

# Ispitivanje interakcije novih derivata benzoksantena s dvočlanim DNA i RNA, te albuminom iz humanog seruma spektroskopskim i kalorimetrijskim metodama

---

**Pregiban, Kristina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*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:217:205855>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-18**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Kristina Pregiban

Ispitivanje interakcija novih derivata  
benzoksantena s dvolančanim DNA i RNA, te  
albuminom iz humanog seruma spektroskopskim i  
kalorimetrijskim metodama

**Diplomski rad**

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

Zagreb, 2020 godina.



Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za biomolekularne interakcije i spektroskopiju, Zavoda za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc. Lidije-Marije Tumir. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić.

Diplomski rad izrađen je u okviru istraživačkog projekta HrZZ pod nazivom „Molekularno prepoznavanje DNA:RNA hibridnih i višelančanih struktura u bioanalitičkim i *in vitro* sustavima“ (IP-2018-01-4694).



## Zahvale

Od srca se zahvaljujem mentorici dr. sc. Lidiji-Mariji Tumir na pomoći oko eksperimentalnog i teorijskog dijela diplomskog rada, na korisnim savjetima i prenesenom znanju, te na uloženom trudu i vremenu.

Zahvaljum se svim članovima Laboratorija za biomolekularne interakcije i spektroskopiju na ugodnoj atmosferi i suradnji tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada.

Zahvaljujem se i mentorici prof. dr. sc. Ivi Juranović Cindrić na pomoći i toplim riječima.

Najviše hvala mojoj obitelji i prijateljima koji su mi pomogli u najtežim trenucima tijekom studiranja i bili potpora kad mi je najviše trebalo. Bez Vas ovaj put bi bio puno teži.



# Sadržaj

<b>SAŽETAK .....</b>	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>VII</b>
<b>§ 1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>3</b>
2.1. Strukture i svojstva nukleinskih kiselina .....	3
2.2. Nevalentne interakcije malih molekula s polinukleotidima.....	5
2.3. Albumin iz ljudskog seruma .....	6
2.4. Benzoksantenski lignani.....	8
2.5. Metode ispitivanja nevalentnih interakcija malih molekula s DNA i RNA.....	10
2.5.1. UV/VIS spektroskopija .....	10
2.5.2. Promjena temperature mekšanja dvolančanih polinukleotida .....	12
2.5.3. Fluorescencijska spektroskopija.....	13
2.5.4. Spektropolarimetrija cirkularnog dikroizma.....	15
2.5.5. DSC-Diferencijalna pretražna kalorimetrija .....	17
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO.....</b>	<b>19</b>
3.1. Materijali.....	19
3.2. UV/Vis spektroskopija .....	20
3.2.1. Promjena temperature mekšanja dvolančanih polinukleotida .....	21
3.3. Fluorescencijska spektroskopija.....	22
3.3.1. Fluorimetrijske titracije .....	23
3.4. CD titracije.....	24
3.5. DSC-Diferencijalna pretražna kalorimetrija .....	24
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>25</b>
4.1. Spektroskopska svojstva spojeva CT-A19, CT-A22, CT-A23 i CT-A24 .....	25
4.1.1. UV/Vis spektri spojeva .....	25
4.1.2. Termička stabilnost vodenih otopina spojeva.....	26
4.1.3. Fluorescencijski spektri.....	27
4.2. Interakcija spojeva CT-A19,CT-A22,CT-A23 i CT-A24 s jednolančanim i dvolančanim DNA i RNA polinukleotidima, te albuminom iz humanog seruma .....	29
4.2.1. Promjena temperature mekšanja .....	29
4.2.2. Fluorimetrijske titracije .....	30
4.2.3. Cirkularni dikroizam.....	34



---

4.2.4. Proučavanje utjecaja spojeva CT-A19-CT-A24 na denaturaciju albumina iz humanog seruma diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom.....	36
<b>§ 5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>38</b>
<b>§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (PREMA POTREBI) .....</b>	<b>40</b>
<b>§ 7. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>42</b>
<b>§ 8. DODATAK .....</b>	<b>VIII</b>
<b>§ 9. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>XXV</b>





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

Diplomski rad

## SAŽETAK

### ISPITIVANJE INTERAKCIJA NOVIH DERIVATA BENZOKSANTENA S DVOLANČANIM DNA I RNA, TE ALBUMINOM IZ HUMANOG SERUMA SPEKTROSKOPSKIM I KALORIMETRIJSKIM METODAMA

Kristina Pregiban

U okviru ovog diplomskog rada metodama UV/Vis i fluorescencijske spektroskopije, spektroskopski su okarakterizirane vodene otopine novih derivata benzoksantena (CT-A19, CT-A22, CT-A23 i CT-A24). UV/Vis i fluorescencijski spektri pokazali su linearnost u određenom koncentracijskom području u skladu s Beer-Lambertovim zakonom. Koristeći fluorimetrijske titracije, spojevi su pokazali veći afinitet prema albuminu iz humanog seruma (HSA), nego prema polinukleotidima. Konstante stabilnosti kompleksa ispitivanih benzoksantenskih spojeva s polinukleotidima i proteinom izračunate su pomoću Scatchardove jednadžbe metodom nelinearne regresije. Mjerenjem temperature mekšanja i spektroskopijom cirkularnog dikroizma pokazano je da vezanje spojeva ne utječe značajno na stabilnost i promjenu sekundarne strukture polinukleotida. Diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom istraženo je vezanje benzoksantena na protein HSA, pri čemu je pokazano da spoj CT-A22 najviše utječe na termičku stabilnost sekundarne strukture proteina.

(XXV + 43 stranica, 29 slika, 7 tablica, 29 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: albumin iz humanog seruma, apsorbancija, benzoksanteni, cirkularni dikroizam, DSC, fluorescencija, konstanta stabilnosti, polinukleotidi

Mentor: dr. sc. Lidija-Marija Tumir, zn. sur. IRB

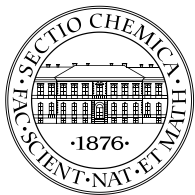
Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Ocjenitelji:

1. Prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
  2. Prof. dr. sc. Željka Soldin
  3. Izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković
- Zamjena: Izv. prof. dr. sc. Sanda Rončević

Datum diplomskog ispita: 17. veljače 2020.





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

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### STUDY OF INTERACTIONS OF NEW BENZOXANTHENE DERIVATIVES WITH DOUBLE-STRANDED DNA AND RNA, AND ALBUMIN FROM HUMAN SERUM BY SPECTROSCOPIC AND CALORIMETRIC METHODS

Kristina Pregiban

The thesis describes characterisation of water solutions of new benzoxanthene derivatives (CT- A19, CT-A22, CT-A23 and CT-A24) by UV/Vis and fluorescence spectroscopic methods. UV/Vis and fluorescence spectra of compounds showed linear dependence on compound's concentrations according to the Beer-Lambert law. Examined compounds showed higher affinity of for human serum albumin (HSA) than for the polynucleotides obtained by fluorimetric titrations. The stability constants of the complexes of the studied benzoxanthenic compounds with polynucleotides and proteins were calculated using the Scatchard equation. Thermal melting measurements and circular dichroism spectroscopy showed no significant effect on double helix stability and they didn't change the polynucleotide secondary structure. Differential scanning calorimetry (DSC) was used to examine the influence of benzoxanthene compound to HSA thermal stability. Results showed highest CT-A22 impact on the protein thermal stability.

(XXV + 43 pages, 29 figures, 7 tables, 29 references, original in Croatian language)

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: absorbance, benzoxanthenes, circular dichroism, DSC, fluorescence, human serum albumin, polynucleotides, stability constant

Mentor: Dr. Lidija-Marija Tumir, Research Associate IRB

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor

Reviewers:

1. Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor
  2. Dr. Željka Soldin, Professor
  3. Dr. Vesna Petrović Peroković, Associate Professor
- Substitute: Dr. Sanda Rončević, Associate Professor

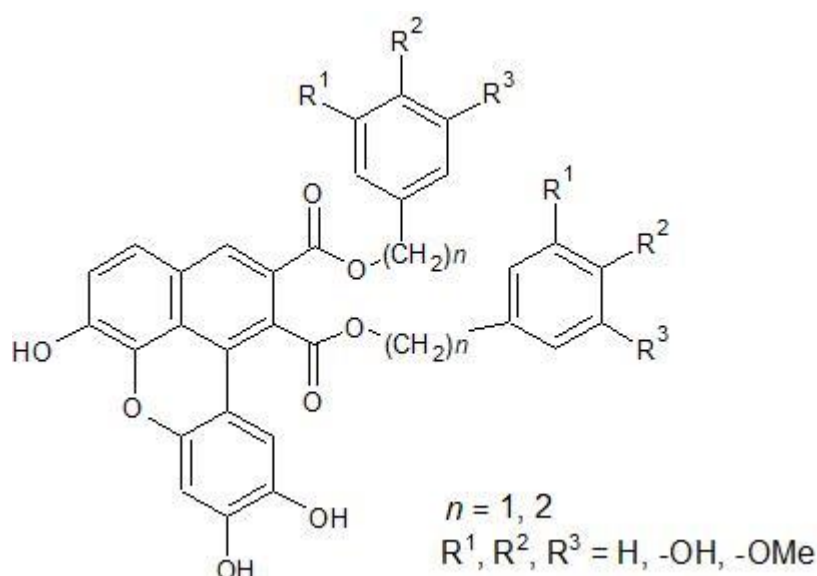
Date of exam: 17<sup>th</sup> February 2020.



## § 1. UVOD

Benzoksantenski lignani su spojevi čija se interakcija s nukleinskim kiselinama sve više istražuje jer djeluju antitumorsko, antioksidacijsko, protuupalno, antiangiogeno, kardiovaskularno i antivirusno. Postoje prirodni benzoksantenski lignani koji se mogu pronaći u različitim dijelovima biljaka poput kore, lišća, sjemenka, plodova i stabljike, ili se mogu proizvesti biosintetski oksidativnim povezivanjem fenilpropanoidnih (C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>) jedinica.<sup>1</sup>

Nakon sinteze četiri bezoksantenska spoja (CT-A19, CT-A22, CT-A23 i CT-A24) opće strukture prikazane na Slici 1, koji su pripremljeni u grupi koju vodi prof. dr. sc. C. Tringali, University of Catania - Department of Chemical Sciences, slijedi ispitivanje njihove interakcije s DNA, RNA i proteinima.



Slika 1. Opća struktura derivata benzoksantena koji su ispitani u okviru ovog rada

Ta istraživanja provode se jer vezanje male molekule na biološki važne molekule kao što su polinukleotidi i proteini može utjecati na biologiju stanice, npr. inhibirati replikaciju DNA i transkripciju na RNA, te inhibirati interakcije DNA-protein.<sup>2</sup> Općenito, male molekule mogu se nekovalentnim interakcijama vezati na polinukleotide na tri načina: interkaliranjem (umetanjem između parova baza), vezanjem u mali ili veliki utor, te elektrostatskim vezanjem pozitivno nabijene molekule uz negativno nabijenu fosfatnu okosnicu.<sup>3</sup>

U radu su za proučavanje nekovalentnih interakcija benzoksantena s DNA i RNA korištene spektroskopske metode. UV/Vis spektroskopija korištena je za ispitivanje apsorpcije zračenja spojeva i analizu termičke stabilnosti kojom se provjerilo kako povećanje temperature utječe na apsorpciju. Pomoću UV/Vis spektrofotometra određena je i temperatura mekšanja dvolančanih polinukleotida kojom se usporedio afinitet jednog spoja prema različitim polinukleotidima, ali i usporedio afinitet više različitih spojeva prema jednoj vrsti polinukleotida.<sup>4</sup> Metodama fluorescencijske spektroskopije istražen je utjecaj koncentracije spojeva na njihovu emisiju, te koristeći fluorimetrijske titracije istražen afinitet spojeva prema jednolančanim i dvolančanim polinukleotidima, te albuminu iz ljudskog seruma. Spektroskopijom CD utvrđeno je kako vezanje spojeva na polinukleotide utječe na promjenu sekundarne strukture polinukleotida. Vezanje spojeva na protein utječe na njegovu stabilizaciju, što je analizirano metodom diferencijalne pretražne kalorimetrije. Konstante stabilnosti kompleksa ispitivanih benzoksantenskih spojeva s polinukleotidima i proteinom izračunate su pomoću Scatchardove jednadžbe metodom nelinearne regresije.<sup>5</sup>

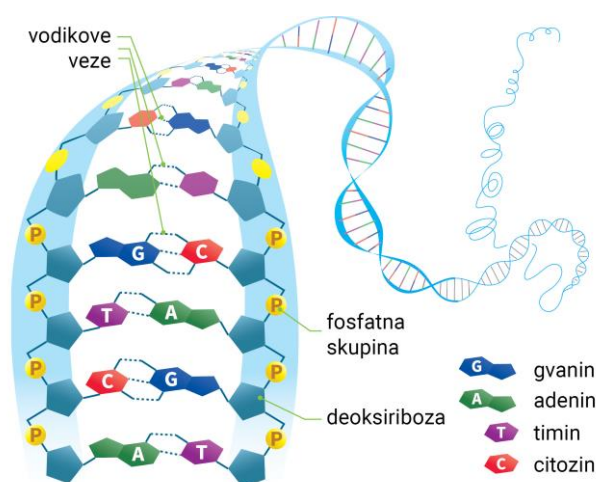


## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Strukture i svojstva nukleinskih kiselina

Nukleinske kiseline linearni su polimeri izgrađeni od međusobno povezanih sličnih jedinica. Svaka jedinica unutar nukleinske kiseline naziva se nukleotid, a sastoji se od tri komponente: šećera, fosfata i baze. Šećer u deoksiribonukleinskoj kiselini (DNA) je deoksiriboza, dok je kod ribonukleinske kiseline šećer riboza. Razlika između ova dva šećera je nedostatak 2'-hidroksilne skupine kod deoksiriboze. Šećeri u nukleinskim kiselinama povezani su fosfodiesterskim vezama. 3' - hidroksilna skupina jednog šećera vezana je fosfatnom skupinom na 5'-hidroksilnu skupinu drugog šećera. Tako povezani šećeri čine okosnicu nukleinske kiseline. Baze u nukleinskim kiselinama derivati su purina: adenin (A) i gvanin (G), te pirimidina: citozin (C) i timin (T) ili uracil (U) kod ribonukleinske kiseline.

Prve strukture DNA otkrivene su tijekom studija prostorne građe DNA, gdje su M. Wilkins i R. Franklin dobili fotografije difrakcije X-zraka s vlakna DNA, koje su pokazale da je DNA građena od dvaju lanaca međusobno uvijenih u dvostruku uzvojnica. Iz toga su Watson i Crick izveli strukturni model prema kojem su polinukleotidni lanci zamotani oko zajedničke osi i teku u suprotnim smjerovima, šećerno-fosfatne okosnice nalaze se na vanjskoj strani, a baze na unutarnjoj i one su gotovo okomite na os uzvojnice i razmaknute 3,4 Å, te je promjer uzvojnice 20 Å. Prema Watson-Crickovom modelu, baze se sparuju na način da se adenin veže vodikovim vezama s timinom ili uracilom, a gvanin s citozinom (Slika 2).<sup>6</sup>



Slika 2. Watson-Crickovo sparivanje baza<sup>7</sup>

Vodikove veze doprinose stabilnosti dvostruke uzvojnice. Osim vodikovih veza, stabilnosti doprinosi hidrofobni učinci baza koje se nalaze s unutrašnjosti uzvojnice, daleko od okolne vode. Zbog hidrofobnog učinka, baze se slažu jedna na drugu i međusobno privlače Van der Waalsovima interakcijama koje su dosta male i iznose 2 do 4 kJ/mol. Dvostruke uzvojnice sadržavaju velike i male utore koji nastaju jer glikozidne veze u jednom baznom paru nisu potpuno nasuprot jedna drugoj. Svaki utor sadržava atome koji sudjeluju u vodikovim vezama i omogućuju specifične interakcije s proteinima.<sup>6</sup>

Watsonov i Crickov model poznat je kao B-DNA uzvojnica. Drugi model, poznat kao A-DNA uzvojnica je šira i kraća od B-DNA, a parovi baza su nagnuti, a ne okomiti na os uzvojnice. Fosfati u A-DNA vežu manje vode nego u B-DNA, te stoga dehidratacija potiče stvaranje A-DNA. Osim A i B modela, poznat je i Z model u kojem su fosfati u „cikcak“ liniji, te je takva uzvojnica lijeva, za razliku od desne A i B uzvojnice. Strukturna svojstva svih tri modela DNA prikazana su u Tablici 1.

Tablica 1. Strukturna svojstva A,B i Z-DNA<sup>6</sup>

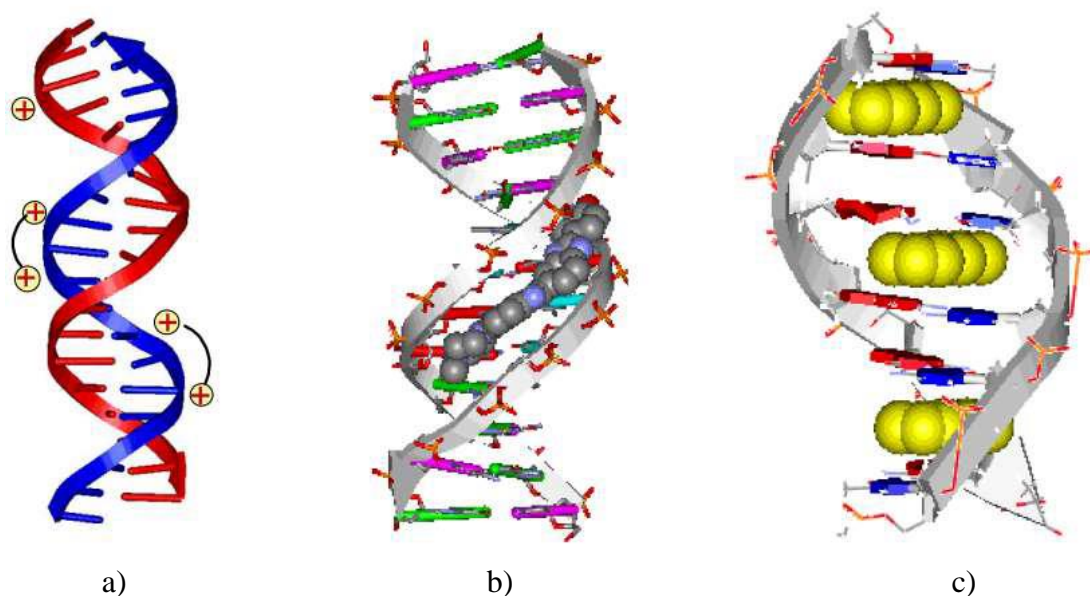
	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>Z</b>
Oblik	najšira	srednja	najuža
Visinska razlika između baznih parova/Å	2,3	3,4	3,8
Zavijenost	desna	desna	lijeva
Broj parova baza u jednom navoju	11	10,4	12
Promjer / Å	25,5	23,7	18,4
Visina navoja/ Å	25,3	35,4	45,6
Glikozidna veza	<i>anti</i>	<i>anti</i>	naizmjenično <i>sin</i> i <i>anti</i>
Nagib baznog para prema osi / °	19	1	9
Veliki utor	uzak i dubok	širok i dubok	plosnat
Mali utor	širok i plitak	uzak i dubok	uzak i dubok

U znanstvenim istraživanjima koristi se niz komercijalno dostupnih sintetskih polinukleotidnih supstrata. Često se koriste jednolančani polinukleotidi zbog manjih steričkih, hidrofobnih i elektrostatskih utjecaja. Većinom su to poli A, poli G i poli C polinukleotidi koji u vodenom mediju (pH = 6-7,5;  $I = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ ) tvore stabilne uzvojnice zbog aromatskih  $\pi$ - $\pi$  interakcija

između baza, te poli U polinukleotidi.<sup>4</sup> Osim toga, poli A i poli C polinukleotidi u kiselom mediju stvaraju dvolančane uzvojnice zbog protoniranja. Kao dvolančani polinukleotidi koriste se homopolinukleotidi (A-U, G-C, dA-dT, dG-dC) i alternirajući polinukleotidi (dAdT- dAdT, dGdC-dGdC). Osim sintetskih polinukleotida, u znanstvenim istraživanjima koristi se između ostalog prirodna *ct*DNA izolirana iz telećeg timusa čiji redoslijed baza i dalje nije poznat, ali sadrži 40 % G-C parova i 60 % A-T parova baza.

## 2.2. Nekovalentne interakcije malih molekula s polinukleotidima

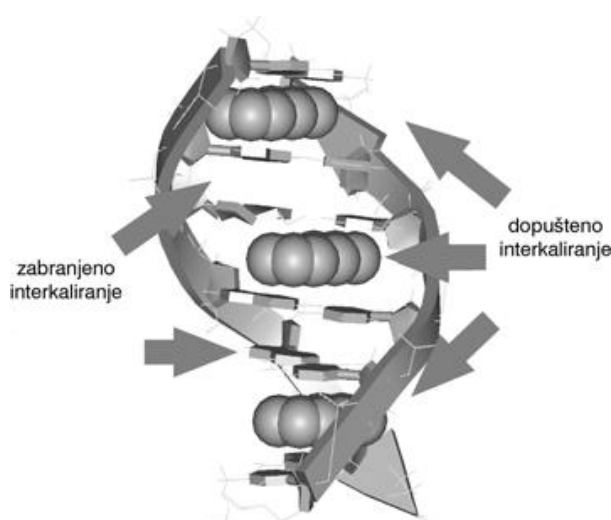
Nekovalentne interakcije malih molekula s polinukleotidima ravnotežne su interakcije u kojima dolazi do nastanka termodinamički najstabilnijih kompleksa. Postoje tri tipa nekovalentnog vezanja malih molekula na polinukleotide. Prvi uključuje elektrostatske interakcije polikationskih spojeva s negativno nabijenim fosfatima na polinukleotidima (Slika 3a), pri čemu afinitet direktno ovisi o broju pozitivnih naboja male molekule.



