0,99$ za sve izračunate K_s .

^bVrijednost I_{lim} je intenzitet emisije kompleksa boja/polinukleotid izračunat obradom titracijskih podataka Scatchardovom jednadžbom.³²

Dobiveni podaci ukazuju na usporediv afinitet svih spojeva prema svim polinukleotidima, iz čega slijedi kako razlika u intenzitetu fluorescencije nije najvjerojatnije bazirana na različitim veznim mjestima već bi se mogla povezati s razlikom strukturnih svojstava istog veznog mjesta. No dobiveni podaci nisu bili dovoljni za određenje tipa veznog mjesta, te su provedeni dodatni eksperimenti.

4.3.2. Temperaturno mekšanje polinukleotida

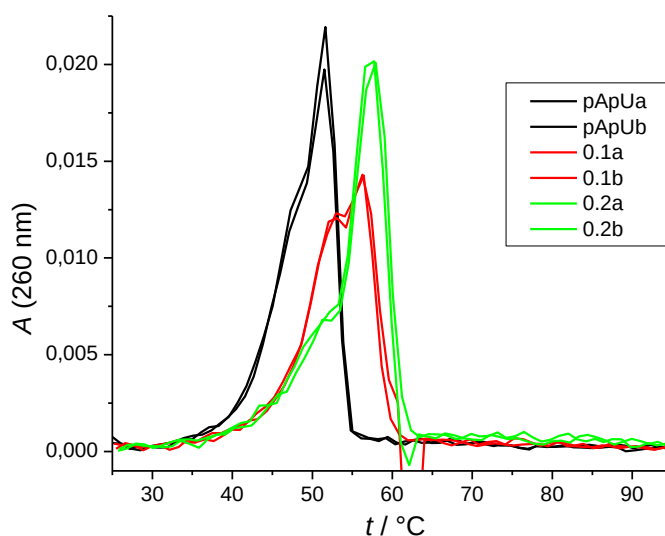
Provedenim eksperimentima temperaturnog mekšanja polinukleotida na koji se veže konjugat cijaninske boje i aminokiseline ispituje se stabilizacija kompleksa polinukleotid/spoj u odnosu na sam polinukleotid. Očitavanjem maksimuma prve derivacije krivulje mekšanja (slika 24) izračuna se temperatura pri kojoj dolazi do mekšanja polinukleotida T_m , kao i temperatura

mekšanja kompleksa spoj/polinukleotid. Koliko je stabiliziran polinukleotid u kompleksu s **10a-c** izračuna se prema sljedećem izrazu:

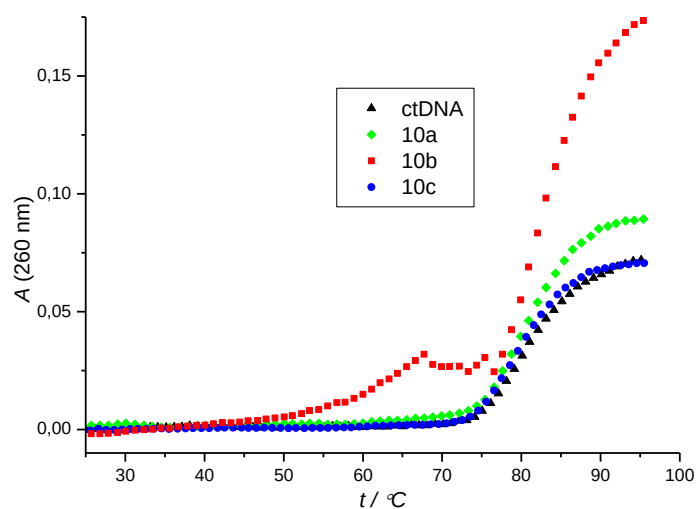
$$\Delta T_m = T_m(\text{kompleks}) - T_m(\text{polinukleotid})$$