Slika 3. a) elektrostatske interakcije s negativno nabijenim fosfatima b) vezanje u mali utor c) interkaliranje<sup>8</sup>

U drugom načinu, spojevi konveksnog oblika vežu se na komplementarni, mali utor dvolančanih uzvojnica DNA ili RNA (Slika 3b), gdje pozitivni naboji u spoju omogućuju interakciju s negativno nabijenim fosfatima na polinukleotidu.<sup>4</sup> Selektivnost vezanja ovisi o utjecaju vodikovih veza, Van der Waalsovih, hidrofobnih, te elektrostatskih interakcija s

veznim mjestom na polinukleotidima. Većina spojeva pokazuje veći afinitet vezanja na mali utor u DNA, u odnosu na RNA, jer je mali utor na RNA širi i plići. Također, male molekule imaju veći afinitet prema dAdT slijedu zbog manjih steričkih utjecaja u odnosu na slijed dGdC. Treći način interkaliranja uključuje interkaliranje planarnih aromatskih molekula između parova baza u otopini dvolančanih i nekih jednolančanih polinukleotida (Slika 3c). Nastajanje takvih kompleksa stabilizira polinukleotidni lanac, te dolazi do produljenja uzvojnice, njenog “odvijanja” i deformacije. Zbog narušavanja lokalne strukture DNA, molekula tj. interkalator interkalira se na svako drugo mjesto na DNA što se naziva „principom isključenja susjeda“ (Slika 4).<sup>4</sup>



Slika 4. „Princip isključenja susjeda“<sup>4</sup>

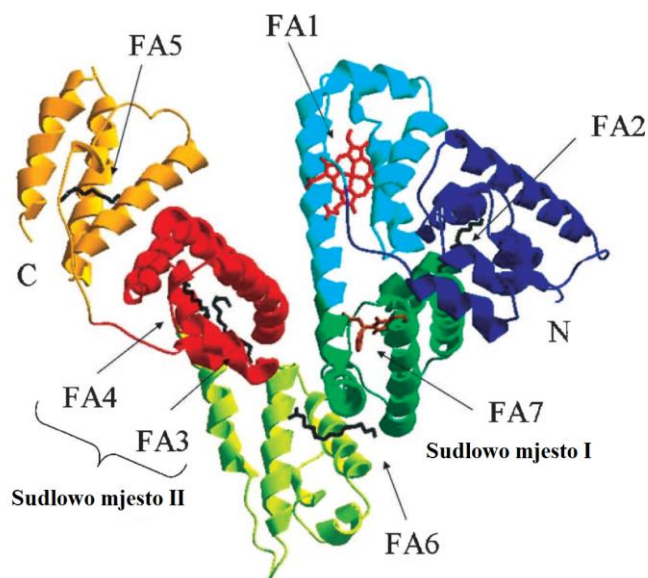
Intercaliranje je složeni proces u kojem je interkalator pozitivno nabijen i stupa u interakciju s negativno nabijenim fosfatima. Nastali kompleks dodatno je stabiliziran hidrofobnim interakcijama malih molekula s DNA i RNA. Stabilnosti doprinose i  $\pi$ - $\pi$  interakcije između aromatskih površina interkalatora i susjednih baza. Osim toga, stabilnosti nastalog kompleksa mogu pridonijeti, ali i odmoći druga međudjelovanja (vodikove veze, Londonova disperzijska međudjelovanja, elektrostatske interakcije).<sup>4</sup>

### 2.3. Albumin iz ljudskog seruma

Albumin HSA jedan je od najvažnijih proteina u ljudskoj plazmi koji se sintetizira u jetri i prenosi u krv kao jedan neglikolizirani lanac pri čemu dostiže koncentraciju u krvi od  $c = 7 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ .<sup>9</sup> HSA ima veliku sposobnost vezanja liganda čija količina može biti veća i od njegove topljivosti u plazmi. HSA služi kao prenositelj masnih kiselina, a ima utjecaj

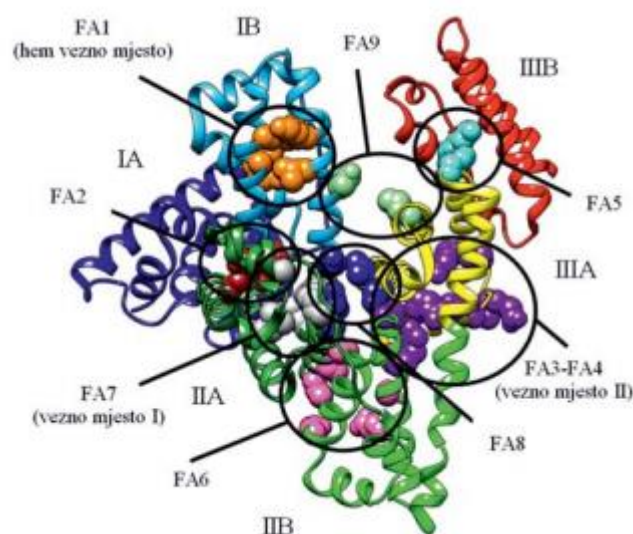
i na farmakokinetičko ponašanje mnogih lijekova, pri čemu utječe na njihovu učinkovitost i brzinu djelovanja. Klinički se koristi za liječenje nekih bolesti (hipovolemiju, šok, opekline, kirurški gubitak krvi, traumatu, krvarenje, hemodijalizu, akutno zatajenje jetre itd.). U nekim slučajevima, HSA drži ligande u napetoj konformaciji, omogućujući njihovu metaboličku modifikaciju, dok neke toksine čini bezopasnima jer ih transportira na mjesta odlaganja. HSA je odgovoran za većinu antioksidacijskih svojstva ljudskog seruma, bilo izravno ili kao nositelj čistača radikala.

Analizom primarne strukture uočeno je da se HSA sastoji od tri domene (I, II i III). Svaku domenu čine dvije odvojene poddomene (A i B) povezane zavojnicom (Slika 5). Terminalne regije sekvencijalnih domena doprinose stvaranju zavojnica unutar domena koje povezuju domenu IA i IB, te IIB i IIIA.<sup>9</sup> HSA pruža različita mjesta vezanja liganda.



Slika 5. Struktura albumina iz ljudskog seruma<sup>9</sup>

Prema Sudlowovoj nomenklaturi, veliki heterociklički anioni vežu se na Sudlowo mjesto I koje je smješteno na poddomeni IIA, dok se aromatski karboksilati vežu na Sudlowo mjesto II smješteno na poddomeni IIIA. Masne kiseline vežu se na HSA elektrostatskim ili polarnim interakcijama i to uglavnom na poddomene od A1-5 (Slika 6). Jedno od FA veznih mjesta smještenih u poddomeni IB služi kao vezno mjesto hema s tetrapirolnim prstenom smještenim u šupljini u obliku slova D.

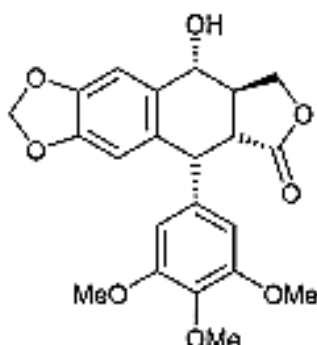
Slika 6. Vezna mjesta masnih kiselina i hema<sup>10</sup>

Dva krajnja tirozina Tyr138 i Tyr161 stupaju u  $\pi$ - $\pi$  interakciju s porfirinom, te na taj način omogućuju željezu hema da primi kisik. U odsutnosti FA mjesta, tiroksin se veže na Sudlowo I mjesto, dok se u prisutnosti FA mjesta veže na džep između domena I i III. Vezanje liganda na HSA ovisno o pH uzrokuje alosteričke promjene na strukturi HSA. Između pH = 2,7 i 4,3, HSA ima oblik F, dok svoj neutralni oblik zadržava između pH = 4,3 i 8,0 i u odsutnosti alosteričkih efektor. U prisutnosti alosteričkih efektor, HSA gubi  $\alpha$  zavoju čime se povećava afinitet za neke ligande. Vezanje hema alosterički regulira vezanje nekih lijekova na Sudlowo mjesto I. Masne kiseline također alosterički reguliraju vezanje liganda na Sudlowo mjesto I. Vezanje masnih kiselina na sučelje domena I-II i II-III uzrokuje rotaciju glavne domene oko duge unutarnje spiralne domene.<sup>9,10</sup>

#### 2.4. Benzoksantenski lignani

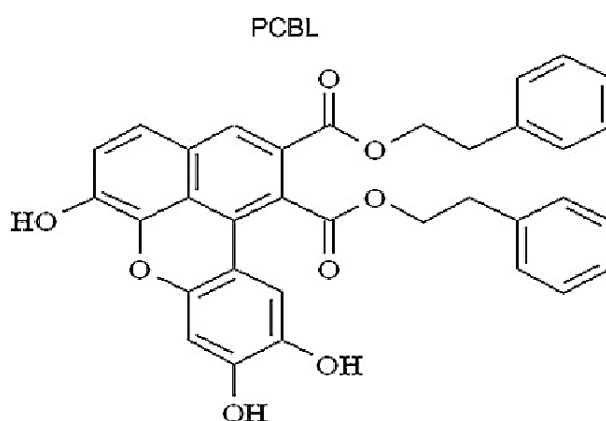
Benzoksantenski lignani su antitumorni agensi koji su proizvedeni biosintetski biomimetičkim oksidativnim povezivanjem fenilpropanoidnih jedinica (C<sub>6</sub>C<sub>3</sub>).<sup>1</sup> Dva lignana su međusobno povezana preko  $\beta$ - $\beta'$  oksidativnog spajanja. Osim što su pronađeni u različitim dijelovima biljaka, mogu se pronaći i kod sisavaca u obliku metaboličkih produkata koji proizlaze iz prehrambenih biljaka. Lignani u biljkama djeluju kao zaštita jer djeluju antimikrobno, antifungalno i kao insekticidi. Također, pokazuju i farmakološka svojstva jer djeluju antitumorsko, protuupalno, antioksidacijsko, antivirusno itd. Najčešći bioaktivni lignan je

podofilotoksin (Slika 7) izoliran iz *Podophyllum peltatum*. Oksidativnim spajanjem kafeinskih estera i metil-kafeata nastaje mnoštvo prirodnih i neprirodnih akiralnih lignana koji imaju planarnu i fluorescentnu benzoksantetsku jezgru. U prirodi postoji pet prirodnih lignana: rufescidrid iz *Cordia rufescens* i *Taraxacum mongolicum*, mongolikumin A iz *T. mongolicum*, junaneinska kiselina H iz *Salvia yunnanensis*, čilantian D iz *Rhoiptelea chilianth* i dodegranozid C iz *Dodecadenia grandiflora*.<sup>1</sup>



Slika 7. Struktura podofilotoksina<sup>1</sup>

Prvi sintetski benzoksanteni dobiveni su biomimetičkom dimerizacijom metil-kafeata i fenil- etil estera kafeinske kiseline (Slika 8).



Slika 8. Struktura benzoksantenskog lignana fenil-etil kafeata<sup>12</sup>

Budući da nema mnogo bioloških podataka o benzoksantetskim lignanima, cilj je istražiti njihovu interakciju s DNA kao i njihova antiproliferativna svojstva. Kao rezultat istraživanja, pronađeno je da se navedeni spojevi mogu na dva načina vezati na DNA: interkalativno i vezanjem u mali utor pomoću skupina na C1 i C2 atomu koje ostvaruju vezu s vanjskom

deoksiribozom okosnice. Hidroksilne skupine na C6, C9 i C10 vodikovim se vezama interkalativno vežu na gvanin i anomerni kisik deoksiriboze. Antitumorni agensi obično djeluju tako se vežu na mali utor ili interkalativno između parova baza. Neke molekule mogu se vezati na oba načina i tako pojačati interakciju s DNA i inhibicijsku aktivnost prema enzimima koji stupaju u interakciju s DNA.<sup>11</sup>

## 2.5. Metode ispitivanja nekovalentnih interakcija malih molekula s DNA i RNA

Eksperimentalne metode koje se najčešće koriste za proučavanje nekovalentnih interakcija malih molekula s DNA i RNA su spektroskopske metode koje se temelje na promjeni spektroskopskih svojstava ispitivanih spojeva (UV/VIS spektroskopija i fluorescencija), spektroskopija CD i LD (ukazuju na orijentaciju molekula ispitivanog spoja te dinamiku i homogenost načina vezanja na polinukleotid) i eksperimenti koji prate stabilnost i promjenu strukture polinukleotida uzrokovane vezanjem ispitivanih spojeva (npr. promjena temperature „mekšanja“ dvostruke uzvojnice po vezanju ispitivanog spoja).<sup>4</sup>

### 2.5.1. UV/VIS spektroskopija

UV/VIS spektroskopija temelji se na apsorpciji zračenja u ultraljubičastom (200-380 nm) i vidljivom (380-800 nm) dijelu spektra. Za apsorpciju zračenja su odgovorni kromofori tj. funkcionalne skupine koje sadrže dvostruke i/ili trostruke veze, konjugirani sustavi ili fenili.

Prolaskom zračenja kroz otopinu uzorka, molekule uzorka apsorbiraju zračenje, a količina apsorbiranog zračenja mjeri se pomoću spektrofotometra. Količina apsorbiranog zračenja može se izraziti Beer-Lambertovim zakonom koji govori da je apsorbancija  $A$  proporcionalna koncentraciji otopine  $c$  ( $\text{mol dm}^{-3}$ ), molarnom apsorpcijskom koeficijentu  $\varepsilon$  ( $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) i duljini puta zračenja kroz kivetu  $l$  (cm) (1).

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (1)$$

Apsorbancija  $A$  je povezana s transmitancijom  $T$ , prema izrazu (2)

$$A = -\log T = \log (I_0 / I), \quad (2)$$

gdje je  $I_0$  intenzitet upadnog, a  $I$  intenzitet propuštenog zračenja.

Iz snimljenog spektra može se odrediti vrijednost najveće apsorbancije tj. vrijednost valne duljine zračenja na kojoj molekula najviše apsorbira, te se pomoću Beer-Lambertovog zakona

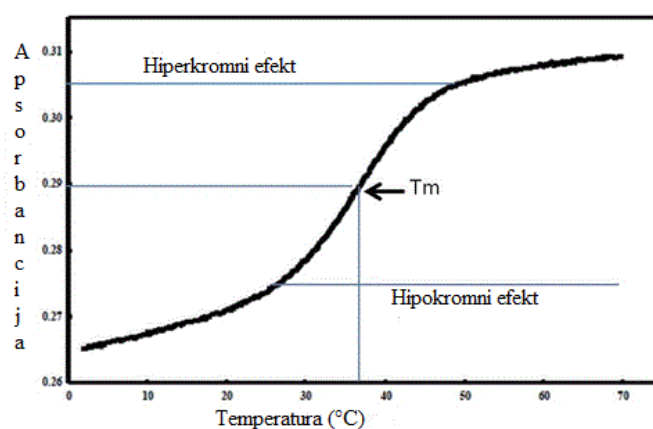


može izračunati nepoznata koncentracija otopine spoja ukoliko je poznat molarni ekstinkcijski koeficijent. UV/VIS spektrofotometri koriste energiju koja uzrokuje promjene u elektronskoj energiji molekule pri čemu dolazi do prijelaza elektrona iz veznih u protuvezne orbitale. Prema rastućim vrijednostima, molekulske orbitale možemo poredati na sljedeći način:  $\sigma < \pi < n < \pi^* < \sigma^*$  (Slika 9), pri čemu je prijelaz iz  $\sigma$  u  $\sigma^*$  najteži i potrebna je veća energija za taj prijelaz.<sup>13</sup>



Slika 9. Prijelaz elektrona između molekulskih orbitala<sup>13</sup>

Hoće li molekula apsorbirati UV/Vis zračenje ovisi o elektronskoj konfiguraciji molekule i energiji fotona, odnosno o energijskim razlikama između elektronskih stanja u molekuli. Prilikom titracije ispitivanog spoja s polinukleotidima, uočavaju se promjene u apsorpcijskom spektru. Ove promjene nastaju zbog povećanja intenziteta apsorpcije, odnosno dolazi do hiperkromnog efekta. Također je moguće uočiti i hipokromni efekt, gdje dolazi do smanjenja intenziteta apsorpcije (Slika 10).



Slika 10. Hiperkromni i hipokromni efekt uslijed vezanja spoja na polinukleotid<sup>16</sup>

Na izgled apsorpcijskog spektra utječe i izbor otapala, tj. može doći do batokromnog ili hipsokromnog pomaka u apsorpcijskom maksimumu. Batokromni pomak predstavlja pojavu gdje dolazi do pomaka apsorpcijskih maksimuma prema većim valnim duljinama zbog otapala ili supstitucije, dok hipsokromni pomak predstavlja pomak apsorpcijskih maksimuma prema nižim valnim duljinama. Osim toga, u apsorpcijskom spektru može se uočiti i izosbestična točka, kod koje je apsorbancija uzorka tijekom kemijske reakcije konstanta. Pojava izosbestične točke zapravo predstavlja nastajanje samo jednog tipa kompleksa spoj-polinukleotid.<sup>14,15</sup>

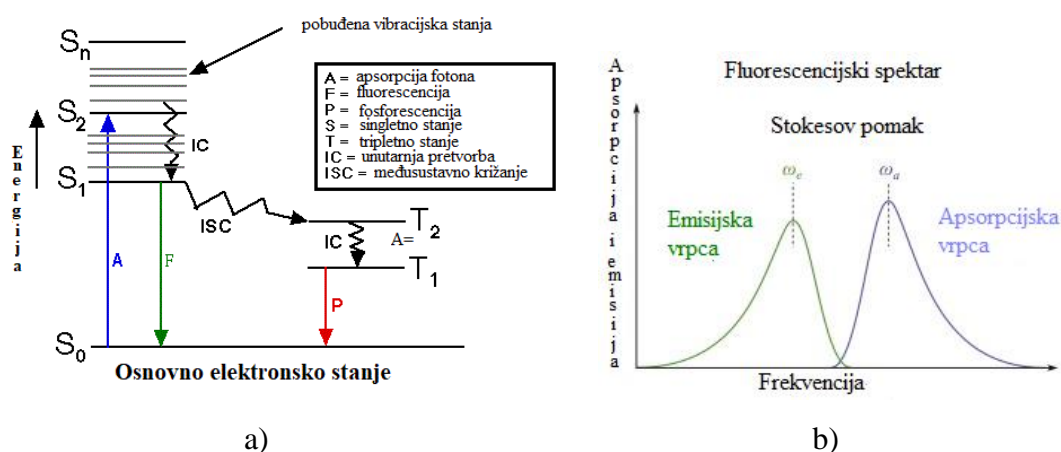
### 2.5.2. Promjena temperature mekšanja dvolančanih polinukleotida

Dvostruke uzvojnice dvolančanih polinukleotida su termički nestabilne i zbog toga dolazi do pucanja vodikovih veza između baza i odvajanja lanaca prilikom zagrijavanja njihovih otopina. Taj proces narušavanja uređene strukture polinukleotida naziva se denaturacija. Osim promjenom temperature, na promjenu strukture polinukleotida se može djelovati i promjenom pH, ionske jakosti ili uvođenjem novih komponenti u sustav. Denaturacija je proces u kojem se mijenja apsorpcija polinukleotida, te se zbog toga može pratiti UV/Vis spektroskopijom. Kada dođe do denaturacije, u apsorpcijskom spektru može se uočiti porast apsorpcije tj. dolazi do hiperkromnog efekta. Denaturacijska krivulja polinukleotida dobije se mjerenjem ovisnosti apsorbancije o promjeni temperature.<sup>4</sup>

Temperatura mekšanja je temperatura na sredini krivulje, a predstavlja temperaturu kod koje dolazi do razmatanja polovine dvostruke uzvojnice. Budući da su GC parovi stabilizirani trima vodikovim vezama, njihove temperature mekšanja nalaze se na većim vrijednostima u odnosu na parove AT. Vezanjem malih molekula na dvostruke uzvojnice dolazi do promjene u temperaturi mekšanja. Općenito, vezanje molekula na utore DNA/RNA uzrokuje pozitivne  $\Delta T_m$  (vezanjem dolazi do stabilizacije polinukleotida), ali i negativne  $\Delta T_m$  vrijednosti jer dolazi do destabilizacije dvostruke uzvojnice. Interkalativni način vezanja molekula na dvostruke polinukleotide, s druge strane, daje pozitivne  $\Delta T_m$  vrijednosti i dovodi do stabilizacije dvostruke uzvojnice.<sup>4</sup> Ovom metodom može se istodobno ispitivati kakav utjecaj ima spoj na stabilizaciju dvostruke uzvojnice kada se veže na više različitih polinukleotida.<sup>17</sup>

## 2.5.3. Fluorescencijska spektroskopija

Fluorescencijska spektroskopija je metoda molekulske spektroskopije kod koje dolazi do pobude molekule u više energijsko stanje apsorpcijom zračenja točno određene valne duljine, a zatim do emisije zračenja u ultraljubičastom ili vidljivom dijelu spektra. Dio apsorbirane energije, molekula gubi prilikom vibracijske relaksacije, gdje prelazi iz višeg vibracijskog stanja u niže. Iz najnižeg vibracijskog stanja, molekula može neradijativnim putem prijeći u niže elektronsko stanje istog multipliciteta procesom unutarnje pretvorbe (*eng. internal conversion, IC*) ili u stanje različitih multipliciteta procesom međusustavnog križanja (*eng. intersystem crossing, ISC*).<sup>18</sup> U radijativne procese spadaju fluorescencija i fosforescencija. Razlikuju se ovisno o prirodi pobuđenih stanja i prijelazima između tih stanja. Do fluorescencije dolazi kada molekula iz prvog pobuđenog singletnog stanja, emisijom fotona prelazi u osnovno elektronsko stanje. Za razliku od fluorescencije, kod fosforescencije se molekula iz tripletnog stanja emisijom vraća u osnovno stanje. Singletno stanje nalazi se na višoj energiji i zbog toga se fluorescencija javlja na višim valnim duljinama, ali je fosforescencija sporija zbog prijelaza između različitih multipliciteta. Dijagram Jablonskog (Slika 11a) prikazuje prijelaze između različitih energijskih stanja. Budući da molekula gubi dio energije prilikom vibracijske relaksacije, valne duljine na kojima se odvija fluorescencija pomaknute su prema većim vrijednostima u odnosu na apsorbirano zračenje. Ovu pojavu nazivamo Stokesov pomak (Slika 11b).

Slika 11. a) Dijagram Jablonskog<sup>19</sup> b) Stokesov pomak<sup>20</sup>

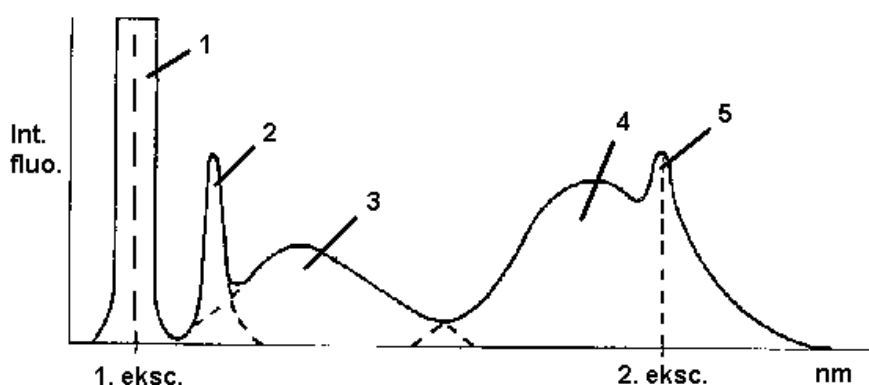
Kad se radi s razrijeđenim otopinama, intenzitet fluorescencije može se opisati prema jednadžbi (3).

$$F = K \cdot I_0 \cdot c \cdot l \cdot \varepsilon \cdot \Phi \quad (3)$$

gdje je,  $K$  konstanta instrumenta,  $I_0$  intenzitet pobudnog zračenja,  $c$  množinska koncentracija tvari u otopini,  $[\text{mol dm}^{-3}]$ ,  $l$  duljina puta zračenja,  $[\text{cm}]$ ,  $\epsilon$  molarni ekstinkcijski koeficijent,  $[\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{cm}^{-1}]$ , i  $\Phi$  kvantno iskorištenje.<sup>18</sup>

Omjer molekula koje fluoresciraju u odnosu na ukupan broj pobuđenih molekula daje kvantno iskorištenje. Kvantno iskorištenje ovisi o vrsti otapala, temperaturi, prisutnosti tvari koje gase fluorescenciju i polarnosti, a njegove vrijednosti kreću se između 0 i 1. Vrijeme života pobuđenog stanja je vrijeme koje fluorofor provede u pobuđenom stanju i karakteristično je za pojedine skupine spojeva.