Općenita pravila ukazuju na očekivane vrijednosti ΔT_m za određene načine vezanja malih molekula na dvolančane DNA ili RNA.^{8,39} Za vrijednosti $\Delta T_m < 2$ °C mala molekula se najvjerojatnije veže uzduž DNA/RNA uzvojnice kombinacijom elektrostatskih i hidrofobnih veza, ne utječući bitno na stabilnost uzvojnice. Za $\Delta T_m = 2\text{--}5$ °C moguća vezna mjesta su utori DNA/RNA ili eventualno djelomično interkaliranje. Vrijednosti $\Delta T_m > 6$ °C ukazuju na značajnu stabilizaciju DNA/RNA što može biti posljedica klasičnog interkaliranja, vezanja u utor DNA/RNA većim brojem vodikovih veza i niza drugih tipova interakcija, ali i mješani načini vezanja (koji uključuju istovremeno prisustvo nekoliko različitih tipova veznih mjesta).

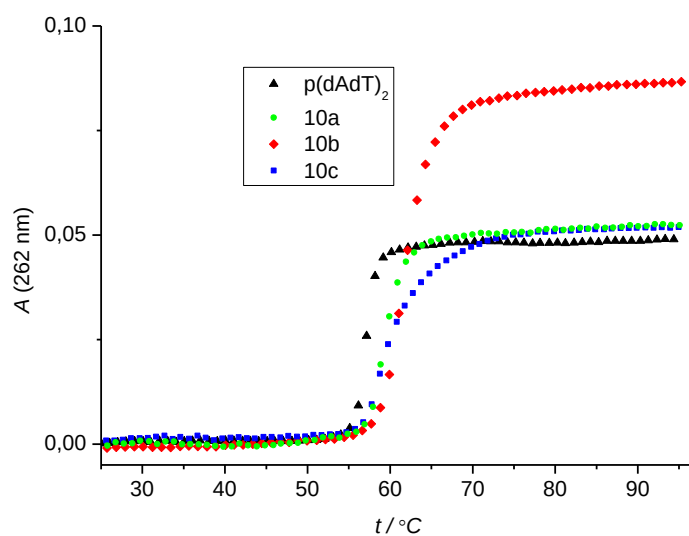
Na slikama 25, 26, 27 i u tablici 3 prikazane su vrijednosti stabilizacija pojedine kombinacije polinukleotida i konjugata pri omjerima 0,1 i 0,2. Spoj **10b**, s propilnim veznim lancem, jedini značajnije stabilizira sve polinukleotide, s time da je najveća stabilizacija izmjerena za kompleks spoja **10b** s pApU (slika 24).



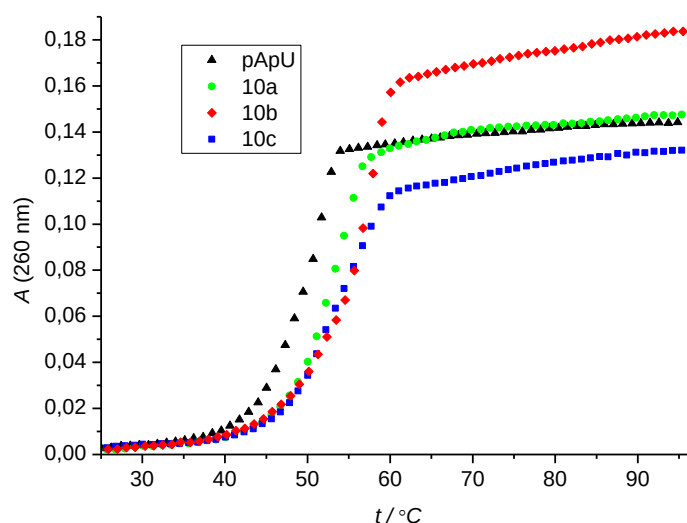
Slika 24. Maksimumi prvih derivacija krivulja mekšanja, pApU sa spojem **10b** pri raznim omjerima $r_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]}$, pH = 7,0, u natrijevom kakodilatnom puferu, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$.



Slika 25. Krivulja mekšanja ctDNA nakon dodatka **10a-c** za $r_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]} = 0,2$ pri pH = 7,0, u natrijevom kakodilatnom puferu, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$.



Slika 26. Krivulja mekšanja $p(\text{dAdT})_2$ nakon dodatka **10a-c** za $r_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]} = 0,2$ pri pH = 7,0, u natrijevom kakodilatnom puferu, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$.



Slika 27. Krivulja mekšanja pApU nakon dodatka **10a-c** za $r_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]} = 0,2$ pri $\text{pH} = 7,0$, u natrijevom kakodilatnom puferu, $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$.

Tablica 3. Promjena temperature mekšanja, ΔT_m , polinukleotida nakon interkcije sa spojevima **10a-c** pri omjerima $r_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]} = 0,1$ i $0,2$.^a

	$\Delta T_m / ^\circ\text{C}$			
	r	ctDNA	p(dAdT) ₂	pApU
10a	0,1	1,5	1,5	0,9
	0,2	1,7	1,7	2,8
10b	0,1	1,3	2,7	4,8
	0,2	2,2	4,1	6
10c	0,1	1,8	1,8	0,2
	0,2	-0,4	2,1	1,8

^a Greška metode je $\Delta T_m \pm 0,5 ^\circ\text{C}$.

Dobiveni rezultati uglavnom (tablica 3) ukazuju na slabu do umjerenu stabilizacije ds-polinukleotida s dodatkom spojeva, bez posebne selektivnosti između stabilizacije ds-DNA i ds-RNA. Neselektivna stabilizacija tog tipa može ukazivati na djelomično interkaliranje spojeva, no to je nužno provjeriti strukturno informativnijim metodama.

4.3.3. Dodatne metode istraživanja

Kako bi se bolje razjasnio tip veznih mjesta **10a-c** u istraživačkoj grupi je dr. sc T. Šmidlehner provela eksperimente cirkularnog dikroizma.^{41,42} Iako navedeni rezultati nisu dio ovog diplomskog, radi potpunosti razumjevanja interakcija **10a-c** s DNA/RNA biti će naveden sažetak.

Cirkularni dikroizam je kirooptička, visoko informativna metoda za proučavanje konformacijskih promjena u sekundarnoj strukturi kiralnih sustava, poput recimo DNA ili RNA. Dodatno, akiralne male molekule koje nemaju CD spektar, mogu po vezanju na kiralnu DNA/RNA pokazati inducirani CD (ICD) spektar (u području valnih duljina > 300 nm, gdje DNA/RNA ne apsorbiraju zračenje) kao posljedicu jednoznačnog vezanja na kiralnu uzvojniciu polinukleotida. Kako se uglavnom male molekule vežu na jedan tip veznog mjesta, takvi ICD spektri mogu pomoći odrediti koje je to vezno mjesto.⁴³

Zbog upotrebe racemične smjese **10a-c** u svim eksperimentima, intenzitet njihovih CD spektara je zanemariv. Dodatak **10a-c** konjugata svim polinukleotidima donio je značajne promjene u CD spektrima u polinukleotidnoj regiji pri $\lambda < 300$ nm, kao i snažno induciranim CD spektrima (ICD) pri $\lambda = 400\text{--}600$ nm, raspon u kojem samo konjugati **10a-c** apsorbiraju.

Analiza ICD spektara kompleksa polinukleotida sa spojevima **10a-c** ukazala je da spojevi s kraćom poveznicom u strukturi (**10a,b**) pokazuju ICD interkalirajućeg načina vezanja s p(dAdT)₂ (slab negativni ICD), dok je spoj s najduljim lancem (**10c**) pokazao pozitivni ICD spektar karakterističan za vezanje u mali utor p(dAdT)₂. Za p(dGdC)₂ i pApU dobiveni su uglavnom pozitivni ICD spektri bez obzira na strukturu liganda, koji s obzirom na nepovoljne strukture malog utora ukazuju na veliki utor p(dGdC)₂ i pApU kao najvjerojatnije vezno mjesto.⁴²