Intenzitet emisije ovisi o koncentraciji analita gdje pri visokim koncentracijama molekule apsorbiraju zračenje koje druge molekule emitiraju tj. dolazi do autoapsorpcije. Osim toga, intenzitet ovisi i o pH otopine i temperaturi, pri čemu se fluorescencija smanjuje s povećanjem temperature. Fluorescencijski spektri sastoje se od pobudnog i emisijskog spektra. Pobudni spektar prikazuje ovisnost intenziteta fluorescencije o valnoj duljini pobude i snima se pri definiranoj valnoj duljini emisije i konstantnim širinama pukotine. Emisijski spektar prikazuje ovisnost intenziteta fluorescencije o valnoj duljini emisije, a snima se pri definiranoj valnoj duljini pobude. U samom spektru uzorka (Slika 12) moguće je uočiti signale koji odgovaraju raspršenju na valnoj duljini pobude (1), Ramanovom raspršenju otapala (2), emisiji nečistoća i otapala (3), emisiji uzorka (4), te raspršenju drugog reda valne duljine pobude (5).<sup>18,21</sup> Fluorescencijska spektroskopija omogućava određivanje analita kod vrlo niskih koncentracija ( $c = 10^{-8} \text{ mol dm}^{-3}$ ), te je zbog toga osjetljivija u odnosu na apsorpcijsku spektroskopiju.



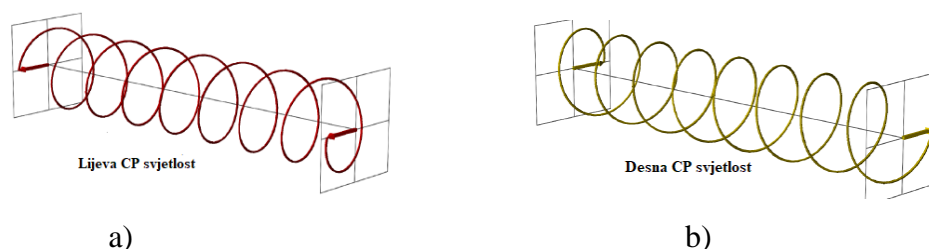
Slika 12. Fluorescencijski spektar uzorka<sup>21</sup>

#### 2.5.4. Spektropolarimetrija cirkularnog dikroizma

Cirkularni dikroizam je spektroskopska metoda koja se temelji na različitoj apsorpciji lijevog (L-CP) i desnog (R-CP) cirkularnog polariziranog svjetla. Cirkularni dikroizam služi za proučavanje optički aktivnih spojeva, te daje informacije o kiralnosti molekula koje apsorbiraju zračenje u UV-Vis području jer dolazi do prijelaza iz osnovnog u pobuđeno stanje. Također se koristi i za praćenje promjena u sekundarnoj strukturi makromolekula kada se one nalaze u različitim uvjetima ili u interakciji s drugim molekulama. Koristi se i za praćenje termodinamičkih i kinetičkih svojstava makromolekula.<sup>22</sup>

Elektromagnetsko zračenje se sastoji od oscilirajućeg magnetskog i električnog polja koji su okomiti jedan na drugi i na smjer širenja zračenja. U većini izvora zračenja, magnetska i električna polja osciliraju u svim smjerovima okomito na smjer širenja, dok kod kružno polarizirane svjetlosti električno polje konstantno cirkulira oko osi širenja. U slučaju linearno polarizirane svjetlosti magnituda oscilira, a smjer vektora je konstantan za razliku od cirkularne gdje je magnituda konstantna, a vektor oscilira.

Kada se radi o cirkularnoj polariziranoj svjetlosti, razlikujemo onu koja cirkulira u smjeru kazaljke na satu, odnosno desnu polariziranu svjetlost, te lijevu cirkularnu polariziranu svjetlost koja cirkulira u smjeru obrnutom od smjera kazaljke na satu (Slika 13).



Slika 13. a) Lijeva cirkularna polarizirana svjetlost i b) desna cirkularna polarizirana svjetlost<sup>23</sup>

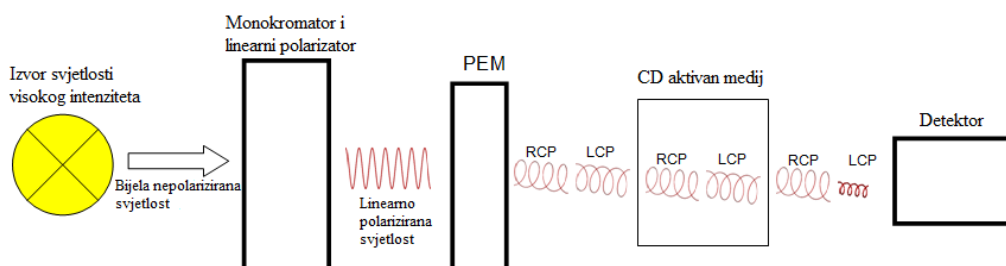
Kiralna molekula koja je optički aktivna u interakciji s cirkularnom polariziranom svjetlošću apsorbira različitu količinu desnog odnosno lijevog cirkularnog polariziranog svjetla, a razlika u apsorpciji lijevog i desnog polariziranog svjetla može se mjeriti i kvantificirati prema Beer- Lambertovom zakonu (4)

$$\Delta A = A_l - A_r \quad (4)$$

Odnosno:  $A = (\epsilon_l - \epsilon_r)cl$ , gdje je razlika u molarnoj apsorptivnosti zapravo molarni cirkularni dikroizam. Molarni cirkularni dikroizam ovisi o valnoj duljini i konformaciji molekule koja apsorbira zračenje. Budući da optički aktivna molekula različito apsorbira lijevu i desnu

cirkularnu polariziranu svjetlost, dolazi do zaostajanja u fazi i javljaju se razlike u magnitudama rezultatnog rotirajućeg vektora. Rezultantni val je eliptično polariziran i zbog toga se cirkularni dikroizam ponekad izražava i u stupnjevima eliptičnosti  $\theta$ .<sup>24</sup>

Cirkularni dikroizam mjeri se pomoću CD spektrometra (Slika 14) koji se sastoji od izvora zračenja, monokromatora, fotoelastičnog modulatora, držača uzorka i detektora.



Slika 14. Shematski prikaz rada CD spektrometra<sup>24</sup>

Zračenje koje izlazi iz izvora je linearno polarizirano i prolazi kroz monokromator. Monokromator propušta svjetlost jedne valne duljine koja prolazi kroz modulator koji pretvara linearnu polariziranu svjetlost u cirkularnu. Cirkularno polarizirano svjetlo naizmjenično prolazi kroz kiralni medij, a razlika u apsorpciji L-CP i R-CP se detektira pomoću detektora.

Spektroskopija CD se najčešće koristi u identifikaciji strukture proteina i DNA. Dušične baze su same po sebi akiralne, ali nukleozidi i derivati nukleotida su optički aktivni te 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 toga je signal u CD spektru veći u odnosu na signal pojedinačnih nukleotida, a pojavljuje se na oko 300 nm. Vežanjem akiralnog liganda na nukleinsku kiselinu dolazi do nastanka inducirano cirkularnog dikroizma (ICD). ICD je posljedica sprege električnih prijelaznih momenata nukleinske kiseline i liganda pri čemu dolazi do nastanka rezultatnog prijelaznog momenta koji je paralelan s vektorom električnog polja cirkularne polarizirane svjetlosti. Na ovaj način moguće je dobiti korisne informacije o načinima interakcije i geometriji vežanja jer su prijelazni momenti jednoliko orijentirani s obzirom na mjesto vežanja na DNA ili RNA.

Kada se snimanje odvija na valnoj duljini manjoj od 300 nm, a ligand ne apsorbira svjetlost, tada se promjene u spektru mogu odnositi na promjene u sekundarnoj strukturi nukleinske kiseline zbog vežanja liganda. Ako ligand apsorbira svjetlost u navedenom rasponu, promjene u spektru ne mogu se interpretirati isključivo kao promjena u strukturi nukleinske kiseline jer

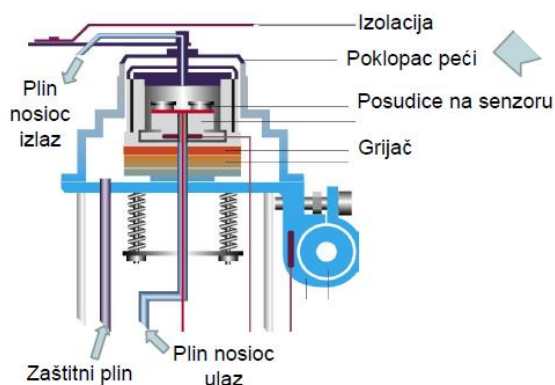
se eventualni ICD signal liganda može kombinirati s CD signalom polinukleotida. Kada se snimanje odvija na valnoj duljini većoj od 300 nm sve promjene u spektru odnose se na ligand jer nukleinske kiseline u ovom rasponu ne apsorbiraju svjetlost. U tom slučaju promjene u spektru mogu nastati zbog:

- a) promjena u kiralnosti liganda zbog strukturnih promjena uzrokovanih vezanjem,
- b) nastanka induciranog CD zbog vezanja liganda na kiralna mjesta,
- c) vezanja eksitona između većeg broja agregiranih molekula liganda.

Pojava izodikroične točke (na kojoj je CD ekvivalentan izobestičnoj točki) u spektru tijekom titracije označava nastanak samo jednog tipa kompleksa DNA ili RNA/ligand, a može se pojaviti u rasponu valnih duljina na kojima apsorbira DNA ili ligand. 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>23</sup>

#### 2.5.5. DSC-Diferencijalna pretražna kalorimetrija

Diferencijalna pretražna kalorimetrija je tehnika za termičku analizu kojom se mjeri razlika u toplinskom toku između ispitivanog i referentnog materijala kad je uzorak podvrgnut kontroliranoj temperaturi i atmosferi.<sup>25</sup> Diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom može se odrediti temperatura faznih prijelaza, toplinska i oksidativna stabilnost uzorka, kinetika, te promjena entalpije i toplinskog kapaciteta. DSC instrument (Slika 15) se sastoji od radne i referentne ćelije koje su termički izolirane od vanjskih utjecaja.



Slika 15. Shematski prikaz DSC kalorimetra<sup>26</sup>

Općenito se u referentnu ćeliju dodaje otopina pufera, a u radnu otopina pufera i uzorka. Povećanje temperature se vrši pomoću električnih grijača koji su u dobrom toplinskom kontaktu s obje ćelije. Tijekom endotermnog prijelaza, temperatura u radnoj ćeliji je manja u odnosu na referentnu i zbog toga grijač mora dovesti energiju tj. toplinu u ćeliju s uzorkom da temperature u radnoj i referentnoj ćeliji budu jednake. Poznavanjem koncentracije uzorka, moguće je iz dovedene topline i temperature odrediti toplinski kapacitet. Površina ispod krivulje toplinskog kapaciteta može se koristiti za dobivanje kalorimetrijske entalpije prijelaza,  $\Delta H_{\text{cal}}$ , prema  $\Delta H_{\text{cal}} = \int C_p dT$ .<sup>25</sup> Ako se radi o egzotermnom procesu dolazi do oslobađanja topline i entalpija je negativna, dok dovođenje topline uzorku rezultira endotermnim procesom i pozitivnom entalpijom.

Količina dovedene ili odvedene topline registrira se kao signal na DSC krivulji pri čemu se održava konstantna razlika u temperaturi između uzorka i referentnog materijala. Osim signala, na DSC krivulji nalaze se osnovna i nulta linija. Nulta linija označava krivulju koja se dobije kada se provodi mjerenje bez uzorka, dok se osnovna linija dobije povezivanjem linije prije i nakon signala. Na DSC krivulji mora biti naznačen smjer endotermnog odnosno egzotermnog procesa. Temperatura početka signala je temperatura kod koje pik odstupa od osnovne linije i označava se s  $T_i$ . Temperatura završetka signala predstavlja temperaturu kod koje pik završava i označava se s  $T_f$ . Temperatura maksimuma signala,  $T_p$  je temperatura kod koje se pik nalazi na najvećoj vrijednosti u odnosu na osnovnu liniju.  $T_e$  je ekstrapolirana temperatura početka signala tj. sjecište tangente na padajući ili rastući nagib signala i osnovnu liniju. Na izgled signala na DSC krivulji utječe brzina, a najčešće iznosi 10°/min. Što je brzina zagrijavanja ili hlađenja veća, osjetljivost je veća, signali su intenzivniji, a rezolucija manja.<sup>26</sup>



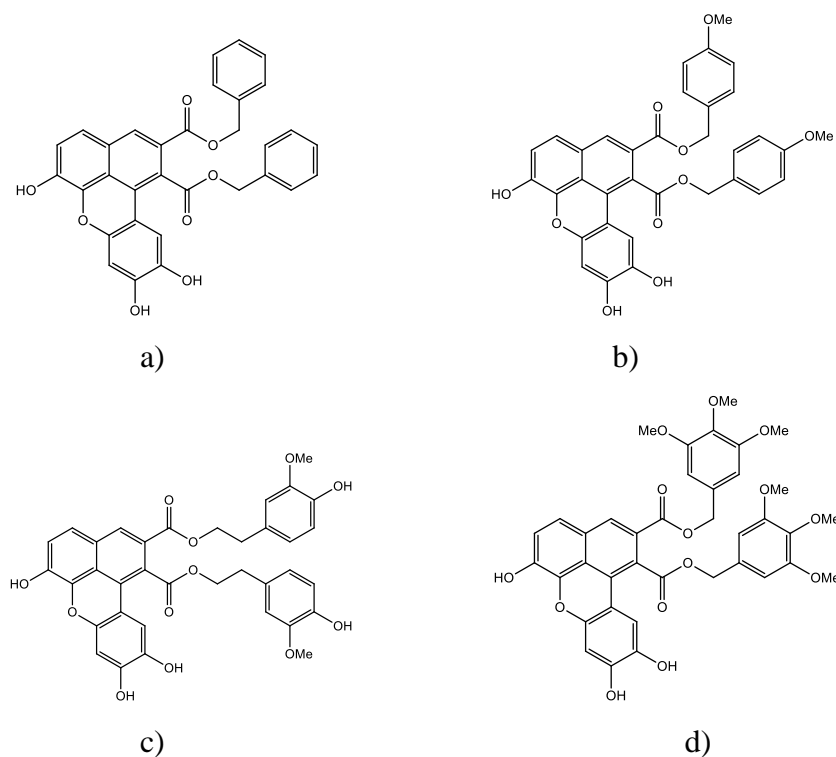
## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali

Uzorci benzoksantetskih lignana CT-A koncentracije  $c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  pripremljeni su otapanjem u DMSO točno poznatog volumena: CT-A19 (1,475 mg u 1,379 mL DMSO), CT-A22 (1,175 mg u 0,988 mL DMSO), CT-A23 (1,35 mg u 1,031 mL DMSO) i CT-A24 (1,45 mg u 1,1075 mL DMSO).

Sva spektroskopska mjerenja provedena su u Na-kakodilatnom puferu koncentracije  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$  pri  $\text{pH} = 7$  u kojem su pripremljene i sve otopine polinukleotida kao i otopina HSA koncentracije  $c = 1,5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ .

Spojevi su sintetizirani u grupi koju vodi prof. dr. sc. C. Tringali, University of Catania-Department of Chemical Sciences, Italija. Strukturne formule spojeva prikazane su na slici 16.



Slika 16. Strukturne formule spojeva a) CT-A19 b) CT-A22 c) CT-A23 d) CT-A24

Polinukleotidi korišteni u radu (*calf thymus* DNA, poli rA-poli rU, poli dAdT-poli dAdT i poli dGdC-poli dGdC, poli rA) otopljeni su prema uputi proizvođača (Sigma Aldrich) u kakodilatnom puferu ( $\text{pH} = 7,0$ ,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ). Koncentracija polinukleotida određena je spektrofotometrijskim mjerenjem apsorbancije pri određenoj valnoj duljini, a izražena je kao koncentracija fosfata.<sup>27, 28</sup> Albumin iz humanog seruma HSA (Sigma Aldrich) otopljen je u kakodilatnom puferu ( $\text{pH} = 7,0$ ,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ), koncentracija albumina je  $c = 1,5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ .

### 3.2. UV/Vis spektroskopija

Za potrebe snimanja UV/Vis spektara spojeva korišten je spektrofotometar Varian Cary Bio 100. Spektri su snimljeni pomoću programskog paketa Cary WinUV, modul *Scan* u kvarcnoj kivetu s optičkim putem 1,00 cm na valnim duljinama u rasponu od 240-550 nm pri temperaturi od 25 °C i  $\text{pH} = 7$ . Svi dobiveni podaci su pohranjeni kao datoteke ASCII, te su kasnije obrađeni u programu OriginPro 7.5.

U kvarcne kivete je dodan 1 mL kakodilatnog pufera ( $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) i snimljena bazna linija koja je automatski korigirana prilikom snimanja spektara uzoraka. Zatim su dodavani alikvoti ispitivanih otopina spojeva: 2  $\mu\text{L}$  CT-A19 ( $c_0 = 2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ , ukupno dodano 10  $\mu\text{L}$ ) CT-A22 ( $c_0 = 1,98 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ , ukupno dodano 4  $\mu\text{L}$ ), CT-A23 ( $c_0 = 2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ , ukupno dodano 4  $\mu\text{L}$ ), CTA-24 ( $c_0 = 2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ , ukupno dodano 4  $\mu\text{L}$ ), te su pojedinačno snimljeni apsorpcijski spektri vodenih otopina spojeva u ovisnosti o koncentraciji na temperaturi od 25 °C.

Termička stabilnost otopina spojeva ispitana je snimanjem apsorbancije ispitivanih spojeva: CT-A19 ( $c = 8 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ), CT-A22 ( $c = 7,9 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ), CT-A23 ( $c = 8 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) i CT-A24 ( $c = 8 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) zagrijavanjem na temperature (25, 30, 40, 50, 60, 80 °C) i ponovno hlađenjem na 25 °C.

Promjena apsorbancije spoja CTA-19 praćena je spektrofotometrom Cary Bio 100 u području od 240 do 550 nm u aplikaciji *Scan*. U kvarcnu kivetu dodan je 1mL kakodilatnog pufera, snimljena bazna linija i otpipetirano 5  $\mu\text{L}$  otopine CT-A19 i 5  $\mu\text{L}$  otopine *ctDNA* ( $c = 8,4 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ), te je snimljen UV/Vis spektar nakon dodatka otopine *ctDNA*.

### 3.2.1. Promjena temperature mekšanja dvolančanih polinukleotida

Promjena temperature mekšanja snimljena je pomoću spektrofotometrom Cary Bio 100 pri valnoj duljini 260 nm (maksimum apsorbancije polinukleotida) u aplikaciji *Thermal*. Svaka otopina u kivetu snimana je u temperaturnom intervalu od 25 do 95 °C.

U 9 kvarcnih kiveta s optičkim putem od 1 cm dodan je 1 mL kakodilatnog pufera i snimljena je bazna linija. Zatim je u prvih 4 kivete dodana otopina *ctDNA* i spoja, a u drugih 4 otopina poli rA-poli rU i/ili poli dAdT-poli dAdT i spoja, dok je u zadnju kivetu dodana samo otopina spoja, tako da je približna koncentracija otopina u kivetama bila  $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ . Pomoću molarnih ekstinkcijskih koeficijenata (Tablica 2) izračunati su dodaci spojeva potrebni da konačan omjer spoja/polinukleotida u kivetu bude: 0, 0,3, 0,3 i 0. U kivete s polinukleotidima (bez spoja) dodan je alikvot DMSO koji odgovara dodanom volumenu spoja u kivatama s kompleksom spoja i polinukleotida. Dobiveni podaci proanalizirani su u programu OriginPro, gdje su dobivene prve derivacije krivulje mekšanja iz čijih je maksimuma određena vrijednost temperature mekšanja polinukleotida  $T_m$ . Promjene temperature mekšanja dobivene su oduzimanjem srednje vrijednosti  $T_m$  kompleksa ispitivanih spojeva s polinukleotidima od srednje vrijednosti  $T_m$  određenih za čiste polinukleotide.

Tablica 2. Molarni ekstinkcijski koeficijenti ( $\varepsilon$ ) i valne duljine maksimuma apsorbancije ( $\lambda_{\max}$ ) za pojedini polinukleotid

polinukleotid	$\varepsilon / \text{mmol}^{-1} \text{cm}^2$	$\lambda_{\max} / \text{nm}$
<i>ctDNA</i>	6600	260
poli(dA) : poli(dT)	6000	260
poli dAdT : poli dAdT	6600	262
poli(A) : poli(U)	6000	260
poli(dG) : poli(dC)	7400	253
poli dGdC : poli dGdC	8400	254
poli(G) : poli(C)	7400	253

### 3.3. Fluorescencijska spektroskopija

Fluorescencijski spektri spojeva snimljeni su na fluorimetaru Varian Cary Eclipse s automatskim držačem 4 kiveteta. Širina pukotine odabrana je tako da su snimljeni emisijski spektri otopine spoja s različitim širinama, te je na kraju odabrana ona širina pukotine kod koje je instrument dao najbolji odgovor (int. fluorescencije > 50 arb. jedinica). Prema tome, širina emisijske pukotine iznosila je 10 nm, dok je širina pobudne pukotine iznosila 20 nm. Kao valna duljina pobude izabrana je ona kod maksimalne apsorpcije spoja ( $\lambda_{exc} = 274$  nm, snimljen i spektar pri  $\lambda_{exc} = 400$  nm), dok je valna duljina maksimuma emisije  $\lambda_{em} = 515$  nm. Emisija spojeva praćena je na valnim duljinama od 400 do 700 nm.

Mjerenja su provedena u kivetama s optičkim putem 1 cm. U svaku kivetu dodana su 2 mL kakodilatnog pufera pH = 7,03 ( $c = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>) i snimljena bazna linija. Zatim su dodavani alikvoti otopine spojeva ( $c_0 = 2 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup>,  $V = 0,5-1$  μL), tako da je konačna koncentracija otopina u kiveti  $c = 3 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>, te je snimljen emisijski spektar otopine spojeva u ovisnosti o koncentraciji.

Eksperiment kojim se dobila ovisnost fluorescencijskog emisijskog spektra o promjeni temperature proveden je u kvarcnim kivetama s optičkim putem od 1 cm. Snimanja su provedena na valnoj duljini emisije 274 nm. U svaku kivetu dodana su 2 mL kakodilatnog pufera pH = 7,03 ( $c = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>) i snimljena bazna linija. Nakon toga dodavani su alikvoti otopine spojeva ( $c_0 = 2 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup>,  $V = 2$  μL) tako da je konačna koncentracija otopine u kiveti  $c = 2 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>. Snimanje je provedeno zagrijavanjem otopina u temperaturnome rasponu od 25-80 °C, te ponovnim hlađenjem na 25 °C.

Osim toga, snimljena je i ovisnost emisijskog spektra o vremenu za otopine spojeva koncentracije  $c = 2 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>. Mjerenja su provedena korištenjem *cycle* moda na valnoj duljini emisije 274 nm. Snimljeno je 10 ciklusa s vremenom inkubacije 2 minute za otopinu spoja CT-A19, dok je za ostale spojeve snimljeno 8 ciklusa s vremenom inkubacije 2 minute.