§ 5. ZAKLJUČAK

Bakrom katalizirana cikloadicija azida i alkina (CuAAC), izabrana je kao najpogodnija klik-reakcija za sintezu tri konjugata cijaninske boje TO i aminokiseline DL-propargilglicina. Derivati se razlikuju po duljinama veznog lanca između aminokiseline i cijaninskog kromofora od 2, 3 i 4 ugljikova atoma. Izbor aktivirane bakrene žice i CuSO₄ kao katalizatorskog sustava u provedenoj CuAAC reakciji pokazao se najboljim, pošto omogućuje najjednostavniji postupak obrade produkta, te daje relativno visoke prinose (56–81 %). Zatim je uklonjena zaštitna skupina s amino-skupine i anionska izmjena kako bi se dobile dijodidne soli s dva pozitivna naboja u neutralnom vodenom mediju.

Tri novosintetizirana konjugata su u potpunosti karakterizirani i u vodenom mediju, te je analiza UV/Vis spektara ukazala kako je duljina lanca između aminokiseline i cijanina korelirana sa svojstvom cijaninskog kromofora da agregira u vodi. Prema očekivanju, novi spojevi ne pokazuju intrinzičnu fluorescenciju u vodenom mediju.

Interakcije konjugata cijanina i DL-propargilglicina s različitim polinukleotidima istražene su spektrofotometrijskim metodama. Metodom temperaturnog mekšanja utvrđeno je kako su svi spojevi slabo do umjereno stabilizirali dvolančane polinukleotide, bez selektivnosti između DNA i RNA. Isto je nađeno u prethodnim istraživanjima u kojima su istraženi konjugati cijanina-aminokiselina.³⁷

Poznato svojstvo cijaninskih boja da snažno fluoresciraju nakon dodatka DNA/RNA, omogućilo je fluorimetrijske titracije konjugata s DNA/RNA. Intenzitet emisije značajno je ovisio o polinukleotidnoj sekundarnoj strukturi. Ispitivani konjugati **10a-c** pokazuju najveće povećanje emisije fluorescencije nakon dodatka pApU, do pet puta veće u usporedbi s parovima p(dGdC)₂. Fluorimetrijskim titracijama određene su konstante stabilnosti vezanja konjugata s polinukleotidima, koje su sve u mikromolarnom rasponu, bez izrazite selektivnosti.

Uzevši u obzir i rezultate ciklarnog dikroizma, za spojeve s kraćim veznim lancem između cijanina i amino kiseline određeno je interkaliranje u p(dAdT)₂ kao dominantni način vezanja, dok se derivat s najduljom prenosnicom veže u mali utor p(dAdT)₂, najvjerojatnije zbog za njega specifičnog svojstva izrazitog agregiranja u vodi (vidi UV/Vis rezultate, poglavlje 4.2.1.). Svi spojevi se vežu na p(dGdC)₂ i pApU najvjerojatnije u veliki utor, s tim da

karakteristike pApU velikog utora (značajno uži i dublji od DNA velikog utora), uzrokuju najveći porast fluorescencije svih istraživanih spojeva.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

Boc - *tert*-butiloksikarbonilna (engl. *tert-butyloxycarbonyl protecting group*)

CD - cirkularni dikroizam (engl. *circular dichroism*)

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

CuAAC - (engl. *Cu azide alkyne cycloaddition*)

Cy - cijaninska boja (engl. *cyanine dye*)

DCM - diklormetan (engl. *dichloromethane*)

DMF - dimetilformamid (engl. *dimethylformamide*)

DMSO - dimetilsulfoksid (engl. *dimethyl sulfoxide*)

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

HRMS - masena spektrometrija visoke rezolucije (engl. *high-resolution mass spectrometry*)

ICD - inducirani CD

IR - infra crveno (od engl. *infrared*)

K_s - konstanta stabilnosti

LD - linearni dikroizam (engl. *linear dichroism*)

MS - masena spektrometrija (engl. *mass spectrometry*)

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

OBOC - jedna-kuglica, jedan-spoj (engl. *one-bead, one-compound*)