### 3.3.1. Fluorimetrijske titracije

Fluorimetrijske titracije provedene su u fluorimetrijskim kivetama s optičkim putem 1 cm. Širina emisijske i pobudne pukotine je 20 nm. Emisijski spektri snimljeni su na valnoj duljini pobude 400 nm. U svaku kivetu dodan je kakodilatni pufer pH = 7,03 ( $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ), te je snimljena bazna linija. U svaki pufer su otpipetirane otopine spojeva  $c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  tako da je konačna koncentracija otopine spojeva u kiveti  $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ , te su snimljeni spektri spojeva. U otopine spojeva su zatim otpipetirani alikvoti otopine polinukleotida, odnosno HSA dok se nije postiglo zasićenje. Nakon svakog dodanog alikvota otopine polinukleotida i HSA pričekava se 2 minute prije snimanja da bi se uspostavila ravnoteža u reakcijskog smjesi.

Dobiveni podaci obrađeni su u programu OriginPro 7.5, a konstanta stabilnosti kompleksa,  $K_s$  i omjer  $n$  (koncentracija vezanog spoja / koncentracija polinukleotida) izračunati su pomoću Scatchardove jednadžbe<sup>5</sup> nelinearnom regresijskom metodom. (5)

$$I = I_0 + ((I_{\text{lim}} - I_0) / (2 \cdot c)) \cdot (c + n \cdot c_s + 1 / K_s - ((c + n \cdot c_s + 1 / K_s)^2 - 4 \cdot c \cdot n \cdot c_s)^{1/2}) \quad (5)$$

$c$  – množinska koncentracija ispitivanog spoja u otopini

$c_s$  – množinska koncentracija polinukleotida; u ovom radu je izražena kao koncentracija fosfata okosnice

$n$  – omjer koncentracije vezanog spoja i polinukleotida

$I_0$  – spektroskopski odgovor čistog spoja (u slučaju spektroskopski neaktivnog spoja,  $I_0$  je nula)

$I$  – spektroskopski odgovor nakon dodatka određene količine polinukleotida,

$I_{\text{lim}}$  – spektroskopski odgovor kompleksa kad više nema slobodnog spoja u otopini (u slučaju spektroskopski neaktivnog kompleksa  $I_{\text{lim}}$  je nula)

$K_s$  – konstanta stabilnosti kompleksa

### 3.4. CD titracije

CD spektri spojeva snimani su na spektrometru Jasco J-815 CD, u aplikaciji Spectra Manager, Spectrum Measurement, u fluorimetrijskim kivetama duljine optičkog puta 1 cm. Snimanja su provedena s visokom osjetljivošću instrumenta brzinom od 200 nm/min. Za svaki uzorak snimana su dva spektra, te je konačni spektar bio prosjek oba spektra. Ovim spektrometrom istodobno je praćena promjena cirkularnog dikroizma i apsorbancije u području od 240 nm do 550 nm.

U fluorescencijsku kivetu dodan je kakodilatni pufer pH = 7,03 ( $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ), te je snimljena bazna linija koja je korigirana nakon snimanja. U kakodilatni pufer je otpipetirana otopina polinukleotida tako da je konačni volumen otopine u kiveti bio 2 mL, a konačna koncentracija otopine  $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ . Snimljeni su spektri bez spojeva, a potom su dodavani alikvoti otopine spojeva ( $c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ) izračunati za različite omjere koncentracije spoja i koncentracije polinukleotida. Nakon svakog dodanog alikvota otopine spoja sniman je spektar, te je od snimljenog spektra oduzet spektar pufera, a dobiveni podaci obrađeni su u programu OriginPro 7.5.

### 3.5. DSC-Diferencijalna pretražna kalorimetrija

Snimanja su provedena na nano kalorimetru DSC (Pyris Diamond DSC, Perkin Elmer), gdje je u radnu ćeliju dodavana odzračena pripremljena otopina HSA, spoja i pufera, a u referentnu pripremljena odzračena otopina kakodilatnog pufera pH = 7,03 ( $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ). Snimanja su provedena pri konstantnom protoku plina u temperaturnom intervalu od 25-100 °C, te ponovno hlađenjem na 25 °C.

Otopine su pripremljene tako da je u jednu epruvetu Eppendorf otpipetirano 750  $\mu\text{L}$  pufera, a u drugu 100  $\mu\text{L}$  otopine HSA ( $c = 1,5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ), 45  $\mu\text{L}$  otopine spoja ( $c = 2 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ) i 605  $\mu\text{L}$  otopine kakodilatnog pufera, tako da je konačna koncentracija HSA  $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ , a spoja  $c = 1,2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ .

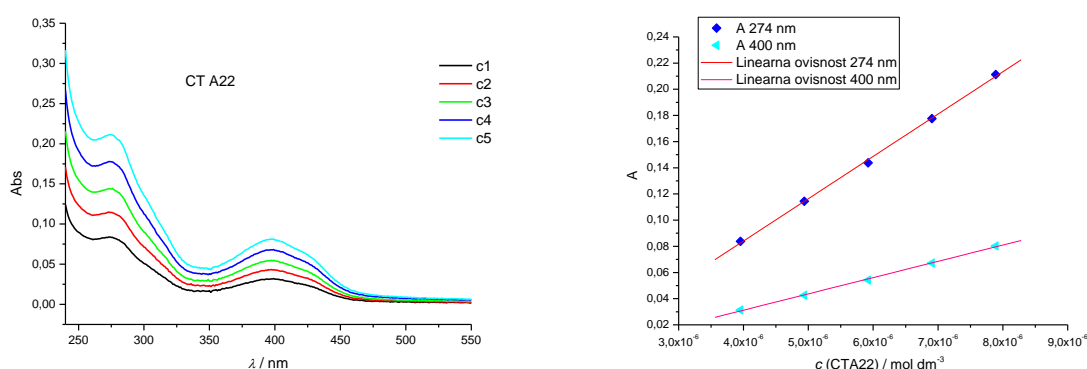
Dobiveni spektri obrađeni su u programu NanoAnalyze (DSC Analysis), te zatim u OriginPro 7.5.

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Spektroskopska svojstva spojeva CT-A19, CT-A22, CT-A23 i CT-A24

#### 4.1.1. UV/Vis spektri spojeva

Ispitivani spojevi otopljeni su u DMSO, te volumni udio DMSO prilikom mjerenja nije prelazio 1 %. UV/Vis spektri spojeva snimljeni su u Na-kakodilatnom puferu ( $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $\text{pH} = 7$ . Na temelju dobivenih spektara utvrđen je linearni porast apsorbancije do koncentracije  $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ , na temelju čega je zadovoljen Beer-Lambertov zakon (Slika 17, Dodatak- Slika D1-D3). Linearni porast apsorbancije spojeva u ovisnosti o koncentraciji ukazuje da u korištenom koncentracijskom području ne dolazi do intermolekularnih interakcija među molekulama spoja.



Slika 17. UV/Vis spektar spoja CT-A22, ( $c1-c5 = 0,4-2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) (lijevo); linearna ovisnost apsorbancije o koncentraciji vodenih otopina spoja (desno); snimljeni u Na-kakodilatnom puferu ( $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) pri valnim duljinama od 274 i 400 nm

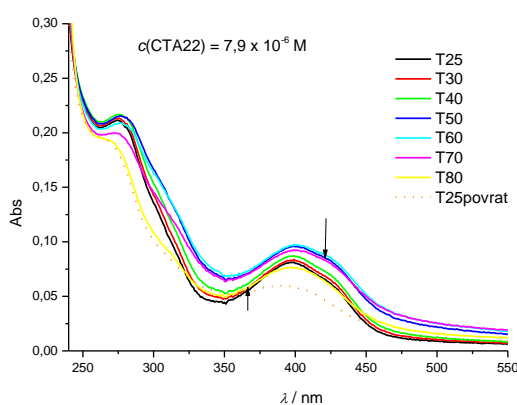
Valne duljine apsorpcijskih maksimuma ispitanih spojeva i njihovi molarni ekstinkcijski koeficijenti dani su u Tablici 3. Svi spojevi imaju približno jednake vrijednosti molarnih ekstinkcijskih koeficijenata na valnim duljinama maksimuma apsorpcije u UV i Vis području spektra, osim spoja CT-A22 čiji je molarni ekstinkcijski koeficijent dvostruko veći.

Tablica 3. Molarni ekstinkcijski koeficijenti spojeva na valnim duljinama maksimuma apsorpcije (Na-kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ ).

	<b>pH = 7</b>	
	$\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$	$\varepsilon / \text{mmol}^{-1} \text{cm}^2$
<b>CT-A19</b>	274	16477
	400	7450
<b>CT-A22</b>	274	32353
	400	12432
<b>CT-A23</b>	274	11422
	400	4352
<b>CT-A24</b>	274	13537
	400	5241

#### 4.1.2. Termička stabilnost vodenih otopina spojeva

Termička stabilnost spojeva ispitana je snimanjem UV/Vis spektara vodenih otopina spojeva ( $c \approx 8 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) zagrijavanjem na temperaturu od 25-80 °C i ponovno hlađenjem na 25 °C. Prilikom zagrijavanja vodene otopine spoja CT-A22 do 60 °C dolazi do povećanja intenziteta apsorpcije, tj. hiperkromog pomaka za oko 15 %. Daljnjim zagrijavanjem od 60 do 80 °C slijedi pad intenziteta, tj. dolazi do hipokromnog efekta od 15 % (Slika 18) koji je uočen i zagrijavanjem vodene otopine spoja CT-A19 (Slika D4) u tom istom temperaturnom intervalu.



Slika 18. Utjecaj povećanja temperature na apsorpciju vodene otopine spoja CT-A22 ( $c = 7,9 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ )

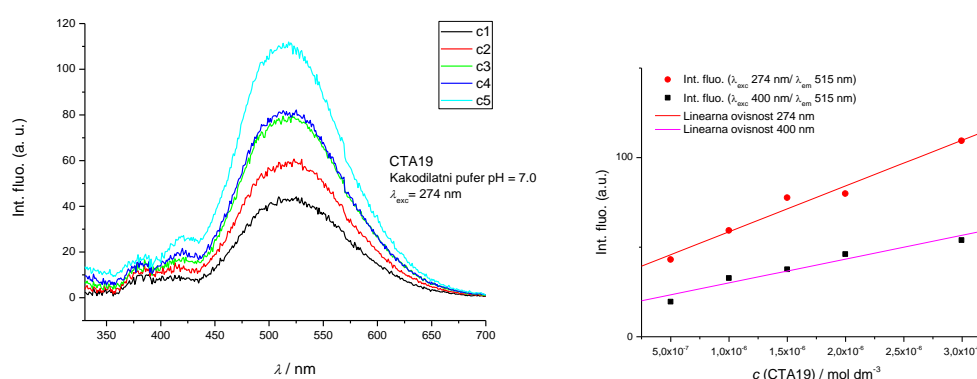


Zagrijavanjem vodenih otopina spoja CT-A23 i CT-A24 intenzitet apsorpcije se nije značajno mijenjao (Slika D4 i D4). Promjene u spektru koje su nastale tijekom zagrijavanja vodenih otopina spojeva, nisu se mijenjale ni nakon hlađenja otopine na 25 °C. Bazna linija je bila znatno veća nakon hlađenja, što se može povezati s taloženjem ili agregacijom molekula.

Osim termičke stabilnosti, ispitana je i ovisnost apsorpcije vodene otopine CT-A19 ( $c = 8 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) o valnoj duljini nakon 24 h. U dobivenom spektru (Slika D5) prikazanom u poglavlju *Dodatak* uočene su male promjene u intenzitetu apsorpcije spoja. Također je ispitana i ovisnost apsorpcije vodene otopine CT-A19 ( $c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) o valnoj duljini nakon dodatka vodene otopine *ctDNA* ( $c = 8,4 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ). U dobivenom spektru (Slika D6) uočen je znatni porast intenziteta apsorpcije tj. došlo je do hiperkromnog efekta nakon dodatka vodene otopine *ctDNA*.

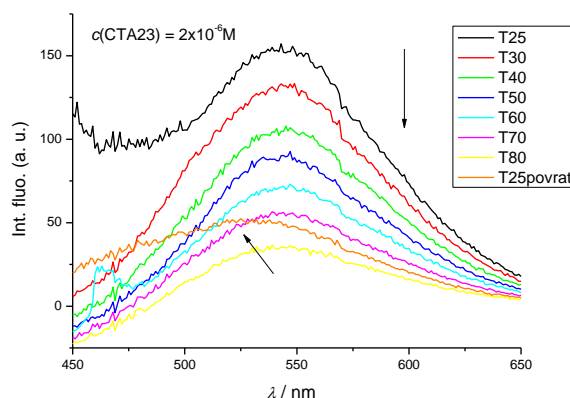
#### 4.1.3. Fluorescencijski spektri

Fluorescencijski emisijski spektri spojeva CT-A19 – CT-A24 snimani su u Na-kakodilatnom puferu ( $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH = 7) na valnim duljinama emisije od 400 do 700 nm. Slika 19 (lijevo) prikazuje spektar ovisnosti emisije spoja CT-A19 o valnoj duljini, za različite koncentracije spoja. Slika 19 (desno) prikazuje spektar linearne ovisnosti emisije spoja CT-A19 o koncentraciji, snimljen na valnim duljinama pobude  $\lambda_{exc} = 274$  i 400 nm. Ovisnost linearno raste do  $c = 3 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ . Fluorescencijski emisijski spektri ostalih spojeva prikazani su na slici D7 u *Dodatku*.



Slika 19. Fluorescencijski spektar CT-A19,  $c_1$ - $c_5 = 0,5$ - $3 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  (lijevo); linearna ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji vodene otopine spoja na valnim duljinama ekscitacije  $\lambda_{exc} = 274 \text{ nm}$  i  $\lambda_{exc} = 400 \text{ nm}$ , te emisije  $\lambda_{em} = 515 \text{ nm}$  (desno), (Na-kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH = 7,0).

Spektar ovisnosti intenziteta fluorescencije o temperaturi spoja CT-A23 (Slika 20) dobiven je zagrijavanjem vodene otopine spoja ( $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u Na-kakodilatnom puferu ( $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7,0$ ) na temperaturu od 25 do 80 °C, te ponovnim hlađenjem na 25 °C na valnoj duljini pobude  $\lambda_{\text{exc}} = 274 \text{ nm}$ . Spektri ostalih spojeva prikazani su u dodatku (Slika D8). Uočeno je da se zagrijavanjem, intenzitet fluorescencije spojeva CT-A19, CT-A23 i CT-A24 smanjuje s povećanjem temperature, dok intenzitet fluorescencije spoja CT-A22 pada zagrijavanjem do 50 °C, nakon čega naglo raste zagrijavanjem do 80 °C. Smanjenje intenziteta fluorescencije praćeno je s batokromnim pomakom maksimuma emisije od 30-50 nm. Ponovnim hlađenjem otopine spoja CT-A23 na 25 °C uočen je hipsokromni pomak maksimuma emisije za 25 nm. Budući da se intenzitet fluorescencije spojeva smanjivao s vremenom, puferirane otopine spojeva pripremljene su 10-20 minuta prije titracije s polinukleotidima i HSA da se osiguraju stabilni spektri spojeva.

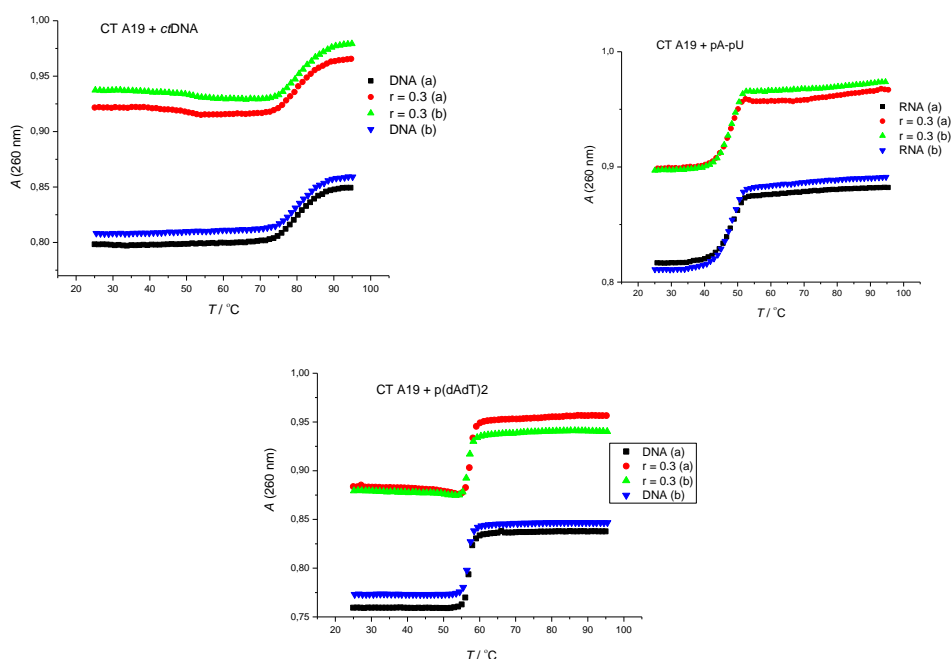


Slika 20. Utjecaj povećanja temperature na intenzitet fluorescencije spojeva CT-A23  
 $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ , (Na-kakodilatni pufer,  $\text{pH} = 7$ ,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).

## 4.2. Interakcija spojeva CT-A19, CT-A22, CT-A23 i CT-A24 s jednolančanim i dvolančanim DNA i RNA polinukleotidima, te albuminom iz humanog seruma

### 4.2.1. Promjena temperature mekšanja

Temperatura mekšanja je temperatura pri kojoj dolazi do razmatanja dvostruke uzvojnice polinukleotida, pri čemu je polovica dvostruke uzvojnice sačuvana, dok je polovica razmotana. Vežanje molekula uzrokuje stabilizaciju ili destabilizaciju dvostruke uzvojnice što se očituje u promjeni temperature mekšanja. Snimanjem UV/Vis spektara u aplikaciji *Thermal* ispitano je kakav utjecaj imaju spojevi CT-A19, CT-A22, CT-A23 i CT-A24 na termičku stabilnost dvolančanih polinukleotida: *ctDNA* (DNA izolirana iz prsne žlijezde teleta), poli rA-poli rU (dvolančani homopolinukleotid adeninske i uracilne ribonukleinske kiseline) i poli dAdT- poli dAdT (dvolančani alternirajući polinukleotid adeninske i timinske deoksiribonukleinske kiseline). Slika 21 prikazuje krivulje taljenja polinukleotida *ctDNA*, poli rA-poli rU i poli dAdT-poli dAdT u interakciji sa spojem CT-A19. Krivulje taljenja navedenih polinukleotida s ostalim spojevima prikazane su u poglavlju *Dodatak* na Slikama D9-D11.



Slika 21. Krivulje taljenja polinukleotida *ctDNA* (lijevo), poli rA-poli rU (desno) i poli dAdT-poli dAdT (dolje) u interakciji s CT-A19,  $c(\text{RNA}) = 1,5-1,7 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  i  $c(\text{DNA}) = 1,8-2,3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  pri omjeru  $r = 0,3$ ;  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  u Na-kakodilatnom puferu (pH = 7,0),  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ .

Zagrijavanjem vodenih otopina spojeva na valnoj duljini od 260 nm, UV spektri spojeva se nisu bitno promijenili. Temperatura mekšanja određena je iz maksimuma prve derivacijske krivulje mekšanja polinukleotida, a vrijednosti promjene temperature mekšanja ( $\Delta T_m$ ) su navedene u Tablici 4.

Tablica 4. Vrijednosti  $\Delta T_m$  (°C)<sup>a</sup> ispitivanih dvolančanih polinukleotida nakon dodavanja CT- A19, CT-A22, CT-A23, CT-A24 (omjer  $r = 0,3$ )<sup>b</sup> pri pH = 7,0 (pufer Na-kakodilat,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).

$\Delta T_m / ^\circ\text{C}$			
SPOJ	ctDNA	poli dAdT-polii dAdT	poli rA-polii rU
CT-A19	+0,8	+0,4	0
CT-A22	+0,2	+0,15	-0,1
CT-A23	+0,5	0	-0,2
CT-A24	+0,2	-0,2	-0,2

<sup>a</sup> Pogreška mjerenja  $\Delta T_m \pm 0,5 ^\circ\text{C}$

<sup>b</sup>  $r = (\text{koncentracija ispitivanog spoja}) / (\text{koncentracija polinukleotida})$

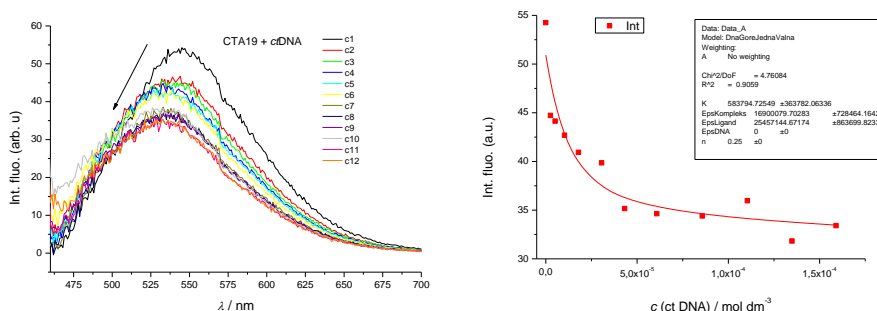
Promjena temperature mekšanja ( $\Delta T_m$ ) je dobivena oduzimanjem srednje vrijednosti  $T_m$  kompleksa od srednje vrijednosti  $T_m$  određene za čiste polinukleotide. Iz tablice se vidi da su promjene ( $\Delta T_m$ ) jako male, što znači da vezanje spojeva nema značajan utjecaj na stabilnost dvostruke uzvojnice DNA/RNA.

#### 4.2.2. Fluorimetrijske titracije

Afinitet ispitivanih spojeva prema ctDNA (DNA izolirana iz prsne žlijezde teleta), poli rA- poli rU (dvolančani homopolinukleotid adeninske i uracilne ribonukleinske kiseline) i HSA (albumin iz humanog seruma) određen je pomoću fluorimetrijske titracije. Na temelju dobivenih rezultata, pomoću Scatchardove jednadžbe<sup>5</sup> izračunate su konstante stabilnosti kompleksa,  $K_s$  i omjer  $n$  (koncentracija vezanog spoja / koncentracija polinukleotida ili proteina). Budući da se intenzitet fluorescencije spojeva smanjivao s vremenom, puferirane otopine spojeva pripremljene su 10-20 minuta prije titracije s polinukleotidima i HSA da se osiguraju stabilni spektri spojeva. Za potrebe fluorimetrijskih titracija, spojevi su pobuđivani na UV-Vis maksimumu  $\lambda = 400 \text{ nm}$ , jer na toj valnoj duljini niti polinukleotidi niti HSA ne apsorbiraju, te se na taj način izbjegava smanjenje fluorescentne emisije spoja uslijed apsorpcije

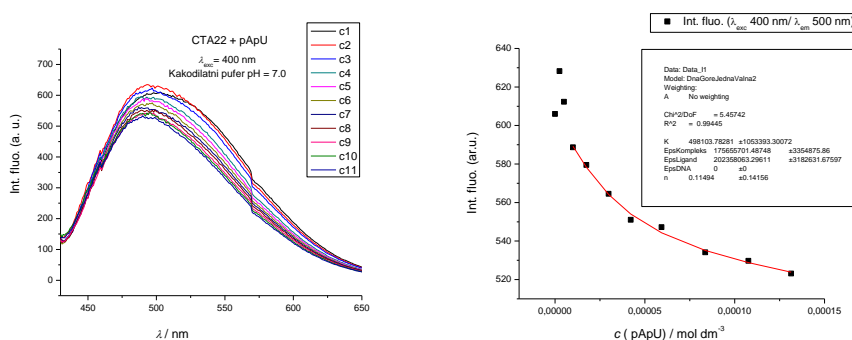
zračenja od strane makromolekule. Na taj se način sve promjene fluorescentnih spektara mogu pripisati nastanku kompleksa i makromolekule.

Na temelju dobivenih spektara može se uočiti da prilikom titracije ispitanih spojeva s polinukleotidom *ctDNA* dolazi do smanjenja intenziteta fluorescencije spojeva CTA-19 (Slika 22) i CT-A23 (Slika D12b) u kombinaciji sa značajnim hipsokromnim pomakom maksimuma emisije (5-70 nm), dok kod titracije otopine spojeva CT-A22 i CT-A24 ne dolazi do značajnijih promjena u intenzitetu fluorescencije (Slika D12a i D12c).



Slika 22. Fluorimetrijska titracija CT-A19,  $\lambda_{exc} = 400 \text{ nm}$ ,  $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  s *ctDNA* (lijevo); eksperimentalni (●) i izračunati (-) intenziteti fluorescencije CTA-19 pri  $\lambda_{em} = 545 \text{ nm}$  nakon dodatka *ctDNA* (desno) (pH = 7,0, Na-kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )

Slika 23 prikazuje spektar ovisnosti intenziteta fluorescencije spoja CT-A22 o valnoj duljini emisije tijekom titracije s polinukleotidom poli rA-poli rU. Uočeno je da dolazi do smanjenja odnosno gašenja intenziteta fluorescencije.



Slika 23. Fluorimetrijska titracija CT-A22,  $\lambda_{exc} = 400 \text{ nm}$ ,  $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  s poli rA-poli rU (lijevo); eksperimentalni (●) i izračunati (-) intenziteti fluorescencije CT-A22 pri  $\lambda_{em} = 500 \text{ nm}$  nakon dodatka poli rA-poli rU (desno) (pH = 7,0, Na-kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )

U slučaju titracije spoja CT-A19 s poli rA-poli rU dolazi do malog porasta intenziteta zračenja (Slika D13a), kao i kod titracije spoja CT-A23 (Slika D13b), koji je praćen sa hipsokromnim pomakom maksimuma emisije, dok kod titracije spoja CT-A24 nisu uočene promjene u spektru (Slika D13c). U Tablici 5. prikazane su izračunate vrijednosti konstante stabilnosti nastalih kompleksa,  $K_s$  za različite vrijednosti  $n$ .

Tablica 5. Konstante stabilnosti ( $\log K_s$ )<sup>a</sup>,  $n$ <sup>b</sup> vrijednosti i spektroskopska svojstva kompleksa,  $\Delta I^c$  CT-A spojeva s ds-polinukleotidima izračunate prema fluorimetrijskim titracijama (pH = 7,0, Na-kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{exc} = 400 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 430-650 \text{ nm}$ ,  $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ).

	$\log K_s^a / n^b / \Delta I^c$			
	CT-A19	CT-A22	CT-A23	CT-A24
ctDNA	5,7 / 0,25 / -33 %	d	6,3 / 0,5 / -27 %	d
poli rA-poli rU	d	5,7 / 0,11 / -13 %	6,3 / 0,4 / -24 %	d

<sup>a</sup> Konstante stabilnosti dobivene pomoću Scatchardove jednadžbe<sup>5</sup> nakon fluorimetrijske titracije; koeficijenti korelacije bili su  $> 0,9$  za sve izračunane  $K_s$ .

<sup>b</sup> Vrijednosti omjera  $n = [\text{vezani spojevi}] / [\text{polinukleotid}]$ .

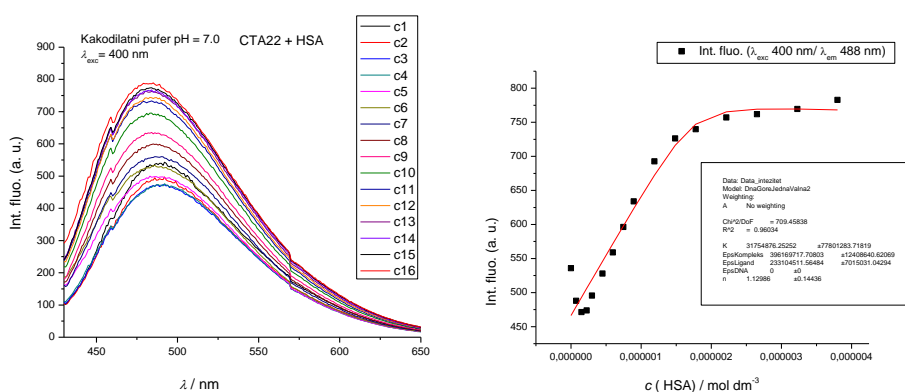
<sup>c</sup> Promjene u fluorescenciji spoja CT-A inducirane nastajanjem kompleksa ( $\Delta I = (I_{lim} - I_0) \times 100 / I_0$ ; gdje je  $I_0$  izračunat intenzitet emisije slobodnog spoja, a  $I_{lim}$  je intenzitet emisije kompleksa izračunat obradom podataka nakon titracije pomoću Scatchardove jednadžbe.<sup>5</sup>

<sup>d</sup> mala/linearna promjena fluorescencije/bez promjene fluorescencije/velika odstupanja intenziteta fluorescencije onemogućuju izračun konstante stabilnosti

Vežanje spojeva CT-A na polinukleotide dovodi do malih promjena fluorimetrijskih spektara ispitivanih spojeva. Iz izračunatih vrijednosti  $K_s$  i omjera  $n$ , može se reći da se spojevi vežu malim afinitetom (manjim od mikromolarnog).

Kod titracije spojeva s otopinom proteina HSA dolazi do povećanja u intenzitetu fluorescencije (Slika 24). Osim porasta intenziteta zračenja, uočen je batokromni pomak maksimuma emisije kod titracije spoja CT-A19 (Slika D14a) i hipsokromni pomak maksimuma emisije (5-20 nm) kod titracije spoja CT-A23 (Slika D14b). Dobiveni spektri ostalih spojeva prikazani su u *Dodatku* na slici D14. Konstante stabilnosti,  $K_s$  kompleksa nastalih interakcijom spojeva CT-A i HSA, te vrijednosti omjera  $n = [\text{vezani spojevi}] / [\text{protein}]$  dane su u Tablici 6. Na temelju dobivenih rezultata može se reći da se spojevi vežu većim afinitetom na protein

HSA, nego na polinukleotide, te vezanje spojeva na protein dovodi do značajnog porasta fluorescentne emisije.



Slika 24. Fluorimetrijska titracija CT-A22,  $\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$ ,  $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  s HSA (lijevo); eksperimentalni (●) i izračunati (-) intenziteti fluorescencije CT-A22 pri  $\lambda_{\text{em}} = 488 \text{ nm}$  nakon dodatka HSA (desno) (pH = 7,0, Na-kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )

Tablica 6. Konstante stabilnosti ( $\log K_s$ )<sup>a</sup>,  $n^b$  vrijednosti i spektroskopska svojstva kompleksa,  $\Delta I^c$  spojeva s proteinom HSA izračunate prema fluorimetrijskim titracijama (pH = 7,0, Na- kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 430\text{-}650 \text{ nm}$ ,  $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ).

	$\log K_s^a / n^b / \Delta I^c$			
	CT-A19	CT-A22	CT-A23	CT-A24
HSA	6,13 / 6 / 56 %	7,5 / 1,13 / 70 %	4,8 / 7,5 / > 387 %	5,8 / 15,6 / > 110 %

<sup>a</sup> Konstante stabilnosti dobivene pomoću Scatchardove jednadžbe<sup>5</sup> nakon fluorimetrijske titracije; koeficijenti korelacije bili su  $> 0,9$  za sve izračunane  $K_s$ .

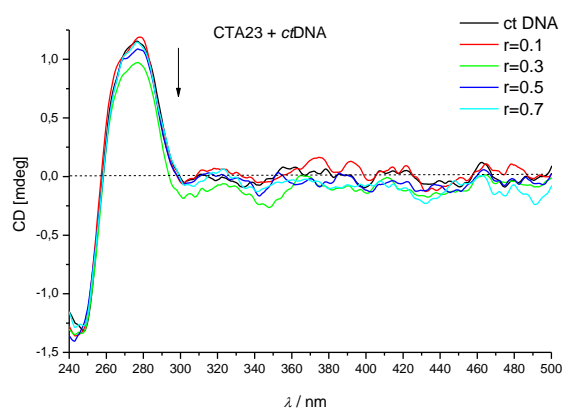
<sup>b</sup> Vrijednosti omjera  $n = [\text{vezani spojevi}] / [\text{protein}]$ .

<sup>c</sup> Promjene u fluorescenciji spoja CT-A inducirane nastajanjem kompleksa ( $\Delta I = (I_{\text{lim}} - I_0) \times 100 / I_0$ ; gdje je  $I_0$  izračunat intenzitet emisije slobodnog spoja, a  $I_{\text{lim}}$  je intenzitet emisije kompleksa izračunat obradom podataka nakon titracije pomoću Scatchardove jednadžbe.<sup>5</sup>

<sup>d</sup> mala/linearna promjena fluorescencije/bez promjene fluorescencije/velika odstupanja intenziteta fluorescencije onemogućuju izračun konstante stabilnosti

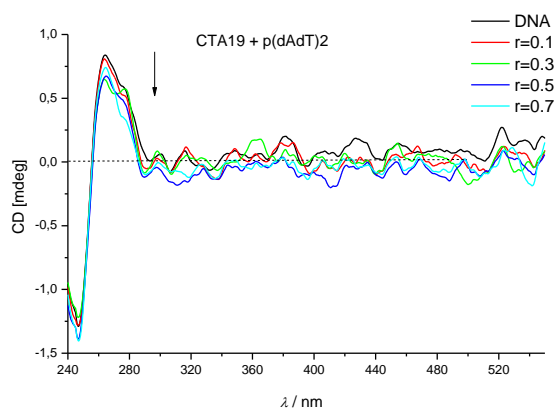
#### 4.2.3. Cirkularni dikroizam

Cirkularni dikroizam je korišten da bi se istražile konformacijske promjene sekundarne strukture polinukleotida nastale vezanjem male molekule na polinukleotid. Spojevi CT-A19 - CT-A24 su akiralni i prema tome nemaju intrinzični CD spektar. Cirkularnim dikroizmom dobiva se spektar polinukleotida koji ima helikoidalnu kiralnost. Dodatkom ispitivanog spoja može doći do promjene u spektru polinukleotida, te se može javiti inducirani CD signal u području apsorpcije spoja uslijed jednoznačnog vezanja spoja u odnosu na kiralnu os polinukleotida. Cirkularnim dikroizmom ispitan je utjecaj spojeva CT-A19–CT-A24 na promjenu sekundarne strukture *ctDNA* (DNA izolirana iz prsne žlijezde teleta), poli rA-poli rU (dvolančani homopolinukleotid adeninske i uracilne ribonukleinske kiseline), poli dAdT- poli dAdT (dvolančani alternirajući polinukleotid adeninske i timinske deoksiribonukleinske kiseline), poli rA (jednolančani homopolinukleotid adeninske kiseline) i poli dGdC-poli dGdC (dvolančani alternirajući polinukleotid gvaninske i citozinske deoksiribonukleinske kiseline). Interakcijom spojeva CT-A23 s *ctDNA*, CT-A19 s poli dAdT- poli dAdT, te CT-A22 i CT-A24 s poli dGdC-poli dGdC, dolazi do malih promjena u CD spektru (Slika 25-27), dok kod ostalih nema promjena (Slika D15-D18), što znači da navedeni spojevi ne utječu značajno na promjenu sekundarne strukture polinukleotida i/ili da se na polinukleotide vežu slabim intenzitetom. U slučaju titracije poli dGdC-poli dGdC s CTA-22 i CT-A24 uočen je slabi negativni inducirani CD signal, koji bi mogao ukazivati na djelomično interkaliranje ispitivanih spojeva između parova baza. Može se pretpostaviti da je vezanje na polinukleotide u većini slučajeva otežano zbog steričkih smetnji samih molekula.

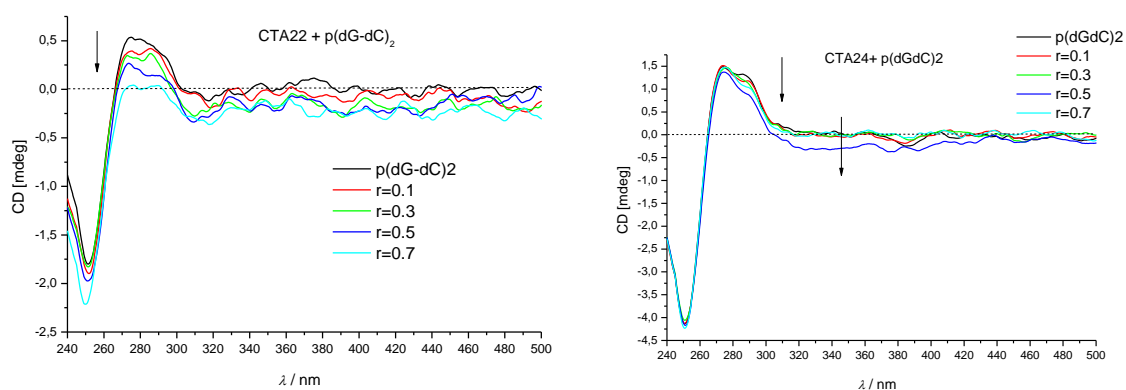


Slika 25. Promjene u CD spektru *ctDNA* ( $c(\text{DNA}) = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) dodatkom spoja CT-A23 pri različitim molarnim omjerima  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$ , pH = 7,0, Na-kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$





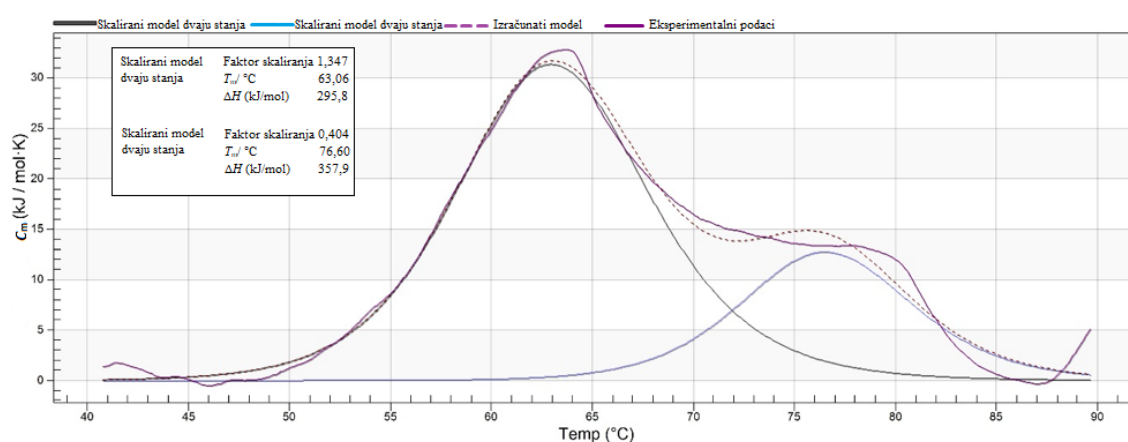
Slika 26. Promjene u CD spektru poli dAdT-poli dAdT ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) dodatkom spoja CT-A19 u različitim molarnim omjerima  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$ ,  $\text{pH} = 7,0$ , Na-kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



Slika 27. Promjene u CD spektru poli dGdC-poli dGdC ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) dodatkom spoja CT-A22 (lijevo) i CT-A24 (desno) u različitim molarnim omjerima  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$ ,  $\text{pH} = 7,0$ , Na-kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$

#### 4.2.4. Proučavanje utjecaja spojeva CT-A19 – CT-A24 na denaturaciju albumina iz humanog seruma diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom

Vežanje spoja na protein uzrokuje promjene strukture proteina. Osim toga, za nastanak kompleksa važni su entalpijski i entropijski doprinosi koji određuju Gibbsovu energiju interakcije.<sup>29</sup> Diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom (DSC) ispitan je utjecaj spojeva CT- A19, CT-A22, CT-A23 i CT-A24 na toplinsku stabilnost i denaturaciju HSA ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ). Na Slici 28 prikazana je ovisnost molarnog toplinskog kapaciteta o promjeni temperature za albumin iz humanog seruma (HSA) dobivena analizom podataka DSC u programu NanoAnalyze.



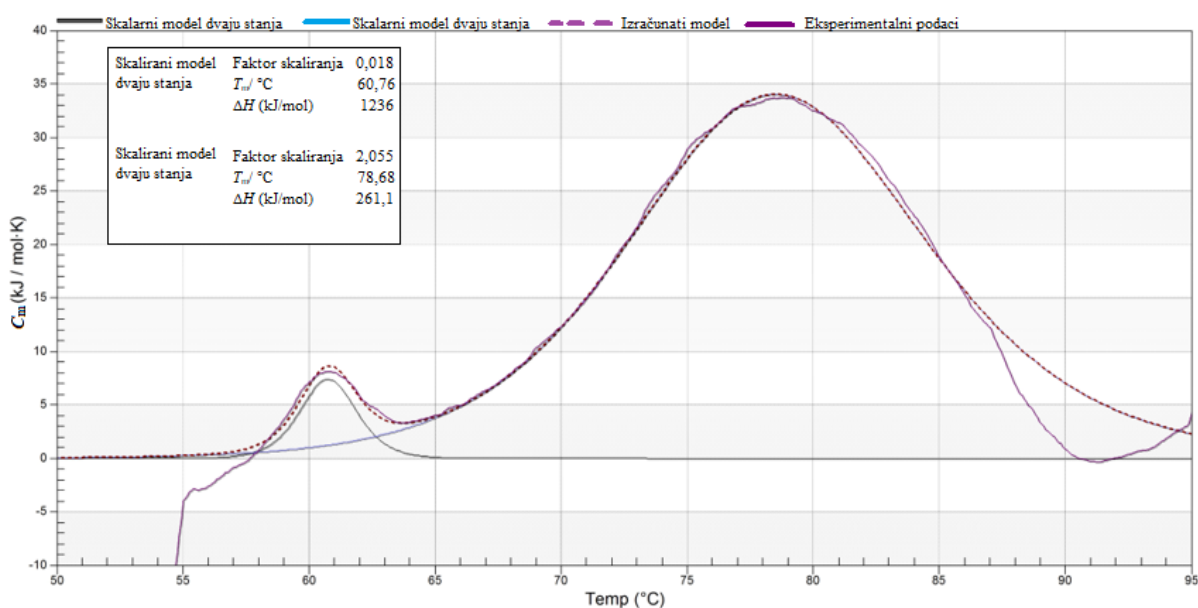
Slika 28. Denuracijska krivulja HSA ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) dobivena DSC analizom u Na-kakodilatnom puferu pH = 7,0,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$

Dovođenjem topline otopini albumina dolazi do endotermnih procesa u samom proteinu. Protein HSA pokazuje dva široka endotermna prijelaza koja odgovaraju promjeni sekundarne strukture albumina, odnosno prvoj i drugoj temperaturi denaturacije. U Tablici 7 prikazani su temperaturni prijelazi za denaturaciju samog proteina HSA i denaturaciju kompleksa HSA- CT- A. Općenito, dodatak spojeva CT-A uzrokovao je malu negativnu promjenu prvog i drugog temperaturnog prijelaza, odnosno malu pozitivnu promjenu drugog prijelaza u slučaju spojeva CT-A22 i CT-A23. Iz temperaturnih razlika drugih prijelaza se može reći da vežanje spoja CT-A22 najviše pridonosi stabilnosti proteina HSA povećavajući temperaturu prijelaza između native i denaturirane strukture (Slika 29). Utjecaj ispitivanih spojeva na termičku stabilnost sekundarne strukture proteina nije velik, iako se ispitivani spojevi, prema rezultatima

fluorimetrijskih titracija vežu visokim afinitetom. Denaturacijske krivulje vodene otopine HSA u interakciji s ostalim spojevima prikazane su u Dodatku na slici D19-D21.

Tablica 7. Promjene temperature prijelaza između native i denaturacijske strukture proteina HSA ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u reakciji sa spojevima CT-A ( $c = 1,2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) dobivene DSC analizom u Na-kakodilatnom puferu  $\text{pH} = 7,0$ ,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$

	$T_{m1} / ^\circ\text{C}$	$\Delta T_{m1} / ^\circ\text{C}$	$T_{m2} / ^\circ\text{C}$	$\Delta T_{m2} / ^\circ\text{C}$
HSA	63,06		76,60	
HSA + CT-A19	61,45	-1,61	75,65	-0,95
HSA + CT-A22	60,76	-2,30	78,68	+2,08
HSA + CT-A23	60,33	-2,73	77,26	+0,66
HSA + CT-A24	61,23	-1,83	75,35	-1,25



Slika 29. Denaturacijska krivulja HSA ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) i spoja CT-A22 ( $c = 1,2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) dobivena DSC analizom u Na-kakodilatnom puferu  $\text{pH} = 7,0$ ,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$

## § 5. ZAKLJUČAK

U sklopu ovog diplomskog rada spektroskopski su okarakterizirani novi benzoksantenski spojevi CT-A19, CT-A22, CT-A23 i CT-A24. UV-Vis spektroskopijom, fluorescencijskom spektroskopijom, spektroskopijom cirkularnog dikroizma i diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom istraženo je vezanje benzoksantenskih spojeva na DNA i RNA polinukleotide i na albumin iz humanog seruma.

Iz malih promjena temperature mekšanja,  $\Delta T_m$ , može se reći da spojevi imaju mali utjecaj na stabilnost dvolančane uzvojnice polinukleotida. Dodatak polinukleotida otopinama spojeva CT-A nije značajno mijenjao fluorescencijske spektre ispitivanih spojeva. Titracijom spoja CT-A24 s polinukleotidima nije došlo ni do kakvih promjena u spektru, dok je kod ostalih spojeva došlo do povećanja intenziteta fluorescencije tijekom titracije s poli rA-poli rU, a pada tijekom titracije s ctDNA. Male promjene fluorescencije u titracijama onemogućile su određivanje konstante stabilnosti i okupiranosti veznih mjesta. U titracijama u kojima se mogao izračunati afinitet vezanja, dobivene su konstante stabilnosti koje iznose  $\log K_s = 5-6$ .

Male promjene u CD spektrima polinukleotida pokazale su da interakcijom spojeva s jednolančanim i dvolančanim polinukleotidima ne dolazi do značajnih promjena u sekundarnoj strukturi polinukleotida. Budući da ispitani spojevi sadrže aromatske skupine moguće je njihovo interkaliranje u polinukleotide. S obzirom na male promjene CD spektara interkaliranje se ne može sa sigurnošću potvrditi. U slučaju vezanja spojeva CT-A22 i CT-A24 na poli dGdC- poli dGdC mali negativni inducirani CD signal ukazuje na interkaliranje navedenih benzoksantenskih spojeva između parova baza.