PNA - peptidna nukleinska kiselina (engl. *peptide nucleic acid*)

RIF - relativni intenzitet fluorescencije (engl. *relative intensity of fluorescence*)

R_f - faktor zaostajanja (engl. *retention factor*)

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

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

TLC - tankoslojna kromatografija (engl. *thin liquid chromatography*)

TMS - tetrametilsilan (engl. *trimethylesilane*)

TO - tiazol-narančasto (engl. *thiazole orange*)

UV/Vis - ultraljubičasto-vidljivo (engl. *ultraviolet-visible*)

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. I. Piantanida, *Kem. Ind.* **52** (2003) 545–552.
2. B. Willis, D. P. Arya, *Biochemistry* **49** (2010) 452–469.
3. B. A. Armitage, *Top. Curr. Chem.* **253** (2005) 55–76.
4. G. M. Cooper, R. E. Hausman, *Stanica - Molekularni pristup*, Medicinska naklada, Zagreb, 2004, str. 89–95.
5. R. B. Silverman, M. W. Holladay, *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action.*, Elsevier, New York, 2014.
6. S. U. Rehman, T. Sarwar, M. A. Husain, H. M. Ishqi, M. Tabish, *Arch. Biochem. Biophys.* **576** (2015) 49–60.
7. S. Sobha, R. Mahalakshmi, N. Raman, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **92**, (2012) 175–83.
8. M. Demeunynck, C. Bailly, W. D. Wilson, *Small Molecule DNA and RNA Binders.* Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2003.
9. A. Rescifina, C. Zagni, M. G. Varrica, V. Pistarà, A. Corsaro, *Eur. J. Med. Chem.* **74** (2014) 95–115.
10. R. E. Mcknight (ur.), *Applications of Calorimetry in a Wide Context-Differential Scanning calorimetry, Isothermal Titration Calorimetry and Microcalorimetry*, poglavlje 6, InTech, 2013, str. 129–152.
11. C. H. G. Williams, *Trans. R. Soc. Edinburgh* **21:377** (1856).
12. A. Mishra, R. K. Behera, P. K. Behera, B. K. Mishra, G. B. Behera, *Chem. Rev.* **100** (2000) 1973–2011.
13. D. M. Sturmer, A. Weissberger, E. C. Taylor, *The chemistry of heteroaromatic compounds*, **30**, Wiley, New York, 1997.
14. R. B. Mujumdar, L. A. Ernst, S. R. Mujumdar, C. J. Lewis, *Bioconjug. Chem.* **4** (1993) 105–111.
15. A. Larsson, C. Carlsson, M. Jonsson, B. Albinsson, *J. Am. Chem. Soc.* **116** (1994) 8459–8465.
16. H. S. Rye, S. Yue, D. E. Wemmer, *Nucleic Acids Res.* **20** (1992) 2803–2812.
17. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *Osnove analitičke kemije*, Školska knjiga, Zagreb,

- 1999, str. 493-593.
18. T. Cvitaš, *Fizikalna kemija, skripta za internu upotrebu*, Zagreb.
 19. D. Suh, J. B. Chaires, *Bioorg. Med. Chem.* **3** (1995) 723–728.
 20. J. Nygren, N. Svanvik, M. Kubista, *Biopolymers* **1** (1998) 39–51.
 21. N. Svanvik, G. Westman, D. Wang, M. Kubista, *Anal. Biochem.* **281** (2000) 26–35.
 22. Y. Y. Davidson, B. M. Gunn, S. A. Soper, *Appl. Spectrosc.* **50** (1996) 211–221.
 23. N. Svanvik, J. Nygren, G. Westman, M. Kubista, *J. Am. Chem. Soc.* **123** (2001) 803–809.
 24. R. Liu, X. Li, K. S. Lam, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **38** (2017) 117–126.
 25. B. P. Gray, K. C. Brown, *Chem. Rev.* **114** (2014) 1020–1081.
 26. R. Liu, K. S. Lam, *Wiley Encycl. Chem. Biol.* **3** (2009) 575–587.
 27. R. Houghten, C. Pinilla, S. E. Blondelle, J. R. Appel, C. T. Dooley, *Nature* **354** (1991) 84–86.
 28. H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **40** (2001) 2004–2021.
 29. W. hai Zhan, W. jun Wu, J. li Hua, Y. hua Jing, *Tetrahedron Lett.* **48** (2007) 2461–2465.
 30. B. T. Worrell, J. A. Malik, V. V. Fokin, *Science* **340** (2013) 457–460.
 31. B. C. Boren, S. Narayan, L.K. Rasmussen, L. Zang, *J. Am. Chem. Soc.* **130** (2008) 8923–8930.
 32. J. D. McGhee, P. H. von Hippel, *J. Mol. Biol.* **103** (1976) 679–684.
 33. J. Matić, *N-sulfonilpurini i peptidni derivati fenantridina – sinteza, interakcije s polinukleotidima i biološka ispitivanja*, Doktorski rad, Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci, 2016, str. 128–131.
 34. T. G. Deligeorgiev, D. A. Zaneva, S. H. Kim, R. W. Sabnis, *Dye. Pigment.* **37** (1998) 205–211.
 35. T. Deligeorgiev, N. Gadjev, A. Vasilev, K. H. Drexhage, S. M. Yarmoluk, *Dye. Pigment.* **72** (2007) 28–32.
 36. T. Deligeorgiev, N. Gadjev, A. Vasilev, K. H. Drexhage, S. M. Yarmoluk, *Dye. Pigment.* **70** (2006) 185–191.
 37. Q. Q. Shi, R. Sun, J. F. Ge, Q. F. Xu, *Dye. Pigment.* **93** (2012) 1506–1511.
 38. L. Ackermann, H. K. Potukuchi, D. Landsberg, R. Vicente, *Org. Lett.* **10** (2008) 3081–3084.

39. J. L. Mergny, L. Lacroix, *Oligonucleotides* **13** (2003) 515–537.
40. T. Šmidlehner, I. Piantanida, *Amino Acids* **49** (2017) 1381–1388.
41. T. Šmidlehner, *Multifunkcionalno molekularno prepoznavanje sekundarne strukture DNA/RNA molekulskim senzorima*, Doktorski rad, Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci, 2018.
42. T. Šmidlehner, A. Kurutos, J. Slade, R. Belužić, D. L. Ang, A. Rodger, I. Piantanida, *Eur. J. Org. Chem.* **15** (2018) 1682–1692.
43. T. Šmidlehner, I. Piantanida, G. Pescitelli, *Beilstein J. Org. Chem.* **14** (2018) 84–105.

§ 8. DODATAK

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Jakov Slade

Datum rođenja: 6. 12. 1990.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

1997–2005	Osnovna škola Silvije Strahimir Kranjčević, Zagreb
2001–2003	Osnovna škola Miller Place, New York, SAD
2005–2009	Srednja škola XV. gimnazija, Zagreb
2009–2014	Prediplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu
2014	Sveučilišni prvostupnik kemije sa završnim radom „Metode atomske spektrometrije za određivanje zlata u nanomaterijalima“
2014–2018	Diplomski studij kemije, istraživački smjer, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu

rujan 2012. – **Sinteza i karakterizacija nanočestica željezova oksida**
veljača 2013. Voditelj: dr. sc. Marijan Gotić
Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2015 Otvoreni dan Kemijskog odsjeka

Publikacije

1. T. Šmidlehner, A Kurutos, J. Slade, R. Belužić, D. L. Ang, A. Rodger, I. Piantanida, *Eur. J. Org. Chem.* **15** (2018) 1682–1692.

2. T. Šmidlehner, A Kurutos, J. Slade, I. Piantanida, Copper-catalyzed azidealkyne cycloaddition in attaching cyanine dyes to amino acid's side chain // *Challenges in Catalysis for Pharmaceuticals and Fine Chemicals V* London, UK, 2016. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)