Za razliku od fluorimetrijskih titracija s polinukleotidima, intenzitet fluorescencije spojeva tijekom titracije s albuminom iz humanog seruma (HSA) se značajno povećavao. Na temelju dobivenih rezultata pokazano je da se spojevi vežu većim afinitetom na protein HSA, nego na polinukleotide, te da se vezanje spojeva na HSA signalizira velikim porastom intenziteta fluorescencije. Povećani afinitet spojeva za protein u odnosu na polinukleotide može se objasniti neutralnošću ispitivanih molekula, te pogodnim steričkim uklapanjem molekule u strukturu proteina i stvaranjem velikog broja Van der Waalsovih interakcija što bi se u budućim istraživanjima moglo dodatno potvrditi molekulskim modeliranjem.

Diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom pokazano je da spojevi utječu na termostabilnost proteina HSA, pri čemu spoj CT-A22 povećava njegovu stabilnost, što je uočeno na temelju razlike temperature prijelaza.

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (prema potrebi)

*A* - apsorbancija

*c* - množinska koncentracija

CD - cirkularni dikroizam

*ctDNA* -  *calf timus* deoskiribonukleinska kiselina

DMSO - dimetil-sulfoksid

DNA - deoksiribonukleinska kiselina

DSC - diferencijalna pretražna kalorimetrija

$\epsilon$  - molarni ekstinkcijski koeficijent

$\Delta H_{cal}$  - kalorimetrijska entalpija prijelaza

HSA - albumin iz ljudskog seruma

*I* - intenzitet

IC - unutrašnja pretvorba

ICD - inducirani cirkularni dikroizam

ISC - međusustavno križanje

ITC - izotermna titracijska kalorimetrija

$K_s$  - konstanta stabilnosti kompleksa

L-CP - cirkularna polarizirana svjetlost

LD - linearni dikroizam

poli rA - jednolančani homopolinukleotid adeninske kiseline

poli rA-polu rU - dvolančani homopolinukleotid adeninske i uracilne kiseline

PCBL - benzoksantenski lignan fenetil kafeat

poli dAdT-polu dAd - dvolančani alternirajući polinukleotid adeninske i timinske kiseline

poli dGdC-polu dGdC - dvolančani alternirajući polinukleotid gvaninske i citozinske kiseline

R-CP - desna cirkularna polarizirana svjetlost

RNA - ribonukleinska kiselina

UV/Vis - ultraljubičasta i vidljiva spektroskopija

*T* - transmitancija

$T_m$  - temperatura mekšanja

$\Delta T_m$  - promjena temperature mekšanja

X-zrake - rentgenske zrake

$\Phi$  - kvantno iskorištenje

$\theta$  - stupanj eliptičnosti

$\lambda$  - valna duljina

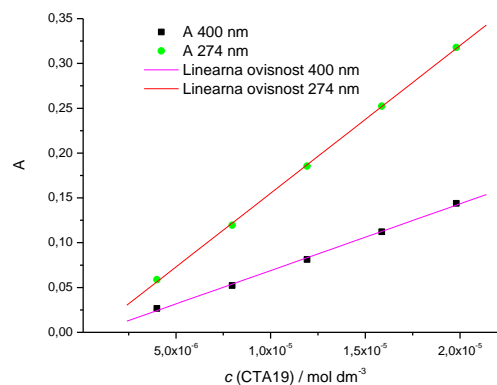
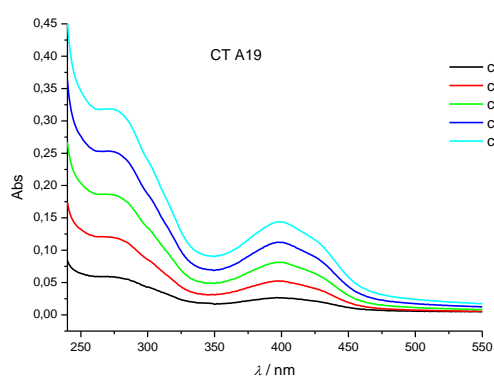
## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. S. Di Micco, F. Mazue, C. Daquino, C. Spatafora, D. Delmas, N. Latruffe, C. Tringali, R. Riccio, G. Bifulco, *Org. Biomol. Chem.* **9** (2011) 701–710.
2. S. Chiang, J. Welch, F. J. Rauscher, T. A. Beerman, *Biochem.* **33** (1994) 7033–7040.
3. M. Demeunynck, C. Bailly, W. D. Wilson, *DNA and RNA binders*, Wiley-VCH, Weinheim, 2003, str. 146–267.
4. I. Piantanida, *Kem. Ind.* **52** (2003) 545–552.
5. G. Scatchard, *Ann. NY Acad. Sci.* **51** (1949) 660–672.
6. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013, str. 107–112, 784–787.
7. <https://edutorij.e-skole.hr/share/proxy/alfresco-noauth/edutorij/api/proxy-guest/b657b5d5-0970-476c-a890-83df2e8bb8a5/biologija-1/m02/j04/index.html> (datum pristupa 12. prosinca 2019.)
8. M. Radić-Stojković, *Interakcije ekstraktata i/ili spojeva s nukleinskim kiselinama*, predavanje, 2018.
9. M. Fasano, S. Curry, E. Terreno, M. Galliano, G. Fanali, P. Narciso, S. Notari, P. Ascenzi, *IUBMB Life.* **57** (2005) 787–796.
10. H. Rimac, M. Bojić, *Acta Pharm.* **73** (2017) 793–808.
11. C. Spatafora, V. Barresi, V.M. Bhusainahalli, S. Di Micco, N. Musso, R. Riccio, G. Bifulco, D. Condorelli, C. Tringali, *Org. Biomol. Chem.* **12** (2014). 2686–2701.
12. <https://www.semanticscholar.org/paper/Phenethyl-cafeate-benzoxanthene-lignan-is-a-of-in-Vijayakurup-Spatafora/de4076429781ad12967faab086de5ab65db1c9cc/figure/0> (datum pristupa 12. prosinca 2019.)
13. [https://www.fkit.unizg.hr/\\_download/repository/Nastavni\\_tekst\\_Molekulska\\_spektroskopija.pdf](https://www.fkit.unizg.hr/_download/repository/Nastavni_tekst_Molekulska_spektroskopija.pdf) (datum pristupa 13. listopada 2019.)
14. *Propis UV/Vis apsorpcijska spektroskopija za Viši praktikum analitičke kemije*, Zagreb, 2017, str. 10–13.
15. *Interna skripta za praktikum iz biokemije*, Zagreb, 2016, str. 41–43.

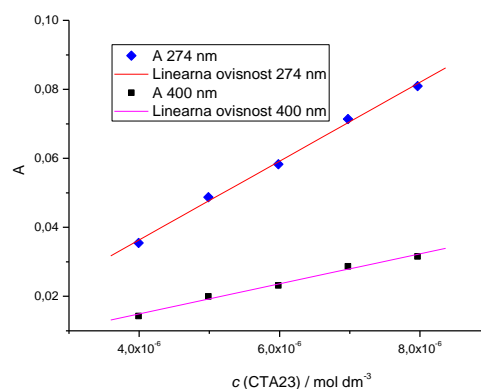
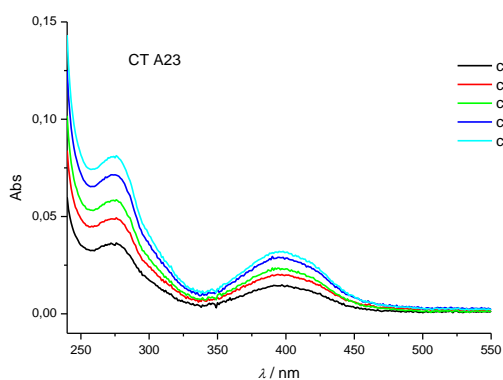


16. [https://www.google.com/search?biw=1366&bih=625&tbm=isch&sxsrf=ACYBGNTAQ\\_jCriZWWR0o3vkXilWlW6vPw%3A1576263748933&sa=1&ei=RODzXaGxONL8kwW\\_8Kv4Bg&q=hypochromic+and+hyperchromic+effect&oq=hyperchromic+and+effect&gs\\_l=img.1.0.0i8i30.52014.52767..55120...0.0..0.276.1012.0j3j2.....0....1..gwszimg.....35i39j0i19j0i5i30i19j0i8i7i30.Mv3y3FeLYPc#imgrc=2YBbgMrF0i2b6M](https://www.google.com/search?biw=1366&bih=625&tbm=isch&sxsrf=ACYBGNTAQ_jCriZWWR0o3vkXilWlW6vPw%3A1576263748933&sa=1&ei=RODzXaGxONL8kwW_8Kv4Bg&q=hypochromic+and+hyperchromic+effect&oq=hyperchromic+and+effect&gs_l=img.1.0.0i8i30.52014.52767..55120...0.0..0.276.1012.0j3j2.....0....1..gwszimg.....35i39j0i19j0i5i30i19j0i8i7i30.Mv3y3FeLYPc#imgrc=2YBbgMrF0i2b6M) : (datum pristupa 12. prosinca 2019.)
17. M. Jean-Louis, L. Lacroix, *Oligonucleotides*. **13** (2003) 515–537.
18. S. Rončević, *Fluorescencijska spektroskopija*, predavanja iz kolegija Instrumentna analitika 1, 2017.
19. [https://www.shsu.edu/chm\\_tgc/chemilumdir/JABLONSKI.html](https://www.shsu.edu/chm_tgc/chemilumdir/JABLONSKI.html) (datum pristupa 12. prosinca 2019.)
20. <https://www.sciencedirect.com/topics/engineering/stokes-shift> (datum pristupa 12. prosinca 2019.)
21. P. Novak, *Molekulska spektroskopija*, predavanja iz kolegija Analitička kemija 2, 2013.
22. D. H. A. Corrêa, C.H. I. Ramos, *Afr. J. Biochem. Res.* **13** (2009) 164–173.
23. T. Šmidlehner, I. Piantanida, G. Pescitelli, *Beilstein J. Org. Chem.* **14** (2018) 84–105.
24. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\\_Textbook\\_Maps/Supplemental\\_Modules\\_\(Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\)/Spectroscopy/Electronic\\_Spectroscopy/Circular\\_Dichroism](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Circular_Dichroism) (datum pristupa 8. prosinca 2019.)
25. I. Haq, B. Z. Chowdhry, T.C. Jenkins, *Methods in enzymology*, Vol. 340, Elsevier, 2001, str. 109–149.
26. Ž. Soldin, *Termička analiza*, predavanja iz kolegija Instrumentne metode izučavanja tvari u čvrstom stanju, 2018.
27. L. J. Bresloff, D. M. Crothers, *Biochem.* **20** (1981) 3547–3553.
28. T.V. Chalikian, J. Völker, G. E. Plum, K.J. Breslauer, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96** (1999) 7853–7858.
29. J. L. Lahti, G. W. Tang, E. Capriotti, T. Liu, R. B. Altman, *J. R. Soc. Interface.* **9** (2012) 1409–1437.

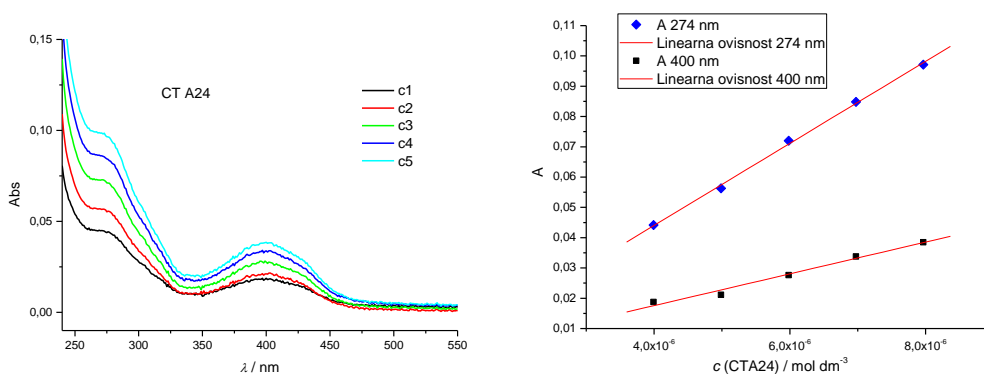
## § 8. DODATAK



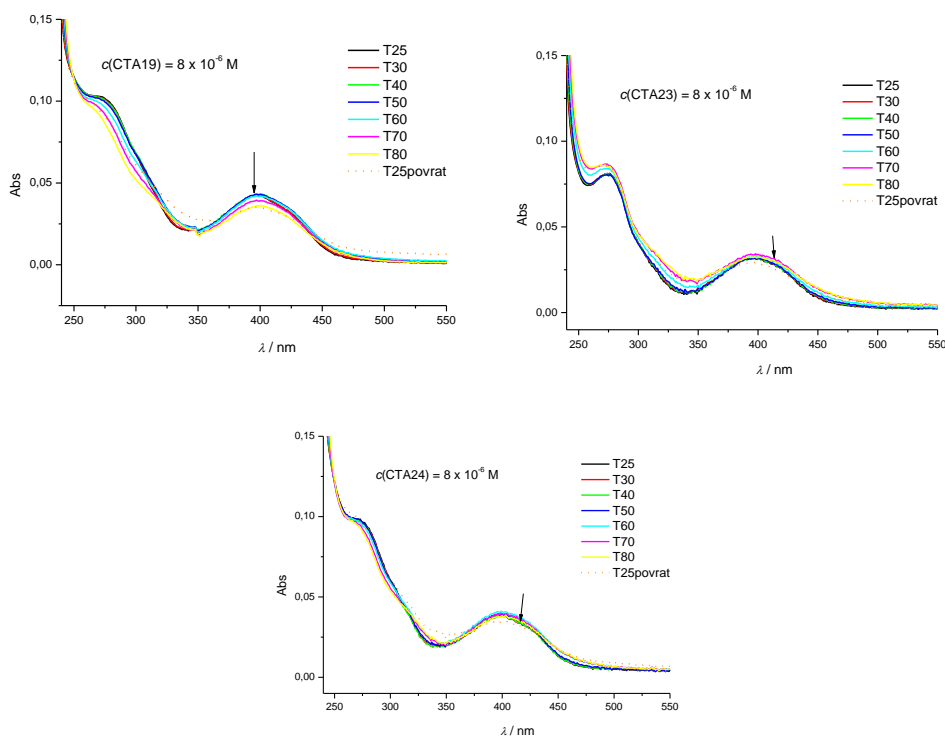
D1. UV/Vis spektar spoja CT-A19 ( $c_1-c_5 = 0,4-2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) (lijevo); linearna ovisnost apsorbancije o koncentraciji vodenih otopina spoja (desno); snimljeni u Na-kakodilatnom puferu ( $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) na valnim duljinama od 274 i 400 nm



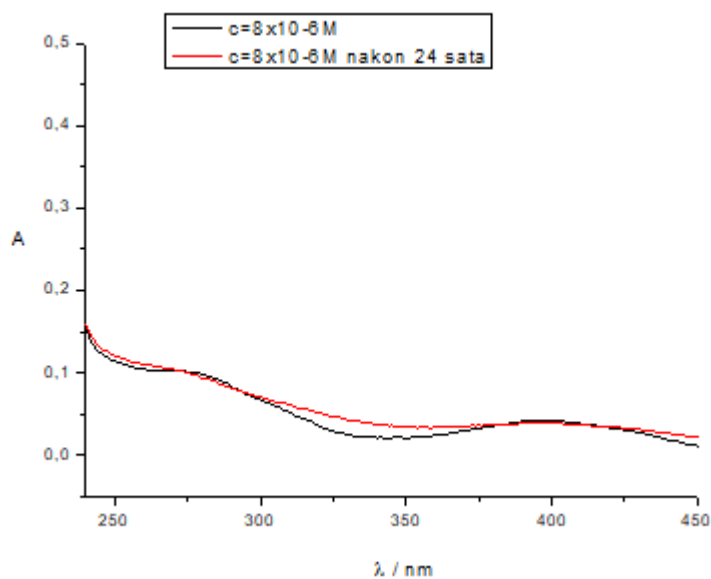
D2. UV/Vis spektar spoja CT-A23 ( $c_1-c_5 = 0,4-2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) (lijevo); linearna ovisnost apsorbancije o koncentraciji vodenih otopina spoja (desno); snimljeni u Na-kakodilatnom puferu ( $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) na valnim duljinama od 274 i 400 nm



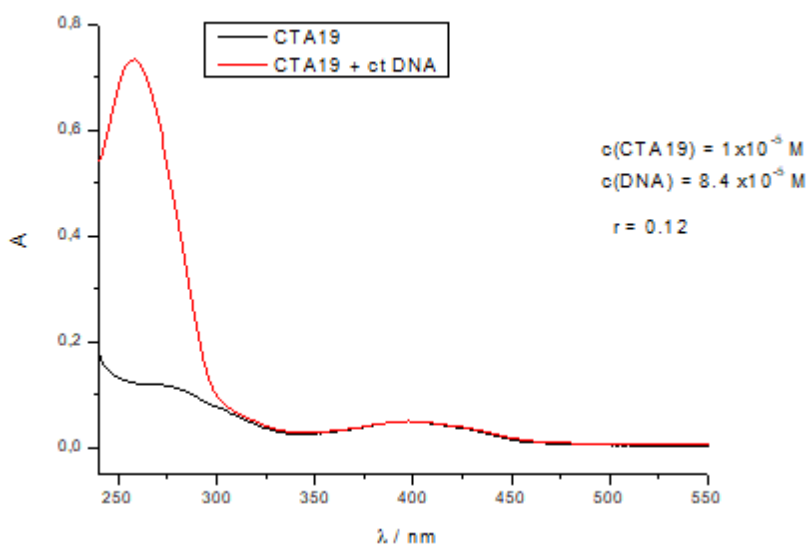
D3. UV/Vis spektar spoja CT-A24 ( $c_1$ - $c_5 = 0,4$ - $2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) (lijevo); linearna ovisnost apsorbancije o koncentraciji vodenih otopina spoja (desno); snimljeni u Na-kakodilatnom puferu ( $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) na valnim duljinama od 274 i 400 nm



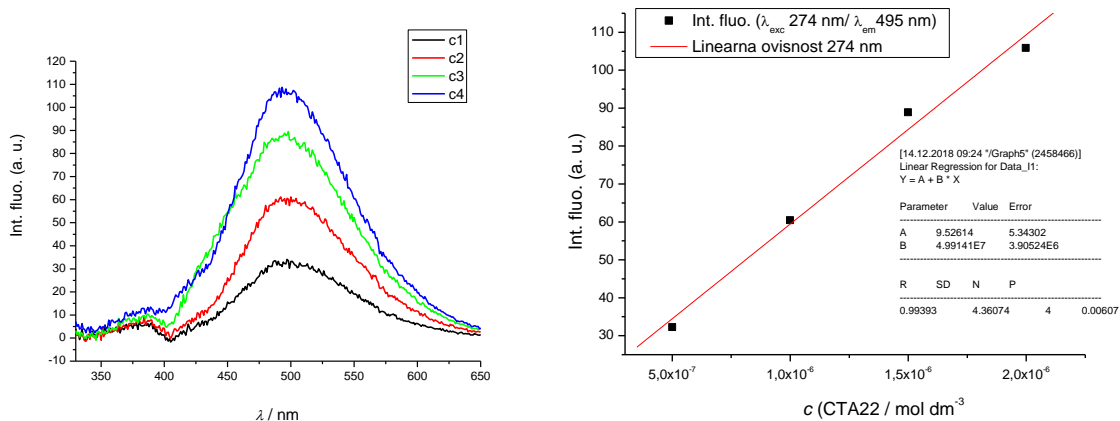
D4. Utjecaj povećanja temperature na apsorpciju vodene otopine spoja CT-A19 (lijevo), CT-A23 (desno) i CT-A24(dolje); ( $c = 8 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ )



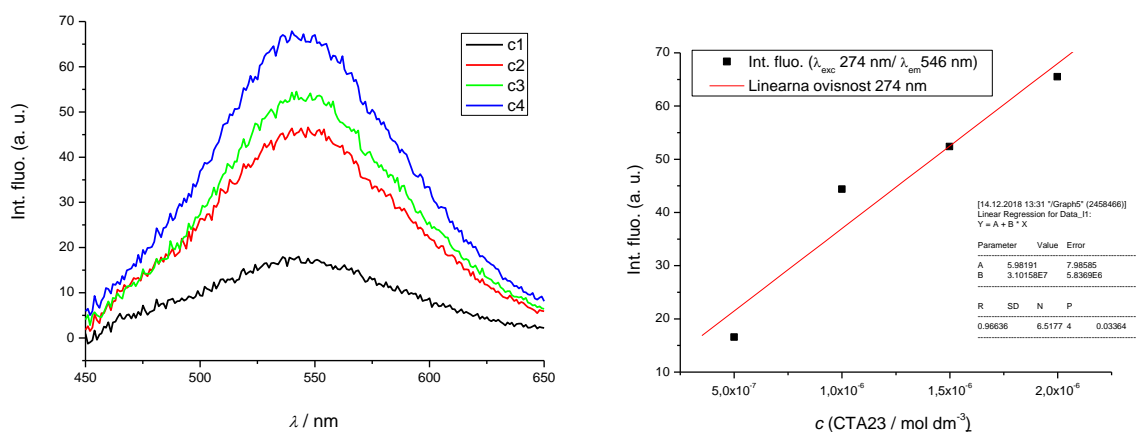
Slika D5. Promjena UV/Vis spektra otopine spoja CT-A19 ( $c = 8 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) nakon 24 h snimanog u Na-kakodilatnom puferu ( $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) u valnom području od 240-550 nm



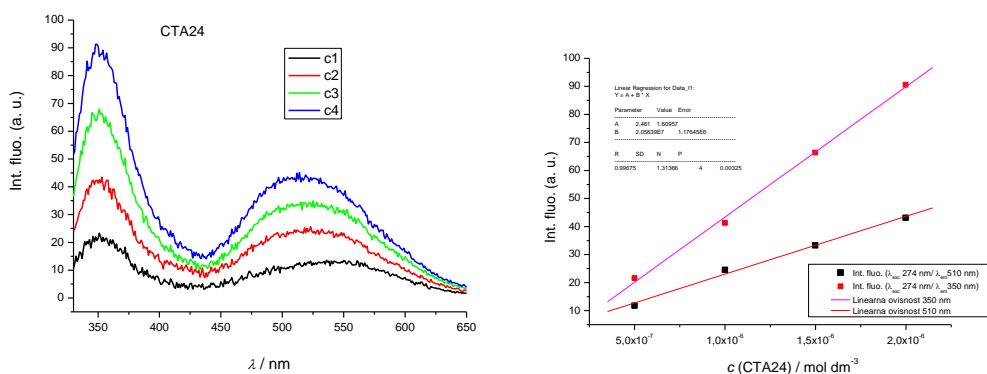
Slika D6. Promjena UV/Vis spektra otopine spoja CT-A19 ( $c = 8 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) nakon dodatka *ct*DNA snimanog u Na-kakodilatnom puferu ( $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ ) u valnom području od 240-550 nm.



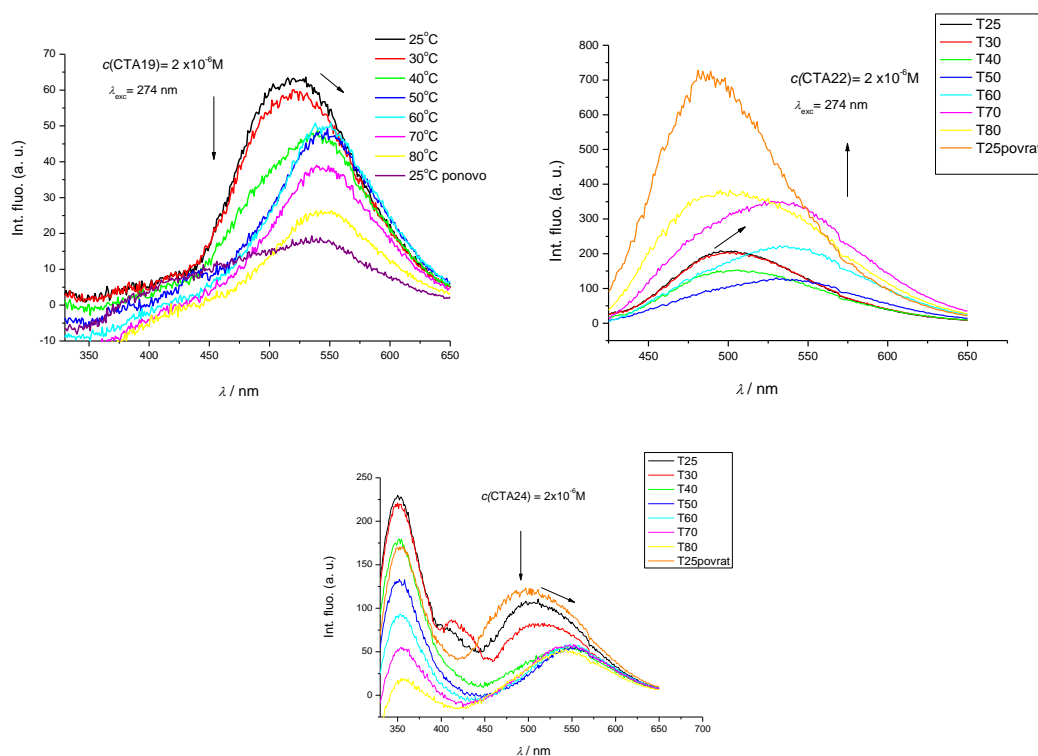
Slika D7. a) Fluorescencijski spektar CT-A22,  $c_1$ - $c_5 = 0,5$ - $3 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  (lijevo); linearna ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji vodene otopine spoja (desno), (Na-kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7,0$ ).



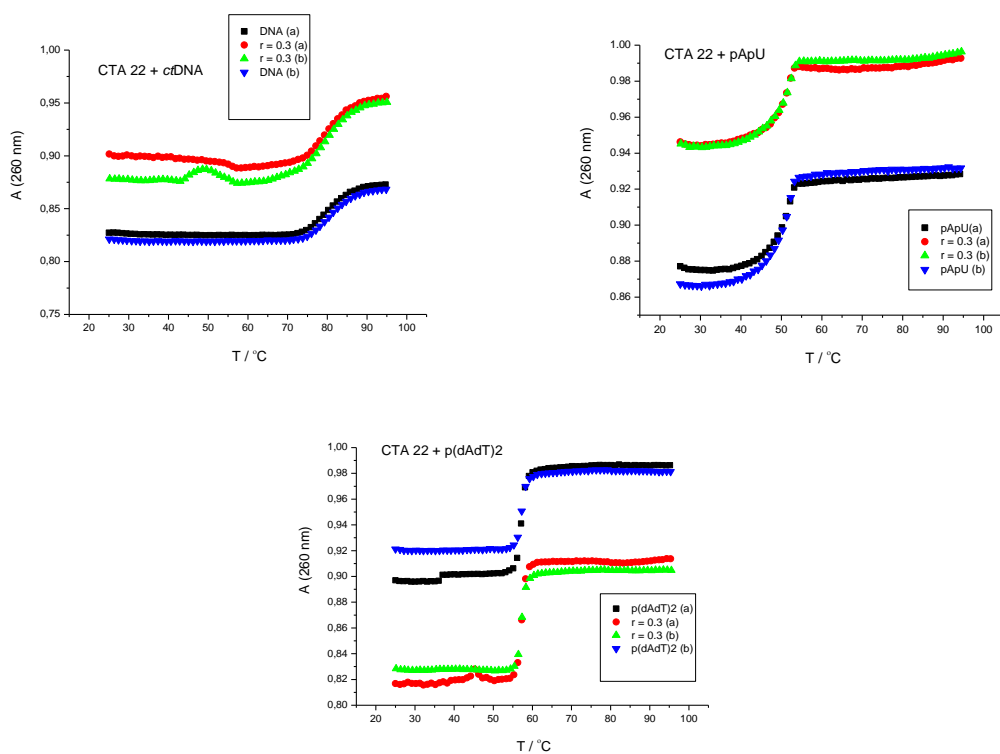
Slika D7. b) Fluorescencijski spektar CT-A23,  $c_1$ - $c_5 = 0,5$ - $3 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  (lijevo); linearna ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji vodene otopine spoja (desno), (Na-kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7,0$ ).



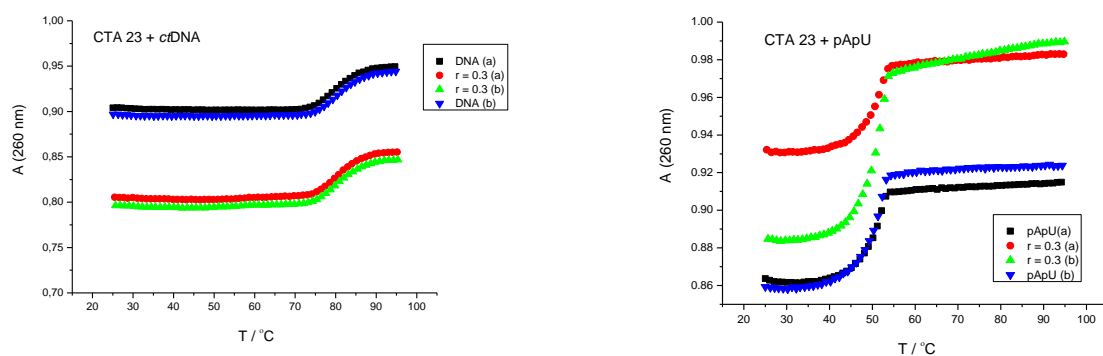
Slika D7. c) Fluorencijski spektar CT-A24,  $c_1$ - $c_5 = 0,5$ - $3 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  (lijevo); linearna ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji vodene otopine spoja (desno), (Na-kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7,0$ ).

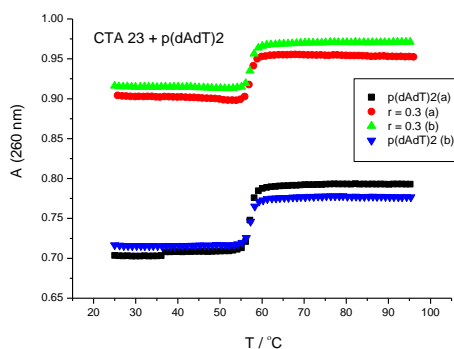


Slika D8. Utjecaj povećanja temperature na intenzitet fluorescencije spojeva CT-A19 (lijevo), CT-A22 (desno) i CT-A24 (dolje);  $c = 6 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ , (Na-kakodilatni pufer,  $\text{pH} = 7$ ,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )



Slika D9. Krivulje mekšanja polinukleotida ctDNA(lijevo), pApU (desno) i p(dAdT)<sub>2</sub> (dolje) u interakciji s CT-A22;  $c(\text{RNA}) = 1,5\text{-}1,7 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  i  $c(\text{DNA}) = 1,8\text{-}2,3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ , pri omjeru  $r = 0,3$ ;  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  u Na-kakodilatnom puferu ( $\text{pH} = 7,0$ ),  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ .



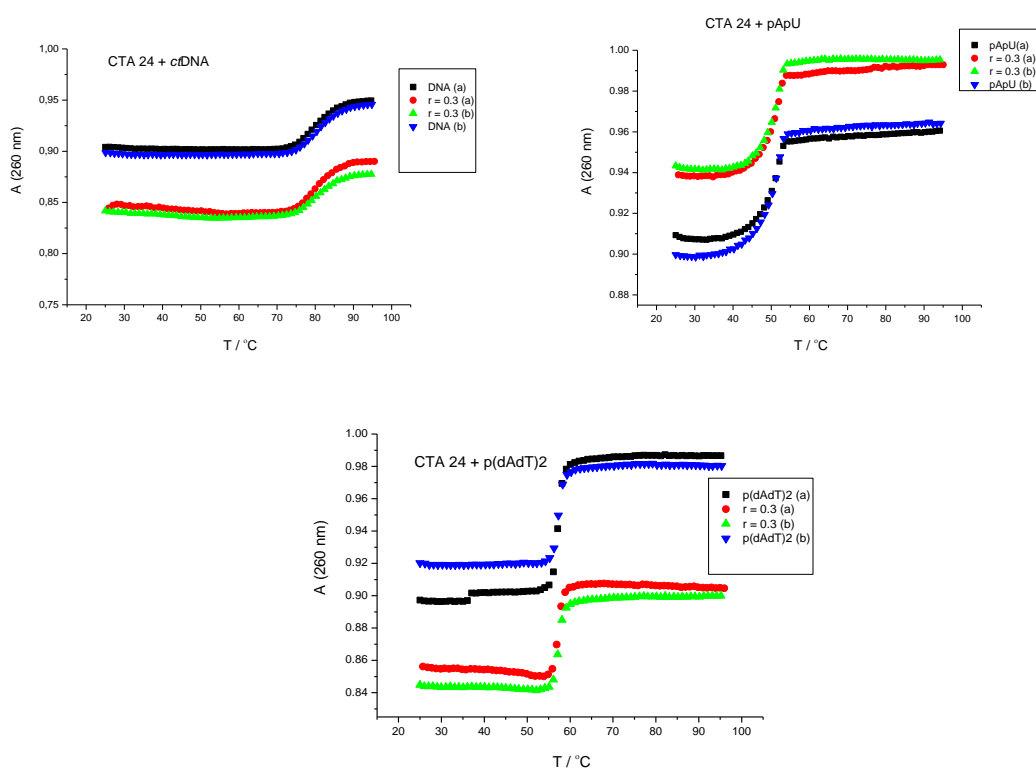


Slika D10. Krivulje mekšanja polinukleotida *ct*DNA(lijevo), pApU (desno) i p(dAdT)<sub>2</sub> (dolje)

u interakciji s CT-A23;  $c(\text{RNA}) = 1,5-1,7 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  i

$c(\text{DNA}) = 1,8-2,3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ , pri omjeru  $r = 0,3$ ;  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$

u Na-kakodilatnom puferu ( $\text{pH} = 7,0$ ),  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



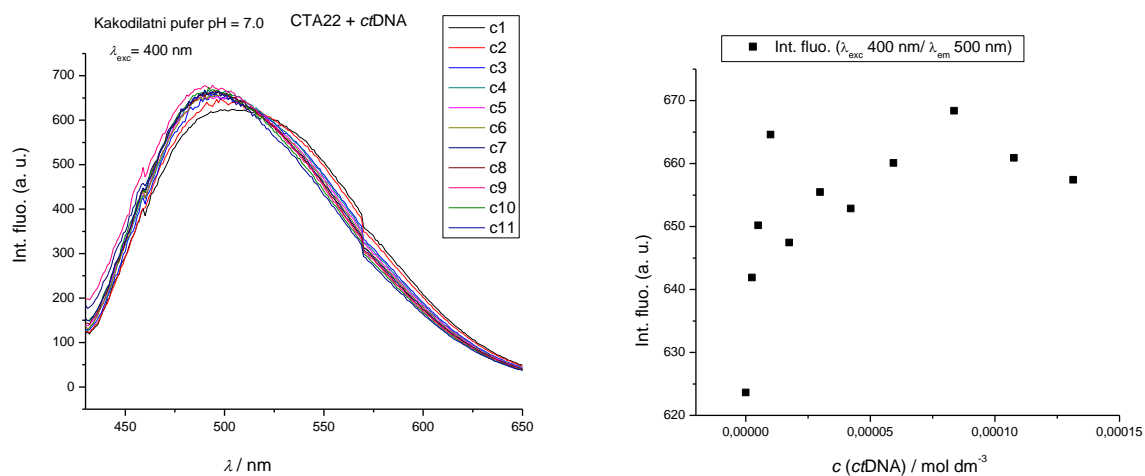
Slika D11. Krivulje mekšanja polinukleotida *ct*DNA(lijevo), pApU (desno) i p(dAdT)<sub>2</sub> (dolje)

u interakciji s CT-A23;  $c(\text{RNA}) = 1,5-1,7 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  i

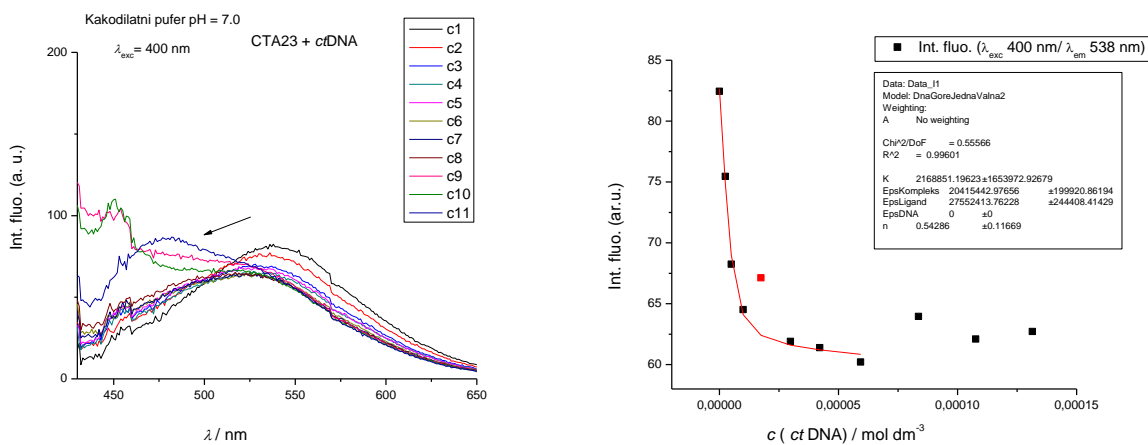
$c(\text{DNA}) = 1,8-2,3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ , pri omjeru  $r = 0,3$ ;  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$

u Na-kakodilatnom puferu ( $\text{pH} = 7,0$ ),  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$

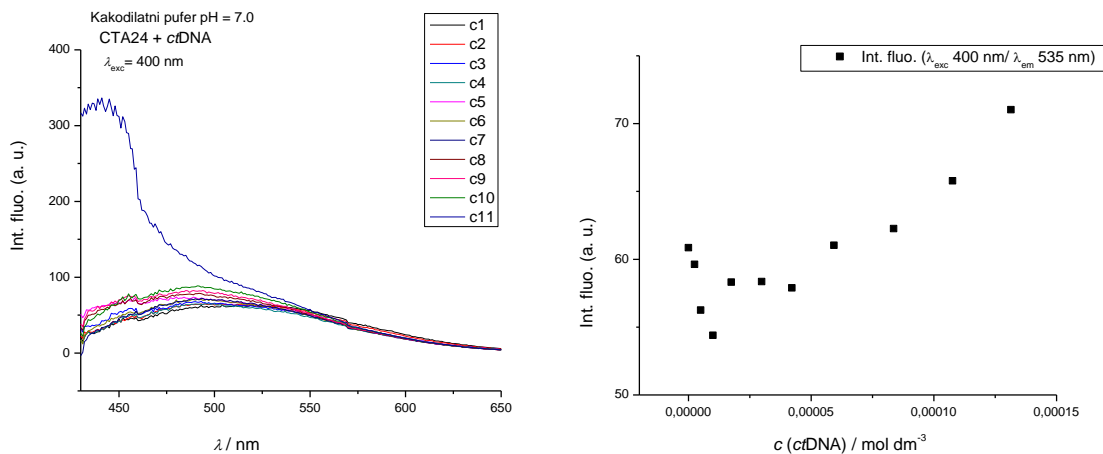




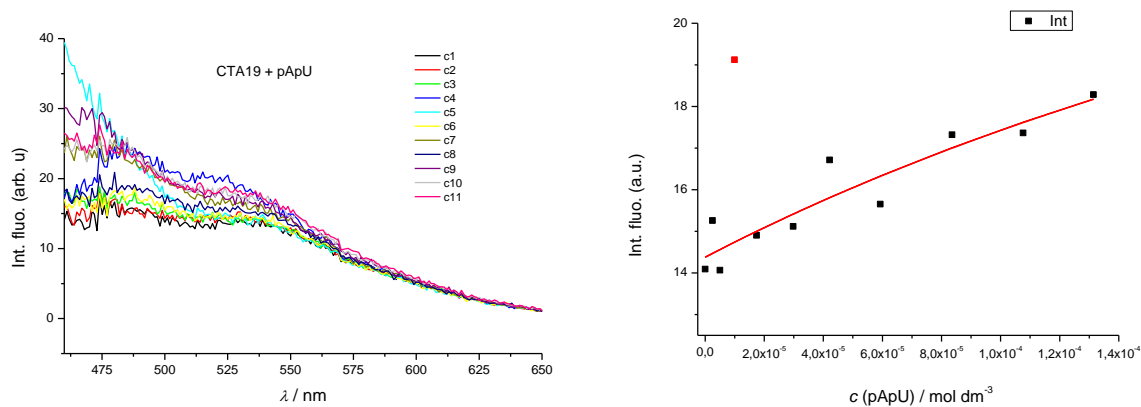
Slika D12. a) Fluorimetrijska titracija CT-A22,  $\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$ ,  $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  s *ctDNA* (lijevo); eksperimentalni (●) intenziteti fluorescencije CT-A22 pri  $\lambda_{\text{em}} = 500 \text{ nm}$  nakon dodatka *ctDNA* (desno), (pH = 7,0, Na-kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )



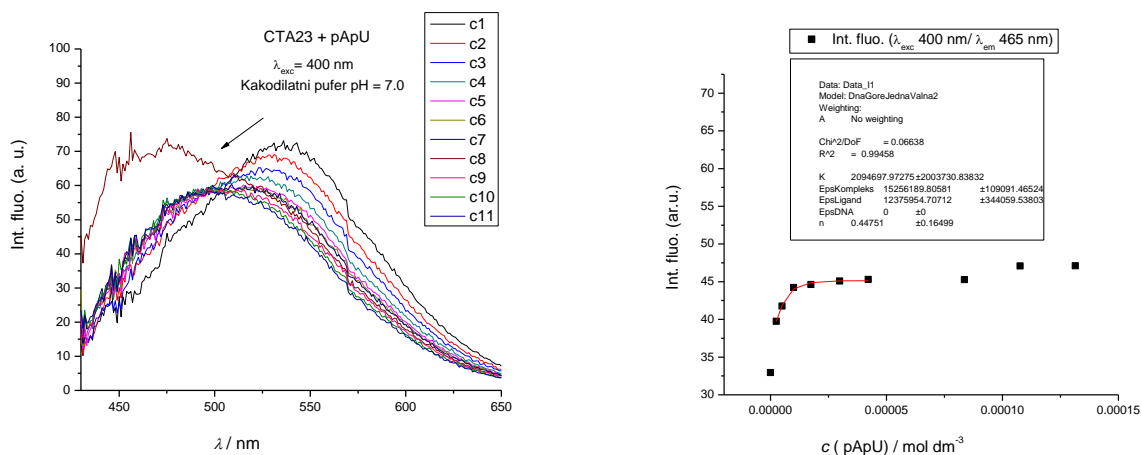
Slika D12. b) Fluorimetrijska titracija CT-A23,  $\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$ ,  $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  s *ctDNA* (lijevo); eksperimentalni (●) i izračunati (-) intenziteti fluorescencije CT-A23 pri  $\lambda_{\text{em}} = 538 \text{ nm}$  nakon dodatka *ctDNA* (desno), (pH = 7,0, Na-kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )



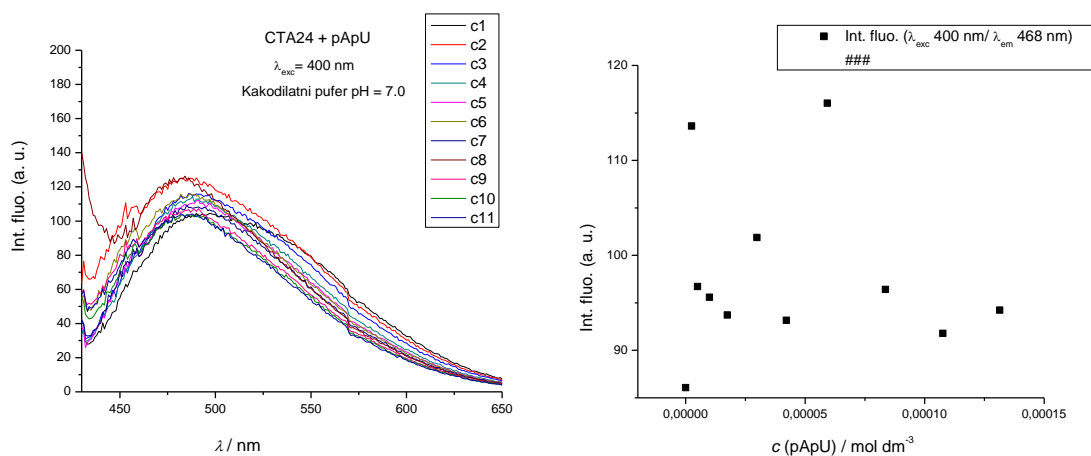
Slika D12. c) Fluorimetrijska titracija CT-A24,  $\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$ ,  $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  s *ctDNA* (lijevo); eksperimentalni (●) intenziteti fluorescencije CT-A24 pri  $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$  nakon dodatka *ctDNA* (desno) (pH = 7,0, Na-kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )



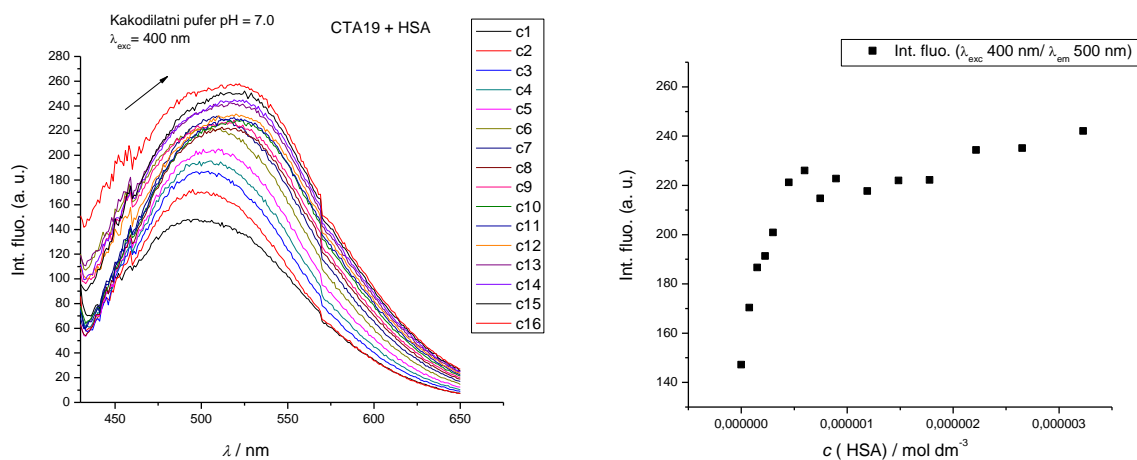
Slika D13. a) Fluorimetrijska titracija CT-A19,  $\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$ ,  $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  s pApU (lijevo); eksperimentalni (●) i izračunati (-) intenziteti fluorescencije CT-A19 pri  $\lambda_{\text{em}} = 505 \text{ nm}$  nakon dodatka pApU (desno), (pH = 7,0, Na-kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )



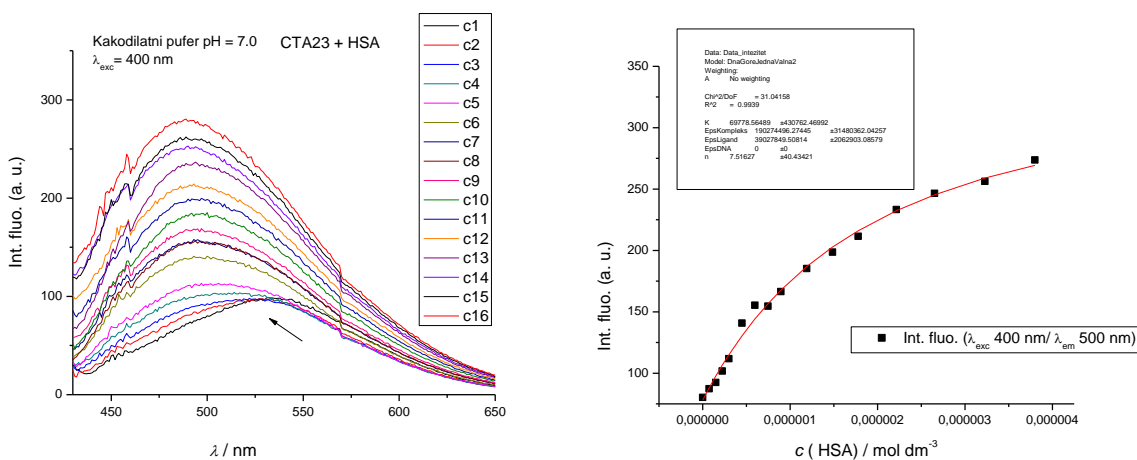
Slika D13. b) Fluorimetrijska titracija CT-A23,  $\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$ ,  $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  s pApU (lijevo); eksperimentalni (●) i izračunati (-) intenziteti fluorescencije CT-A23 pri  $\lambda_{\text{em}} = 465 \text{ nm}$  nakon dodatka pApU (desno), (pH = 7,0, Na-kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )



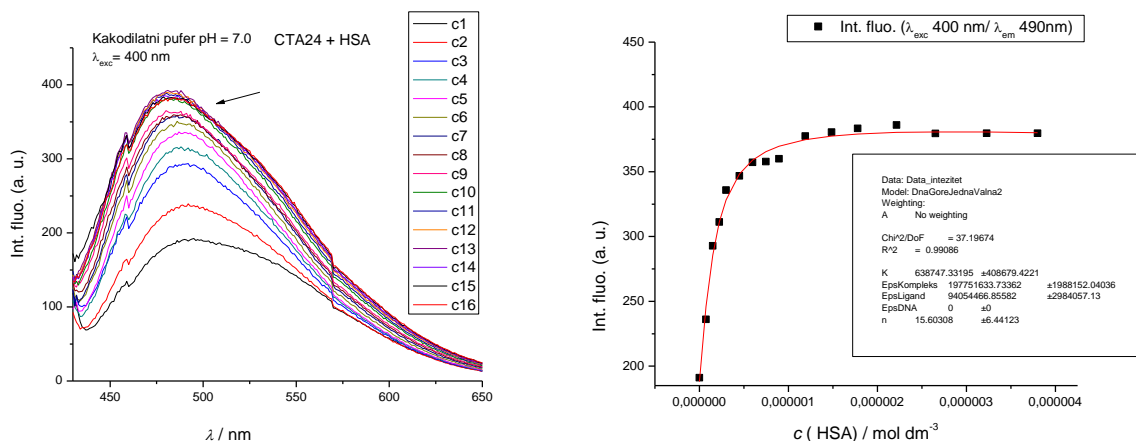
Slika D13. c) Fluorimetrijska titracija CT-A24,  $\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$ ,  $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  s pApU (lijevo); eksperimentalni (●) intenziteti fluorescencije CT-A24 pri  $\lambda_{\text{em}} = 468 \text{ nm}$  nakon dodatka pApU (desno), (pH = 7,0, Na-kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )



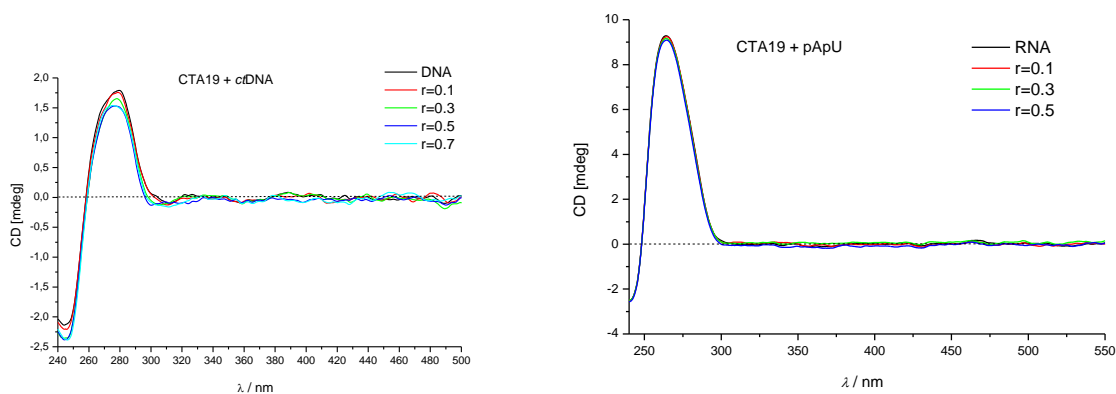
Slika D14. a) Fluorimetrijska titracija CT-A19,  $\lambda_{exc} = 400 \text{ nm}$ ,  $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  s HSA (lijevo); eksperimentalni (●) intenziteti fluorescencije CT-A19 pri  $\lambda_{em} = 500 \text{ nm}$  nakon dodatka HSA (desno) (pH = 7,0, Na-kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )



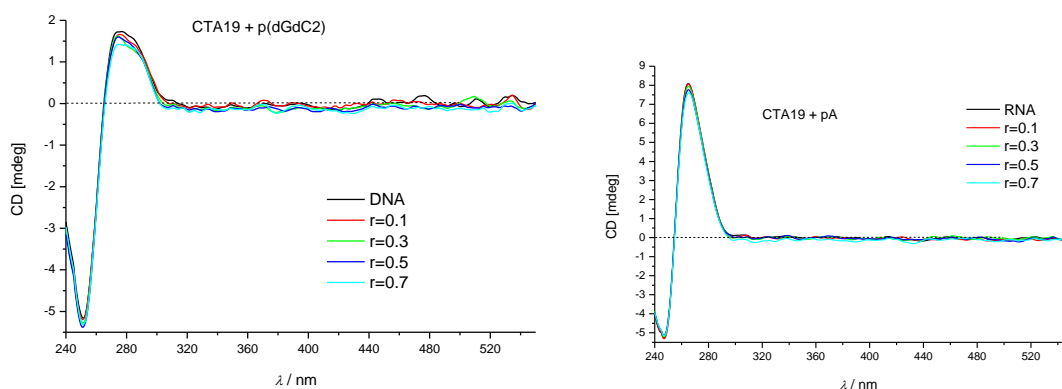
Slika 14. b) Fluorimetrijska titracija CT-A23,  $\lambda_{exc} = 400 \text{ nm}$ ,  $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  s HSA (lijevo); eksperimentalni (●) i izračunati (-) intenziteti fluorescencije CT-A23 pri  $\lambda_{em} = 500 \text{ nm}$  nakon dodatka HSA (desno), (pH = 7,0, Na-kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )



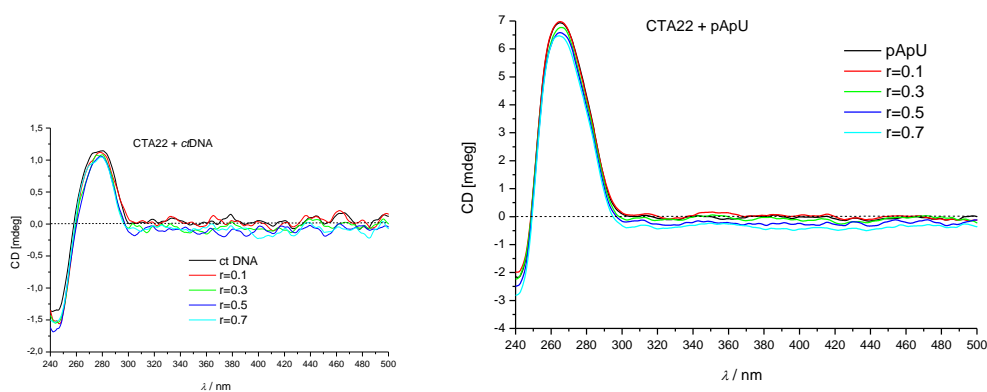
Slika 14. c) Fluorimetrijska titracija CT-A24,  $\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$ ,  $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  s HSA (lijevo); eksperimentalni (●) i izračunati (-) intenziteti fluorescencije CT-A24 pri  $\lambda_{\text{em}} = 490 \text{ nm}$  nakon dodatka HSA (desno), (pH = 7,0, Na-kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )



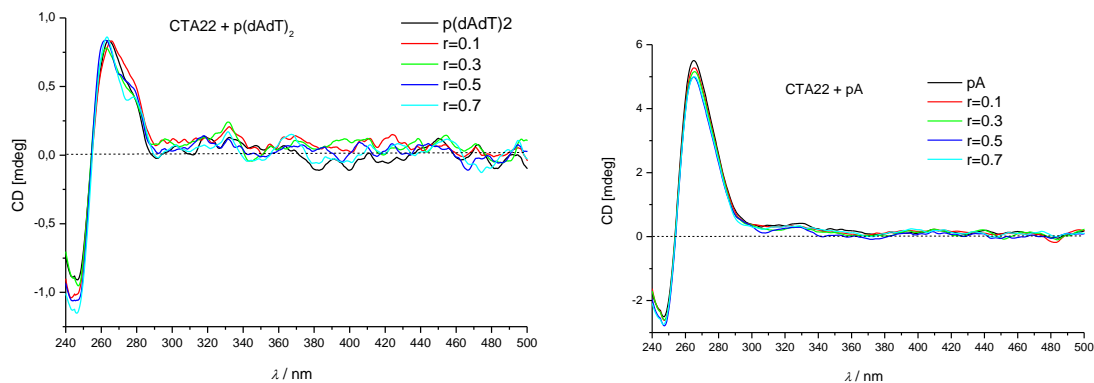
Slika D15. a) Promjene u CD spektru *ct*DNA (lijevo) i pApU (desno), ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) dodatkom spoja CT-A19 pri različitim molarnim omjerima  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$ , pH = 7,0, Na-kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



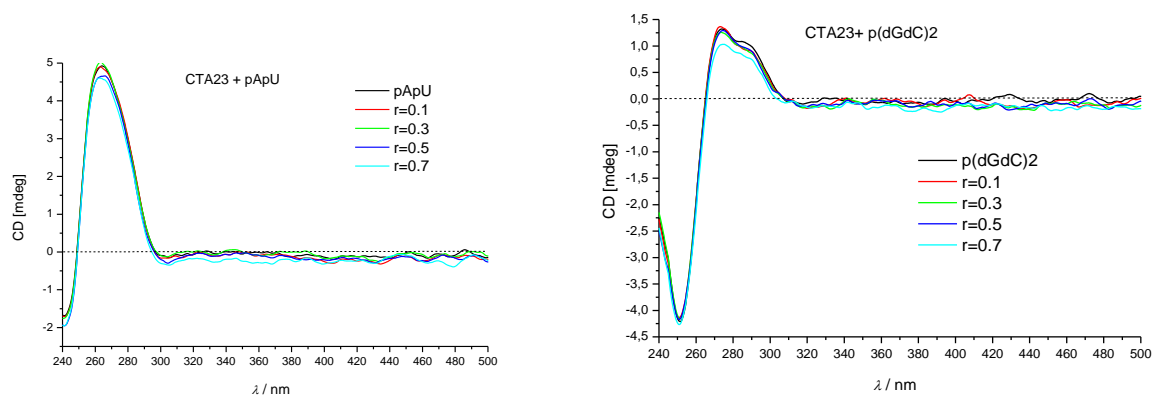
Slika D15. b) Promjene u CD spektru p(dGdC)<sub>2</sub> (lijevo) i pA (desno), ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) dodatkom spoja CT-A19 pri različitim molarnim omjerima  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$ , pH = 7,0, Na-kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



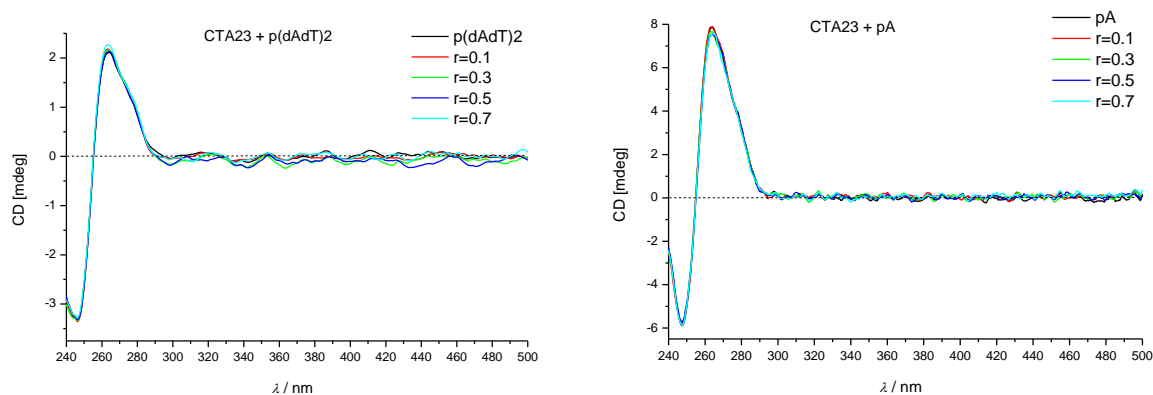
Slika D16. a) Promjene u CD spektru ctDNA (lijevo) i pApU (desno), ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) dodatkom spoja CT-A22 pri različitim molarnim omjerima  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$ , pH = 7,0, Na-kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



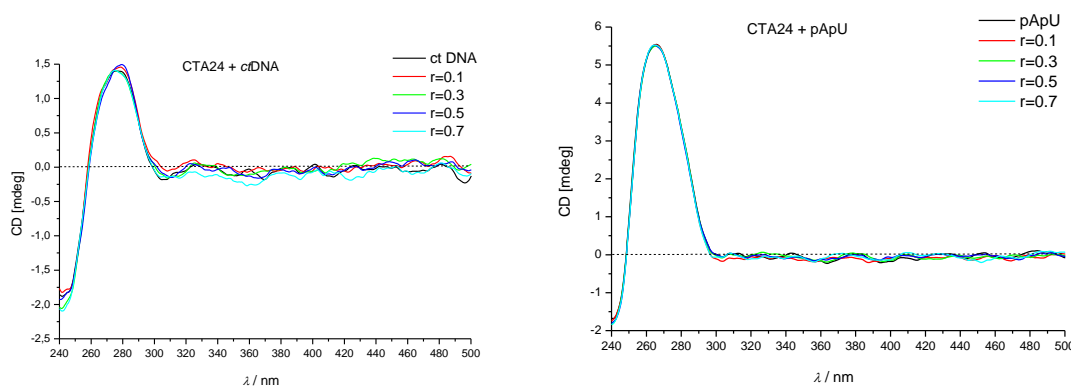
Slika D16. b) Promjene u CD spektru p(dAdT)<sub>2</sub> (lijevo) i pA(desno), ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) dodatkom spoja CT-A22 pri različitim molarnim omjerima  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$ , pH = 7,0, Na-kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



Slika D17. a) Promjene u CD spektru pApU (lijevo) i p(dGdC)<sub>2</sub> (desno), ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) dodatkom spoja CT-A23 pri različitim molarnim omjerima  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$ , pH = 7,0, Na-kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$

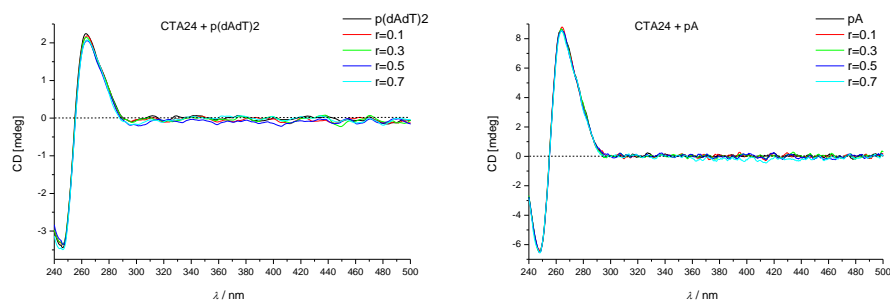


Slika D17. b) Promjene u CD spektru p(dAdT)<sub>2</sub> (lijevo) i pA(desno), ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) dodatkom spoja CT-A23 pri različitim molarnim omjerima  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$ , pH = 7,0, Na-kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$

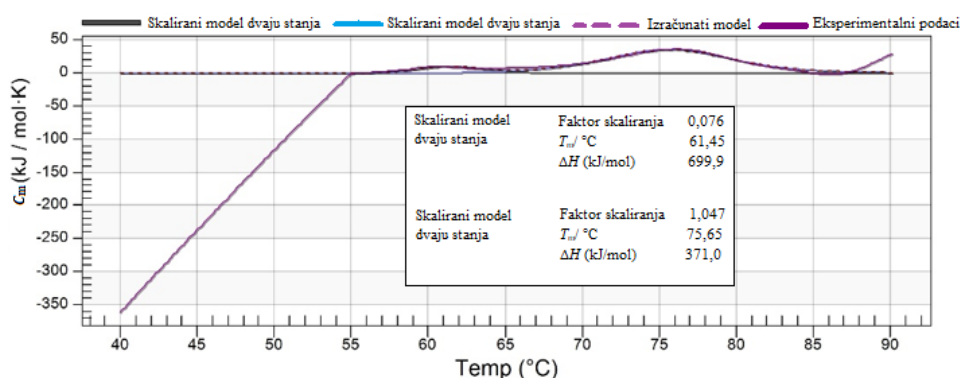


Slika D18. a) Promjene u CD spektru ctDNA (lijevo) i pApU (desno), ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) dodatkom spoja CT-A24 pri različitim molarnim omjerima  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$ , pH = 7,0, Na-kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$

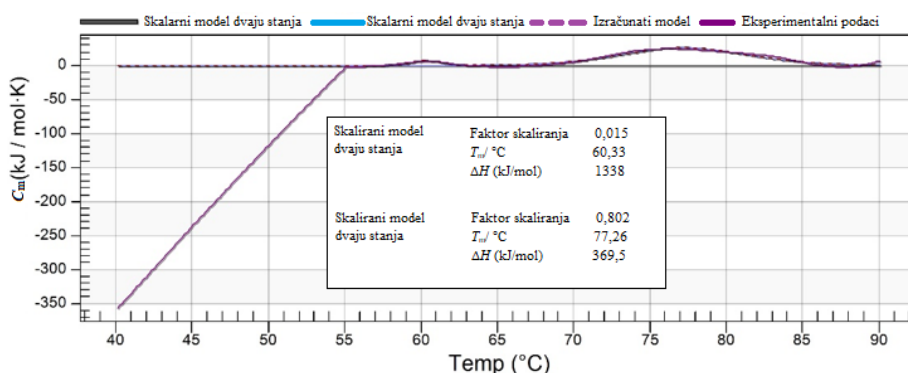




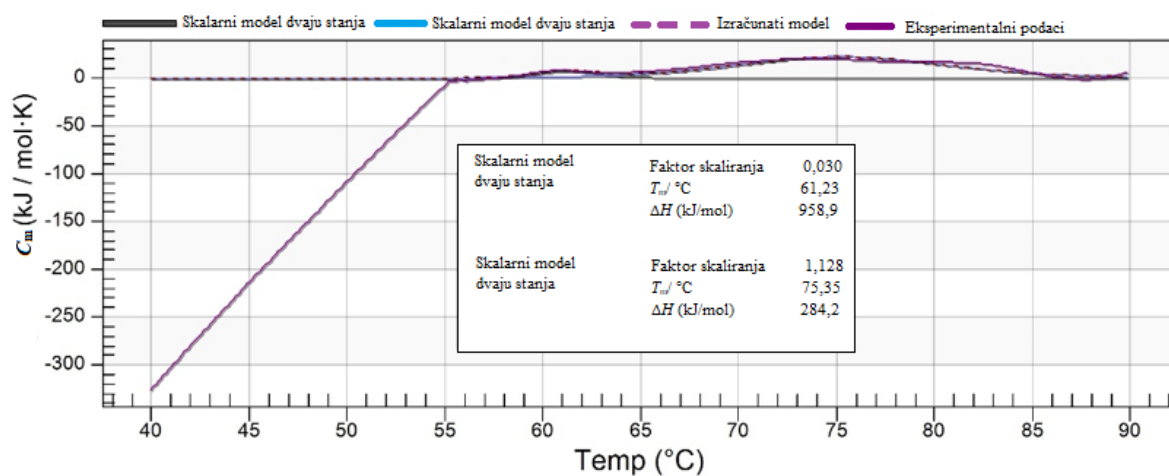
Slika D18. b) Promjene u CD spektru p(dAdT)<sub>2</sub> (lijevo) i pA(desno), ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) dodatkom spoja CT-A24 pri različitim molarnim omjerima  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$ , pH = 7,0, Na-kakodilatni pufer,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



Slika D19. Denaturacijska krivulja HSA ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) i spoja CT-A19 ( $c = 1,2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) dobivena analizom DSC u Na-kakodilatnom puferu pH = 7,0,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



Slika D20. Denaturacijska krivulja HSA ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) i spoja CT-A23 ( $c = 1,2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) dobivena analizom DSC u Na-kakodilatnom puferu pH = 7,0,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



Slika D21. Denaturacijska krivulja HSA ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) i spoja CT-A24 ( $c = 1,2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) dobivena analizom DSC u Na-kakodilatnom puferu pH = 7,0,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$

## § 9. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Kristina Pregiban

Datum rođenja: 09. kolovoza 1995.

Mjesto rođenja: Koprivnica

### Obrazovanje

2002.–2010. Osnovna škola Grgura Karlovčana, Đurđevac

2010.–2014. Srednja škola Koprivnica, Koprivnica

2014.–2017. Preddiplomski studij kemije, Odjel za kemiju, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Osijek

2017.–2020. Diplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb