

# Molekulsko prepoznavanje hibridnih i višelančanih struktura DNA i RNA

---

Zonjić, Iva

Doctoral thesis / Disertacija

2023

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:217:957466>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-21**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Iva Zonjić

**MOLEKULSKO PREPOZNAVANJE HIBRIDNIH I  
VIŠELANČANIH STRUKTURA DNA I RNA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2023



Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Iva Zonjić

**MOLEKULSKO PREPOZNAVANJE  
HIBRIDNIH I VIŠELANČANIH STRUKTURA  
DNA I RNA**

DOKTORSKI RAD

Mentorice:  
dr. sc. Marijana Radić Stojković  
dr. sc. Lidija-Marija Tumir

Zagreb, 2023







University of Zagreb  
FACULTY OF SCIENCE

Iva Zonjić

**MOLECULAR RECOGNITION OF HYBRID  
AND MULTISTRANDED DNA AND RNA  
STRUCTURES**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:  
Dr. Marijana Radić Stojković  
Dr. Lidija-Marija Tumir

Zagreb, 2023





Ova doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za biolomekularne interakcije i spektroskopiju, Zavoda za organsku kemiju i biokemiju, Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom dr. sc. Marijane Radić Stojković i dr. sc. Lidijske-Marije Tumir u sklopu Poslijediplomskog studija kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.



Rad je sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom HRZZ-IP-2018-01-4694 " Molekularno prepoznavanje DNA:RNA hibridnih i višelančanih struktura u bioanalitičkim i *in vitro* sustavima, DNARNAHyB-MolBio" voditeljice dr. sc. Marijane Radić Stojković.



## Zahvala

*Hvala mojim mentoricama, dr. sc. Marijani Radić Stojković i dr. sc. Lidiji-Mariji Tumir na pruženoj prilici i povjerenju. Hvala vam na svakom savjetu i najugodnijoj atmosferi u kojoj je bio užitak raditi. Zahvaljujem vam na velikoj pomoći i strpljenju tijekom izrade ove disertacije.*

*Hvala cijelom Laboratoriju za biomolekularne interakcije i spektroskopiju na ugodnoj radnoj atmosferi. Posebno hvala dr. sc. Ivi Crnolatu na svim savjetima i pomoći oko ITC-a. Zahvaljujem dr. sc. Mariji Matković na svim razgovorima i savjetima te njenom neuništivom sintetskom entuzijazmu.*

*Hvala svim curama u Laboratoriju za biomolekularne interakcije i spektroskopiju i onima koje su kroz ove godine bile dio njega, na ugodnom društvu. Hvala mojoj cimerici Ivani na ugodnom cimerstvu i tehničkoj pomoći prilikom pisanja rada. Posebno hvala Željki, Ivi, Ivoni, Petri, Lei i Marti na prijateljstvu i brojnim druženjima sve ove godine.*

*Hvala Nikši na bezuvjetnoj podršci i razumijevanju te vjetru u leđa u svakom trenutku.*

*Najveće hvala mojoj obitelji, a posebno mojim roditeljima na beskrajnoj potpori i ljubavi. Upravo vama posvećujem ovaj rad.*

*Iva*



# Sadržaj

SAŽETAK .....	XI
ABSTRACT .....	XII
§ 1. UVOD .....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED.....	4
2.1. GRAĐA I VRSTE NUKLEINSKIH KISELINA .....	4
2.1.1. Hibridne dvolančane DNA:RNA strukture.....	5
2.1.2. Višelančane strukture.....	6
2.2. Nekovalentne interakcije malih molekula s nukleinskim kiselinama.....	8
2.3. FENANTRIDINI.....	9
2.3.1. Sinteza fenantridina .....	10
2.3.1.1. Sinteza u radikalnim uvjetima.....	11
2.3.1.2. Sinteza katalizirana prijelaznim metalima .....	15
2.3.2. Spektroskopska svojstva fenantridina i utjecaj supstituenata na vezanje na nukleinske kiseline.....	17
2.4. BENZOTIAZOLI.....	20
2.4.1. Interakcije benzotiazolnih derivata s nukleinskim kiselinama .....	20
2.4.2. Biološka svojstva benzotiazolnih derivata .....	21
2.5. CIJANINSKE BOJE .....	23
2.5.1. Interakcija cijaninskih boja s nukleinskim kiselinama .....	25
2.5.2. Spektroskopska svojstva cijaninskih boja.....	26
2.6. METODE BRZOG PROBIRA .....	27
2.6.1. Kompeticijska dijaliza.....	27
2.6.2. Temperaturno mekšanje smjesa .....	30
2.6.3. RNaza H test.....	31
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	33
3.1. SINTEZA FENANTRIDINSKIH DERIVATA .....	33
3.1.1. <i>tert</i> -butil-((2 <i>S</i> )-3-(1 <i>H</i> -indol-3-il)-1-((6-metilfenantridin-8-il)amino)-1-oksopropan-2-il)karbamat (A1).....	35
3.1.2. (2 <i>S</i> )-3-(1 <i>H</i> -indol-3-il)-1-[(6-metilfenantridin-8-il)amino]-1-oksopropan-2-aminijev trifluoracetat (A2).....	36
3.1.3. <i>di-tert</i> -butil-((2 <i>S</i> ,2' <i>S</i> )-((6-metilfenantridin-3,8-diil)bis(azandiil)bis(3-(1 <i>H</i> -indol-3-il)-1-oksopropan-1,2-diil)dikarbamat (A3).....	37
3.1.4. (2 <i>S</i> ,2' <i>S</i> )-1,1'-[(6-metilfenantridin-3,8-diil)bis(azandiil)]bis[3-(1 <i>H</i> -indol-3-il)-1-oksopropan-2-aminijev] trifluoracetat (A4).....	38
3.2. ISPITIVANI BENZOTIAZOLNI DERIVATI.....	40
3.3. ISPITIVANE CIJANINSKE BOJE .....	41
3.4. SPEKTROSKOPSKA KARAKTERIZACIJA I ISPITIVANJE INTERAKCIJA FENANTRIDINSKIH DERIVATA, CIJANINSKIH BOJA I BENZOTIAZOLNIH DERIVATA .....	42
3.4.1. Priprema otopina .....	42
3.4.2. Priprava polinukleotida .....	42
3.4.3. UV-Vis i fluorescencijska spektroskopija i cirkularni dikroizam .....	43
3.4.4. Izotermalna titracijska kalorimetrija .....	44
3.4.5. Određivanje apsolutnih kvantnih prinosa .....	44
3.5. METODE BRZOG PROBIRA SPOJEVA .....	44
3.5.1. Kompeticijska dijaliza.....	44
3.5.2. Temperaturno mekšanje smjesa .....	45
3.5.3. RNaza H test .....	45
3.6. BIOLOŠKA ISPITIVANJA .....	46
3.6.1. Test stanične vijabilnosti.....	46

---

3.6.2. Konfokalna mikroskopija .....	47
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>48</b>
4.1. FENANTRIDINSKI DERIVATI.....	48
4.1.1. Sinteza fenantridinskih derivata .....	49
4.1.2. Spektroskopska karakterizacija fenantridinskih derivata.....	54
4.1.3. Interakcije fenantridinskih derivata s ctDNA.....	54
4.1.3.1. Fluorescencijska spektroskopija .....	54
4.1.3.2. Cirkularni dikroizam.....	56
4.1.4. Biološka ispitivanja.....	58
4.2. BENZOTIAZOLNI DERIVATI.....	60
4.2.1. Spektroskopska karakterizacija benzotiazolnih derivata .....	60
4.2.2. Interakcije benzotiazolnih derivata s različitim nukleinskim kiselinama .....	61
4.2.2.1. Kompeticijska dijaliza .....	61
4.2.2.2. Izotermalna titracijska kalorimetrija i fluorescencijska spektroskopija .....	64
4.2.2.3. Temperaturno mekšanje .....	69
4.2.2.4. RNaza H test.....	72
4.2.2.5. Cirkularni dikroizam.....	73
4.2.3. Molekulsko modeliranje .....	78
4.3. CIJANINSKE BOJE .....	79
4.3.1. Spektroskopska karakterizacija cijaninskih boja .....	80
4.3.2. Interakcije cijaninskih boja s različitim nukleinskim kiselinama .....	81
4.3.2.1. Kompeticijska dijaliza .....	81
4.3.2.2. Fluorescencijska spektroskopija .....	82
4.3.2.3. Temperaturno mekšanje .....	85
4.3.2.4. Cirkularni dikroizam.....	94
4.3.3. Biološka ispitivanja.....	104
4.3.3.1. MTT test .....	104
4.3.3.2. Konfokalna mikroskopija .....	105
<b>§ 5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>108</b>
<b>§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....</b>	<b>111</b>
<b>§ 7. LITERATURNI IZVORI .....</b>	<b>114</b>





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

Doktorska disertacija

## SAŽETAK

### MOLEKULSKO PREPOZNAVANJE HIBRIDNIH I VIŠELANČANIH STRUKTURA DNA I RNA

Iva Zonjić  
Institut Ruđer Bošković

Male molekule koje se preferencijalno vežu za hibridne i višelančane strukture DNA i RNA nekovalentnim interakcijama od velikog su znanstvenog interesa, te mogu naći primjenu kao novi i bolji dijagnostički i terapijski alati. Iako te strukture imaju važnu biološku funkciju unutar stanice mali je broj liganada koji se na njih preferencijalno vežu. Cilj ovog rada je pronaći nove strukturne motive/spojeve koji se preferencijalno vežu na hibridne i višelančane u odnosu na regularne DNA i RNA strukture. Ispitano je nekoliko grupa spojeva: benzotiazolni derivati i cijaninske boje koje su dobivene u suradnji s drugim istraživačkim grupama. Također, istražene su interakcije nosintetiziranih fenatridinskih derivata s DNA. Spojevi s preferencijalnim vezanjem na hibridne i višelančane strukture DNA i RNA odabrani su pomoću brzih metoda probira-kompeticijske dijalize i temperaturnog mekšanja smjesa te RNaza H testa. Daljnjim bioanalitičkim metodama (spektroskopija UV/Vis, fluorescencijska spektroskopija i cirkularni dikroizam) detaljno su okarakterizirane interakcije vezanja malih molekula s odabranim metama. Pokazali smo da se benzotiazolski i cijaninski derivati preferencijalno vežu na hibridne i višelančane strukture DNA i RNA u odnosu na regularne što bi se moglo iskoristiti u antitumorskoj terapiji i za detekciju struktura nukleinskih kiselina.

(122 stranice, 57 + XXIV slika, 14 shema, 16 tablica, 188 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: DNA/benzotiazolni derivati/cijaninske boje/fenatridinski derivati/hibridne strukture nukleinskih kiselina/RNA/višelančane strukture nukleinskih kiselina

Mentor: dr. sc. Marijana Radić Stojković, v. zn. sur.; dr. sc. Lidija-Marija Tumir, zn. sur.

Rad prihvaćen: 28. lipnja 2023.

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Snežana Miljanić, PMF, Zagreb
2. dr. sc. Nikola Basarić, zn. savj. u trajnom zvanju, IRB, Zagreb
3. dr. sc. Aleksandar Višnjevac, v. zn. sur., IRB, Zagreb



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

Doctoral Thesis

## ABSTRACT

### MOLECULAR RECOGNITION OF HYBRID AND MULTISTRANDED DNA AND RNA STRUCTURES

Iva Zonjić  
Ruđer Bošković Institute

Small molecules able to preferentially bind to specific hybrid and multistranded structures of DNA and RNA by non-covalent interactions are of great scientific interest when it comes to obtaining new and better diagnostic and therapeutic tools. Although these structures have an important biological function inside the cell, there is only a few known ligands which preferentially bind to them. The goal of this thesis is to find new structural motifs/compounds that preferentially bind to hybrid and multistranded structures compared to regular DNA and RNA structures. A small library of several groups of compounds was formed: benzothiazole derivatives and cyanine dyes obtained in collaboration with other research groups. Also, interactions of newly synthesized phenanthridine derivatives with DNA were investigated. Compounds with preferential binding to hybrid and multistranded structures of DNA and RNA were selected using competitive dialysis as a rapid screening method, as well as with melting of mixtures and RNase H assay. Further bioanalytical methods (fluorescence and UV/Vis spectroscopy and circular dichroism) were used to characterize their binding interactions with selected targets in detail. The obtained results indicate that certain derivatives from the mentioned classes of compounds preferentially bind to hybrid and multistranded structures of DNA and RNA compared to regular ones, which opens the possibility of their application in antitumor therapy and for the detection of nucleic acid structures.

(122 pages, 57 + XXIV figures, 14 schemes, 16 tables, 188 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: DNA/benzothiazole derivatives/cyanine dyes/hybrid nucleic acid structures/multistranded nucleic acid structures/phenanthridine derivatives/RNA

Supervisors: Dr. Marijana Radić Stojković, Senior Research Associate; Dr. Lidija-Marija Tumir, Research Associate

Thesis accepted: 28th June 2023

Reviewers:

Dr. Snežana Miljanić, Professor,  
Dr. Nikola Basarić, Senior Scientist  
Dr. Aleksandar Višnjevac, Senior Research Associate

## § 1. UVOD

Biološka aktivnost mnogih lijekova temelji se na interakcijama malih organskih molekula s DNA i RNA.<sup>1</sup> Zbog svojih esencijalnih funkcija u stanici (poput replikacije, transkripcije i translacijske regulacije) molekule DNA/RNA predstavljaju odlične molekularne mete u antitumorskoj, antibakterijskoj, antiparazitskoj i antivirusnoj terapiji.<sup>2</sup>

Postoji više različitih strukturnih oblika DNA.<sup>3</sup> Najčešći strukturni oblici DNA su dvolančane A- i B-uzvojnice. U mnogim biološkim procesima prisutne su hibridne DNA:RNA i višelančane strukture. One se stvaraju kao prijelazne strukture tijekom mnogih biološki važnih procesa kao što su replikacija DNA, transkripcija, replikacija telomera, ali i u životnom ciklusu nekih retrovirusa, poput virusa HIV-a.<sup>4,5</sup> Upravo zbog sudjelovanja u raznim biološkim procesima hibridne i višelančane strukture DNA su također potencijalne terapijske mete.

Male molekule se na polinukleotide mogu vezati na tri osnovna načina: (i) elektrostatskim interakcijama s negativno nabijenom fosfatnom okosnicom, (ii) vezanjem u utor uzvojnice polinukleotida i (iii) umetanjem aromatske molekule (interkaliranjem) između parova baza.<sup>6,7</sup> Do sada je identificiran vrlo mali broj liganada koji se preferencijalno vežu na hibride i višelančane strukture.<sup>4,8,9</sup> Već poznati ligandi koji se interkaliraju ili vežu u utor DNA (npr. distamicin) nisu pokazali učinkovito vezanje na navedene strukture od interesa. Do sada je iz literature poznato da se molekule koje imaju planarnu kondenziranu ili zakrivljenu heterocikličku aromatsku strukturu, snažnije vežu na dvolančane hibridne strukture u odnosu na uobičajene dvolančane strukture koje se sastoje samo od DNA ili RNA lanaca.<sup>8,9</sup> Neki spojevi koji su pokazali vezanje na hibridne i višelančane DNA strukture su: etidijev bromid, elipticin, propidij jodid, koralin, aminoglikozidi i tiazol-narančasto.<sup>8,9</sup> Utvrđeno je da se aminoglikozidi poput paromomicina i neomicina vežu u veći utor nukleinskih kiselina koje imaju A-uzvojnici, a pokazali su i značajnu temperaturnu stabilizaciju hibridnih struktura DNA:RNA.<sup>10,11</sup> Na trolančanu strukturu DNA preferencijalno se veže koralin,<sup>9</sup> te etidijev bromid koji se još preferencijalno veže i na hibridnu strukturu (poli rA-poli dT).<sup>8,9</sup>

Fenantridinska aromatska jezgra čest je motiv kod prirodnih spojeva. Veliki je broj fenantridinskih derivata koji pokazuju antifungalnu, antitumorsku, antibakterijsku i citotoksičnu aktivnost.<sup>12,13</sup> Fenantridini pokazuju velik porast fluorescencije prilikom vezanja na polinukleotide,<sup>11</sup> zbog čega su zanimljivi kao fluorescentni markeri za nukleinske kiseline. Jedan od najistraživanijih fenantridinskih derivata je etidijev bromid (EtBr), poznati DNA i RNA fluorescentni marker, koji posjeduje značajnu *in vivo* i *in vitro* antiparazitsku i

antitumorsku aktivnost.<sup>11</sup> Upravo zbog spomenutih svojstava koje fenantridinski derivati posjeduju, sintetizirani su derivati fenantridina na čiju je jezgru amidnom vezom vezan triptofan, te je ispitano njihovo vezanje na DNA.

Smatra se da se antitumorsko djelovanje benzotiazolnih spojeva zasniva na inhibiciji enzima tirozin kinaze i topoizomeraze I i II.<sup>14,15</sup> Stoga su različiti derivati benzotiazola zanimljivi za farmaceutsku upotrebu, ne samo zbog antitumorskog već i antialergijskog i protuupalnog djelovanja. Kako struktura benzotiazola također zadovoljava kriterij strukturnog motiva (planarna kondenzirana zakrivljena heterociklička aromatska struktura) koji ima afinitet prema hibridnim i višelančanim DNA strukturama,<sup>8,9</sup> za ispitivanje vezanja na polinukleotide izabrano je devet derivata benzotiazola koji su pokazali visoku antiproliferativnu aktivnost na tumorskim stanicama.

Tiazol-narančasto (TO) jedan je od najpoznatijih predstavnika cijaninskih boja. Prilikom interakcije s nukleinskim kiselinama, neovisno o načinu vezanja, cijaninski spojevi daju odličan fluorescentni odgovor zbog čega se koriste kao biosenzori.<sup>16</sup> Budući da uvođenje supstituenta s elektron-akceptorskim svojstvima na cijaninsku jezgru može rezultirati izraženom promjenom u prepoznavanju DNA i RNA,<sup>17,18</sup> ispitane su interakcije polinukleotida sa serijom derivata tiazol-narančastog koji sadrže fluor ili klor na položaju 6 benzotiazolskog prstena s dodatnim pozitivno nabijenim dijelom (piridin ili pirolidin). Istražen je utjecaj supstitucije derivata tiazol-narančasto halogenom na prepoznavanje jednolančanih, uobičajenih i hibridnih dvolančanih i trolančanih struktura DNA i RNA.

Na temelju literaturnih izvora o molekulskom prepoznavanju,<sup>8-11</sup> cilj ovog rada je pronaći nove strukturne motive/spojeve koji se preferencijalno vežu na hibridne DNA:RNA i višelančane strukture u odnosu na uobičajene nehibridne strukture nukleinskih kiselina. Formirana je biblioteka benzotiazolnih derivata i cijaninskih boja dobivenih u suradnji s drugim istraživačkim grupama. Ispitano je vezanje nosintetiziranih fenantridinskih derivata s DNA. Spojevi koji se preferencijalno vežu na DNA:RNA hibridne i višelančane strukture odabrani su pomoću brzih metoda probira (kompeticijska dijaliza i temperaturno mekšanje smjesa te RNaza H test). Daljnjim bioanalitičkim metodama (spektroskopija UV/Vis, fluorescencijska spektroskopija i cirkularni dikroizam) detaljno su okarakterizirane interakcije vezanja spojeva s odabranim metama. Ispitana je antitumorska aktivnost kako bi se pokazao potencijal i bioprimjenjivost postojećih fluorofora.

Ovim će se istraživanjem proširiti znanja o strukturnim motivima potrebnim za preferencijalno vezanje na hibridne DNA:RNA i višelančane strukture nukleinskih kiselina, te spoznaje o tipu i stabilnosti tako nastalih nekovalentnih kompleksa. Time će se optimirati

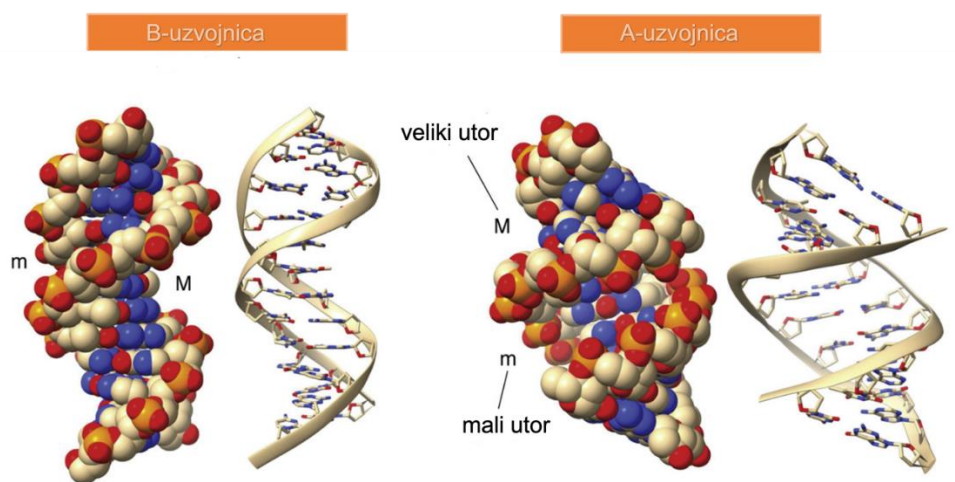
struktura liganada i poboljšati selektivnost vezanja na spomenute strukture nukleinskih kiselina. Spojevi sa sposobnošću prepoznavanja sekvence ili strukture nukleinskih kiselina ili razlikovanja tih meta na temelju preferencijalnog spektroskopskog odgovora mogli bi se koristiti u antitumorskoj terapiji i metodama oslikavanja.

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Građa i vrste nukleinskih kiselina

Nukleinske kiseline su biološke makromolekule koje sudjeluju u pohrani, prijenosu i ekspresiji genetske informacije. Sastoje se od monomernih jedinica, nukleotida koji su poredani u genetski određenom slijedu. Svaki nukleotid sastoji se od baze (purin, pirimidin), monosaharidnog šećera pentoze (riboza, deoskiriboza) i fosfatnih grupa.<sup>19</sup> Zajedno su povezani fosfodiesterskom vezom, tvoreći polinukleotid sa slobodnom 5' fosfatnom i 3' hidroksilnom skupinom na krajevima lanca.<sup>20</sup> Dva komplementarna polinukleotidna lanca u antiparalelnoj orijentaciji tvore dvostruku uzvojnica koja je stabilizirana vodikovim vezama između komplementarnih baza. Najpoznatije dvostruke uzvojnice su molekule DNA i RNA.

Molekula DNA sastoji se od šećera deoksiriboze i komplementarnih baza, adenina (A) i timina (T) međusobno povezanih s dvije odnosno gvanina (G) i citozina (C), međusobno povezanih s tri vodikove veze.<sup>20,3</sup> Najčešći strukturni oblici molekule DNA su A- i B-uzvojnica. Obje su desne dvolančane uzvojnice koju čine antiparalelni lanci povezani Watson-Crick-ovim sparivanjem baza. Na B-uzvojnici, najčešćem i najstabilnijem obliku DNA u fiziološkim uvjetima, jasno su definirani veliki i mali utor. Veliki je utor širok i plitak, a mali dubok i uzak. A-uzvojnica također ima definirani veliki i mali utor koji su suprotnih dimenzija od B-uzvojnice (mali utor je širok i plitak, a veliki je uzak i dubok). Uzvojnica tipa A šira je i kraća od B-uzvojnice, a ravnine njezinih parova baza nisu okomite na os uzvojnice već su nagnute u odnosu na nju (slika 1).<sup>21,22</sup>



Slika 1. Prikaz A- i B-uzvojnice molekule DNA s njihovim karakterističnim malim (m) i velikim (M) utorom (slika preuzeta i modificirana).<sup>23</sup>

Predstavnik A-uzvojnice je molekula RNA. Ona sadrži šećer ribozu, a baza timin iz molekule DNA zamijenjena je uracilom (U) kao komplementarnom bazom adeninu. RNA se najčešće pojavljuje u obliku jednolančane uzvojnice.<sup>21</sup> Postoji još jedna vrsta dvolančane molekule DNA, a to je lijeva Z-uzvojnica kojoj je veliki utor spljošten, a mali je jako uzak i izrazito dubok. Smatra se da Z-uzvojnica nastaje pri transkripciji gena u biološkim uvjetima. Z-DNA je obično prisutna u otopini visoke ionske jakosti ili višeg postotka alkohola.<sup>20,24</sup>

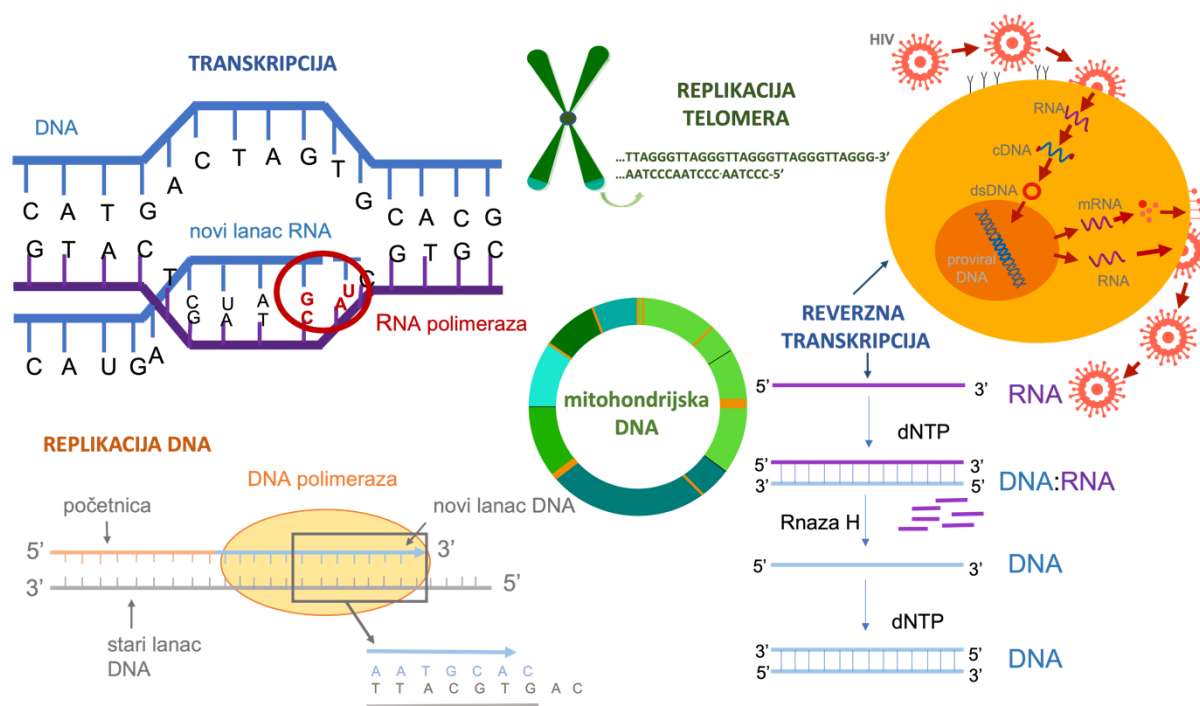
Zbog heterogenosti prirodnih struktura, za ispitivanje interakcija malih molekula s DNA i RNA koriste se sintetski polinukleotidi ujednačenih duljina lanaca. Koriste se jednolančani DNA i RNA polinukleotidi (poli dA, poli dT, poli rA, poli rU). Za ispitivanje interakcija s dvolančanim strukturama koriste se sintetski dvolančani nealternirajući i alternirajući polinukleotidi. Za ispitivanje interakcija koriste se različite hibridne strukture DNA:RNA (poli rA-poli dT, poli dA-poli rU) te trolančane DNA, RNA i DNA:RNA strukture (dAdTdT, rArUrU, rAdTdT) nastale povezivanjem spomenutih dvolančanih i jednolančanih polinukleotida. Često se koristi prirodna dvolančana molekula izolirana iz timusne žljezde teleta (engl. *calf thymus* DNA-*ct*DNA) koja se sastoji od 42 % GC parova baza i 58 % AT parova baza.<sup>25</sup>

Svaka od navedenih struktura pripada određenom tipu uzvojnice. Male molekule mogu prepoznati određenu sekvencu ili strukturu nukleinskih kiselina što se očituje u većem afinitetu vezanja ili specifičnom spektroskopskom odgovoru.

### 2.1.1. Hibridne dvolančane DNA:RNA strukture

Samo nekoliko godina nakon što su Watson i Crick otkrili strukturu DNA, sintetska hibridna struktura DNA:RNA dobivena je povezivanjem lanca RNA i komplementarnog lanca DNA.<sup>9</sup> Struktura poli rA-poli dT sastoji se od adeninskog lanca RNA i timidinskog lanca DNA, te ima konformaciju B-uzvojnice.<sup>4,9</sup> Pretpostavlja se da je za stabilizaciju hibridne strukture odgovorna metilna skupina timina na pirimidinskom lancu. Druga hibridna struktura je poli dA-poli rU u kojoj jedan lanac (purinski) pokazuje karakteristike B-uzvojnice, dok drugi lanac (pirimidinski) pokazuje karakteristike A-uzvojnice. Na globalnu konformaciju poli dA-poli rU više utječe pirimidinski lanac, zbog čega ovaj polinukleotid poprima A tip uzvojnice, slično molekuli RNA.<sup>4</sup> Tijekom godina otkriveno je da se ove strukture stvaraju kao prijelazne strukture tijekom mnogih biološki važnih procesa u stanici kao što su replikacija DNA, transkripcija, replikacija telomera i reverzna transkripcija prisutna kod retrovirusa poput virusa HIV-a. Zbog toga ove strukture predstavljaju dobre mete za vezanje malih molekula (slika 2).<sup>26</sup>





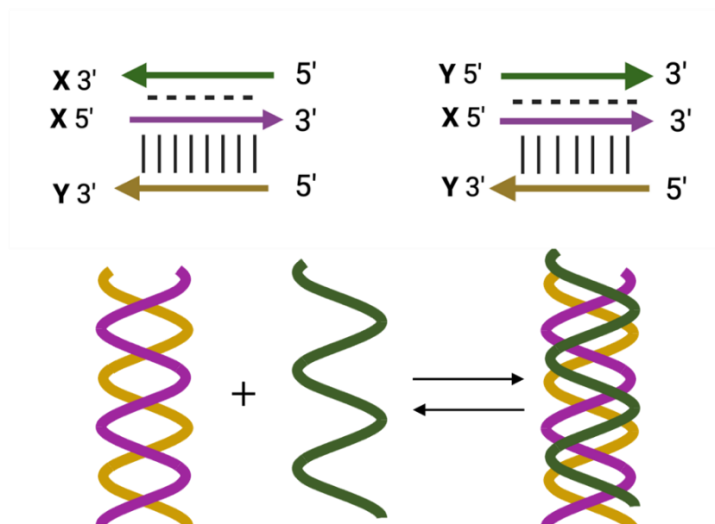
Slika 2. Biološki procesi unutar stanice u kojima se može pronaći hibridna struktura DNA:RNA.

Replikacijom molekule DNA dolazi do nastanka kratkih DNA fragmenata poznatih kao Okazakijevi fragmenti koje odvajaju RNA početnice (engl. *primer*), pa preferencijalno prepoznavanje i vezanje malih molekula na takve hibridne strukture može utjecati na regulaciju gena.<sup>4,26</sup> Kao što je već spomenuto, hibridne DNA:RNA strukture su prisutne u reverznoj transkripciji kod virusa HIV-a i drugih retrovirusa. Prvi produkt koji nastaje reverznom transkripcijom je hibridna struktura DNA:RNA.<sup>5</sup> Formiranje i integracija virusne dvolančane DNA u genom domaćina ovisi o razgradnji lanca RNA pomoću RNaze H, pa prepoznavanje hibridne DNA:RNA strukture pomoću malih molekula inhibira RNazu H i time se može kontrolirati ciklus HIV-a u stanici domaćina.<sup>4</sup>

### 2.1.2. Višelančane strukture

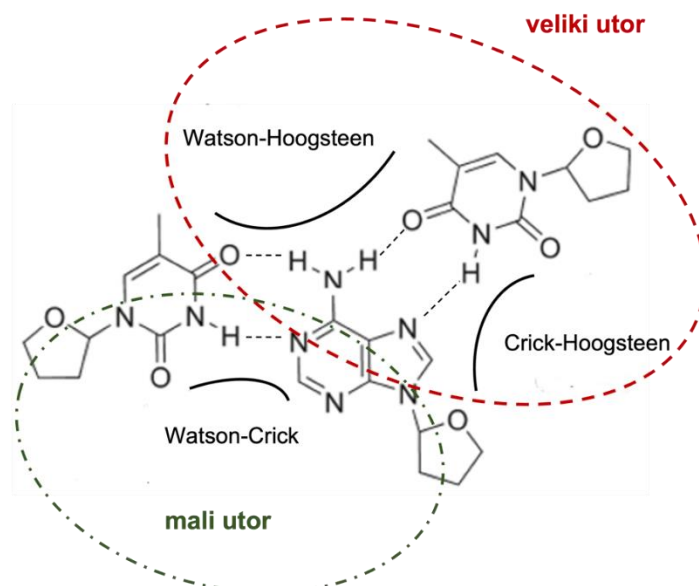
U stanicama se pojavljuju i trolančane strukture koje se mogu naći u promotorskim sekvencama i na aktivnom mjestu DNA polimeraze.<sup>27</sup> Otkrivene su 1957. i sastoje se od dvostruke uzvojnice povezane Watson-Crick-ovim vodikovim vezama i komplementarnog jednolančanog lanca smještenog u velikom utoru koji je na dvostruku uzvojnici vezan Hoogsteen-ovim sparivanjem baza.<sup>28</sup> Treći lanac (pirimidin/purin) se prilikom sparivanja na dvolančanu strukturu može orijentirati paralelno ili antiparalelno (slika 3).<sup>24,27</sup>





Slika 3. Prikaz različitih orijentacija uzvojnica koje čine trolančanu molekulu (lijevo-antiparalelna, desno-paralelna orijentacija). Crticama je prikazano Watson-Crick-ovo sparivanje, a isprekidanim crticama Hoogsteen-ovo sparivanje baza. Y predstavlja pirimidinski motiv, a X purinski.

Kod trolančane strukture DNA (dAdTdT) manji utor je sličan manjem utoru B-uzvojnice molekule DNA. Međutim, veliki utor se dosta razlikuje u odnosu na isti utor uobičajene B-uzvojnice. Taj utor je širi zbog dodatnog lanca koji se veže na dvolančanu uzvojniciu te je podijeljen u dva dijela Watson-Hoogsteen-ov i Crick-Hoogsteen-ov utor (slika 4).<sup>28</sup>



Slika 4. Prikaz malog i velikog utora trolančane strukture DNA (dAdTdT).

Otkriće trolančane uzvojnice potaknulo je intenzivnije proučavanje tih struktura zbog njihovog potencijala za primjenu kao terapijske mete.<sup>29</sup> Dizajnom spojeva koji prepoznaju točno

određeni dio dvolančane uzvojnice, te potiču nastanak trolančane uzvojnice može se regulirati ekspresija gena što se također može iskoristiti u terapiji.<sup>30</sup>

Višelančane strukture nalaze se i u telomerama, u kojima regije bogate gvaninom formiraju G-kvadruplekse. Oni se sastoje od dva ili tri planarno složena kvarteta koji se sastoje od četiri gvanina u kvadratnom rasporedu, stabilizirana Hoogsteen-ovim načinom sparivanja.<sup>31</sup> Ligandi koji se preferencijalno vežu na hibride DNA:RNA i G-kvadruplekse imaju potencijalnu terapijsku primjenu u kontroli aktivnosti RNaze H i telomeraze, koja ima regulatornu ulogu u 80 – 90 % tumorskih stanica.<sup>9,32,33</sup>

## 2.2. Nekovalentne interakcije malih molekula s nukleinskim kiselinama

Dva su osnovna načina interakcija malih organskih molekula s nukleinskim kiselinama. Prvi način vezanja su nepovratne interakcije kod kojih se stvaraju kovalentne veze s nukleinskim kiselinama. Drugi način su nekovalentne, ravnotežne reakcije.<sup>34</sup> U ovom radu ispituju se nekovalentne interakcije malih molekula s različitim strukturama nukleinskih kiselina. Tri su osnovna načina na koji se mala molekula može nekovalentno vezati na nukleinske kiseline: elektrostatsko vezanje, vezanje u utor uzvojnice i interkaliranje između parova baza (slika 5).



Slika 5. Načini nekovalentnog vezanja male molekule na polinukleotide. A) elektrostatsko vezanje, B) vezanje u manji utor i C) interkaliranje.

Elektrostatsko vezanje karakteristično je za pozitivno nabijene male molekule koje stupaju u interakciju s negativno nabijenom fosfatnom okosnicom nukleinskih kiselina. Ovakav tip nekovalentnog vezanja je nespecifičan.<sup>34</sup> Alifatski poliamini primjer su molekula koje se vežu elektrostatskim interakcijama na nukleinske kiseline.<sup>34</sup>

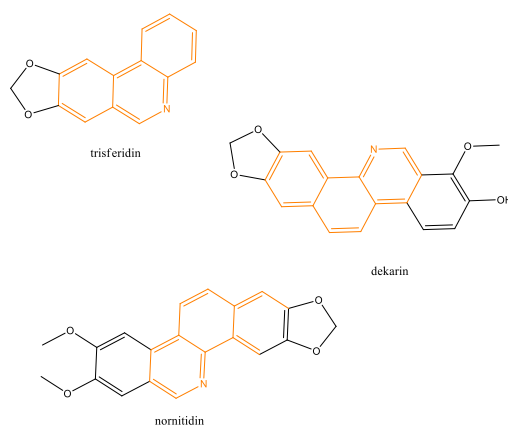
Drugi način nekovalentnih interakcija je vezanje u utor nukleinskih kiselina. Molekule koje se vežu u utor obično su izduženog, zakrivljenog, polumjesečastog oblika koji odgovara obliku utora nukleinskih kiselina. Također, te molekule imaju i dodatne funkcionalne skupine koje omogućuju vezanje na fosfate te nastanak vodikovih veza s krajevima baza u manjem ili većem utoru.<sup>35</sup> Za razliku od molekule DNA čiji je manji utor dubok i uzak i pogodan za vezanje malih molekula zakrivljenog oblika, kod RNA je taj utor širok i plitak te nije pogodan za vezanje takvih molekula. Antitumorski lijekovi poput netropsina i distamicina vežu se u manji utor molekule DNA.<sup>34,35</sup>

Interkalacija je umetanje planarne molekule između parova baza molekule DNA, što rezultira stabilizacijom strukture, smanjenjem uvijanja i produljenjem uzvojnice DNA.<sup>35</sup> Takav kompleks je stabiliziran  $\pi$ - $\pi$  interakcijama slaganja između baza DNA i interkalirane molekule. U procesu interkalacije, jedna molekula sprječava umetanje druge molekule između sljedećih parova baza pa se interkalatori mogu vezati na svaki drugi par baza u strukturi nukleinske kiseline, što se naziva „princip isključenja susjeda“.<sup>36</sup> Proces interkaliranja je termodinamički povoljan zbog pozitivnog doprinosa entalpije uzrokovanog otpuštanjem vode koja se nalazi oko molekula liganda u okolnu vodu.<sup>11,37</sup>

Neki antitumorski lijekovi (elipticin, daunomicin) te antibiotici (aktinomicin D, nogalamicin) se vežu interkalacijom na nukleinske kiseline. Njihovo djelovanje temelji se na blokiranju djelovanja topoizomeraze II.<sup>34</sup>

### 2.3. Fenantridini

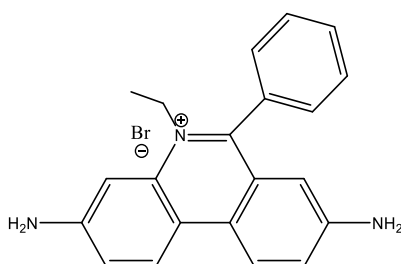
Heterocikličke molekule s dušikom su od iznimnog interesa zbog njihove reaktivnosti i bioloških svojstava, a posebice su zanimljivi fenantridini čija se jezgra može naći u mnogim biološki relevantnim i prirodnim spojevima (slika 6).<sup>38,39</sup> Tako se primjerice, trisferidin se može naći u lišću i lukovicama biljke *Lapiedra martinezii*. Fenantridini pokazuju antifungalno, antitumorsko i antibakterijsko djelovanje.<sup>12</sup>



Slika 6. Biološki aktivni spojevi koji sadrže fenantridinsku jezgru (narančasto obojena).<sup>38</sup>

Fenantridinski derivati često se koriste kao ligandi za nekovalentne interakcije s polinukleotidima upravo zbog njihove planarne strukture pogodne za interkaliranje. Veličina i zakrivljenost aromatske površine fenantridinskih derivata odgovara prostoru između parova baza nukleinskih kiselina.<sup>40</sup>

Jedan od najpoznatijih i najčešće korištenih fenantridina je 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridinijev bromid poznatiji kao etidijev bromid (slika 7).



Slika 7. Struktura etidijeva bromida

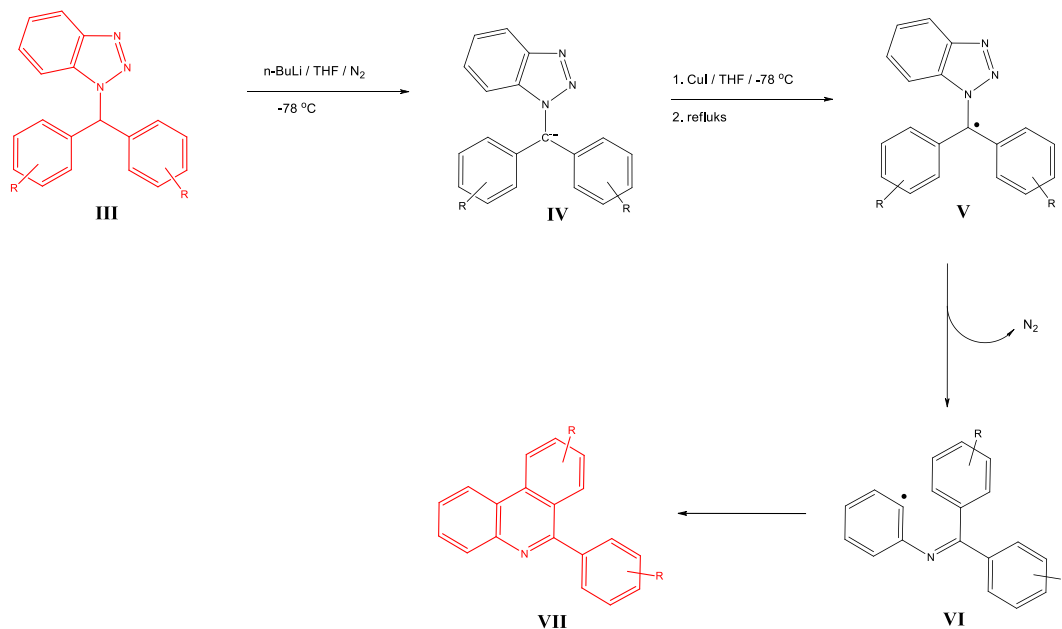
Etidijev bromid je za čovjeka kancerogen, ali se 50-tih godina prošlog stoljeća koristio za liječenje afričke tripanosomijaze kod stoke. Danas se koristi kao fluorescentni marker za molekule DNA i RNA jer mu prilikom vezanja na polinukleotide dolazi do porasta (oko 40 puta) kvantnog prinosa fluorescencije.<sup>11,39</sup>

### 2.3.1. Sinteza fenantridina

Pictet i Ankersmit sintetizirali su fenantridin 1891. reakcijom pirolize kondenzacijskog produkta benzaldehida i anilina.<sup>41</sup> Do ciklizacije dolazi dehidrativnim zatvaranjem prstena acil-*o*-aminobifenila zagrijavanjem s cinkovim kloridom na visokim temperaturama. Ovakva je metoda imala mnoge nedostatke, poput dugog grijanja, loših metoda čišćenja, koje su

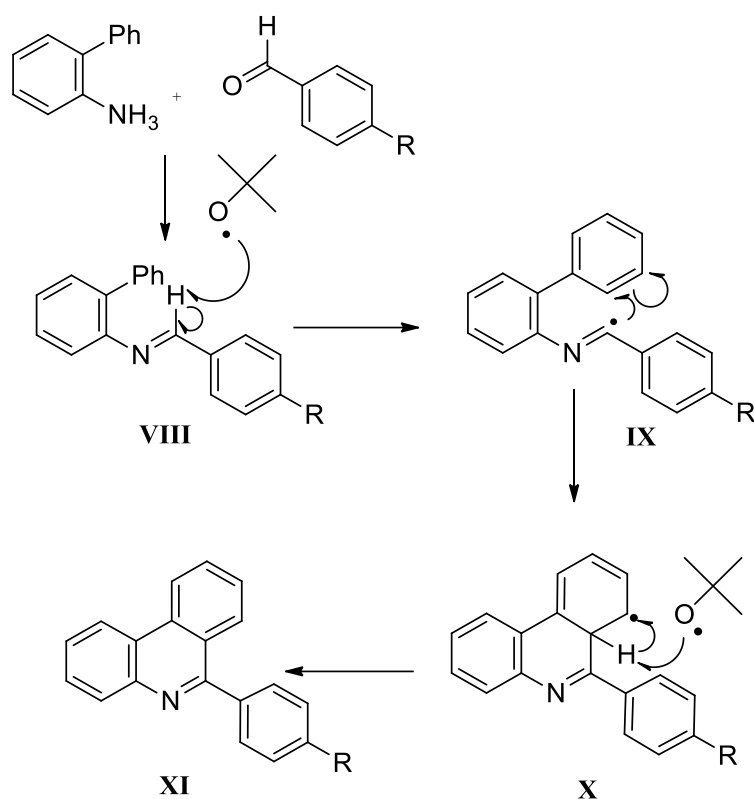


položaju C8.<sup>11,40,52</sup> Koriste se benzotriazolni derivati akridina, diarilmetana, ksantena ili tioksantena.<sup>52,53</sup> Katrizky i suradnici su iz derivata benzotriazola **III** generirali stabilni karbaanion **IV** koji se oksidira u radikal **V** pomoću bakrovog (I) jodida (shema 5). Kada su supstituenti R vezani na dvije arilne jedinice bili različiti, dobivena je smjesa izomera **VII** koji su razdvojeni kolonskom kromatografijom (shema 2).



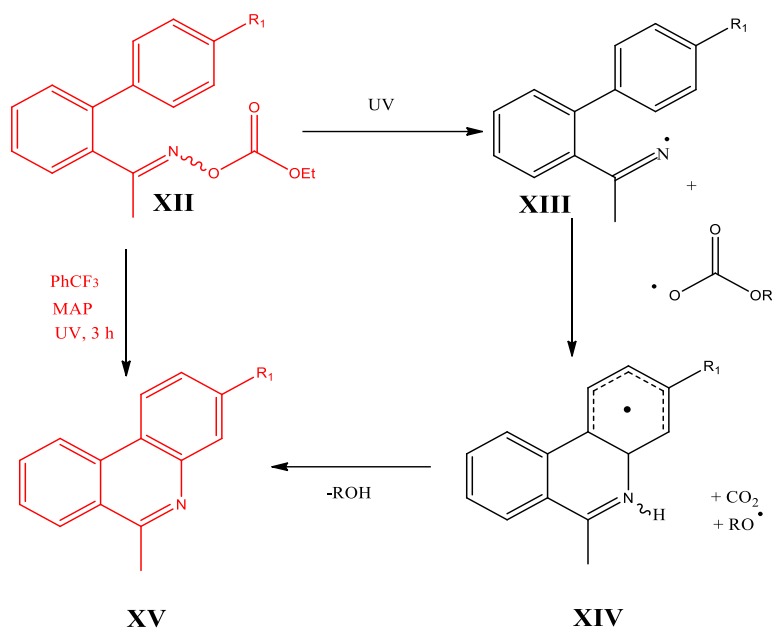
Shema 2. Radikalna sinteza 6-arilfenantridina iz derivata benzotriazola. Crveno su prikazani početni i krajnji produkt, a crno je prikazan cijeli mehanizam nastanka fenantridinskog derivata.

Metoda sinteze 6-arilfenantridinskih derivata pomoću imidoilnih radikala razvijena je 80-ih godina prošlog stoljeća,<sup>48</sup> međutim iz sigurnosnih razloga je modificirana te se za provedbu koristi *tert*-butoksilni radikal ( $t\text{-BuO}^\bullet$ ).<sup>50</sup> Mehanizam za stvaranje fenantridina je homolitička aromatska supstitucija. *Tert*-butoksilni radikal oduzima vodikov atom s imina **VIII** i stvara imidoilni radikal **IX** koji podliježe ciklizaciji sa susjednim fenilnim prstenom. Novi *tert*-butoksilni radikal oduzima vodikov atom čime nastaje dvostruka veza i generira se aromatska triciklička struktura **X** te iz nje fenantridin **XI** (shema 3).



Shema 3. Mehanizam radikalске homolitičke aromatske supstitucije pri sintezi 6-arilfenantridina iz diariliminskih prekursora.

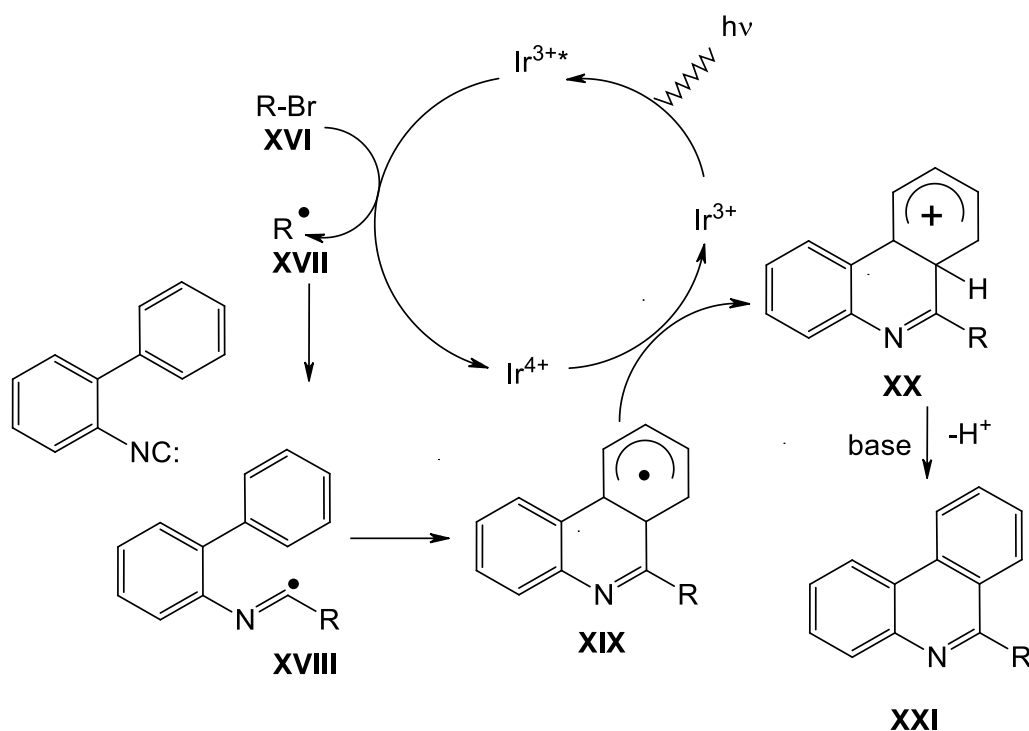
McBurney i suradnici upotrebljavaju oksim-karbonate kao prekursore za fotoinducirano stvaranje iminilnih radikala u sintezi heterocikala.<sup>54</sup> Predložen je mehanizam (shema 4) u kojem se slaba N-O veza homolitički cijepa, te nastaje iminilni radikal. Dolazi do intramolekulske ciklizacije iminilnog radikala **XIII** te se stvara cikloheksadienilni radikal **XIV**. Zatim se vodikov atom prenosi na etoksilni radikal, čime se konačno dobiva fenantridinski produkt **XV**. Njihova metoda pokazala je da su oksim-karbonati pogodni i čisti prekursori radikala. Sintaza je jeftina i jednostavna, a nusprodukti koji nastaju su bezopasni i lako se otklanjaju (ugljičkov dioksid, etanol ili fenol).<sup>54</sup>



Shema 4. Mehanizam nastanka fenantridinskog derivata **XV** fotolizom derivata **XII** pri sobnoj temperaturi. Crveno je prikazana sažeta reakcija.

Jiang i suradnici proveli su fotokonverziju različitih izocijanida u alkilirane derivate fenantridina uz vidljivo svjetlo te iridijev fotokatalizator.<sup>55</sup> Njegova je uloga fotoinducirano nastanjanje alkilnog radikala R (**XVII**). Alkilni radikal R (**XVII**) prolazi kroz intramolekulsku homolitičku aromatsku supstituciju (engl. *Intramolecular homolytic aromatic substitution*, HAS) te potom dolazi do oksidacije radikala **XIX** u kationski intermedijar **XX** (taj oksidacijski proces obnavlja katalizator). Deprotoniranjem kationskog intermedijara dobiva se 6-alkilirani fenantridin (**XXI**) u dobrom iskorištenju (shema 5). Ova je metoda povoljna zbog odvijanja na sobnoj temperaturi te je ekološki prihvatljiva. Izocijanidi su jeftini i lako dostupni, a jedini nusprodukt koji nastaje reakcijom je bromovodik koji se lako uklanja.





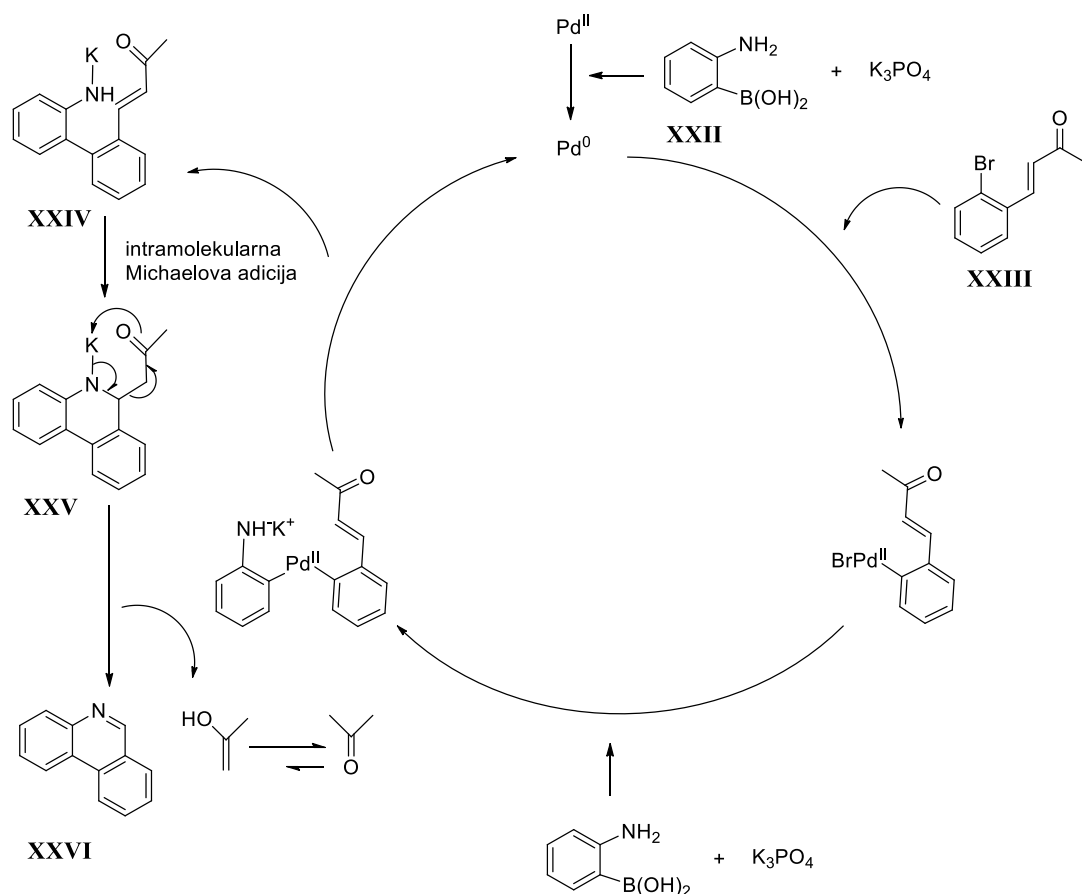
Shema 5. Fotoinducirana metoda pripreve 6-alkiliranih fenantridinskih derivata primjenom iridijevog fotokatalizatora.

### 2.3.1.2. Sinteza katalizirana prijelaznim metalima

Sinteza katalizirana prijelaznim metalima omogućuje dobivanje različitih fenantridinskih derivata iz relativno jeftinih i sintetski lako dostupnih polaznih spojeva kao što su benzil amini, aril jodidi ili imini. Prednost ove metode je stereo- i regioselektivnost te priprema fenantridina višestruko supstituiranih različitim supstutentima. Kao katalizatori najčešće se koriste paladijevi kompleksi što čini ovu metodu znatno skupljom te manje ekološki prihvatljivom od radikalne sinteze.<sup>56</sup>

Pearson i suradnici objavili su dvostupanjsku sintezu fenantridina temeljenu na paladijem kataliziranim pikolinamidima iz lako dostupnih prekursora (benzil-amina i aril-jodida).<sup>57</sup> Također, Bowman i suradnici osim dobivanja fenantridina homolitičkom aromatskom supstitucijom, pronašli i metodu sinteze fenantridina uz paladij kao katalizator. Međutim na istim su derivatima dobili bolje prinose radikalnom metodom sinteze.<sup>50</sup> Ghosh i suradnici pokazali su da se supstituirani fenantridini mogu pripraviti pomoću aerobne Suzuki reakcije katalizirane nanočesticama paladija stvorenim *in situ* nakon čega slijedi intramolekulska Michaelova adicija (shema 6).<sup>58</sup> β-(2-bromaril)-α,β-nezasićeni karbonilni derivat **XXIII** u reakciji s 2-aminofenil bornom kiselinom **XXII** uz dodatak paladijevih nanočestica i kalijeva

fosfata, koji služi kao baza i stabilizator paladijevih nanočestica, Suzukijevom reakcijom daje derivat **XXIV**. Borna kiselina **XXIII** služi kao redukcijsko sredstvo, a paladijeve nanočestice kao katalizator reakcije. Derivat **XXIV** nastao Suzukijevom reakcijom podliježe reakciji intramolekularne Michaelove adicije. Nastali međuprodukt **XXV** kataliziran je in situ generiranim paladijevim nanočesticama kako bi se konačno dobio fenantridinski derivat **XXVI**. Nedostaci ove metode su visoka cijena paladija i slaba ekološka prihvatljivost zbog čega su istraživanja zadnjih deset godina usmjerena na zamjenu paladija željezom.<sup>49</sup> Uvođenjem homolitičke aromatske supstitucije (HAS) uz organo-katalizator, napravljen je iskorak prema jeftinijoj i ekološki prihvatljivijoj sintezi pomoću prijelaznih metala.



Shema 6. Predloženi mehanizam aerobne Suzuki reakcije povezivanja u kombinaciji s Michaelovom adicijom u prisustvu paladijevog katalizatora i kalijevog fosfata kao baze.<sup>58</sup>

Homolitička aromatska supstitucija (HAS) arilnim radikalom uvedena je kao alternativa arilaciji C-H veze kataliziranoj prijelaznim metalom, zbog čega je implementirana u dvokomponentnoj ciklizaciji derivata fenantridina.<sup>59</sup> Sintaza obuhvaća reakciju izocijanidnog bifenila s fenilnim radikalom (sličan radikal **XVIII** u shemi 5), koji je generiran iz fenilboronske kiseline i manganovih soli, te dolazi do ciklizacije i aromatizacije. Međutim,

mana pripreve HAS-om je ograničenost na nekoliko fenantridinskih derivata i benzofenantridina.

Sinteza uz korištenje slobodnih radikala idealna je za dobivanje 6-aril ili 6-alkilfenantridinskih derivata, dok se metodom prijelaznih metala mogu pripremiti fenantridini s polisupstituiranim bočnim fenilima. Oba načina imaju vrlo visoka iskorištenja reakcije (50 – 90 %), no sinteza u radikalskim uvjetima je jeftinija u odnosu na onu u kojoj se koriste prijelazni metali.

### 2.3.2. Spektroskopska svojstva fenantridina i utjecaj supstituenata na vezanje na nukleinske kiseline

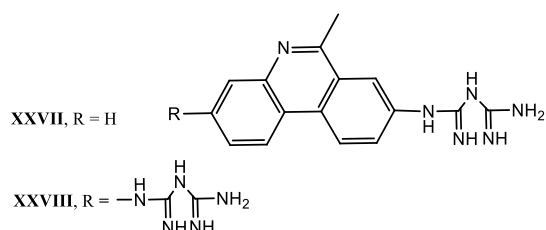
Lerman je prvi predložio da planarni policiklički aromatski heterocikli imaju sposobnost interkaliranja između dva susjedna para baza u dvolančanoj molekuli DNA.<sup>60</sup> Nabijeni aromatski heterocikli su najčešći tip interkalatora koji se nekovalentno veže na strukture nukleinskih kiselina.<sup>61</sup>

Etidijev bromid posjeduje sve strukturne značajke važne u svojoj klasi: veličina i zakrivljenost aromatske površine koja odgovara obliku para baza, pozitivan naboj (gotovo idealno delokaliziran u cijelom aromatskom sustavu), visoka polarizabilnost, visok afinitet prema elektronu (etidijev bromid i drugi kationski interkalatori dobri su akceptori elektrona) i vrlo polarne amino skupine omogućuju dobro vezanje na polinukleotide aromatskim  $\pi$ - $\pi$  interakcijama i vodikovim vezama.<sup>61,62</sup> Primjer je tipičnog interkalatora koji se sastoji od heterocikličke aromatske molekule s bočnim amino skupinama.<sup>63</sup> Razumijevanje sposobnosti interkalacije i porasta kvantnog prinosa prilikom vezanja etidijeva bromida na polinukleotide od velike je važnosti za razvoj novih i poboljšanih fluorescentnih interkalatora za molekularnu dijagnostiku s DNA i RNA. Prilikom interkaliranja spoja u polinukleotid vjerojatno dolazi do desolvatacije amino skupina na položajima 3 i 8 fenantridina, te je stoga porast fluorescencije nakon vezanja spoja u polinukleotidni lanac pripisan smanjenoj brzini prijenosa protona s pobuđene molekule interkalatora na molekule vode.<sup>61,64,65</sup> Djelomični pozitivni naboji koje nose etidijevi egzociklički amini važni su u interakcijama elektrostatskog privlačenja i stvaranja vodikovih veza s fosfatnim skupinama DNA.<sup>66,67</sup> Supstitucija egzocikličkih fenantridinskih amino skupina dramatično utječe i na afinitet/specifičnost nukleinske kiseline i na elektronska svojstva: derivati fenantridina koji imaju supstituentne sa slabijim elektron-donorskim svojstvima pokazali su veći kvantni prinos fluorescencije od etidijevog

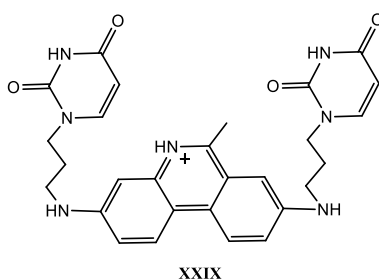
bromida.<sup>67</sup> Fenantridinski derivati s dvije amino skupine na položajima 3 i 8 rezultiraju slabom fluorescencijom te jakim povećanjem emisije nakon vezanja u molekule DNA.<sup>11,61,64</sup>

Povećanje selektivnosti prema određenim sekvencama ili strukturnim polinukleotidnim motivima moguće je dizajniranjem hibridnih, višenamjenskih malih molekula konstruiranih od nekoliko DNA/RNA veznih motiva.<sup>68,69</sup> Takva molekula sadržava: a) jedan ili više DNA/RNA interkalatora ili jedinica s visokim afinitetom prema utoru molekula DNA/RNA;<sup>68,69</sup> b) kovalentno vezanu nukleobazu za stvaranje Watson-Crick-ove ili nekanonske vodikove veze s DNA/RNA bazama;<sup>68,69</sup> c) poveznicu između interkalatora i nukleobaze, koja bi mogla kontrolirati udaljenost i fleksibilnost male molekule i aktivno sudjelovati u prepoznavanju slijeda nukleinskih kiselina<sup>68,69</sup> i d) peptidni interkalator koji posjeduju prednosti obje skupine spojeva za vezanje na nukleinske kiseline.<sup>68,69</sup>

Supstitucija egzocikličkih amina etidijeva bromida gvanidinima pretvorila je klasični interkalator u ligand koji se veže u manji utor DNA.<sup>70</sup> Afinitet liganda s gvanidinskim supstituentima prema AT bogatim sekvencama DNA bio je znatno jači u usporedbi s etidijevim bromidom.<sup>70</sup> 6-metilfenantridinski derivati **XXVII** i **XXVIII** s bigvanidnim skupinama na položaju 3 i/ili 8 uspješno razlikuju nealternirajuće strukture poli dA-poli dT i poli dG-poli dC različitim odgovorom u fluorescencijskoj spektroskopiji, te različitim odgovorom u spektroskopiji cirkularnog dikroizma (CD) razlikuju DNA i RNA polinukleotide.<sup>71</sup>

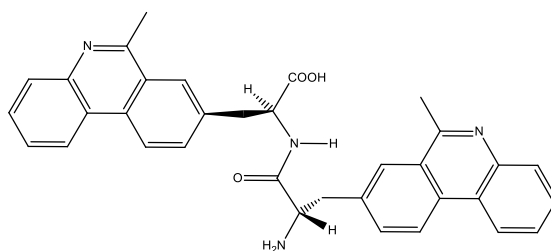


Sintetizirani su derivati fenantridina s nukleobazama kao supstituentima.<sup>72,73</sup> Adeninski derivat fenantridina prepoznao je komplementarni uracilni slijed u blago kiselom vodenom mediju.<sup>74</sup> Također, bis-uracilni derivat 6-metilfenantridina **XXIX** prepoznao je AT sekvencu kombinacijom aromatskog slaganja i vodikovih veza.<sup>75</sup>



Serijski aminokiseline s fenantridinom na bočnom lancu pripravljen je metodom sinteze na čvrstom nosaču<sup>76</sup> te je dobiven bis-fenantridinski derivat **XXX** s kratkom, rigidnom

poveznicom. On je dao specifični fluorescentni odgovor uslijed stvaranja intramolekulskog ekscimera u vodenoj otopini, što je prvi takav slučaj opisan kod fenantridinskih derivata.<sup>77</sup>



XXX

Osim zanimljivog fluorescentnog odgovora derivat **XXX** pokazao je dobru topljivost i slabu toksičnost što ga čini pogodnim fluorescentnim markerom za strukture DNA i RNA.

Amidne veze sudjeluju u izgradnji i sastavu bioloških sustava. One predstavljaju glavne kemijske veze koje povezuju građevne blokove aminokiselina zajedno dajući proteine koji igraju ključnu ulogu u gotovo svim biološkim procesima (enzimska kataliza, transport/skladištenje, imunološka zaštita).<sup>78</sup> Amidne veze također igraju ključnu ulogu u farmaceutskoj industriji budući da se karboksamidna skupina pojavljuje u više od 25 % poznatih lijekova.<sup>79</sup>

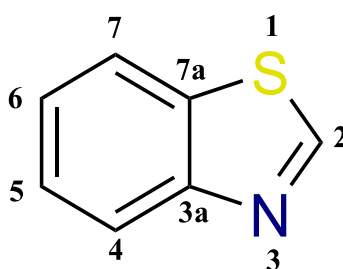
Triptofan ima hidrofobni karakter i jedinstvena fizikalno-kemijska svojstva.<sup>80</sup> Triptofan ima uloge u staničnim funkcijama i u posrednom metabolizmu, kao što su translacija, struktura proteina, stvaranje adukta, stvaranje važnih regulatora i regulacija RNA virusa. Često se susreće u membranskim proteinima gdje igra ključnu ulogu u održavanju njihove održavanju njihove strukture i orijentaciji lipidnog dvosloja.<sup>81</sup> Sastoji se od aromatske površine (indol) koja pridonosi snažnim nekovalentnim interakcijama s utorima nukleinskih kiselina.<sup>82,83</sup>

Interkalatori s amidnom vezom kombiniraju značajke obje strukturne podjedinice: interkalatorske jezgre i supstituenta vezanog amidnom vezom. Interkalatorska jezgra sastavljena je od tri ili više kondenziranih aromatskih prstenova veže se aromatskim interakcijama slaganja na polinukleotid, ali je slabo preferencijalna prema određenim sekvencama nukleinskih kiselina.<sup>84</sup> Glavna ideja povezivanja interkalatora s aminokiselinama amidnom vezom je povećanje selektivnosti prema određenoj DNA ili RNA meti zbog interakcija aminokiselinske podjedinice unutar utora nukleinskih kiselina.<sup>69</sup>

U ovom radu istražili smo utjecaj derivata 6-metilfenantridina na koje je na poziciji 3 i/ili 8 amidnom vezom vezana aminokiselina triptofan.

## 2.4. Benzotiazoli

Benzotiazol je biciklički prstenasti sustav sastavljen od tiazolnog i benzenskog prstena (slika 8) koji je prisutan kao važan farmakofor u mnogim lijekovima s antimikrobnim, antitumorskim, antivirusnim, protuupalnim, antihistaminičkim te antioksidativnim svojstvima.<sup>85,86</sup> Značajni potencijal benzotiazola kao terapijskog sredstva potaknuo je sve veći interes za razvoj lijekova na bazi benzotiazola posljednjih godina, što je rezultiralo brojnim novim patentnim prijavama i otvara put dizajnu novih generacija lijekova s benzotiazolnim derivatima kao ključnim farmakoforima.<sup>87,88,89,90</sup> Arilbenzotiazoli, primjerice, pokazuju odličnu aktivnost u neinvazivnoj dijagnostici Alzheimerove bolesti.<sup>91</sup>



Slika 8. Općenita struktura benzotiazola.

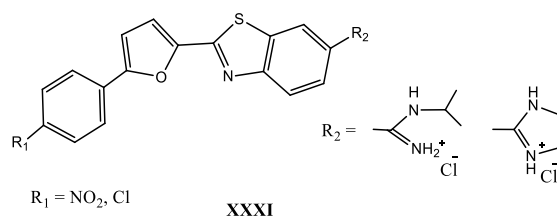
### 2.4.1. Interakcije benzotiazolnih derivata s nukleinskim kiselinama

Utvrđeno je da dvovalentni atomi sumpora u heterocikličkoj jezgri povećavaju afinitet za vezanje liganda na nukleinske kiseline.<sup>85</sup> Benzotiazoli posjeduju mnoge biološke aktivnosti i nalaze se u biološki aktivnim molekulama i mnogim lijekovima (vitamin B1, sulfatiazol (antimikrobni lijek), ritonavir (antiretrovirusni lijek), abafungin (antimikotik) i tiazofurin (antineoplastični lijek)) što je zanimljivo za njihovo ispitivanje interakcija s DNA, RNA te proteinima.<sup>92</sup>

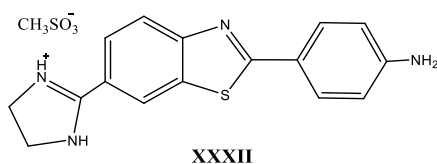
Supstituenti vezani na benzotiazolnu jezgru utječu na afinitet i selektivnost vezanja na nukleinske kiseline. Amidini vezani na benzotiazol pridonose stabilnosti kompleksa nukleinska kiselina/ligand putem vodikovih veza i elektrostatskih interakcija. Amidinska skupina usmjerava heteroaromatski derivat prema vezanju na elektronegativno nabijenu strukturu nukleinske kiseline. Na sličan način na strukture nukleinskih kiselina vežu se i drugi aromatski policiklički spojevi poput berenila, pentamidina, i furamidina.<sup>86,91</sup>

Racané i suradnici pokazali su da derivati benzotiazola supstituirani amidinom **XXXI** pokazuju preferencijalno vezanje na AT bogatu sekvencu DNA, te se vežu u njen manji utor.<sup>86,89</sup> S druge

strane, neki derivati amidino benzotiazola pokazali su preferencijalno vezanje interkalacijom na dvolančanu strukturu RNA i *ct*DNA.



Spoj s cikličkom amidino skupinom (2-imidazolinil) na benzotiazolskom prstenu preferencijalno se interkalirao na strukturu RNA, poli rA-poli rU, te se vezao i u mali utor AT sekvence DNA.<sup>93</sup> Amidino-imidazolil-2-fenil benzotiazolni derivat **XXXII** preferencijalno se vezao na RNA i na AT sekvencu te je pokazao najmanju toksičnost u *in vivo* eksperimentima na miševima.<sup>93</sup>



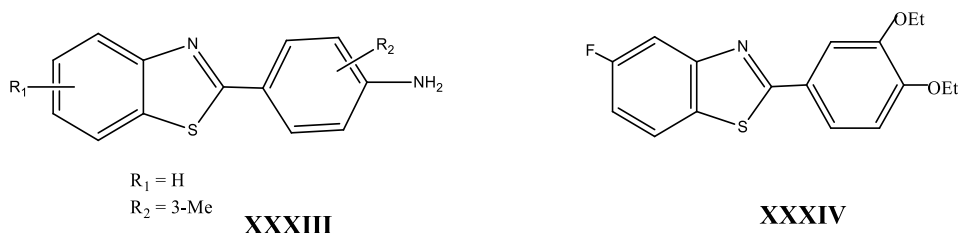
Svi ispitivani derivati furan-benzotiazola, bez obzira na supstituente, vežu se u obliku agregata na alternirajuću strukturu AT DNA (poli(dAdT)<sub>2</sub>).<sup>86</sup>

#### 2.4.2. Biološka svojstva benzotiazolnih derivata

Položaj i vrsta supstituenata na benzotiazolskoj jezgri utječu na interakciju s nukleinskim kiselinama i na biološka svojstva benzotiazola.

Derivati 2-arilbenzotiazola pokazali su zanimljivo antitumorsko djelovanje.<sup>91,94,94,95</sup> Osim antitumorskog djelovanja utvrđena su i njihova antimikotička, antimalarijska i protuupalna svojstva.<sup>96</sup>

Antimikrobna svojstva dikationskih molekula s amidinskim supstutientima sličnim pentamidinu proučavana su od početka 20. stoljeća. Spojevi su pokazali djelovanje protiv niza patogena.<sup>97,98</sup> Racáné i suradnici pokazali su da se ugradnjom jednog ili dva pozitivno nabijena amidinska ostatka na kraju heteroaromatskih derivata benzotiazola može značajno poboljšati njihova biološka aktivnost.<sup>86</sup> Shi i suradnici pripravili su 2-(4-aminofenil) benzotiazol **XXXIII** koji je pokazao preferencijalni učinak prema staničnim linijama raka dojke.<sup>99</sup>

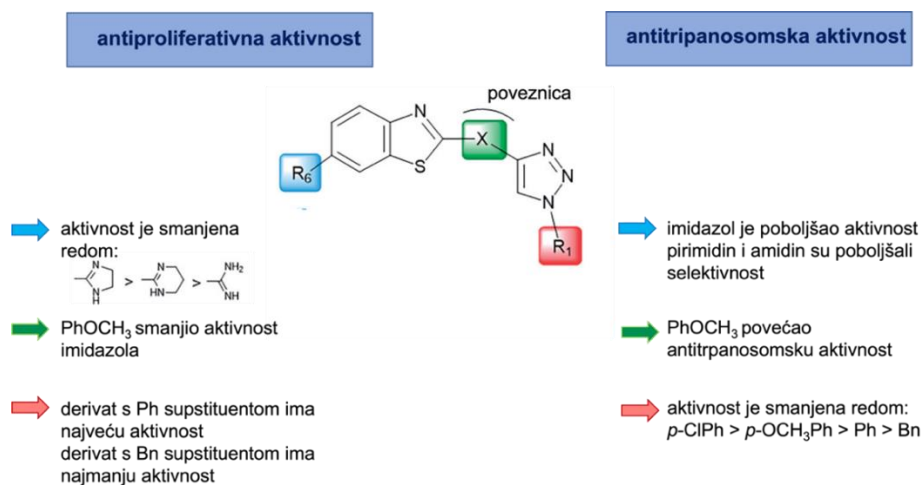


Mortimer i suradnici sintetizirali su 2-(3,4-dimetoksifenil)5-fluorobenzotiazol **XXXIV** koji je pokazao snažan i selektivan učinak na stanične linije raka pluća, debelog crijeva i dojke.<sup>100,87</sup>

Derivati benzotiazola i benzimidazola supstituiranih s karboksamido, amino, halogeno, cijano, amidino, amino ili nitro skupinama smještenim na različitim položajima na benzotiazolskoj jezgri pokazali su antiproliferativno djelovanje.<sup>101,102</sup> Najznačajniji biološki učinak dali su amidino supstituirani benzazoli kod kojih je amidinska skupina nesupstituirana ili supstituirana izopropilom, morfolinilom ili imidazolinilom.<sup>85</sup>

Karminski-Zamola i suradnici sintetizirali su seriju novih hibridnih derivata benzotiazola koji nose niz heterocikla, kao što su furan, benzofuran tiazol, benzotiazol, pirol, indol, imidazol, piridin i kinolin kako bi proučili strukturnu ovisnost aril/heteroarilne skupine spojene na položajima od 2- do 6-(2-imidazolinil) benzotiazola.<sup>87</sup> Dobiveni rezultati pokazali su da svi testirani spojevi imaju jaku do umjerenu antiproliferativnu aktivnost na testiranim staničnim linijama u ovisnosti o aril/heteroarilnom ostatku povezanom s 6-(2-imidazolinil) benzotiazolnim ostatkom.<sup>87</sup>

Benzotiazoli s amidinima kao hidrofilnim krajem i aromatskim supstituentom  $R_1$ , ispitani su na tumorskim staničnim linijama i parazitu *Trypanosoma brucei* (slika 9). Neki su derivati povezani preko fenoksimetilena dok su drugi izravno spojeni na 1,2,3-triazolni prsten s *p*-supstituiranim fenilnim ili benzilnim ostatkom.



Slika 9. Odnos strukture i aktivnosti na antiproliferativno i antitripanosomsko djelovanje 2 – arilbenzotiazol amidina (slika preuzeta i modificirana).<sup>89</sup>



Opažen je utjecaj vrste amidino supstituenta i fenoksimetilenske poveznice na antiproliferativne i antitripanosomalne aktivnosti, što pokazuje da imidazolinski dio ima veliki utjecaj na obje aktivnosti. Benzotiazol imidazolin, koji je bio izravno povezan s *N*-1-fenil-1,2,3-triazolom, imao je najjači inhibitorski učinak na stanice adenokarcinoma crijeva (SW620), dok je benzotiazol imidazolin, koji sadrži fenoksimetilen kao poveznicu, pokazao najbolji antitripanosomalni učinak.<sup>89</sup>

Višak reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) ima ključnu ulogu u patogenezi raznih kroničnih bolesti, poput upalnih procesa, raka, neurodegenerativnih bolesti ili dijabetesa, jer oštećuje biomakromolekule poput proteina, lipida ili DNA/RNA.<sup>103</sup> Stoga je važan razvoj i ispitivanje novih moćnih antioksidativnih molekula koje se mogu koristiti u liječenju raznih bolesti.

Dosadašnja istraživanja s različitim derivatima benzotiazola pokazala su da benzotiazoli imaju dobru antitumorsku i antioksidativnu aktivnost, te varijacija supstituenta na C-6 položaju benzotiazolnog dijela značajno modificira antitumorsku aktivnost u ispitivanim stanicama raka.<sup>104</sup>

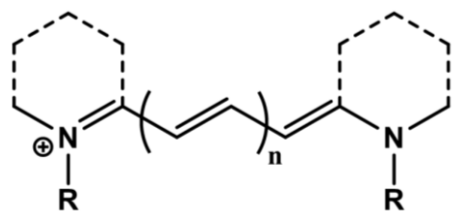
## 2.5. Cijaninske boje

Prije skoro 170 godina Williams je sintetizirao plavu krutinu čime je prvi put zabilježena sinteza cijaninskih boja.<sup>105</sup> Njihova prva primjena bila je u tekstilnoj industriji i fotografiji, a danas se koriste u različitim područjima kao fluorescentne probe i senzori za biološka oslikavanja i detekciju. Veliki interes vlada za aromatske kationske boje koje mogu prodirjeti kroz stanične membrane. Tendencija takvih lipofilnih kationskih boja da se prvenstveno zadržavaju u mitohondrijskom prostoru čini ih važnom skupinom fluorescentnih proba za proučavanje mitohondrijskog lipidnog dvosloja, membranske propusnosti i specifičnog bojenja ovih organela.<sup>106</sup>

Sintetske cijaninske boje su slabo toksične i stabilne su prema kemijskoj razgradnji, što pogoduje njihovoj upotrebi u stani. Osim toga, ova klasa spojeva pokazuje izvrsnu biokompatibilnost dok je podložna različitim kemijskim modifikacijama. Cijaninske boje su istraživane kao fluorescentne probe za promatranje trodimenzionalnih svojstava savijanja G-kvadrupleksnih struktura, a boje koje se temelje na benzotiazol heterocikličkom sustavu pokazale su inhibiciju telomeraze.<sup>107</sup>

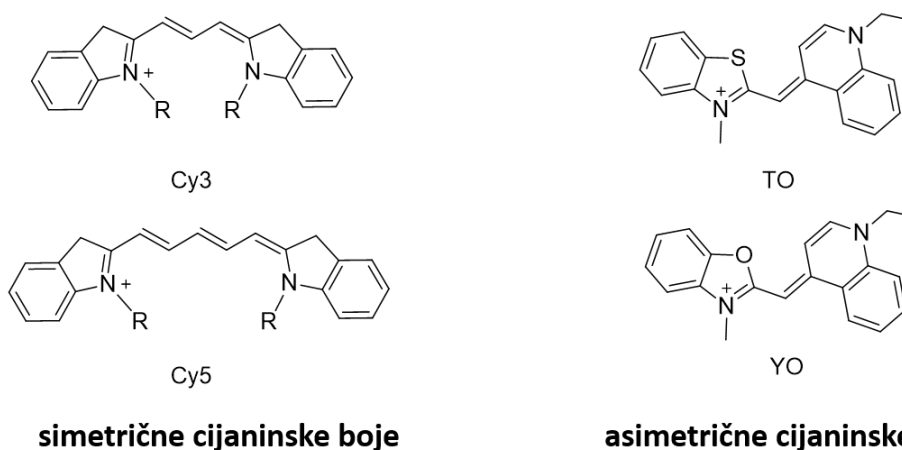
Iako su strukturno prilično raznolika klasa spojeva, većina cijaninskih boja su pozitivno nabijene molekule s dva krajnja heterocikla koji sadržavaju atom dušika i međusobno su

povezani polimetinskim mostom (slika 10). Most se sastoji od neparnog broja ugljika što omogućuje rezonantnu delokalizaciju pozitivnog naboja između dva dušika.<sup>108,109</sup>



Slika 10. Općenita struktura cijaninskih boja u kojoj su dva heterocikla povezana polimetinskim mostom.

Boje se mogu podijeliti na simetrične (isti heterocikli) i asimetrične (različiti heterocikli) prema tome posjeduju li iste ili različite heterocikle u strukturi. Najčešće heterocikličke podjedinice cijaninskih boja su indol, kinolin, benzoksazol te benzotiazol.<sup>109</sup> Ove dvije vrste cijaninskih boja razlikuju se prema spektroskopskim svojstvima i interakcijama s nukleinskim kiselinama. Simetrične boje našle su niz primjena, uključujući staničnu mikroskopiju i protočnu citometriju. Nesimetrične cijaninske boje intenzivno se koriste kao senzori, posebno u detekciji nukleinskih kiselina.<sup>110</sup> Primjer simetričnih cijaninskih boja su fluorescentne probe Cy3 (zeleno fluorescencija) i Cy5 (crvena fluorescencija), dok su najčešće korištene asimetrične cijaninske boje tiazol-narančasto (TO) i oksazol-žuto (YO) (slika 11). Još jedna podjela cijaninskih boja je prema broju metinskih skupina koje se nalaze u polimetinskom mostu. Na slici 11, cijanin s  $n = 0$  je monometin i toj skupini pripadaju TO i YO. Spoj s  $n = 1$  je trimetin, takav primjer je Cy3 dok je Cy5 primjer pentametina ( $n = 2$ ).<sup>109,111</sup>



Slika 11. Prikaz različitih simetričnih i asimetričnih cijaninskih boja.

### 2.5.1. Interakcija cijaninskih boja s nukleinskim kiselinama

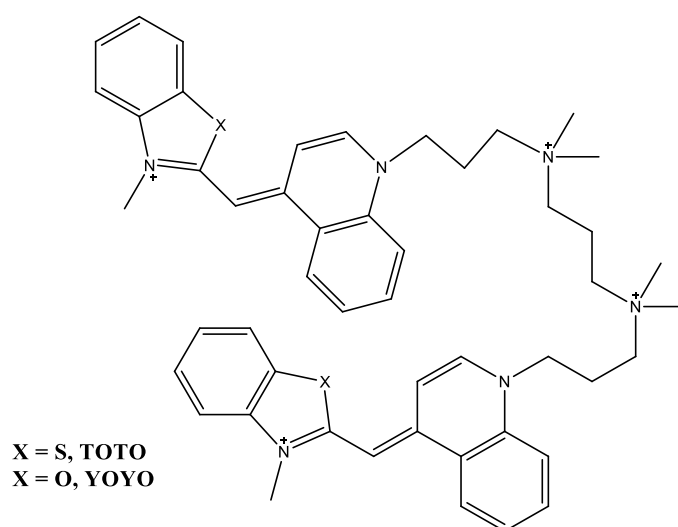
Planarni heterocikli i pozitivan naboj pogoduju interkalaciji dok se polufleksibilni polimetinski most može prilagoditi vezanju u manji utor.

U ovom radu ispitane su interakcije polinukleotida s nekoliko derivata boje tiazol-narančasto koji pripadaju asimetričnim cijaninskim bojama.

Tiazol-narančasto (TO) i njegovi analozi su asimetrični cijanini koji sadrže dva različita heterociklička prstena, benzotiazolni i kinolinski, koji su povezani mostom s jednom metinskom skupinom.<sup>109</sup> Literaturno su otkrivena dva načina vezanja karakteristična za dimer tiazol-narančastog (TOTO). Prvi je bisinterkalacija između parova baza, koja je favorizirana pri visokom omjeru DNA baza/boja, to jest, kada je koncentracija boje niža u usporedbi s koncentracijom parova baza DNA. Spektroskopija NMR pokazuje da kromofor leži preko parova baza s benzotiazolnim prstenom između pirimidina i kinolinskim prstenom između purina. Osim interkalacije, vidljivo je i vezanje u utor pri niskim omjerima baza DNA/boja. Povećanjem duljine mosta, cijaninske boje postaju strukturno sličnije klasičnim ligandima koji se vežu u manji utor.<sup>112,113</sup>

Promjena duljine polimetinskog lanca, te dodavanje različitih supstituenata na heterocikličke jezgre može utjecati na različit način vezanja asimetričnih cijaninskih boja na nukleinske kiseline.<sup>109,114</sup>

Rožman i suradnici pokazali su da kloro-supstituenti na cijaninskom kromoforu dimernih boja TOTO i YOYO (slika 12) rezultiraju boljim vezanjem na strukture DNA i RNA u odnosu na neklorirane spojeve TOTO i YOYO, kao i u odnosu na odgovarajuće monomere (TO, YO).



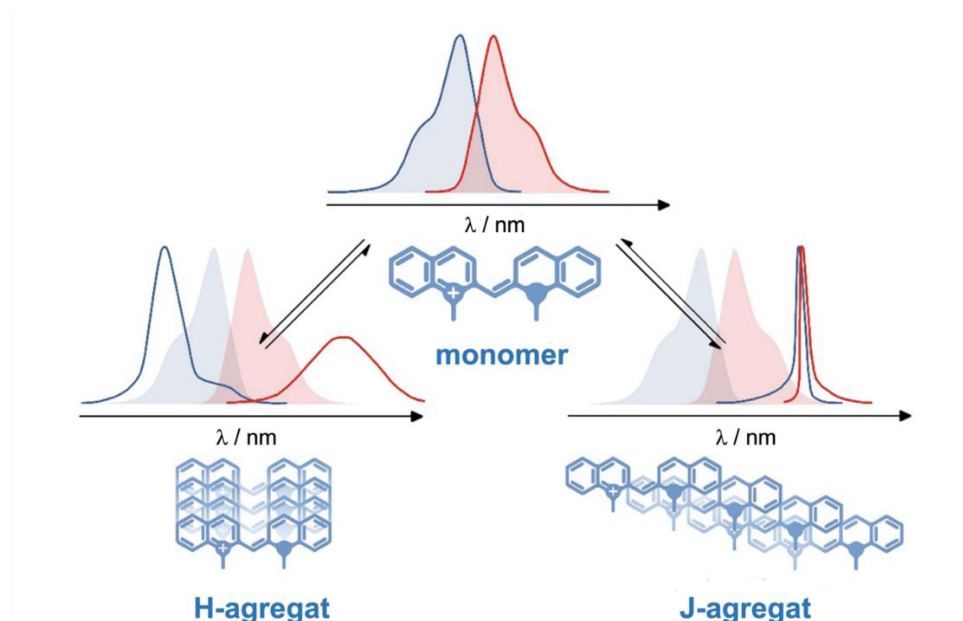
Slika 12. Prikaz TOTO i YOYO boja.

Također su pokazali da se klorirani derivati TOTO i YOYO boja preferencijalno i bolje vežu na strukturu RNA. Osim toga pokazano je da klorirani derivat TOTO može razlikovati alternirajuću od nealternirajuće AT sekvence DNA.<sup>115</sup> Crmolatac i suradnici pokazali su da voluminozni i dugački supstituenti vezani za dužu os molekule poput fosfonijevih supstituenata utječu na vezanje molekule u manji utor molekule DNA te smanjuju biološku aktivnosti.<sup>114</sup>

### 2.5.2. Spektroskopska svojstva cijaninskih boja

Asimetrične cijaninske boje imaju zanemarivo nizak kvantni prinos fluorescencije u vodenim otopinama zbog intramolekulske rotacije oko metinskog mosta.<sup>109</sup> Do gašenja fluorescencije dolazi uslijed brze relaksacije iz pobuđenog stanja kroz torzijsko gibanje polimetinskog mosta. Fluorescencijska emisija raste kada je rotacija oko monometinskog mosta između dva heterociklička dijela ograničena, uslijed agregacije, vezanja na nukleinske kiseline ili proteine, te povećane viskoznosti medija.<sup>17,18</sup> S obzirom na visoki porast kvantnog prinosa fluorescencije prilikom vezanja na polinukleotide asimetrične cijaninske boje koriste se kao fluorescentni senzori.

Cijaninske boje sklone su stvaranju agregata u vodenom mediju zbog svoje hidrofobnosti i polarizabilnosti. Dvije vrste agregata opisane su kao H-tip i J-tip koji se razlikuju po načinu na koji se molekule slažu jedna na drugu. Za nesupstituirane cijaninske boje najpovoljnije je nastajanje agregata H-tipa jer ova vrsta agregata stvara najveći mogući broj Van Der Waalsovih veza te je izloženost cijanina molekulama vode minimalna. S druge strane, supstituirane cijaninske boje potiču stvaranje J-tipa agregata, zbog utjecaja prostornih ili elektrostatičkih čimbenika.<sup>17,109</sup> Ove dvije vrste agregata mogu se razlikovati po svojim karakterističnim apsorpcijskim spektrima. H-agregati nastaju slaganjem molekula cijaninskih boja jedna uz drugu i pokazuju hipsokromni pomak (slika 13). Ova vrsta agregata najstabilnija je među cijaninskim agregatima. S druge strane, J-agregati se sastoje od molekula složenih s pomakom u odnosu na dulju os, te se javlja batokromni pomak u apsorpcijskom spektru u odnosu na monomer (slika 7).<sup>116</sup> Stabilnost J-agregata jako ovisi o koncentraciji boje. Cijaninske boje rjeđe stvaraju J-tip agregata.



Slika 13. Shematski prikaz promjena u spektrima apsorpcije (plavo) i fluorescencije (crveno) pri stvaranju H- i J-agregata cijaninskih boja (slika preuzeta i modificirana).<sup>117</sup>

Osim u otopini, cijanini stvaraju agregate u utorima nukleinskih kiselina, poput manjeg utora dvolančane strukture DNA i većeg utora dvolančane RNA.<sup>118</sup> Stvaranje agregata može se potvrditi spektroskopijom cirkularnog dikroizma jer se stvara karakteristični bisignatni inducirani CD signal u apsorpcijskom području boje.<sup>119</sup>

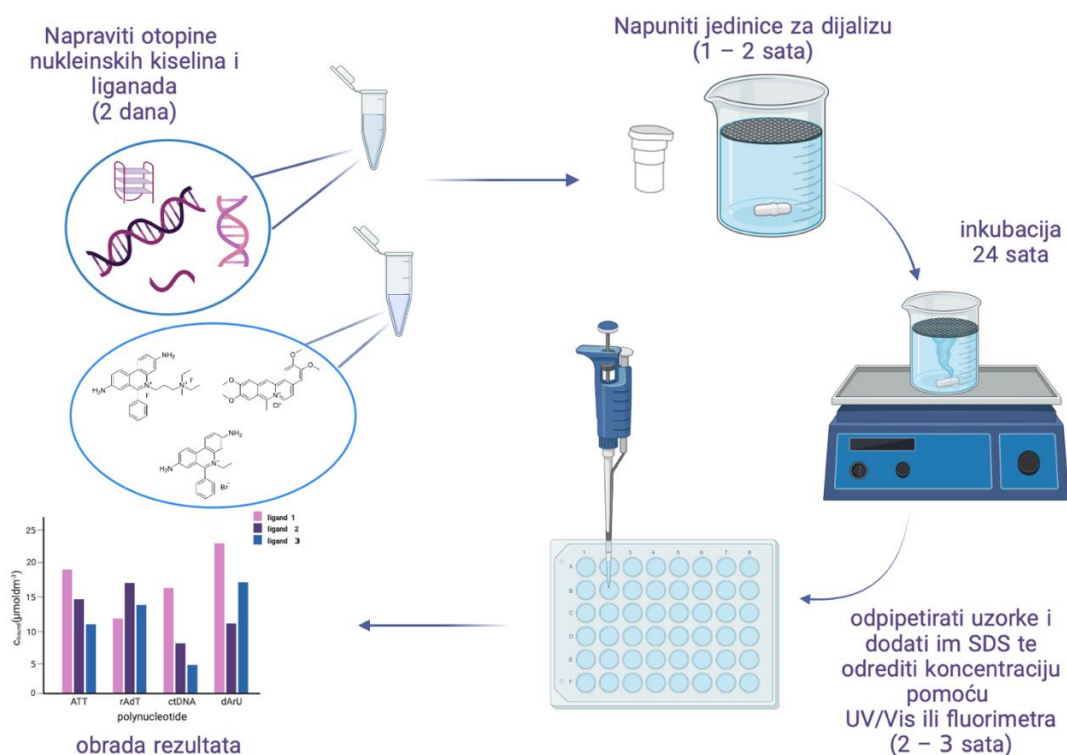
## 2.6. Metode brzog probira

Metode brzog probira važne su za ispitivanje selektivnosti malih molekula prema strukturama/sekvencama hibridnih dvolančanih molekula DNA:RNA, jer se istovremeno može ispitati velik broj liganada i polinukleotidnih struktura i probirati kandidate koji pokazuju visoki afinitet i/ili selektivnost prema određenoj polinukleotidnoj formi ili sekvenci. Sve tri korištene metode opisane u ovom poglavlju, su spektrofotometrijske i izravno detektiraju ili ligand ili nukleinsku kiselinu.

### 2.6.1. Kompeticijska dijaliza

Kompeticijska dijaliza (engl. *Competition Dialysis assay*) je pogodan alat za ispitivanje afiniteta vezanja na nukleinske kiseline kod skupina sličnih spojeva. Ona se temelji na termodinamičkom principu ravnotežne dijalize i daje informaciju o sklonosti i selektivnosti ispitivanog liganda na vezanje s različitim polinukleotidnim lancima.

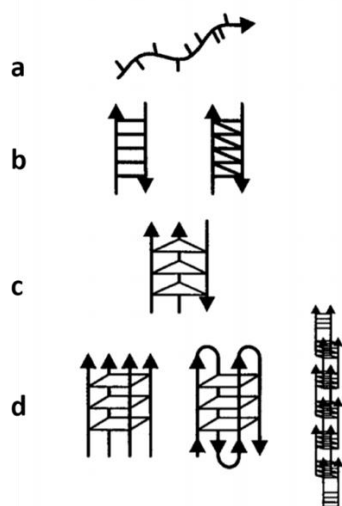
Osnovno načelo kompeticijske dijalize je difuzni protok jednog ili više otapala kroz polupropusnu membranu. One molekule koje su veličinom manje od pora membrane slobodno mogu prolaziti, dok se veće molekule zadržavaju. U kompeticijskoj dijalizi nekoliko je različitih nukleinskih kiselina iste, točno određene, koncentracije smješteno u zasebne jedinice za dijalizu koje se nalaze unutar posude u koju je smještena otopina s ligandom u određenoj koncentraciji. Nukleinske kiseline zbog svoje veličine ne prolaze kroz membranu jedinice za dijalizu, ali ligand prolazi kroz polupropusnu membranu iz otopine u jedinicu za dijalizu i obratno. Difundirajući dio liganda veže se za određenu strukturu polinukleotida, a dio ostaje slobodan u otopini. Ukoliko je afinitet vezanja liganda za određenu sekvencu polinukleotida viši, tada će veći dio liganda ostati vezan na taj polinukleotid u jedinici za dijalizu. Postizanjem ravnoteže nakon 24 sata svaki polinukleotid unutar jedinice za dijalizu je vezao određenu količinu liganda sukladno svom afinitetu vezanja. Formirani kompleksi liganda i nukleinske kiseline prebacuju se iz jedinica za dijalizu u mikrodijalizator te se doda natrijev dodecil sulfat (SDS) koji razara stvoreni kompleks liganda i nukleinske kiseline. Nakon toga je ligand slobodan u otopini te se količina liganda koji je bio vezan utvrđuje spektroskopski.<sup>4,120,121,122</sup> Iz dobivenih rezultata dobiju se podaci o selektivnosti i afinitetu prema određenoj strukturi/sekvenci nukleinske kiseline.<sup>123</sup> Rezultati se prikazuju u obliku stupičastog dijagrama (slika 14).



Slika 14. Sažeti prikaz koraka za provedbu eksperimenta kompeticijske dijalize.

Glavni uvjeti za uspješnu provedbu kompeticijske dijalize su: odsustvo agregiranja spoja unutar 24 sata, da se ispitivani spoj ne veže na površine (membranu za dijalizu ili unutarnju površinu čaše), stabilnost ispitivanog spoja u ionskim uvjetima korištenima u eksperimentu, te da su sve korištene strukture nukleinskih kiselina iste koncentracije.<sup>4,121</sup>

Eksperiment kompeticijske dijalize prvi je put napravljen 1975. godine kada su Müller i Crothers ispitivali afinitet liganda prema različitim sekvencama molekule DNA.<sup>124</sup> U jednu su komoricu stavili sekvencu DNA bogatu AT parovima baza, a u drugu GC parovima baza. Komorice su uronili u otopinu s ligandom i nakon uravnoteženja dobili su rezultat koji je pokazao s kojom sekvencom ligand stvara stabilniji kompleks.<sup>120,125</sup> Današnja metoda je proširenje eksperimenta kojeg su Müller i Crothers napravili prije 50 godina. S vremenom je eksperiment napredovao pa su se uvodile različite polinukleotidne strukture za koje je postojao interes, poput jednolančanih, dvolančanih, hibridnih dvolančanih struktura, trolančanih i višelančanih struktura (slika 15).<sup>122</sup>



Slika 15. Prikaz svih struktura koje se koriste u kompeticijskoj dijalizi danas: a) jednolančane strukture, b) različite dvolančane strukture c) trolančane i d) višelančane strukture (slika preuzeta i modificirana).<sup>126</sup>

Uvođenjem sve brojnijih različitih struktura nukleinskih kiselina, rasla je i potreba za sve složenijim eksperimentalnim sustavom za provođenje ove metode, pa je prva generacija eksperimenta istovremeno mogla proučavati 13 različitih nukleinskih kiselina, druga generacija 19, a treća generacija koristi tehnologiju s čak 96 mogućih mjesta za nukleinske kiseline na mikrodijalizatoru.<sup>120</sup> Time se kompeticijska dijaliza pokazala kao poboljšanje u istraživanju interakcija liganda s hibridnim i višelančanim molekulama DNA.

Kompeticijska dijaliza koristi se za ispitivanje različitih interakcija ligand-nukleinska kiselina jer unutar 24 sata pruža izravnu i kvantitativnu mjeru selektivnosti i nedvosmisleno identificira koje od struktura/sekvenci unutar niza ispitivanih uzoraka stvara stabilni kompleks s određenim ligandom.

### 2.6.2. Temperaturno mekšanje smjesa

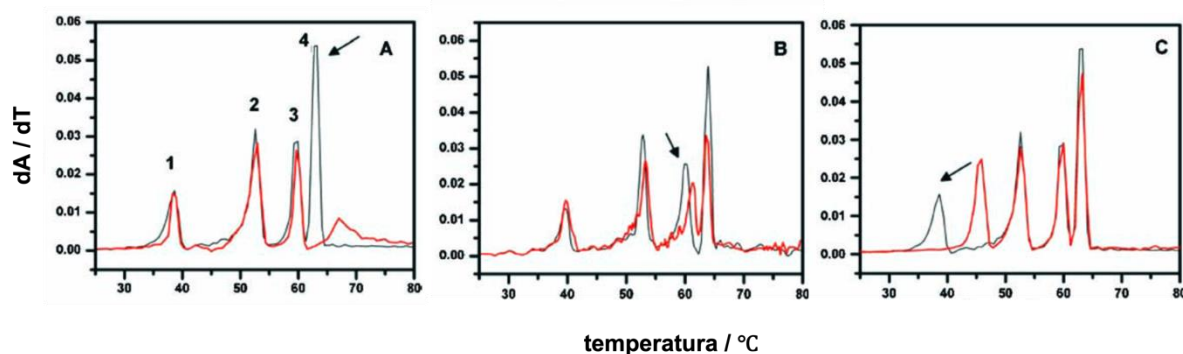
Eksperiment temperaturnog mekšanja često je korišten alat za proučavanje kompleksa liganda i nukleinske kiseline još od ranih 1960-ih. Privlačnost ove metode leži u njenoj jednostavnosti i lako dostupnoj te jeftinoj instrumentaciji. Svaka nukleinska kiselina ima svoju karakterističnu temperaturu mekšanja ( $T_m$ ) koja ovisi o nekoliko parametara, kao što su: duljina i specifični slijed nukleotida u ispitivanoj sekvenci, koncentracija soli i pH vrijednost.<sup>127</sup> Vezanjem liganda na strukturu nukleinske kiseline dolazi često ili uglavnom do stabilizacije dvostruke ili višelančane uzvojnice i podizanja „temperature taljenja“ (odmatanja).<sup>128–130</sup> Eksperiment temperaturnog mekšanja je automatizirana metoda, ali je za dobivanje jedne krivulje mekšanja potrebno i do nekoliko sati što usporedbu vezanja liganda na nekoliko različitih sekvenci nukleinskih kiselina čini razmjerno dugotrajnim eksperimentalnim pothvatom.<sup>131</sup>

Prošireni eksperiment vrijedan je za brzu procjenu preferencijalnog vezanja dodanog liganda i utjecaja na toplinsku denaturaciju četiri strukture istovremeno, dvolančane strukture DNA i RNA te hibridne dvolančane strukture DNA:RNA. Za razliku od klasičnog eksperimenta u kojem se različite strukture nukleinskih kiselina s ligandom stavljaju u zasebne kivete, ovim eksperimentom se sve četiri strukture zajedno s ligandom ispituju u istoj kiveti.<sup>4</sup> Dodatak ispitivanog liganda promijeni izgled krivulje mekšanja strukture nukleinske kiseline za koju se vezao, pružajući jednostavnu, brzu procjenu selektivnosti vezanja liganda na određenu strukturu.

Chaires i Shi<sup>131</sup> ispitali su tri različita spoja s četiri različite strukture nukleinskih kiselina od kojih su dvije standardne dvolančane strukture DNA i RNA, a druge dvije su hibridne dvolančane strukture DNA:RNA (slika 16) kako bi potvrdili valjanost eksperimenta. Upotrijebili su neotropsin kao klasični ligand koji se veže u mali utor B-uzvojnice, što je i potvrđeno stabiliziranjem samo strukture poli dA-poli dT (slika 16, A). Koristili su i etidijev bromid koji se veže kao interkalator, a koji se specifično vezao i stabilizirao samo hibridne strukture DNA:RNA (slika 16, B). Osim klasičnih spojeva s poznatim načinom vezanja na



nukleinske kiseline, korišten je i treći ligand, derivat prirodnog produkta  $\beta$ -lapahona, koji pokazuje selektivnost samo prema hibridnoj strukturi poli dA-poli rU (slika 16, C).



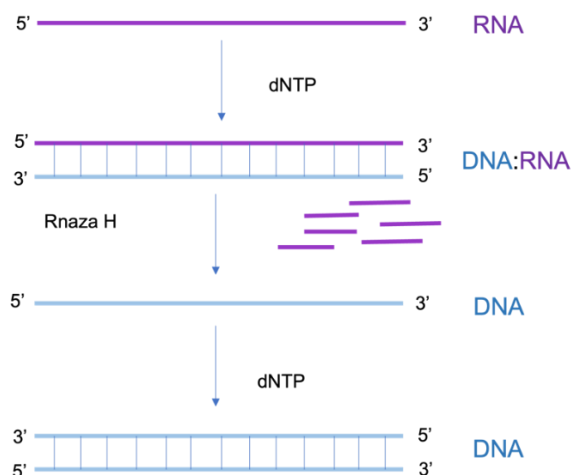
Slika 16. Prošireni eksperiment temperaturnog mekšanja četiri različita dvolančana polinukleotida; crna linija prikazuje profil temperaturnog taljenja četiri polinukleotida bez dodatka liganda: hibridna struktura DNA:RNA [poli dA-poli rU; **1**], RNA [poli rA-poli rU; **2**], hibridna struktura RNA:DNA [poli rA-poli dT; **3**] i DNA [poli dA-poli dT; **4**]; koncentracija svakog polinukleotida je 10  $\mu$ M (parovi baza), a ukupna koncentracija polinukleotida je  $4 \times 10^{-5}$  mol dm $^{-3}$  (parova baza). Crvena linija prikazuje stabilizacijski efekt nakon dodatka liganda (A) neotropsin (B) etidijev bromid (C) derivat prirodnog produkta  $\beta$ -lapahona u  $1,5 \times 10^{-6}$  mol dm $^{-3}$  koncentraciji (slika preuzeta i modificirana).<sup>131</sup>

Test je jednostavan, izravan, jeftin i brz. Kao spektrofotometrijski postupak, metoda je podložna automatizaciji i proširenju dizajna sa složenijim smjesama. Sastav smjesa može se oblikovati u skladu s posebnim interesima istraživača i s obzirom na ciljnu strukturu nukleinske kiseline.

### 2.6.3. RNaza H test

Ligandi selektivni prema strukturi i sekvenci za DNA:RNA hibride imaju različite potencijalne farmaceutske primjene, s obzirom na biološki značaj hibridnih DNA:RNA struktura. Na primjer, prvi nastali proizvod HIV reverzne transkripcije je hibridna dvolančana struktura DNA:RNA. Stvaranje dvolančane virusne DNA i njena integracija u genom domaćina ovise o razaranju lanca RNA unutar hibridne strukture pomoću RNaze H (slika 17).<sup>132</sup> Nakon toga se stvara molekula DNA koja se ugrađuje u genom domaćina. Životni ciklus

virusa se nastavlja i nove virusne čestice koje se oslobađaju iz zaražene stanice sposobne su inficirati nove stanice.



Slika 17. Proces reverzne transkripcije u kojem se iz jednolančane RNA stvara dvolančana molekula DNA.

Prepoznavanje hibridnih dvolančanih struktura DNA:RNA s ligandima malih molekula i njihovo vezivanje na taj lanac, može inhibirati RNazu H, a budući da je njena aktivnost neophodna za replikaciju virusa na taj se način može kontrolirati HIV infekcija.<sup>133</sup>

Spektrofotometrijski RNaza H test temelji se na onom koji su prethodno opisali Rasche i suradnici.<sup>134</sup> Otpuštanje nukleotida iz hibridnog dvolančanog supstrata prati se kao povećanje apsorbancije pri valnoj duljini od 260 nm. Ukupna promjena ( $\Delta A_{260}$ ) je potpuna razgradnja RNA lanca iz hibridne dvolačane strukture. Ovim eksperimentom izravno se prati nestanak supstrata, a signal je neovisan o inhibitoru koji se ispituje. Eksperiment ne zahtjeva uvođenje fluorescentnih oznaka ili radioaktivno označavanje, a može se koristiti za provjeru niza spojeva kako bi se odabrali najjači potencijalni inhibitori enzima RNaze H.<sup>4</sup>

Kako je RNaza H ključna za replikaciju retrovirusa njena se uloga može iskoristiti u primjeni lijekova koji ciljaju na specifične hibridne strukture DNA:RNA čime dolazi do inhibicije retrovirusne replikacije.

Barbieri i sur. u svojem istraživanju prikazali su rezultate koji otkrivaju da vezanje paromomicina na hibridnu dvolančanu strukturu RNA:DNA inhibira cijepanje RNA lanca posredovano RNazom H.<sup>7</sup> Ovo opažanje naglašava potencijal korištenja racionalno dizajniranih molekula za ciljanje specifičnih hibridnih struktura DNA:RNA, čime se specifični biološki procesi moduliraju na željeni način.

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

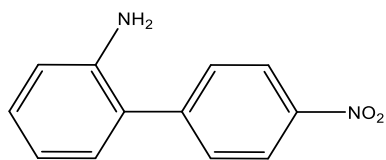
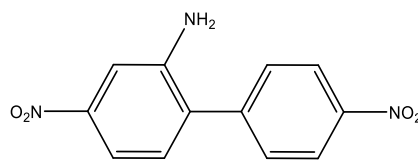
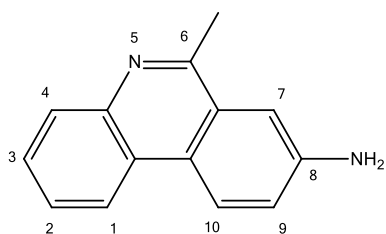
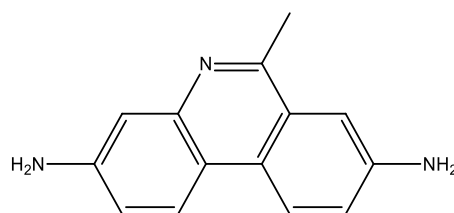
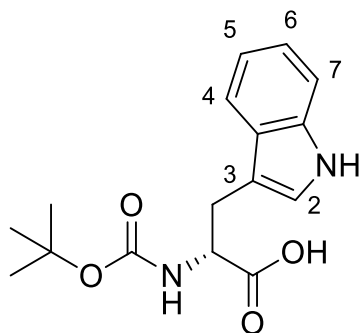
### 3.1. Sinteza fenantridinskih derivata

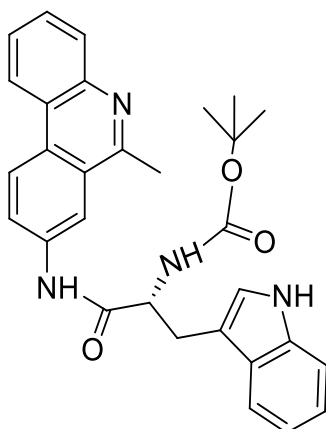
Pripravljene fenantridinski derivati okarakterizirani su pomoću NMR i HRMS analiza.  $^1\text{H}$  NMR i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri snimljeni su na aparatima BRUCKER AV300 i BRUCKER AV600, koristeći 150,92/75,47 MHz za  $^{13}\text{C}$  jezgre i 600,13/300,13 MHz za  $^1\text{H}$  jezgre. Kao unutarnji standard korišten je tetrametilsilan (TMS), a od otapala dimetilsulfoksid- $d_6$ . Kemijski pomaci ( $\delta$ ) izraženi su u ppm, dok su konstante sprege ( $J$ ) izražene u Hz. Signali su označeni kao br-s – široki singlet, s-singlet, d-dublet, dd-dublet dubleta, t-triplet, m-multiplet. Dvodimenzijski COSY (engl. *Correlation Spectroscopy*) i NOESY (engl. *Nuclear Overhauser 37 Effect*) spektri snimljeni su uz upotrebu standardnog programskog paketa Bruker. Uređajima MALDI-TOF/TOF 4800 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) i Agilent 6550 Series Accurate-Mass-Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF), Agilent 1290 Infinity II snimljeni su spektri masa visoke rezolucije (HRMS) u pozitivnom modu. Identifikacijski spektri masa (ESI-MS) spojeva snimljeni su primjenom LC-MS uređaja Shimadzu Nexera LCMS-2020. Spektrometar masa opremljen je s kvadrupolnim analizatorom mase i elektronsprej (engl. *Electron Spray Ionisation*, ESI) ionizacijskim izvorom za ionizaciju uzoraka uz protok nebulizacijskog plina od 1,5 mL/min, DL temperaturom: 250 °C i naponom 3,5 kV. Spektri masa snimani su i u pozitivnom i u negativnom ionizacijskom modu  $m/z$  u rasponu od 100 do 1200.

Temperature tališta pripremljenih spojeva određene su na Koflerovom mikroskopu i nisu korigirane. FTIR (engl. *Fourier Transform Infrared*) spektri snimljeni su na spektrometru FT-IR Spectrum Two PerkinElmer. Frekvencije karakterističnih vrpei izražene su u obliku valnih brojeva  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Tijek reakcija pratio se tankoslojnom kromatografijom, a za čišćenje produkta koristila se kromatografija na pločama. Tankoslojna kromatografija rađena je na pločicama silikagela Kieselgel 60 F245 (Merck, KGaA, Darmstadt, Njemačka), a spojevi su detektirani pomoću UV svjetla pri 254 i 365 nm. Preparativna kromatografija rađena je na pločama Merck 60 F254 (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka) ili pločama (20 × 20 cm) koje su pripremljene s 15 g silikagela Kieselgel HF254 (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka) te aktivirane 90 minuta na 110 °C.

Polazni spojevi koji su korišteni kao prekursori za fenantridinske derivate (**A1** – **A4**) pripremljeni su tijekom ovog rada prema literaturnim propisima te su njihovi NMR spektri odgovarali literaturnim podacima:

2-amino-4'-nitrobifenil<sup>135</sup>2-amino-4,4'-dinitrobifenil<sup>135</sup>8-amino-6-metilfenantridin (**F1**)<sup>136</sup>3,8-bis(amino)-6-metilfenantridin (**F2**)<sup>136</sup>*N*-tert-butoksikarbonil-L-triptofan<sup>137</sup>

3.1.1. *tert*-butil-((2*S*)-3-(1*H*-indol-3-il)-1-((6-metilfenantridin-8-il)amino)-1-oksopropan-2-il)karbamat (**A1**)

Fenantridinski derivat pripravljen je modifikacijom poznate metode za stvaranje amidne veze (engl. *coupling*).<sup>138</sup> U reakcijskoj tikvici u atmosferi argona otopljen je spoj **F1** (21 mg; 0,1 mmol) u suhom acetonitrilu (2 mL). Uz miješanje u reakcijsku smjesu su na sobnoj temperaturi postepeno dodani HOBt (16,12 mg; 0,12 mmol), HBTU (45,51 mg; 0,12 mmol) i Boc-Trp (36,52 mg; 0,12 mmol) te trietilamil (27,9  $\mu$ L; 0,2 mmol). Nastala je narančasta suspenzija. Nastavljeno je miješanje reakcijske smjese u atmosferi argona na sobnoj temperaturi preko noći. Otapalo je iz reakcijske smjese uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Ostatak se otopi u acetonitrilu (500  $\mu$ L) i doda se kap diklormetana. Preko noći je došlo do taloženja. Filtriranjem je dobiven konačni produkt **A1** u obliku svijetlosmeđeg taloga (20,58 mg; 42 %).

$t_r = 219 - 221$  °C;  $R_f = 0,43$  (2 % MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>);

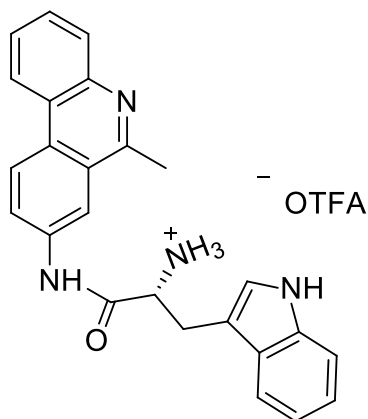
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO)  $\delta$  10,84 (br-s, 1H, Trp-NH); 10,50 (s, 1H, Phen-NH); 8,79 (d,  $J = 9,0$ , Hz, 1H, Phen-H10); 8,67 (d,  $J = 7,1$  Hz, 1H, Phen-H1); 8,58 (s, 1H, Phen-H7); 8,14 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1H, Phen-H9); 7,98 (d,  $J = 7,8$  Hz, 1H, Phen-H4); 7,70-7,62 (m, 3H, Phen-H2, Phen-H3, Trp-H7); 7,33 (d,  $J = 7,9$  Hz, 1H, Trp-H4); 7,22 (br-s, 1H, Trp-H2); 7,08-6,95 (m, 3H, Trp-H6, Trp-H5, Boc-NH); 4,50-4,43 (m, 1H, Trp-CH\*); 3,24 - 3,03 (m, 2H, Trp-CH<sub>2</sub>); 2,92 (s, 3H, Phen-CH<sub>3</sub>); 1,35 (s, 9H, Boc-CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO)  $\delta$  138,6; 136,0; 134,6; 130,2; 129,3 (Trp-C4); 128,4 (Phen-C4); 127,9; 127,5; 127,2; 126,7; 125,7; 124,1 (Phen-C9); 123,8 (Phen-C10); 123,6 (Trp-C2); 123,3; 122,4; 120,8; 119,4; 118,5; 118,2; 115,2 (Phen-C7); 111,3 (Trp-C4); 109,8; 78,3 (Boc-C) 55,9 (Trp-CH\*); 28,1 (Boc-CH<sub>3</sub>); 27,8 (Trp-CH<sub>2</sub>); 22,7 (Phen-CH<sub>3</sub>).

HRMS (MALDI-TOF/TOF): C<sub>30</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> (495,2396 izračunato); eksperimentalno određeno 495,2380.

IR:  $\nu$  / $\text{cm}^{-1}$  3354,42; 3305,67; 2964,09; 1686,97; 1666,98; 1519,82; 1481,78; 1433,17; 1381,09; 1323,57; 1271,53; 1248,26; 1165,69; 1107,31; 1077,49; 1046,04; 1027,49; 874,51; 827,75; 767,04; 738,57; 729,98; 559,89; 464,92.

3.1.2. (2*S*)-3-(1*H*-indol-3-il)-1-[(6-metilfenantridin-8-il)amino]-1-oksopropan-2-aminijev trifluoracetat (**A2**)



U reakcijskoj tikvici u atmosferi argona otopljen je produkt **A1** (15 mg; 0,030 mmol) u diklormetanu (1 mL). Smjesa se hladi na ledu 15 minuta te se uz miješanje u reakcijsku smjesu doda trifluorocetna kiselina (1,1 mL). Nakon dodatka trifluorocetne kiseline, boja reakcijske smjese je iz svijetlosmeđe prešla u tamnosmeđu. Smjesa je ostavljena na ledu do postupnog dolaska na sobnu temperaturu. Nakon četiri sata, otapalo je uklonjeno na vakuumu vodene sisaljke i rotacijskom uparivaču do suhog ostatka. Uparena smjesa otopljena je u minimalnom volumenu diklormetana (HPLC čistoće) uz pomoć ultrazvučne kupelji. Smjesa je istaložila preko noći. Nakon centrifugiranja reakcijske smjese, odvoji se supernatant. Nakon sušenja taloga na vakuumskoj liniji dobiven je konačni produkt **A2** u obliku svijetlosmeđeg-žutog taloga (13,19 mg; 87 %).

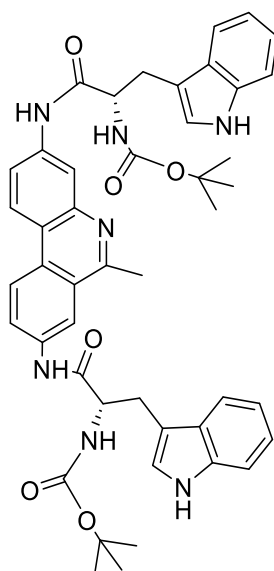
$t_f = 171 - 172$  °C;  $R_f = 0,50$  (5 % MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO)  $\delta$  11,06 (s, 2H, Trp-NH, Phen-NH); 8,91 (d,  $J = 9,0$ , Hz, 1H, Phen-H10); 8,76 (d,  $J = 7,1$  Hz, 1H, Phen-H1); 8,56 (d,  $J = 1,5$  Hz, 1H, Phen-H7); 8,32 (br-s, 3H, NH<sub>3</sub>); 8,15 (dd,  $J = 8,9, 1,6$  Hz, 1H, Phen-H9); 8,06 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H, Phen-H4); 7,80 (t,  $J = 7,6$  Hz, 1H, Phen-H3); 7,75 (t,  $J = 7,4$  Hz, 1H, Phen-H2); 7,67 (d,  $J = 7,9$  Hz, 1H, Trp-H7); 7,37 (d,  $J = 8,1$  Hz, 1H, Trp-H4); 7,28 (d,  $J = 2,3$  Hz, 1H, Trp-H2); 7,07 (t,  $J = 7,5$  Hz, 1H, Trp-H5); 6,96 (t,  $J = 7,4$  Hz, 1H, Trp-H6); 4,27 (br-s, 1H, Trp-CH\*); 3,42 (dd,  $J = 14,8; 7,5$  Hz; 1H, Trp-CH<sub>2</sub>); 3,32 (dd,  $J = 14,8, 7,4$  Hz, 1H, Trp-CH<sub>2</sub>); 2,99 (s, 3H, Phen-CH<sub>3</sub>).

$^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, DMSO)  $\delta$  167,9; 158,3; 137,7; 136,3; 129,0 (Phen-C3); 128,7; 127,4 (Phen-C2); 127,0; 125,4; 125,0 (Trp-C2); 124,7 (Phen-C4); 124,1 (Phen-C10); 123,3; 122,6 (Phen-C1); 121,2 (Trp-C5); 118,5 (Trp-C6); 118,4 (Trp-C7); 116,0 (Phen-C7); 111,5 (Trp-C4); 106,5; 53,7 (Trp-CH\*); 27,3 (Trp-CH<sub>2</sub>); 21,4 (Phen-CH<sub>3</sub>).

HRMS (Q-TOF): C<sub>27</sub>H<sub>23</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> (395,1866 izračunato); eksperimentalno određeno: 395,1890.

IR:  $\nu/\text{cm}^{-1}$  2927,02; 1667,48; 1530,85; 1488,84; 1428,69; 1368,23; 1198,04; 1130,32; 835,46; 798,74; 748,52; 719,86; 513,83.

### 3.1.3. di-*tert*-butil-((2*S*,2'*S*)-((6-metilfenantridin-3,8-diil)bis(azandiil)bis(3-(1*H*-indol-3-il)-1-oksopropan-1,2-diil))dikarbamat (**A3**)



Reakcija je provedena na jednak način kao i za produkt **A1** (opisano u potpoglavlju 3.1.1.).<sup>138</sup> Spoj **F2** (45 mg; 0,202 mmol) otopljen je u suhom acetonitrilu (4 mL) te su mu postepeno uz miješanje na sobnoj temperaturi dodani sljedeći reagensi: HOBT (81,75 mg; 0,605 mmol), HBTU (229,45 mg; 0,605 mmol), Boc-Trp (184,0 mg; 0,605 mmol) te trietilamin (140,8  $\mu\text{L}$ ; 1,01 mmol). Narančasta suspenzija miješa se u atmosferi argona na sobnoj temperaturi iduća tri dana. Zatim se otapalo ukloni iz reakcijske smjese na rotacijskom uparivaču do suhog ostatka. Ostatak se otopi u acetonitrilu (500  $\mu\text{L}$ ) i doda se kap diklormetana. Preko noći je došlo do taloženja. Konačni produkt **A3** dobiven je filtriranjem u obliku svijetlosmeđeg taloga (58,34 mg; 36 %).

$t_r = 183 - 185$  °C;  $R_f = 0,80$  (7 % MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>); <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO)  $\delta$  : 10,82 (br-s, 2H, 2 x Trp-NH); 7,98 (d, 2H,  $J = 8,4$  Hz, 2 x Phen); 7,70 (d,  $J = 8,3$  Hz, 2H, 2 x Phen); 7,54-7,51 (m, 4H, 2 x Phen, 2 x Trp-H4); 7,42-7,40 (m, 2H, Phen); 7,33 (d,  $J = 8,1$  Hz, 2H, 2 x Trp-H7); 7,14 (br-s, 2H, 2 x Trp-H2); 7,06 (t,  $J = 7,3$  Hz, 2H, 2 x Trp-H6); 7,02 – 6,92 (m, 4H, Trp-H5, 2 x Boc-NH); 4,13-4,16 (m, 2H, 2 x Trp-CH\*); 3,13 (dd,  $J = 14,6, 4,6$  Hz, 2H, 2 x Trp-CH<sub>2</sub>), 2,97 (dd,  $J = 14,6, 9,4$  Hz, 2H, 2 x Trp-CH<sub>2</sub>); 1,33 (s, 18H, 2 x Boc-CH<sub>3</sub>).

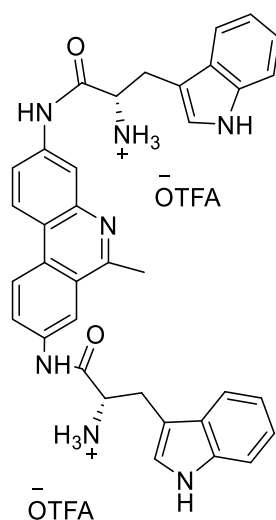
Signal Phen-CH<sub>3</sub> pao pod drugi signal.

<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO)  $\delta$  174,5; 173,9; 155,4; 136,1; 129,2; 127,8; 127,2; 127,2; 124,0 (Trp-C2); 123,3; 122,4; 121,3 (Trp-C6); 120,8; 119,4; 118,5; 118,2; 111,8 (Phen-C7); 111,4; 110,1; 109,6; 78,0 (Boc-C); 54,8 (Trp-CH\*); 28,5 (Boc-CH<sub>3</sub>); 26,8 (Trp-CH<sub>2</sub>).

HRMS (Q-TOF): C<sub>46</sub>H<sub>49</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup> (795,3744 izračunato); eksperimentalno određeno: 796,3817.

IR:  $\nu$  /cm<sup>-1</sup> 4330,95; 3305,14; 2981,94; 1737,95; 1690,79; 1507,70; 1490,84; 1461,93; 1435,54; 1383,65; 1364,66; 1347, 61; 1337,24; 1302,81; 1283,98; 1248,50; 1216,32; 1198,53; 1138,01; 1162,15; 1088,19; 1075,74; 1011,38; 934,87; 848,75; 829,34; 817,87; 785,92; 769,90; 759,68; 726,70; 694,22; 637,94; 618,58; 600,79; 562,39; 474,49.

### 3.1.4. (2*S*,2'*S*)-1,1'-[(6-metilfenantridin-3,8-diil)bis(azandiil)]bis[3-(1*H*-indol-3-il)-1-oksopropan-2-aminijev] trifluoracetat (**A4**)



Produkt **A3** (30 mg; 0,038 mmol) otopljen je u diklormetanu (1,29 mL) u atmosferi argona. Reakcijska smjesa se hladi 15 minuta na ledu. Svijetlosmeđoj, ohlađenoj reakcijskoj smjesi dodana je trifluoroctena kiselina (1,38 mL) nakon čega smjesa postaje tamnosmeđa. Reakcija je prekinuta nakon četiri sata, te je otapalo uklonjeno na vakuumu vodene sisaljke i rotacijskom



uparivaču do sirovog ostatka. Konačni produkt **A4** dobiven je u obliku uljnog tamnosmeđeg filma.

$t_r$  nije moguće odrediti, konačni produkt uljni film;  $R_f = 0,62$  (7 % MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>);

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO)  $\delta$  10,85 (br-s, 2H, 2 x Trp-NH); 9,72 (d, 4H,  $J = 7,7$  Hz, 2x Trp-NH<sub>2</sub>); 7,96 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H, Phen-H10); 7,91 (br-s, 2H, 2x Phen-NH); 7,70 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H, Phen-H1); 7,55 – 7,49 (m, 3H, Phe, Trp); 7,45 (br-s, 2H, 2xPhen); 7,41 – 7,37 (m, 1H, Phen); 7,33 (d,  $J = 8,1$  Hz, 2H, 2 x Trp-H7); 7,13 (d,  $J = 2,3$  Hz, 2H, 2 x Trp-H2); 7,10 – 7,03 (m, 2H, 2 x Trp-H6); 7,02 – 6,96 (m, 2H, 2 x Trp-H5); 4,51-4,48 (m, 2H, 2 x Trp-CH\*); 3,18 – 3,14 (m, 4H, 2 x Trp-CH<sub>2</sub>); 2,73 (s, 3H, Phen-CH<sub>3</sub>).

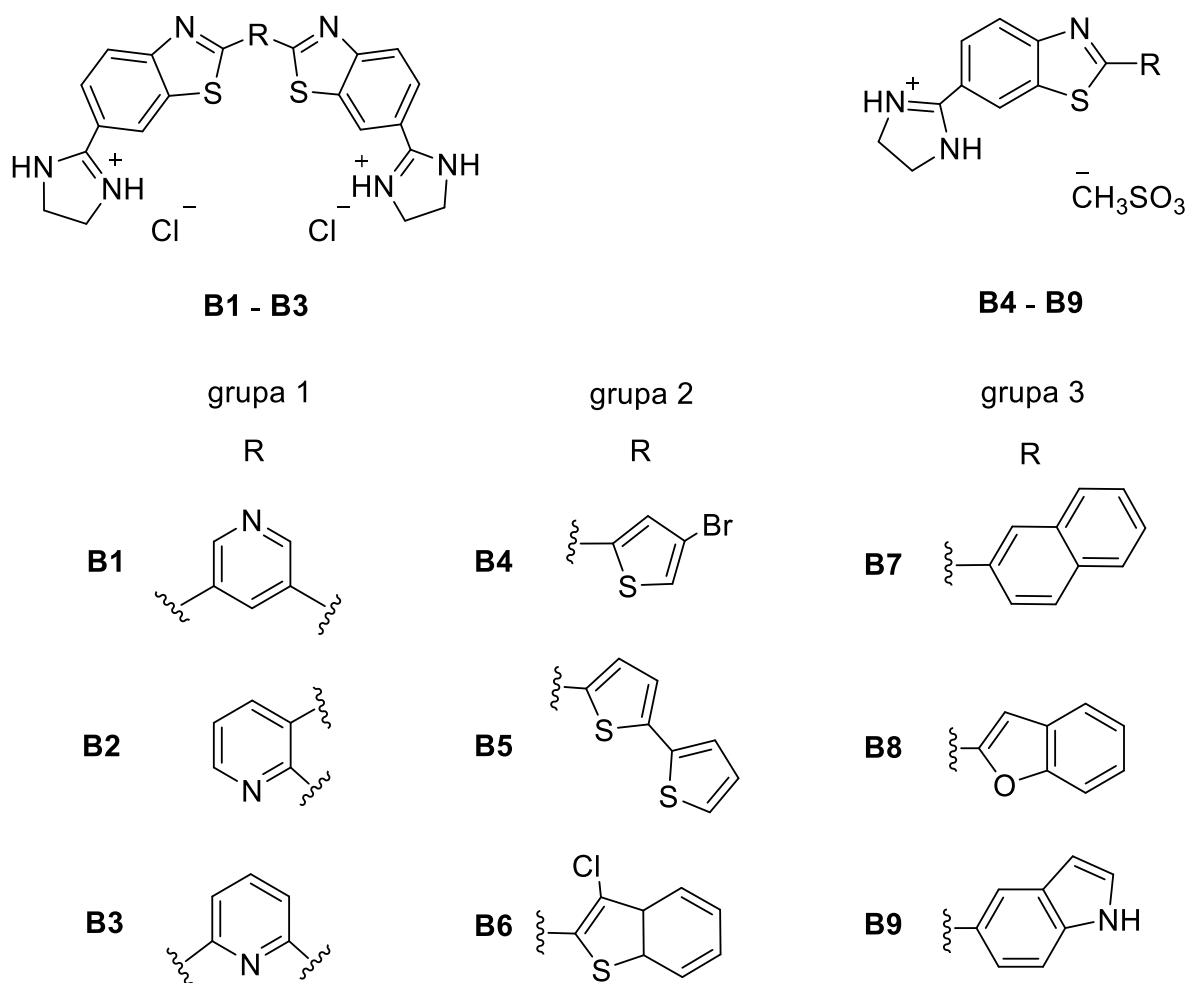
<sup>13</sup>C NMR (151 MHz, DMSO)  $\delta$  171,7; 136,2; 136,1; 127,3; 126,9; 124,9; 123,5 (Trp-C2); 121,2; 121,0 (Trp-C6); 118,6 (Phen-C10); 118,4; 118,2; 118,0 (Trp-C5); 111,5; 111,4 (Trp-C7); 109,6 (Phen-C1); 106,6; 61,7; 53,6 (Trp-CH\*); 52,5 (Trp-CH\*); 26,8 (Phen-CH<sub>3</sub>); 26,1(Trp-CH<sub>2</sub>); 25,9 (Trp-CH<sub>2</sub>).

HRMS (Q-TOF): C<sub>40</sub>H<sub>35</sub>F<sub>6</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup> (597,2841 izračunato); eksperimentalno određeno: 596, 2770/298,6425.

IR:  $\nu$  /cm<sup>-1</sup> 3328,45; 2927,05; 1710,12; 1620,76; 1548,63; 1457,68; 1391,92; 1159,92; 1101,39; 1011,33; 742,43.

### 3.2. Ispitivani benzotiazolni derivati

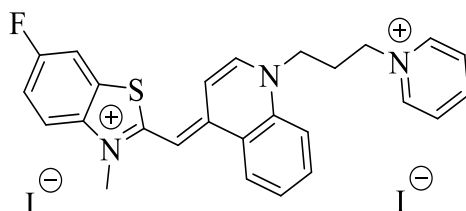
U izradi doktorskog rada ispitana je i skupina benzotiazolnih derivata, koji su dobiveni u suradnji s prof. dr. sc. Liviom Racanéom, Tekstilno-tehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu. Ova skupina obuhvaća devet kationskih liganada: bis(benzotiazolil)piridini (1 – 3, **grupa 1**), 2-benzotienil/2-tienil-supstituirani 6-(2-imidazolinil)benzotiazoli (4 – 6, **grupa 2**) i 2-aryl/heteroaryl-supstituirani 6-(2-imidazolinil)benzotiazoli (7 – 9, **grupa 3**).<sup>139</sup> Sve strukture ispitivanih benzotiazolnih derivata prikazane su slikom 18.



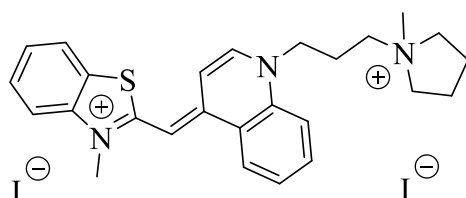
Slika 18. Strukture ispitivanih benzotiazolnih derivata.

### 3.3. Ispitivane cijaninske boje

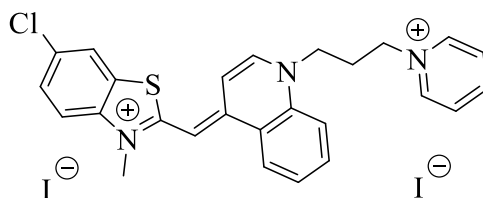
U izradi doktorskog rada ispitane su nove cijaninske boje (slika 19) dobivene u suradnji s dr. sc. Atanasom Kurutosom, Institut za organsku kemiju s centrom za fitokemiju, Sofija (Bugarska).<sup>140</sup>



6-flour-3-metil-2-[[4E)-1-[3-(piridin-1-ij-1-il)propil]-1,4-dihidrokinolin-4-iliden]metil]-2,3-dihidro-1,3-benzotiazol-3-ijev diiodid (**C1**)



3-metil-2-[[4E)-1-[3-(1-metilpirolidin-1-ij-1-il)propil]-1,4-dihidrokinolin-4-iliden]metil]-2,3-dihidro-1,3-benzotiazol-3-ijev diiodid (**C2**)



6-klor-3-metil-2-[[4E)-1-[3-(piridin-1-ij-1-il)propil]-1,4-dihidrokinolin-4-iliden]metil]-2,3-dihidro-1,3-benzotiazol-3-ijev diiodid (**C3**)

Slika 19. Strukture ispitivanih cijaninskih boja.

### 3.4. Spektroskopska karakterizacija i ispitivanje interakcija fenantridinskih derivata, cijaninskih boja i benzotiazolnih derivata

#### 3.4.1. Priprema otopina

Ishodišne otopine fenantridina pripremljene su otapanjem u DMSO-u ( $c = 5 \times 10^{-3}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ). Benzotiazolni derivati ( $c = 5 \times 10^{-3}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ) i cijaninske boje ( $c = 8 \times 10^{-4}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ) otopljeni su u redestiliranoj vodi ili u puferu natrijevog kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ,  $I = 0,05$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ).

#### 3.4.2. Priprava polinukleotida

U ispitivanju interakcija fenantridinskih derivata korištena je *ctDNA* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, SAD) te je prema uputama proizvođača otopljena u puferu (natrijev kakodilatni pufer,  $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ). DNA je sonicirana i filtrirana kroz filter  $0,45 \mu\text{m}$ .<sup>141</sup> Prilikom ispitivanja interakcija cijaninskih boja i benzotiazolnih derivata korišteni su različiti polinukleotidi: poli rA (rA), poli dA (dA), poli rU (rU), poli dT (dT), poli rA-poli rU (rArU), poli dA-poli dT (dAdT), poli dG-poli dC (dGdC), poli(dAdT)<sub>2</sub>, poli(dGdC)<sub>2</sub> i *ctDNA* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, SAD). Svi polinukleotidi otopljeni su u puferu natrijevog kakodilata,  $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05$  mol  $\text{dm}^{-3}$ . Hibridne strukture DNA:RNA pripremljene su (poli rA-poli dT/poli dA-poli rU), miješanjem jednolančanog polinukleotida RNA i jednolančanog DNA polinukleotida u molarnom omjeru 1:1. Puferska otopina s polinukleotidima zagrijava se na  $90 \text{ }^\circ\text{C}$  i nakon 15 minuta postupno se hladi na  $10 \text{ }^\circ\text{C}$  kako bi se dobio hibridni polinukleotid. Trolančane DNA, RNA i hibridne strukture (dAdTdT, rAdTdT, rArUrU) pripremljene su na isti način kao i hibridne strukture, ali miješanjem jednog dvolančanog i jednog jednolančanog polinukleotida ili tri jednolančana polinukleotida u puferu natrijevog kakodilata ( $I = 0,05$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7,0$ ) uz dodatak natrijevog klorida ( $0,05$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ) i  $1 \times 10^{-3}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  EDTA. Koncentracija polinukleotida određena je spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije te je izražena kao koncentracija nukleinskih baza.<sup>142,143</sup>

Kod ispitivanja interakcija s benzotiazolnim derivatima korišteni su dA i dT oligonukleotidi (26 baza; Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, SAD) koji su otopljeni u puferu natrijevog kakodilata ( $I = 0,05$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7,0$ ).

## 3.4.3. UV-Vis i fluorescencijska spektroskopija i cirkularni dikroizam

Sva spektroskopska mjerenja provedena su u puferu natrijevog kakodilata (pH = 7,0; dok je ionska jakost ( $I$ ) bila od 0,05 do 0,2 mol dm<sup>-3</sup>; za neka mjerenja u pufer je dodana i 1 × 10<sup>-3</sup> mol dm<sup>-3</sup> EDTA). UV-Vis spektri su snimljeni na Varian Cary 100 Bio spektrofotometru, a fluorescentni spektri na Varian Cary Eclipse fluorimetru. Korištene su kvarcne kivete duljine optičkog puta 10 mm, pri 25 °C. Spektrofotometrijske titracije su provedene u puferu natrijevog kakodilata (pH = 7,0) dodavanjem alikvota otopine polinukleotida u otopinu ispitivanog spoja. Vrijeme inkubacije nakon svakog dodatka supstrata bilo je 90 sekundi, te je zatim izmjerena apsorbancija, odnosno intenzitet fluorescencije.

U fluorimetrijskim eksperimentima korištena je valna duljina pobude iznad 300 nm. Podaci fluorimetrijskih titracija ispitivanih spojeva s polinukleotidima obrađeni su nelinearnom regresijom po Scatchardovoj jednadžbi<sup>144,145</sup> i dobivene su konstante vezanja ( $K_a$ ). Sve su titracije imale zadovoljavajuće korelacijske koeficijente (> 0,99).

$$I = I_o + ((I_{lim} - I_o)/(2 \times c)) \times (c + n \times c_s + \frac{1}{K_a} - ((c + n \times c_s + \frac{1}{K_a})^2 - 4 \times n \times c \times c_s)^{1/2})$$

$I$  – intenzitet fluorescencije  
 $I_o / I_{lim}$  – intenzitet fluorescencije slobodnog i potpuno vezanog liganda  
 $c$  – koncentracija slobodnog liganda  
 $c_s$  – koncentracija polinukleotida  
 $n$  – omjer [vezani ligand] / [polinukleotid]  
 $K_a$  – konstanta vezanja

Spektri cirkularnog dikroizma (CD) snimljeni su na spektropolarimetru Jasco J-815 u kvarcnim kivetama duljine puta 10 mm, pri 25 °C te brzinom skeniranja od 200 nm/min, kao prosjek od tri uzastopno snimljena spektra. CD eksperimenti su provedeni dodavanjem alikvota otopine ispitivanog spoja u otopinu polinukleotida.

Eksperimenti temperature mekšanja za dvolančane i višelančane polinukleotide i njihove komplekse s ispitivanim spojevima provedeni su praćenjem promjene apsorbancije pri 260 nm u ovisnosti o temperaturi otopine.<sup>127</sup> Uzorci su snimljeni na spektrofotometru Varian Cary 100 Bio u kvarcnim kivetama duljine puta 10 mm. U svakoj se kiveti nalazi kompleks željenog liganda i polinukleotida (2 × 10<sup>-5</sup> mol dm<sup>-3</sup>), a eksperiment se izvodi u temperaturnom rasponu od 15 °C do 95 °C tako da temperatura raste jedan stupanj u minuti. Krivulje su korigirane za apsorbanciju liganda, a skala apsorbancije se normalizira. Vrijednosti temperature mekšanja ( $T_m$ ) oligonukleotida i polinukleotida su točke infleksije u pregibu krivulja, a određuju se iz maksimuma prvih derivacija. Vrijednosti  $\Delta T_m$  izračunate su oduzimanjem vrijednosti  $T_m$  slobodne nukleinske kiseline od vrijednosti  $T_m$  kompleksa. Svaka prikazana vrijednost  $\Delta T_m$

prosječna je vrijednost od dva uzastopna mjerenja. Pogreška instrumenta u  $\Delta T_m$  vrijednostima iznosi  $\pm 0,5$  °C.

#### 3.4.4. Izotermalna titracijska kalorimetrija

Ekperimenti izotermalne titracijske kalorimetrije (ITC) provedeni su na instrumentu Microcal VP-ITC (MicroCal, Inc., Northampton, MA, USA) pri 25 °C. Program Origin 7,0<sup>146</sup> korišten je za obradu podataka.

Ekperimenti su provedeni tako da se referentna ćelija ispuni deioniziranom (Mili-Q) vodom, a mjerna ćelija polinukleotidom, te su ispitivani spojevi dodaju iz rotirajuće injekcije (220 okr/min) u obrocima pri 25 °C. Razmak između svake injekcije je 600 sekundi, a početna odgoda prije prvog injektiranja bila je 2000 sekundi. Napravljeni su i ekperimenti razrjeđenja polinukleotida i liganda.

Sve otopine korištene u ITC ekperimentima degazirane su prije upotrebe pod vakumom (0,64 bara; 10 min). Obradom prikupljenih podataka pomoću programa Origin 7,0 dobivena su tri parametra: promjena reakcijske entalpije ( $\Delta H$ ), konstanta vezanja ( $K_a$ ) i recipročni broj nukleotida koji tvore vezno mjesto ( $n$ ). Vrijednost Gibbsove energije ( $\Delta G$ ) izračunata je iz konstante vezanja ( $\Delta G = -RT \ln K_a$ ), a promjena reakcijske entropije izračunata je iz entalpije vezanja i Gibbsove energije ( $\Delta S = (\Delta H - \Delta G)/T$ ).

#### 3.4.5. Određivanje apsolutnih kvantnih prinosa

Apsolutni kvantni prinosi određeni su za benzotiazolne derivate i komplekse cijaninska boja-polinukleotid integrirajućom sferom SC-30 spektrometra Edinburgh FS5 u kvarcnoj kiveti duljine puta od 10 mm. Apsorbancija spojeva prilikom mjerenja kvantnog prinosa bila je manja od 0,05. Otopine su prije mjerenja propuhivane argonom tijekom 20 minuta. Mjerenja su provedena na sobnoj temperaturi.

### 3.5. Metode brzog probira spojeva

#### 3.5.1. Kompeticijska dijaliza

U metodi je korišteno 13 različitih struktura nukleinskih kiselina. Svaka se stavlja u zasebnu jedinicu za dijalizu Slide-A-Lyzer® MINI, zatim u držač za MINI jedinice (Pierce Chemical Company, Dallas, TX, SAD) i na kraju u stakleni spremnik. Ispipetira se 180  $\mu$ L svake strukture nukleinske kiseline u zasebnu jedinu za dijalizu nakon čega se sve dijaliziraju u

zajedničkoj otopini liganda (koncentracija spoja u otopini je  $5 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>) unutar staklenog spremnika na sobnoj temperaturi (25 °C) uz kontinuirano miješanje 24 sata.<sup>120</sup> Kada se postigne ravnoteža, uzorci se pipetiraju iz jedinice za dijalizu u jažice (mikrodijalizator s 96 jažica, proizvođač Greinder). U svaku jažicu se doda 10 %-tni SDS kako bi konačna koncentracija u jažici bila 1 % (w/v). Koncentracije spojeva se određuju spektrofotometrijski na čitaču mikropločica Tecan Infinite M200. Dobivena očitavanja se obrade u programu Origin 7,5<sup>147</sup> u obliku stupičastog dijagrama. Na dijagramu se prikazuje afinitet i selektivnost ispitivanog liganda s određenim nukleinskim kiselinama, a konstanta vezanja ( $K_{app}$ ) može se dobiti jednostavno iz sljedeće jednadžbe:

$$K_{app} = c_b / \{c_f \times ([DNA]_{total} - c_b)\}$$

$c_b$  - koncentracija vezanog spoja koja se računa prema:  
 $c_b = c_t - c_f$  ( $c_t$  - ukupna koncentracija spoja;  $c_f$  - koncentracija slobodnog liganda)  
 $[DNA]_{total}$  - ukupna koncentracija DNA

Nukleinske kiseline moraju biti pripremljene u točno određenoj koncentraciji ( $7,5 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>) koristeći monomerne jedinice kao standard: baza (jednolančani polinukleotidi), par baza (dvolančani polinukleotidi), te triplet baza (trolančani polinukleotidi). Ligandi koji se ispituju moraju biti topljivi i stabilni u puferu koji se koristi za dijalizu (pH = 7,0;  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>, natrijev kakodilatni pufer s dodatkom 1 mM EDTA). Također, važno je da se ne koristi više od 1 % DMSO-a zbog osjetljivosti jedinica za dijalizu.

### 3.5.2. Temperaturno mekšanje smjesa

U eksperimentu temperaturnog mekšanja korišteni su sljedeći polinukleotidi: dvolančane homopolinukleotidne strukture DNA i RNA te hibridne DNA:RNA strukture. Svi polinukleotidi dodani su s ligandom u istu kivetu. Kompleks ligand-nukleinska kiselina uravnotežuje se tijekom 12 sati na 4 °C prije početka mjerenja. Eksperiment se dalje provodi jednako kao i eksperiment temperature mekšanja opisan u potpoglavlju 3.4.3.

### 3.5.3. Rnaza H test

Eksperiment je proveden na spektrofotometru Varian Cary 100 Bio pri 37 °C tijekom 1 – 3 sata. Korištene su kvarcne kivete duljine puta 10 mm, a kao reakcijski pufer korišten je 0,05 mol dm<sup>-3</sup> Tris, pH 8,0 s dodatkom 0,05 mol dm<sup>-3</sup> NaCl i 0,01 mol dm<sup>-3</sup> MgCl<sub>2</sub>. Spojevi ( $c = 3 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>) su dodani u otopinu polinukleotida ( $c = 2 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>) kako bi se postigao željeni omjer  $r$  ( $[spoj]/[polinukleotid]$ ) = 0,15. Uzorci se drže na 0 – 4 °C najmanje 12

sati prije upotrebe. Nakon 12 sati, otopine polinukleotida/kompleksa (polinukleotid-ligand) drže se na 37 °C 15 minuta. U kivete se izravno doda Rnaza H i reakcijska smjesa se promiješa blagim preokretanjem 12 puta. Otpuštanje nukleotida iz hibridnog supstrata prati se povećanjem apsorbancije na valnoj duljini od 260 nm u periodu od 1 – 3 sata, s početnom odgodom dvije minute (37 °C). Ukupna promjena apsorbancije prikazuje otpuštanje lanca RNA s hibridne molekule, tj. gubitak sekundarne strukture. Ovo je izravni test kojim se prati nestanak supstrata.<sup>4</sup> RNAza H koja se koristila u eksperimentima je dobivena iz *Escherichia coli* H 560 pol A1 (Roche/Merck) i priređena u obliku tekućine (otopina 0,025 mol dm<sup>-3</sup> Tris-HCl; 0,05 mol dm<sup>-3</sup> KCl; 1 × 10<sup>-3</sup> mol dm<sup>-3</sup> ditiotritol; 1 × 10<sup>-4</sup> mol dm<sup>-3</sup> EDTA; 50 % glicerol (v/v); pH 8,0 (1,0 U μL<sup>-1</sup>)).

### 3.6. Biološka ispitivanja

#### 3.6.1. Test stanične vijabilnosti

Linija stanica raka vrata maternice, HeLa (GIBCO BRL, Invitrogen, USA) korištena u eksperimentima, uzgajana je kao jednoslojna kultura u Dulbecco modificiranom Eagleovom mediju (engl. *Dulbecco's modified Eagle's*, DMEM; Sigma-Aldrich, USA), dopunjenim s 10 % fetalnog goveđeg seruma (FBS; Sigma-Aldrich) i koktelom antibiotika PenStrep (pencilin i streptomycin) u vlažnoj atmosferi CO<sub>2</sub> na 37 °C. Stanična linija subkultivirana je svakih 3 – 4 dana.

U svrhu mjerenja preživljenja stanica koristio se kolorimetrijski test MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid). Ukupno 3 × 10<sup>3</sup> HeLa stanica nasadeno je u svaku od jažica u volumenu od 180 μL, u pločicu s 96 jažica.

Nakon 24 sata stanice su tretirane, u četiri primjerka, različitim koncentracijama spojeva. Nakon 72 sata inkubacije na 37 °C medij je uklonjen, a na stanice je dodana 10 puta razrijeđena otopina MTT-a (5 mg/mL) po jažici.<sup>148</sup> Pločica sa stanicama je inkubirana tri sata u inkubatoru za staničnu kulturu. Nakon tri sata inkubacije, kristali formazana otopljeni su u DMSO-u (0,17 mL/jažici) te je određena apsorbancija pri 545 nm na čitaču mikrotitarskih ploča (Awareness Technology Inc., USA).

Konačne apsorbancije otopina iz svake jažice izračunate su oduzimanjem vrijednosti apsorbancije jažice s otopinom bez stanica (negativna kontrola). Koncentracija koja smanjuje preživljenje ispitivanih stanica na polovicu vrijednosti izmjerene u netretiranim stanicama (IC<sub>50</sub>) izračunata je korištenjem računalnog programa GraphPad Prism koristeći metodu



nelinearne regresije najmanjih kvadrata. Na isti je način izračunata i vrijednost  $IC_{80}$  koja smanjuje preživljenje stanica na 80 %. Svi pokusi rađeni su u triplikatu.

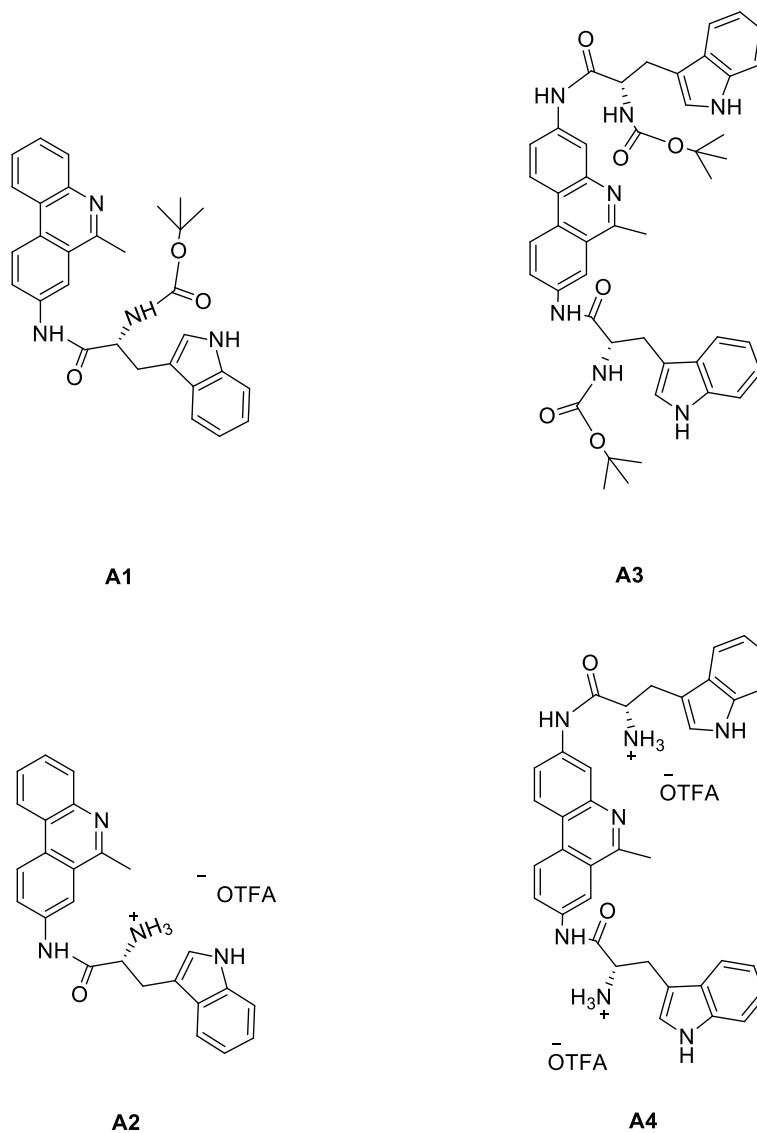
### 3.6.2. Konfokalna mikroskopija

Za snimanje živih stanica, stanice HeLa nasađene su u komore za snimanje stanica (Ibidi, Njemačka) pri gustoći od  $7,5 \times 10^4$  stanica po jažici i inkubirane 48 sati na  $37\text{ }^\circ\text{C}$  (5 %  $\text{CO}_2$ ). Nakon dva dana, stanice su tretirane s  $1 \times 10^{-6}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  otopinom svakog spoja i ostavljene u staničnom inkubatoru 60 minuta kako bi spojevi ušli u stanice. Nakon inkubacije medij je promijenjen, a u komore je dodano 500  $\mu\text{L}$  otopine MitoTracker Deep Red (Invitrogen, Molecular Probes) u koncentraciji  $1 \times 10^{-7}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ . Stanice su inkubirane 20 minuta ( $37\text{ }^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ ), omogućujući MitoTrackeru da uđe u stanice. Nakon inkubacije, medij je zamijenjen s 500  $\mu\text{L}$  svježeg medija. Kolokalizacija spojeva ( $\lambda_{\text{exc}} = 505\text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 550\text{ nm}$ ) i mitohondrija (MitoTracker  $\lambda_{\text{exc}} = 644\text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 665\text{ nm}$ ) je određena korištenjem konfokalnog mikroskopa Leica SP8 X (Leica Microsystems, Njemačka).

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Fenantridinski derivati

Pripravljena su četiri nova derivata 8-amino-6-metilfenantridina i 3,8-bis(amino)-6-metilfenantridina koji sadrže triptofansku aminokiselinu kao supstituent (slika 20).

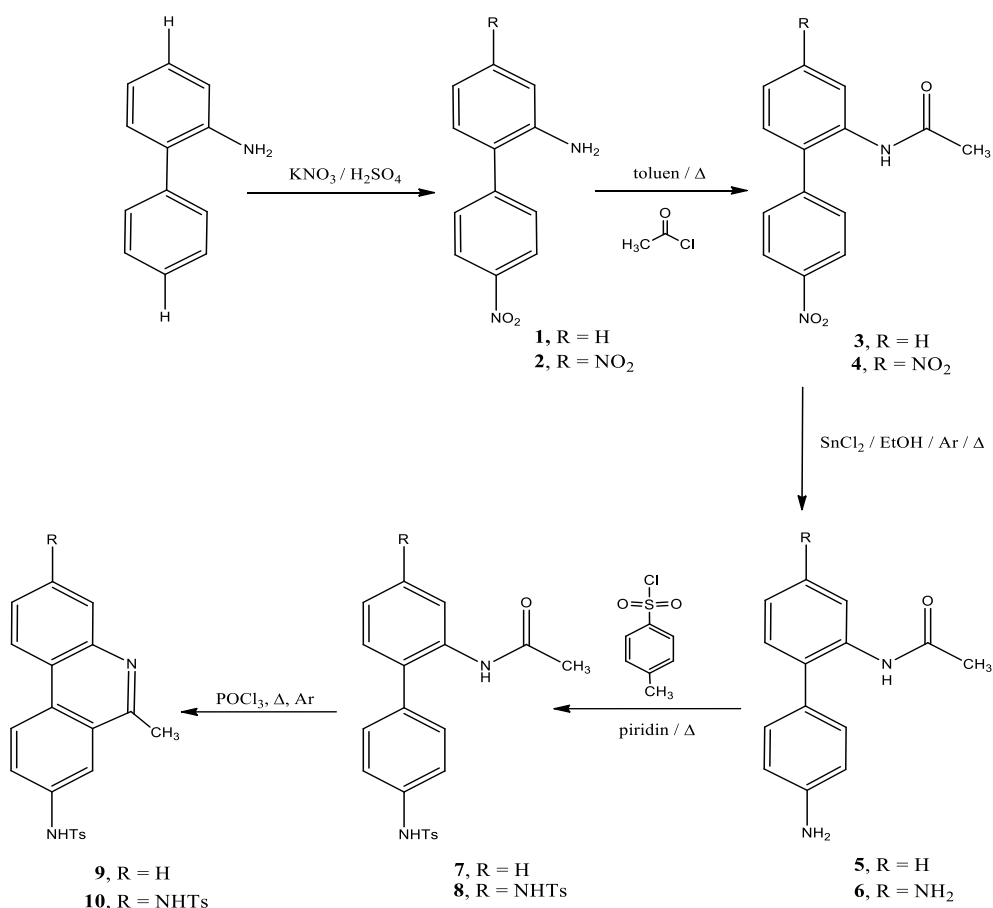


Slika 20. Sintetizirani fenantridinski derivati (**A1** – **A4**) za ispitivanje interakcija sa strukturom *ctDNA*.

Nakon toga derivati su spektroskopski okarakterizirani i ispitane su njihove interakcije s *ctDNA*, te su provedena biološka ispitivanja.

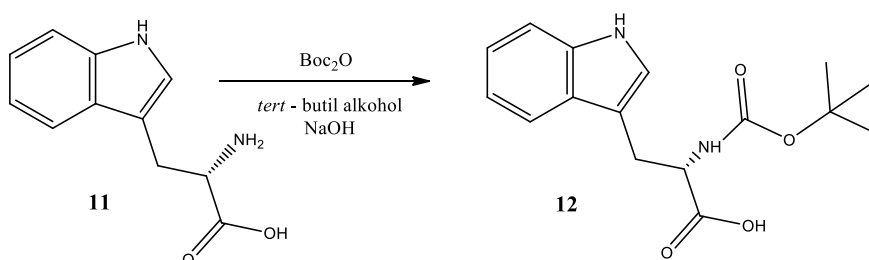
#### 4.1.1. Sinteza fenantridinskih derivata

Sinteza fenantridinske jezgre provedena je u pet koraka, a kreće iz komercijalno dostupnog 2-aminobifenila koji reakcijom nitriranja daje 2-amino-4'-nitrobifenil (**1**), odnosno 2-amino-4,4'-dinitrobifenil (**2**).<sup>135</sup> Nitriranje se provodi pomoću kalijeva nitrita u koncentriranoj sumpornoj kiselini. Oba su spoja dobivena u visokim iskorištenjima (90 %). Nitrirani bifenil acilira se u toluenu pomoću acetil-klorida uz zagrijavanje na 100 °C. Dobiveni su produkti **3** i **4** s iskorištenjima od 90 %. Idućom reakcijom nitro skupine se reduciraju. Redukcija je provedena pomoću kositar (II) klorida u apsolutnom etanolu. Reakcija se odvijala u atmosferi argona s grijanjem uz povrat, te su nakon neutralizacije dobiveni produkti **5** i **6** u iskorištenju 75 %. Na amino skupinu uvodi se tosilna zaštita. Reakcija se provodi u piridinu i dobiveni su tosilirani aminobifenili **7** i **8**<sup>149</sup> u iskorištenju od 70 %. Bifenil se prevodi u fenantridin reakcijom Morgan-Walls-ove ciklizacije (shema 7).<sup>43,150</sup> Reakcija se odvija u u fosforovom oksikloridu koji istovremeno služi i kao otapalo i kao reaktant, Lewisova kiselina. Zaštitom aminobifenila s tosilnom skupinom spriječava se nastajanje polimernih nusprodukata zbog reakcije amino-skupina s POCl<sub>3</sub>. Nakon završetka reakcije slijedi neutralizacija dobivenog hidroklorida s vodenom otopinom natrijeve lužine pri čemu se dobije fenantridin **9** s amino skupinama u položaju 8, odnosno **10** s amino skupinama na položajima 3 i 8 (shema 7) u obliku taloga i u iskorištenju većem od 80 %.



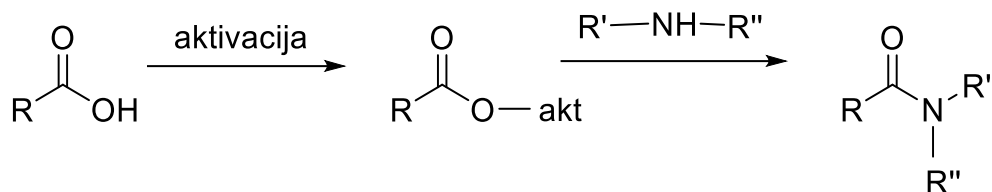
Shema 7. Sinteza 6-metil-8-tosilaminofenantridina **9** i 6-metil-3,8-bis(toslilamino)fenantridina **10**.

Kako bi se dobili željeni derivati fenantridina **A1** – **A4** (slika 20), prije vezanja aminokiseline na fenantridin, potrebno je zaštititi amino-skupinu triptofana. Amino-skupina triptofana **11** zaštićena je *tert*-butiloksikarbonilnom skupinom (Boc) te je dobiven zaštićeni produkt **12** (85 %).<sup>137</sup> Reakcija je prikazana na shemi 8.



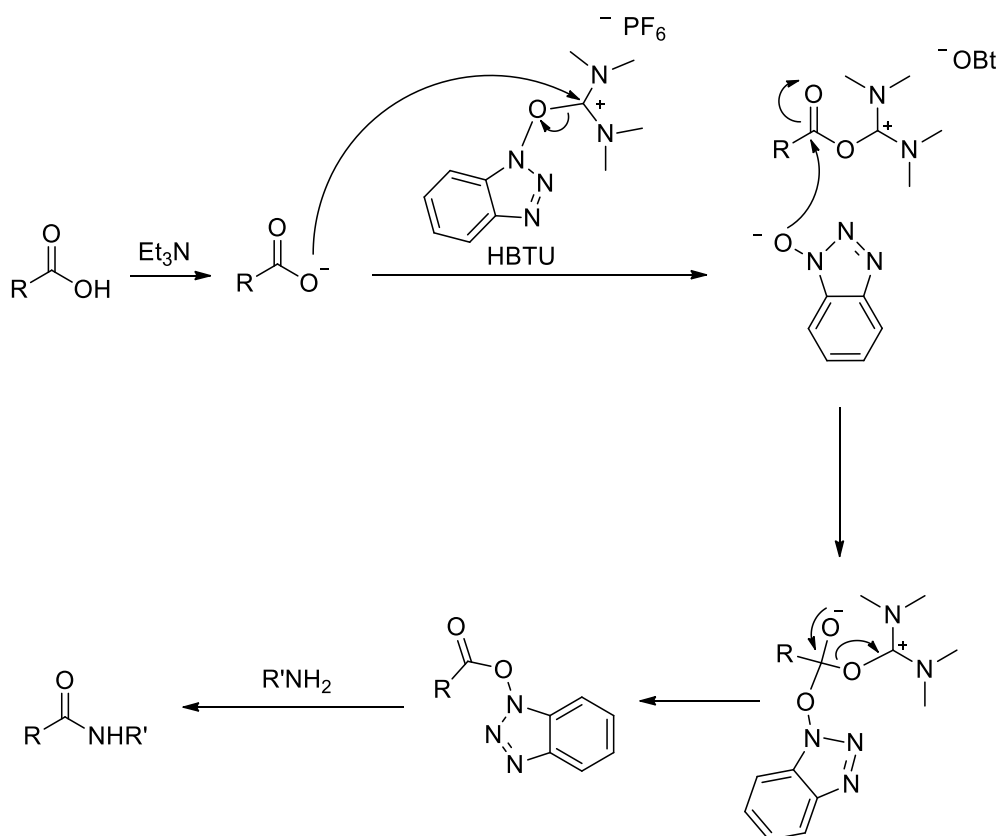
Shema 8. Uvođenje Boc zaštitne skupine na amino-skupinu triptofana.

Nakon uvođenja zaštite na amino skupinu triptofana, amidnom vezom spajaju se triptofan i fenantridin. Karboksilna skupina triptofana aktivira se uvođenjem dobre odlazeće skupine.<sup>78</sup> Na taj način omogućuje se nukleofilni napad amino skupine na karboksilni dio (shema 9).



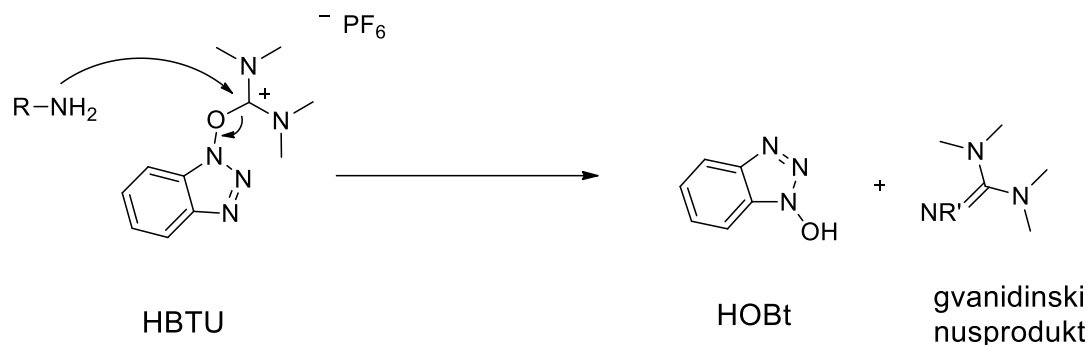
Shema 9. Aktivacija karboksilne kiseline za nastanak amidne veze.<sup>151</sup>

Često korišteni i učinkoviti reagensi za povezivanje (engl. *coupling*) na bazi 1H-benzotriazola su uronijeve/aminijeve soli.<sup>78,151,152</sup> Korišteni reagens *O*-(1H-benzotriazol-1-il)-N, N, N', N'-tetrametiluronij heksafluorofosfat (HBTU) prvo reagira s karboksilnom kiselinom stvarajući aktivni ester koji reagira s aminom. (shema 10).



Shema 10. Aktivacija karboksilne kiseline s HBTU reagensom.<sup>78</sup>

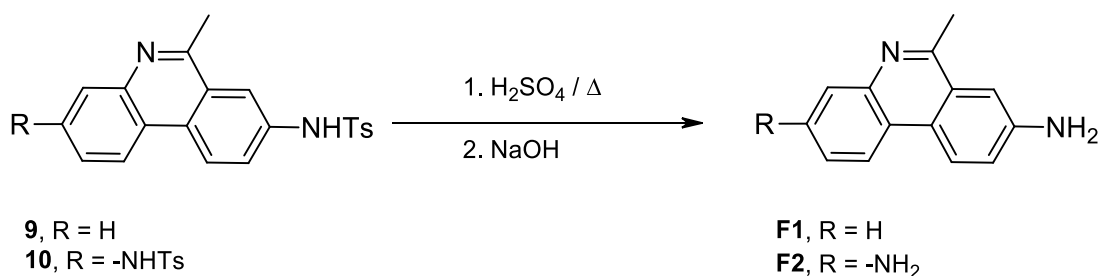
Prilikom korištenja HBTU reagensa u reakciji moguć je nastanak gvanidinskog nusprodukta. Korištenjem nukleofila 1-hidroksi-1H-benzotriazola (HOBt) dolazi do znatnog sprječavanja neželjene gvanidilacije (shema 11), smanjuje se racemizacija, a i reakcijska iskorištenja su poboljšana.<sup>78,151</sup>



Shema 11. Nastajanje gvanidinskog nusprodukta

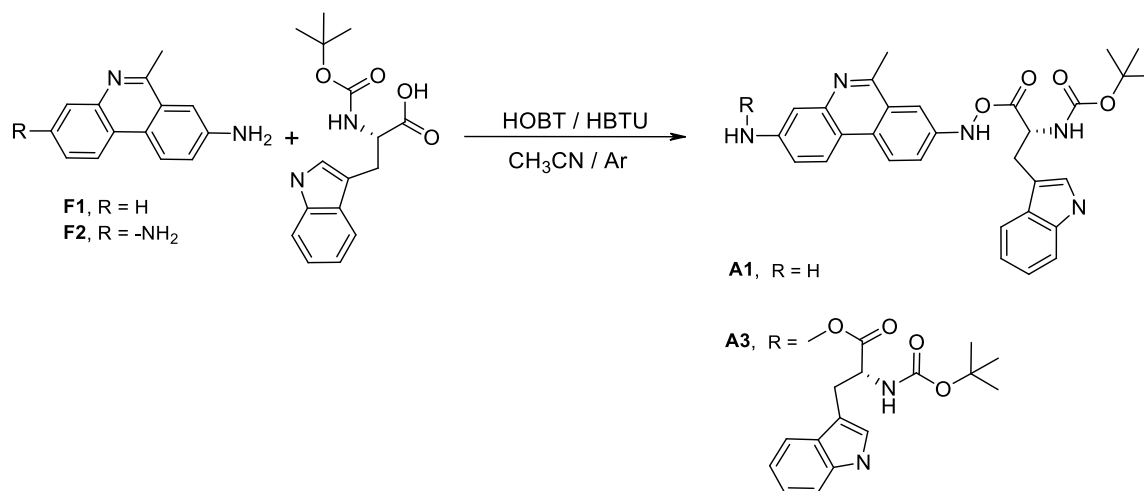
U reakciji povezivanja fenantridina i triptofana karboksilna kiselina aktivirana je HBTU reagensom, a HOBt je dodan kako bi se potisnula racemizacija i smanjilo nastajanje nusprodukta. Reakcija je provedena u acetonitrilu, a korištena je organska baza trietilamin u suvišku te ekvimolarne količine ostalih reagensa.

Prije same reakcije povezivanja fenantridina s aminokiselinom, tosilna zaštita na fenantridinskim amino skupinama uklonjena je grijanjem u koncentriranoj sulfatnoj kiselini te su produkti **F1** i **F2** neutralizirani (shema 12). Produkti **F1** i **F2** dobiveni su u 98 %-tnom iskorištenju.<sup>136</sup>



Shema 12. Uklanjanje tosilne zaštite s fenantridinske amino-skupine.

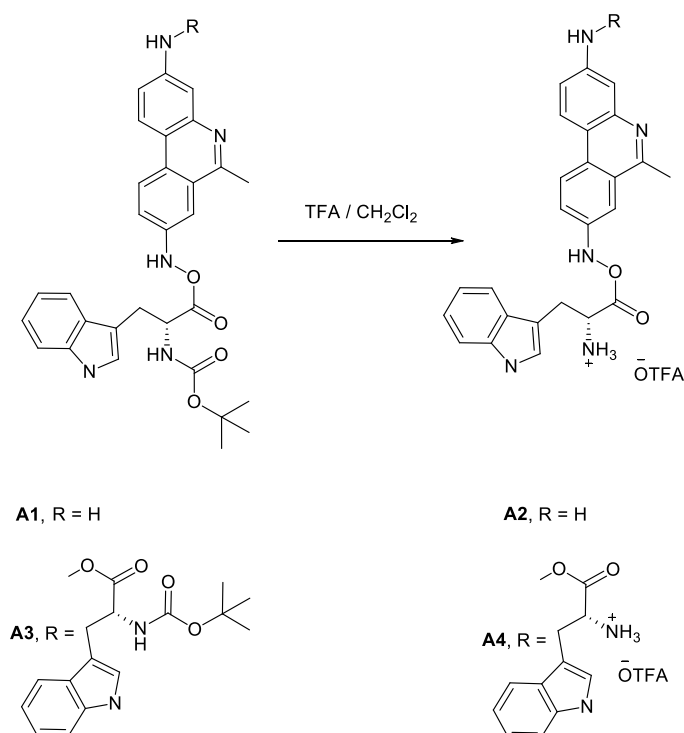
Stvaranjem amidne veze između triptofana i fenantridina dobiveni su željeni produkti **A1** i **A3** (shema 13) s iskorištenjem 20 % za oba produkta.



Shema 13. Reakcija dobivanja derivata **A1** i **A3**.

Pokazalo se kako su najbolja iskorištenja dobivena kad se reakcija odvijala preko noći, u slučaju derivata **A1** ili kada se reakcija provodila tri dana u slučaju derivata **A3**.

Uklanjenjem Boc zaštitne skupine u blagim uvjetima pomoću trifluoroctene kiseline (TFA), dobiveni su derivati **A2** i **A4** u obliku soli trifluoroctene kiseline (shema 14), uz iskorištenje od 10 % za oba produkta.<sup>153</sup>



Shema 14. Reakcija dobivanja derivata **A2** i **A4** u obliku trifluoroacetata.

Uklanjanje zaštitne skupine daje slobodne amino skupine koje imaju mogućnost stvaranja vodikovih veza prilikom interakcije s polinukleotidima. S obzirom da je  $pK_a$  fenantridinskog dušika oko šest,<sup>154</sup> fenantridin je protoniran u reakcijskim uvjetima.

#### 4.1.2. Spektroskopska karakterizacija fenantridinskih derivata

Apsorpcije ispitivanih spojeva bile su proporcionalne njihovim koncentracijama do  $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  (Dodatak, slika D.8.1.). Linearna ovisnost apsorpcije o koncentraciji pokazuje da proučavani spojevi ne agregiraju intermolekulskim interakcijama u korištenim eksperimentalnim uvjetima. U tablici 1 prikazani su apsorpcijski maksimumi i odgovarajući molarni apsorpcijski koeficijenti ( $\epsilon$ ) proučavanih spojeva te valne duljine maksimuma fluorescencije. Ekscitacijski spektri ( $\lambda_{\text{max}}(\mathbf{A1}) = 275 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{max}}(\mathbf{A2}) = 266 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{max}}(\mathbf{A3}, \mathbf{A4}) = 280 \text{ nm}$ ) odgovaraju apsorpcijskim spektrima spojeva u području gdje se emisijski i ekscitacijski spektar ne preklapaju (Dodatak, slika D.8.2.).

Tablica 1. Prikaz emisijskih i apsorpcijskih maksimum te pripadajućih molarnih apsorpcijskih koeficijenata fenantridinskih derivata **A1** – **A4**<sup>a</sup>.

ligand	UV / Vis $\lambda_{\text{max}}$ (nm)	$\epsilon$ ( $\text{mmol}^{-1} \text{ cm}^2$ )	$\lambda_{\text{em}}$ (nm)
<b>A1</b>	275	36805	385
<b>A2</b>	266	28029	385
<b>A3</b>	280	26742	365
<b>A4</b>	280	13957	365

<sup>a</sup> pufer natrijevog kakodilata,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ; pH = 7,0.

#### 4.1.3. Interakcije fenantridinskih derivata s *ct*DNA

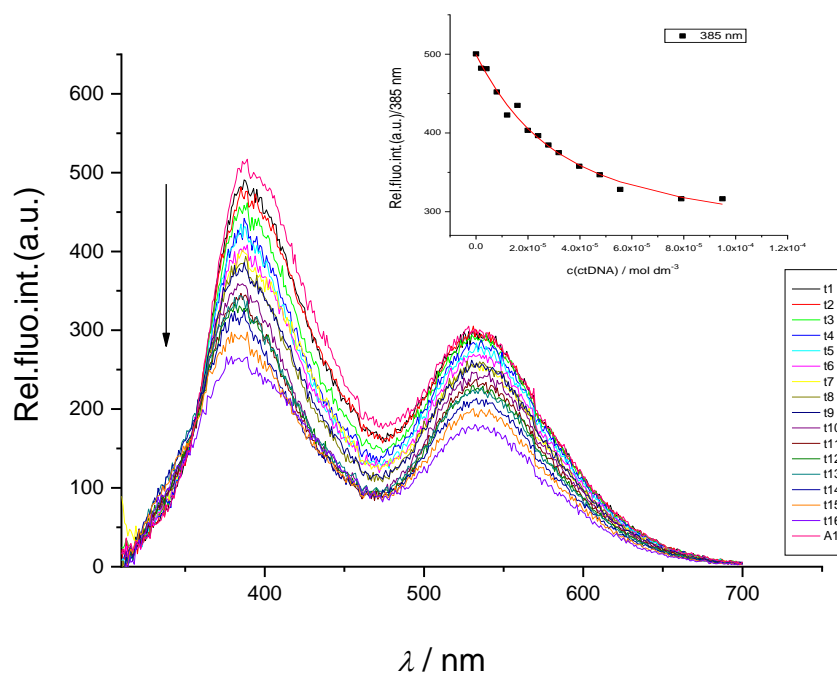
Interakcije fenantridinskih derivata preliminarno su ispitane s *ct*DNA kako bi se utvrdio afinitet prema strukturi B-uzvojnice DNA koja se sastoji od miješanog udjela AT i GC parova baza (58 % AT parova baza). Mjerenja su provedena metodama fluorescencijske spektroskopije i cirkularnog dikroizma.

##### 4.1.3.1. Fluorescencijska spektroskopija

Kako bi se ispitali afiniteti vezanja fenantridina s *ct*DNA korištena je fluorescencijska spektroskopija. Od četiri ispitana fenantridinska liganda, dva su liganda (**A1** i **A2**), sa



zaštićenom i slobodnom triptofanskom aminokiselinom na položaju 8, pokazali dobro vezanje s *ctDNA* (slika 20; Dodatak, slika D.8.3; tablica 2).



Slika 20. Promjene u fluorescencijskom spektru liganda **A1** ( $c = 1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 275 \text{ nm}$ ) nakon titracije s *ctDNA* ( $c = 1,99 \times 10^{-6} - 6,34 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); Umetak: Eksperimentalni (●) i izračunati (–) (prema Scatchardovoj<sup>144,145</sup> jednadžbi) intenziteti fluorescencije liganda **A1** na valnoj duljini emisije,  $\lambda_{\text{em}} = 385 \text{ nm}$  nakon dodatka *ctDNA* (pH = 7,0; natrijev kakovilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).

Titracijom liganda **A3** i **A4** s *ctDNA* dobivene su linearne promjene emisije te se moglo samo procijeniti da su logaritmi konstanti vezanja niži od pet (Dodatak, slika D.8.4. i D.8.5.; tablica 2).

Tablica 2. Konstante vezanja ( $\log K_a$ )<sup>a</sup> dobivene iz fluorimetrijskih titracija liganada **A1** – **A4** sa strukturom *ctDNA* pri pH = 7,0 (natrijev kakovilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).

	<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b>A3</b>	<b>A4</b>
	<b><math>\log K_a</math></b>			
<b><i>ctDNA</i></b>	5,85	6,17	– <sup>b</sup>	– <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Podaci su obrađeni korištenjem Scatchardove<sup>144,145</sup> jednadžbe i dobiveni su omjeri  $n$  [vezani ligand]/[fosfat] = 0,07 (**A1**) i 0,5 (**A2**); koeficijenti korelacije su 0,9 za izračunate  $K_a$ ;

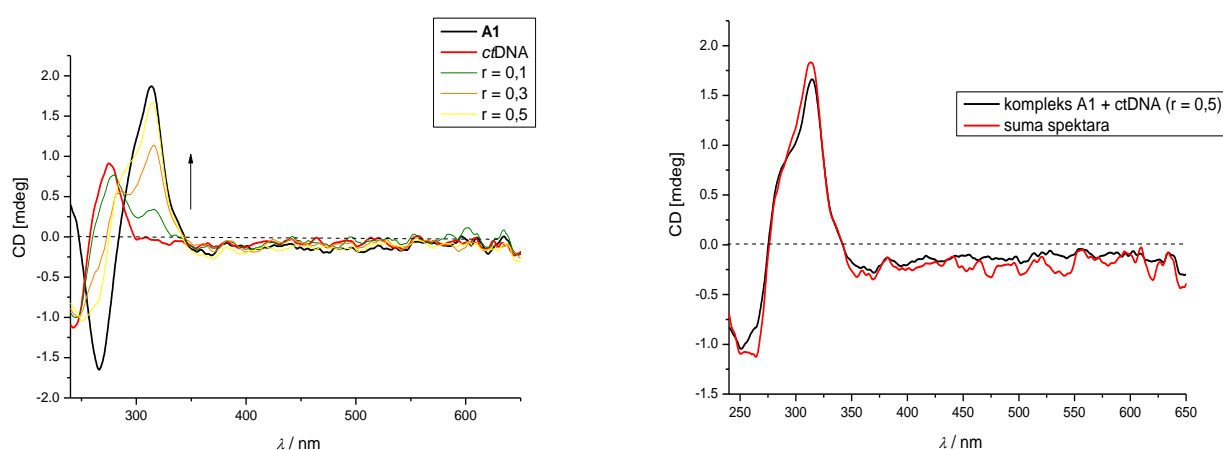
<sup>b</sup> u slučaju liganada **A3** i **A4**,  $\log K_a$  vrijednost nije se mogla izračunati zbog linearnih promjena.

Struktura *ctDNA* pripada B-uzvojnici koju karakteriziraju jasno definirani mali i veliki utor. Veliki je utor širok i plitak, a mali dubok i uzak.<sup>22</sup> Mogući uzrok slabog vezanja liganda **A3** i **A4** može biti steričke prirode budući da oba liganda imaju po dvije triptofanske aminokiseline smještene na fenantridinskoj jezgri na pozicijama 3 i 8.

#### 4.1.3.2. Cirkularni dikroizam

Kako bi se dobio uvid u konformacijske promjene u sekundarnoj strukturi polinukleotida nakon vezanja male molekule, korištena je spektroskopija cirkularnog dikroizma (CD).<sup>119</sup> Cirkularni dikroizam vrlo je osjetljiv na konformacijske strukture spiralne uzvojnice DNA/RNA. Pri interakciji akiralnih malih molekula s nukleinskim kiselinama može se pojaviti inducirani CD signal (ICD) iz kojeg možemo dobiti korisne informacije o načinu vezanja malih molekula na nukleinske kiseline.<sup>155,156</sup> ICD signali uočeni na  $\lambda > 300$  nm mogu se pripisati isključivo proučavanim akiralnim spojevima jer oni pokazuju apsorpcijske spektre u ovoj regiji dok nukleinske kiseline ne pokazuju.<sup>156,157</sup> Ovom metodom može se odrediti uzajamna orijentacija male molekule i polinukleotidne kiralne osi, posljedično pružajući vrijedne informacije o načinima vezanja.<sup>156</sup>

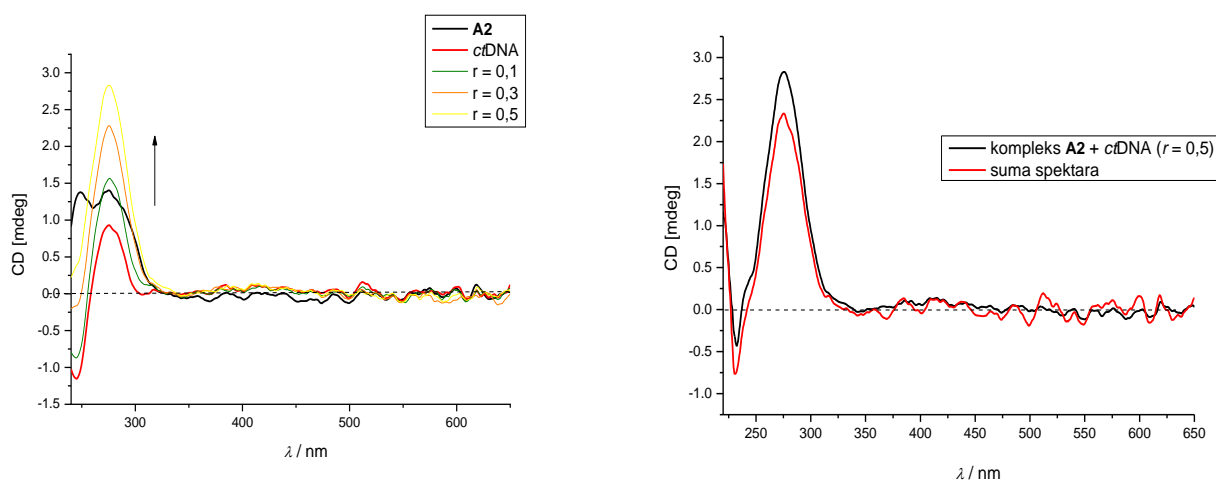
Sva četiri sintetizirana fenantridinska derivata (**A1** – **A4**) imaju kiralni centar zbog čega, za razliku od akiralnih molekula, posjeduju intrinzični CD spektar (slika 21). Usporedbom CD spektara kompleksa *ctDNA* i **A1** te sume CD spektara čistih specija vidi se da je utjecaj kompleksiranja na CD spektar polinukleotida vrlo mali, te se na temelju tih promjena ne može donijeti zaključak o načinu vezanja.



Slika 21. lijevo: CD titracija *ctDNA* ( $c = 3,0 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>) s ligandom **A1** u različitim molarnim omjerima,  $r$  ([spoj]/[polinukleotid]); desno: CD spektar kompleksa *ctDNA* i liganda **A1**,  $r$  ([spoj]/[polinukleotid]) = 0,5 (crna linija) i izračunata suma CD spektara

*ctDNA* i liganda **A1** (crvena linija); koncentracije odgovaraju koncentracijama specija u kompleksu; oba eksperimenta rađeni pri istim uvjetima (pH = 7,0; natrijev kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).

Spoj **A2**, u kojem je amino-skupina triptofana slobodna, nije dao inducirane signale već je uzrokovao porast CD intenziteta *ctDNA* na njenoj maksimalnoj vrijednosti na 275 nm (slika 22, lijevo), što je vidljivo iz sume spektara čistih specija u usporedbi sa spektrom kompleksa (slika 22, desno).



Slika 22. lijevo: CD titracija *ctDNA* ( $c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s ligandom **A2** u različitim molarnim omjerima,  $r$  ([spoj]/[polinukleotid]); desno: CD spektar kompleksa *ctDNA* i liganda **A2**,  $r$  ([spoj]/[polinukleotid]) = 0,5 (crna linija) i izračunata suma CD spektara *ctDNA* i liganda **A2** (crvena linija); koncentracije odgovaraju koncentracijama specija u kompleksu; oba eksperimenta rađeni pri istim uvjetima (pH = 7,0; natrijev kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).

Ostala dva liganda, **A3** i **A4**, koji imaju dvije triptofanske jedinice vezane na pozicijama 3 i 8 fenantridinske jezgre, nisu pokazala nikakve promjene u CD spektrima (Dodatak, slika D.8.6.): ni ICD signale, a ni promjenu u signalima *ctDNA*.

## 4.1.4. Biološka ispitivanja

Ispitana je biološka aktivnost fenantridinskih derivata **A1** – **A4** na vitalnost stanica tumorske stanične linije vrata maternice (HeLa). Vrijednosti  $IC_{50}$  prikazane su u tablici 3.

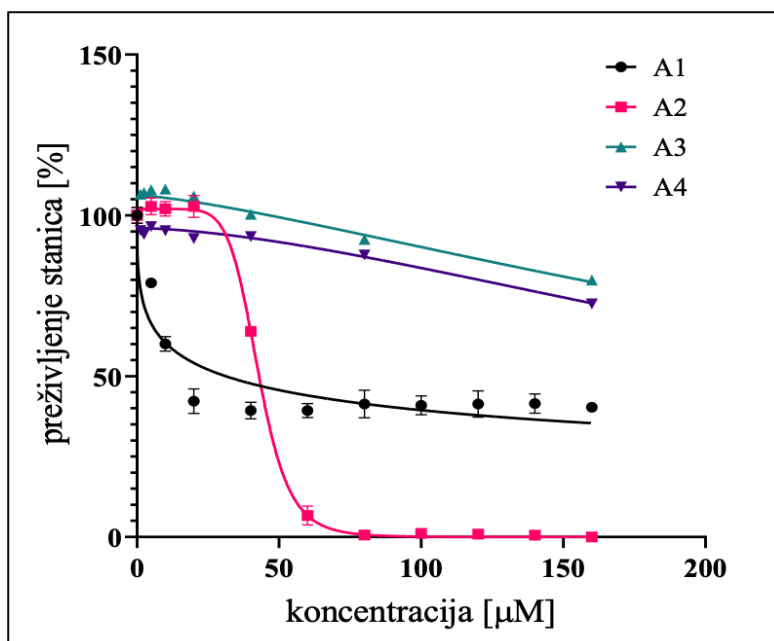
Tablica 3. Citotoksična aktivnost ispitivanih liganada **A1** – **A4** sa staničnom linijom HeLa.  $IC_{50}$  i  $IC_{80}^{a,b}$  ( $IC_{50/80}$  ( $10^{-6}$  mol  $dm^{-3}$ )  $\pm$  SD) vrijednosti izračunate nakon 72 satne inkubacije ligandima **A1** – **A4**.

	<b>A1</b>	<b>A2</b>	<b>A3</b>	<b>A4</b>
<b>IC<sub>80</sub></b>	12,81 $\pm$ 8,68	38,15 $\pm$ 2,33	135,70 $\pm$ 1,56	133,55 $\pm$ 4,03
<b>IC<sub>50</sub></b>	24,15 $\pm$ 3,90	43,31 $\pm$ 3,72	302,7 $\pm$ 10,89	443,40 $\pm$ 17,96 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> IC vrijednosti izračunate su nelinearnom regresijom metodom najmanjih kvadrata iz najmanje tri ponavljanja;

<sup>b</sup> vrijednosti  $IC_{50}$  nije bilo moguće izračunati eksperimentalno jer je maksimalna ispitivana koncentracija bila  $3,2 \times 10^{-4}$  mol  $dm^{-3}$  zbog čega su prikazane  $IC_{80}$  vrijednosti; <sup>c</sup> računalno procjenjene vrijednosti.

Citotoksična aktivnost fenantridinskih derivata prikazana je ispitivanjem utjecaja spojeva na preživljenje stanica raka vrata maternice (HeLa) MTT testom. MTT testom mjeri se vijabilnost stanica. Test je temeljen na pretvorbi tetrazolijske boje MTT u netopivi ljubičasto obojeni formazan kao posljedica aktivnosti enzima mitohondrijske reduktaze. Intenzitet obojenja proporcionalan je količini stanica koje metaboliziraju, odnosno koje su žive, i mjeri se spektrofotometrom.<sup>158</sup> Rezultati su pokazali da spoj **A1** ima izražen citotoksični učinak pri niskim koncentracijama i strmu krivulju odgovora ovisno o dozi (slika 23). Maksimum učinka spoja dosegnut je na  $IC_{35}$  –  $IC_{40}$ . Međutim, spoj **A2** postiže citotoksični efekt pri malo višim koncentracijama u odnosu na **A1** te također ima strmu krivulju odgovora ovisno o dozi. Za razliku od **A1**, korištenjem spoja **A2** moguće je postići 100 %-tni citotoksični učinak.



Slika 23. Prikaz rezultata jednog reprezentativnog eksperimenta u kojem je stanična linija HeLa tretirana je različitim koncentracijama fenantridinskih derivata. Preživljenje stanica izmjereno je MTT testom 72 sata nakon tretmana. Rezultati prikazani u obliku krivulje i izraženi kao srednja vrijednost postotka preživljenja u odnosu na netretirane stanice  $\pm$  SD vrijednost.

Spojevi **A3** i **A4** nisu imali značajni citotoksični učinak ni u koncentracijama od  $3,2 \times 10^{-4}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ , pri kojima je već i citotoksični efekt samog otapala (DMSO) vrlo izražen. Daljnja istraživanja mehanizma ulaska, metabolizma i djelovanja spojeva bit će usmjerena na spoj **A2**.



Tablica 4. Prikaz emisijskih i apsorpcijskih maksimuma te pripadajućih molarnih apsorpcijskih koeficijenata benzotiazolnih liganada **B1** – **B9**. Uz navedeno, prikazan je i Stokesov pomak te apsolutni kvantni prinos ispitivanih liganada.

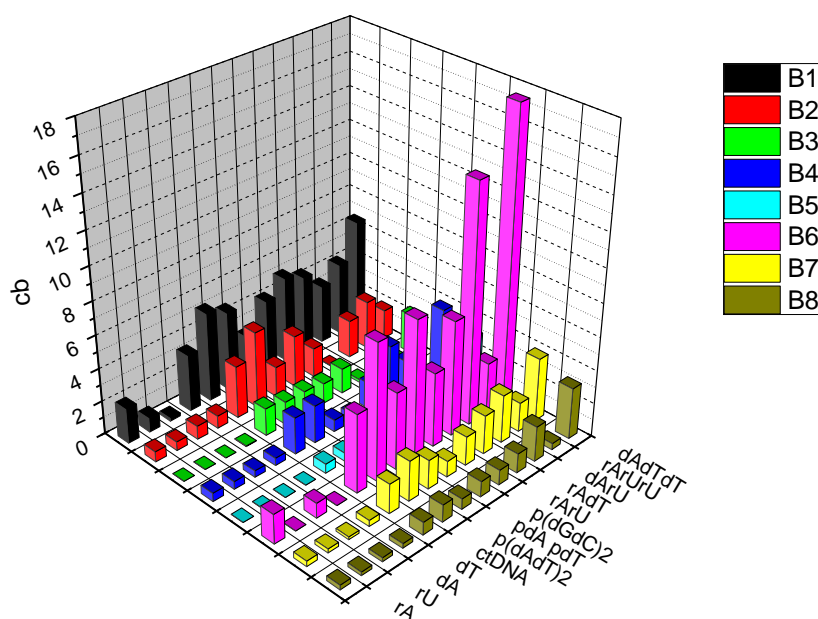
ligand	UV/Vis $\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon$ (mmol <sup>-1</sup> cm <sup>2</sup> )	$\lambda_{em}$ (nm)	Stokesov pomak (10 <sup>-18</sup> J)	$\Phi_f$ <sup>c</sup>
<b>B1</b>	330	32052	379	4,1	0,06
<b>B2</b>	285 / 320 <sup>b</sup>	31744 / 20612	450	1,2/1,5	0,13
<b>B3</b>	330	30745	385	3,6	0,13
<b>B4</b>	343	44947	416	2,7	0,37
<b>B5</b>	391	77940	497	1,9	0,69
<b>B6</b>	342	25147	430	2,3	0,20
<b>B7</b>	325	35417	444	1,7	0,38
<b>B8</b>	355	36611	430	2,6	0,54
<b>B9</b>	343	24243	442	2,0	0,11

<sup>a</sup> natrijev kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH = 7,0; <sup>b</sup> valna duljina pobude za fluorescencijske titracije  $\lambda_{\max} = 320 \text{ nm}$ ; <sup>c</sup> otopine za određivanje apsolutnog kvantnog prinosa bile su propuhane u atmosferi argona prije mjerenja, pogreška instrumenta za vrijednosti kvantnog prinosa iznosi  $\pm 0,5 \%$ .<sup>159</sup>

#### 4.2.2. Interakcije benzotiazolnih derivata s različitim nukleinskim kiselinama

##### 4.2.2.1. Kompeticijska dijaliza

Ispitivane su interakcije benzotiazolnih derivata **B1** – **B9**, sa strukturnim promjenama na položaju 2 benzotiazolne jezgre na bazi imidazola, s različitim strukturama DNA i RNA. Kao metoda brzog probira korištena je kompeticijska dijaliza (slika 25). Ovom metodom istovremeno su ispitivana po tri spoja iz svake grupe s 13 različitih struktura nukleinskih kiselina (jednolančane, dvolančane, hibridne DNA:RNA te trolančane strukture DNA i RNA). Benzotiazoli **B1** – **B8** nisu agregirali u eksperimentalnim uvjetima dok je ligand **B9** agregirao prilikom eksperimenta i nije odgovarao uvjetima ispitivanja metodom kompeticijske dijalize.<sup>4,120</sup>



Slika 25. Sumirani prikaz rezultata kompeticijske dijalize s osam liganada i 13 različitih struktura nukleinskih kiselina ( $c_b$  = koncentracija liganada vezanog za svaku strukturu nukleinske kiseline u  $10^{-6}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ); ispitivanja su provedena u puferu natrijevog kakodilata s dodatkom 1 mM EDTA,  $I = 0,05$  mol  $\text{dm}^{-3}$ , pH = 7,0.

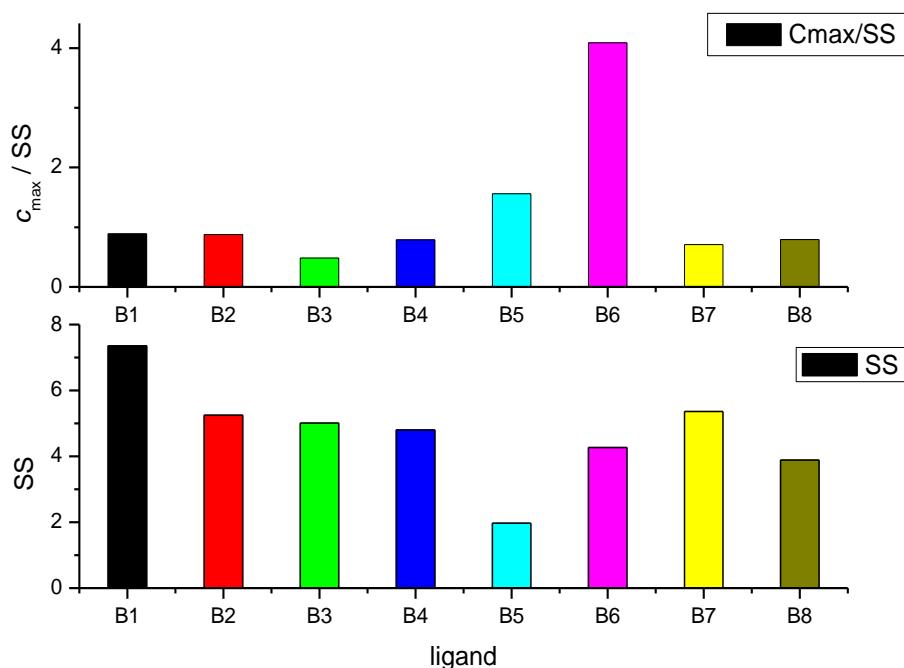
Interakcije benzotiazolnih derivata s dvolančanim polinukleotidima ovise o sastavu baza i sekundarnoj strukturi dvolančanih polinukleotida. Ispitivani ligandi uglavnom su pokazali snažnije vezanje za trolančanu molekulu DNA-dAdTdT, posebno ligand **B5** i **B6**, nego za dvolančane i hibridne molekule DNA i RNA.

Kako je koncentracija liganada vezanog za svaku strukturu nukleinske kiseline ( $c_b$ ) izravno proporcionalna afinitetu vezanja liganada, jasno je da **B1** i **B6** pokazuju najveće afinitete prema većini struktura nukleinskih kiselina. Što se tiče hibridnih molekula DNA:RNA, **B6** je pokazao najjače vezanje za poli dA-poli rU, dok se ligand **B1** malo bolje vezao za poli rA-poli dT nego za poli dA-poli rU. Samo je spoj **B1** pokazao preferencijalno vezanje za jednolančani poli dT, dok su ligandi **B1** i **B6** pokazali jače vezanje za poli rA.

Za bolje razumjevanje rezultata kompeticijske dijalize uvedene su nove vrijednosti, zbroj specifičnosti (engl. *specifity sum*, SS) i omjer  $c_{\max}/SS$ , kako bi se dobile informacije o strukturalnoj selektivnosti i afinitetu spoja.<sup>160</sup> Da bi se izračunao zbroj specifičnosti (SS), najprije je potrebno normalizirati podatke vezanja u odnosu na maksimalnu vezanu koncentraciju ( $c_{\max}$ ) za određenu polinukleotidnu strukturu u eksperimentu. Zatim su normalizirane vrijednosti za svaku strukturu nukleinske kiseline u eksperimentu jednostavno zbrojene.<sup>32,120,121,161</sup> Kako je u



ovom eksperimentu korišteno 13 različitih struktura nukleinskih kiselina, zbroj SS može varirati od 1, što označava preferencijalno vezanje samo na jednu strukturu nukleinske kiseline, do 13, što znači jednako vezanje na sve strukture. Prema slici 26 dolje, najbolju strukturnu selektivnost pokazali su spojevi **B5**, **B6** i **B8**.



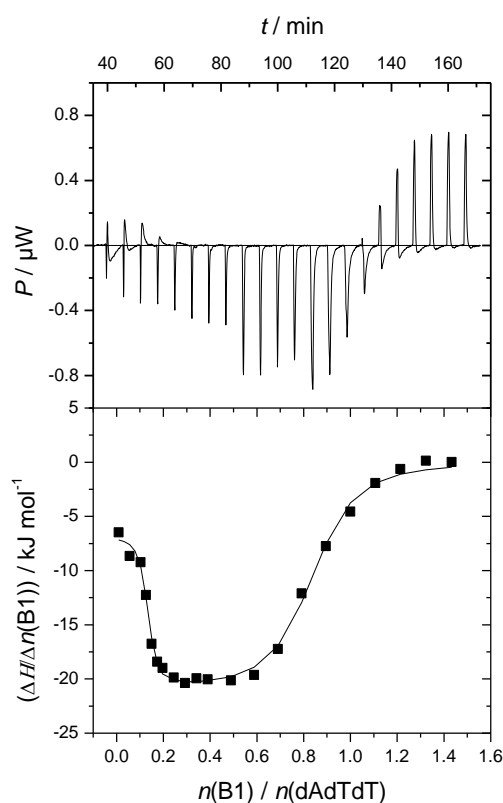
Slika 26. Zbroj specifičnosti SS (dolje) i omjer  $c_{\max}/SS$  (gore) za osam benzotiazolnih derivata.

Omjer  $c_{\max}/SS$  odnosi se na afinitet i na selektivnost te je izravno proporcionalan afinitetu vezanja. Dakle, ako je  $c_{\max}$  visoka vrijednost (visok afinitet vezanja), a SS niska vrijednost (visoka selektivnost), dobit će se visoka vrijednost  $c_{\max}/SS$  i obrnuto.<sup>4,120,162,121</sup> Identifikacija spojeva s najboljom kombinacijom selektivnosti i afiniteta može se dobiti usporedbom vrijednosti SS i  $c_{\max}/SS$ . Na temelju ovih podataka, **B5** i **B6** su identificirani kao spojevi s najvećom kombiniranom selektivnošću i afinitetom. Unatoč najvećoj vrijednosti SS, **B1** je također odabran za daljnju karakterizaciju interakcija s polinukleotidima, budući da je pokazao relativno više vrijednosti  $c_b$  (koncentracija vezanog liganda za svaku strukturu nukleinske kiseline) za dvolančane i trolančane polinukleotide u odnosu na ostale strukture nukleinskih kiselina (slika 25). Sva tri spoja pokazala su selektivnost na strukturu trolančane molekule DNA-dAdTdT. Dodatno, ligand **B6** je pokazao najveći afinitet prema hibridnoj molekuli poli dA-poli rU, dok je **B1** pokazao veći afinitet prema hibridu poli rA-poli dT.

Nakon što je kompeticijska dijaliza, kao metoda brzog probira, dala rezultate afiniteta i selektivnosti pojedinih liganda prema određenim nukleinskim kiselinama (**B1**-dAdTdT, **B1**-poli rA-poli dT, **B6**-dAdTdT, **B6**-poli dA-poli rU i **B5**-dAdTdT), detaljnije su okarakterizirane njihove interakcije ostalim spektroskopskim metodama.

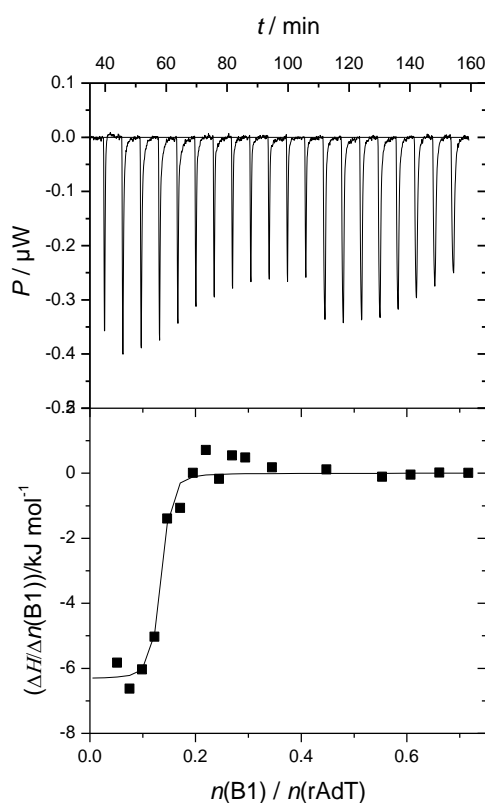
#### 4.2.2.2. Izotermalna titracijska kalorimetrija i fluorescencijska spektroskopija

Ligand **B1** je prema rezultatima kompeticijske dijalize pokazao najveće afinitete prema trolančanoj molekuli DNA-dAdTdT i hibridnoj strukturi poli rA-poli dT. Za karakterizaciju njegova vezanja na ove strukture korištena je izotermalna titracijska kalorimetrija. Eksperimenti izotermalne titracijske kalorimetrije rezultirali su uglavnom negativnim vrijednostima entalpije, što ukazuje da su procesi vezanja egzotermni (slika 27).



Slika 27. (gore) Sirovi podaci titracije liganda **B1** dodavanog u otopinu trolančanog polinukleotida; (dolje) eksperiment izotermalne titracijske kalorimetrije u kojem je trolančana molekula DNA-dAdTdT titrirana s ligandom **B1**; eksperimentalni podaci (■) i izračunati podaci prema modelu dva načina vezanja (—);  $c(\text{dAdTdT}) = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $\text{pH} = 7,0$ ; natrijev kakodilatni pufer s dodatkom  $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  EDTA,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ .

Podaci za kompleks **B1**-dAdTdT prilagođeni su prema modelu s dva načina vezanja korištenjem nelinearne metode najmanjih kvadrata. Spoj **B1** pokazao je dva tipa vezanja u titraciji s trolančanom strukturom DNA-dAdTdT. Prvi način vezanja karakteriziran je višom konstantom vezanja od drugog načina. To je entropijski vođen proces koji je vjerojatno praćen otpuštanjem vezanih molekula vode iz utora polinukleotida.<sup>163</sup> Drugi tip vezanja, karakteriziran je višim omjerom  $n$ , proces je entalpijski vođen i dolazi do povećanja broja vodikovih veza, aromatskog slaganja, elektrostatskih interakcija i van der Waalsovih interakcija. Također, u ovom procesu zamjetan je povoljan entropijski doprinos slobodnoj energiji. Interakcija liganda **B1** s hibridnom strukturom poli rA-poli dT slična je njegovom kompleksu s trolančanom strukturom-dAdTdT, a karakterizira je pozitivna (povoljna) promjena entropije vezanja i slaba negativna promjena entalpije (slika 28), što ukazuje na entropijski vođen proces.

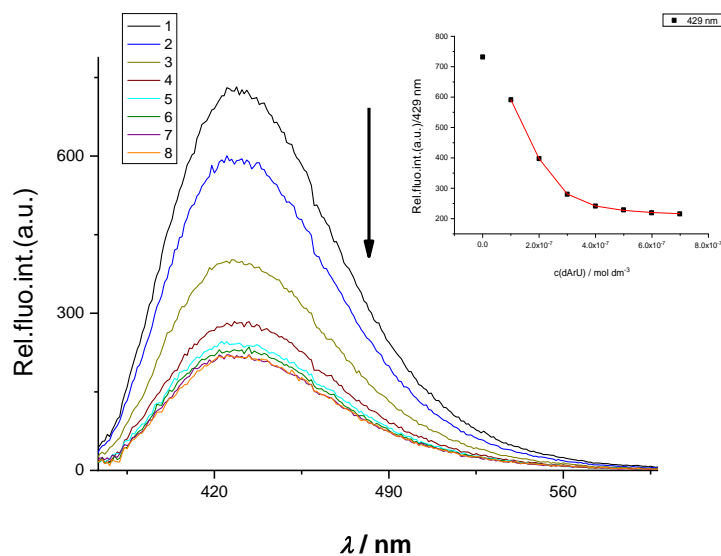


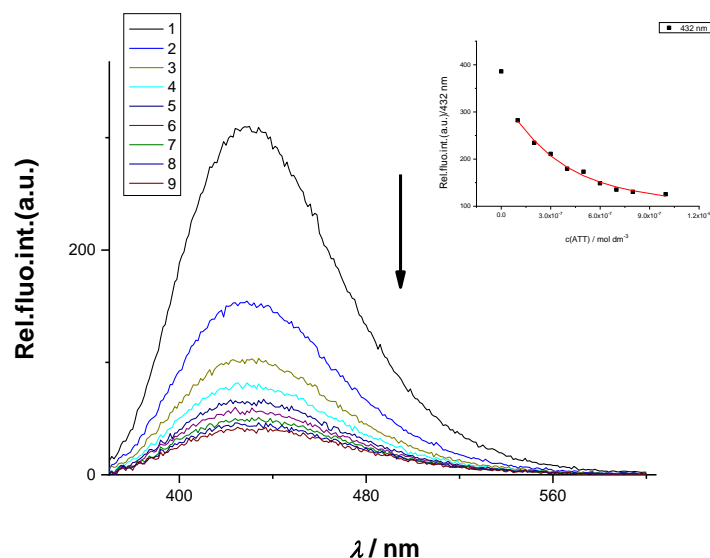
Slika 28. (gore) Sirovi podaci titracije liganda **B1** dodavanog u otopinu hibridnog polinukleotida poli rA-poli dT; (dolje) eksperiment izotermalne titracijske kalorimetrije u kojem je hibridni polinukleotid titriran s ligandom **B1**; eksperimentalni podaci (■) i izračunati podaci prema modelu dva načina vezanja (–);  $c$  (poli rA-poli dT) =  $3,0 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>; pH = 7,0; natrijev kakodilatni pufer s dodatkom  $1 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup> EDTA,  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>.

Vežanje u utor polinukleotida obično je entropijski povoljno i blago endotermno, zbog otpuštanja molekula vode iz uređenih solvacijskih sfera koje okružuju apolarnu površinu utora u okolnu (eng. *bulk*) vodu. Doprinos entalpije slobodnoj energiji povezan je s ukupnim povećanjem veza liganda i domaćina (vodikove veze, ionske, elektrostatske i van der Waalsove interakcije).<sup>164</sup> Analiza kalorimetrijskih eksperimenata spoja **B1** s hibridnom strukturom poli rA-poli dT i trolančanom strukturom-dAdTdT pokazala je visoke i slične konstante vezanja ( $\log K_a$ , tablica 5), što je u skladu s rezultatima dobivenim kompeticijskom dijalizom.

Afiniteti vezanja liganada **B5** i **B6** na strukture nukleinskih kiselina nisu se mogli izračunati metodom izotermalne titracijske kalorimetrije zbog agregacije ovih liganada u rasponu koncentracija koje se koriste za ovu metodu. Afiniteti vezanja ovih liganada sa strukturama nukleinskih kiselina odabranih na temelju kompeticijske dijalize, ispitani su fluorescencijskom spektroskopijom koja omogućuje mjerenje u nižem koncentracijskom području. Interakcija liganada **B5** s trolančanom strukturom DNA-dAdTdT izazvala je male emisijske promjene čime je onemogućen izračun konstante vezanja (Dodatak, slika D.8.9.).

Na temelju podataka fluorescencijskih titracija liganada **B6** i polinukleotida poli dA-poli rU i dAdTdT izračunate su visoke konstante vezanja i visoki omjeri ( $n$ ) za oba kompleksa (slika 29, tablica 5).





Slika 29. (gore) Promjene u fluorescencijskom spektru liganda **B6** ( $c = 2 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 342 \text{ nm}$ ) prilikom titracije s hibridnom strukturom poli dA- poli rU ( $c = 9,9 \times 10^{-8} - 8 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ); umetnuta slika: ovisnost apsorbancije liganda **B6** pri  $\lambda_{\text{max}} = 429 \text{ nm}$  o  $c$  (dArU), pH = 7,0; natrijev kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ . (dolje) Promjene u fluorescencijskom spektru liganda **B6** ( $c = 2 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 342 \text{ nm}$ ) prilikom titracije s trolančanom strukturom-dAdTdT ( $c = 9,9 \times 10^{-8} - 7,9 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ); umetnuta slika: ovisnost apsorbancije liganda **B6** pri  $\lambda_{\text{max}} = 432 \text{ nm}$  o  $c$ (dAdTdT), pH = 7,0; natrijev kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ .

Tablica 5. Podaci dobiveni nelinearnom regresijom (model: jedan i dva načina vezanja) za ITC titraciju za kompleks ligand **B1**-nukleinska kiselina. Konstante vezanja ( $\log K_a$ )<sup>a</sup> i omjeri  $n^a$  ([vezani spoj]/[fosfat]) izračunati iz fluorescencijskih titracija za kompleks ligand **B6**-nukleinska kiselina.<sup>d</sup>

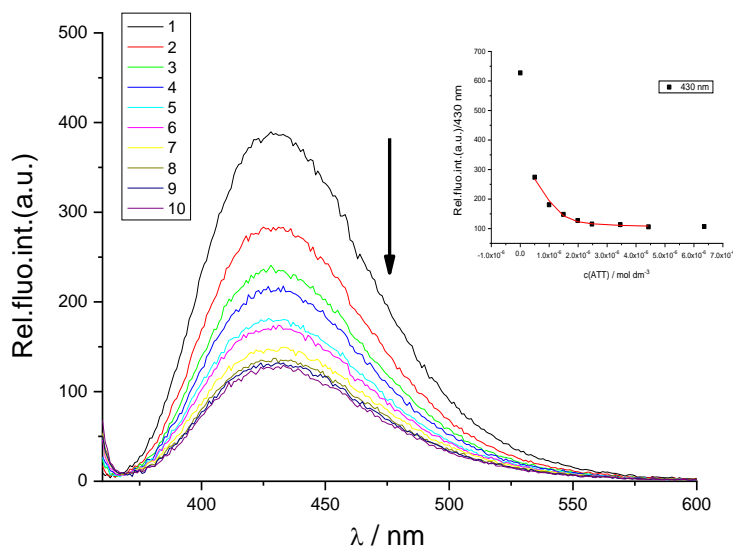
kompleks	$n1/n2$	$\log K_{a1}/K_{a2}$	$\Delta_r H_{1,2}^\circ/\text{kJ mol}^{-1}$	$T\Delta_r S_{1,2}^\circ/\text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta_r G_{1,2}^\circ/\text{kJ mol}^{-1}$
<b>B1-dAdTdT</b>	0,7/0, 1	6,5/8,7	-21,1/-6,8	15,7/43,3	-36,8/-50,1
	$n$	$\log K_a$	$\Delta_r H^\circ/\text{kJ mol}^{-1}$	$T\Delta_r S^\circ/\text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta_r G^\circ/\text{kJ mol}^{-1}$
<b>B1-poli rA-poli dT</b>	0,1	7,8	-6,3	38,4	-44,7
	$n$	$\log K_a$			
<b>B6-dAdTdT<sup>b</sup></b>	0,7	7,6	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>
<b>B6-poli dA-poli rU<sup>b</sup></b>	0,8	8,0	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Obrada titracijskih podataka korištenjem Scatchardove<sup>144,145</sup> jednadžbe dala je vrijednosti omjera  $n$  [vezani spoj]/[fosfat]; koeficijenti korelacije su  $> 0,99$  za većinu izračunatih  $K_a$ ;

<sup>b</sup>  $I/I_0$  za **B6**-dAdTdT i **B6**-poli dA-poli rU = 0,2 i 0,3;  $I_0$ -fluorescencijski intenzitet liganda;  $I$ -fluorescencijski intenzitet kompleksa ligand/fosfat izračunat Scatchardovom jednadžbom;

<sup>c</sup> Konstante vezanja dobivene su fluorescencijskom spektroskopijom; <sup>d</sup> sva su mjerenja napravljena pri pH 7,0 u puferu natrijevog kakodilata,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ .

Kako bi se procijenio utjecaj duljine trolančanog polimera-dAdTdT na konstantu vezanja, interakcije liganda **B6** dodatno su ispitane s trolančanom oligo strukturom-dAdTdT (26 tripleta baza). Obradom titracijskih podataka dobivene su vrijednosti omjera  $n$  i konstante vezanja ( $\log K_a = 7,4$ ;  $n = 0,7$ ) koje su usporedive s onima dobivenim rezultatima s dAdTdT polinukleotidom (slika 30).

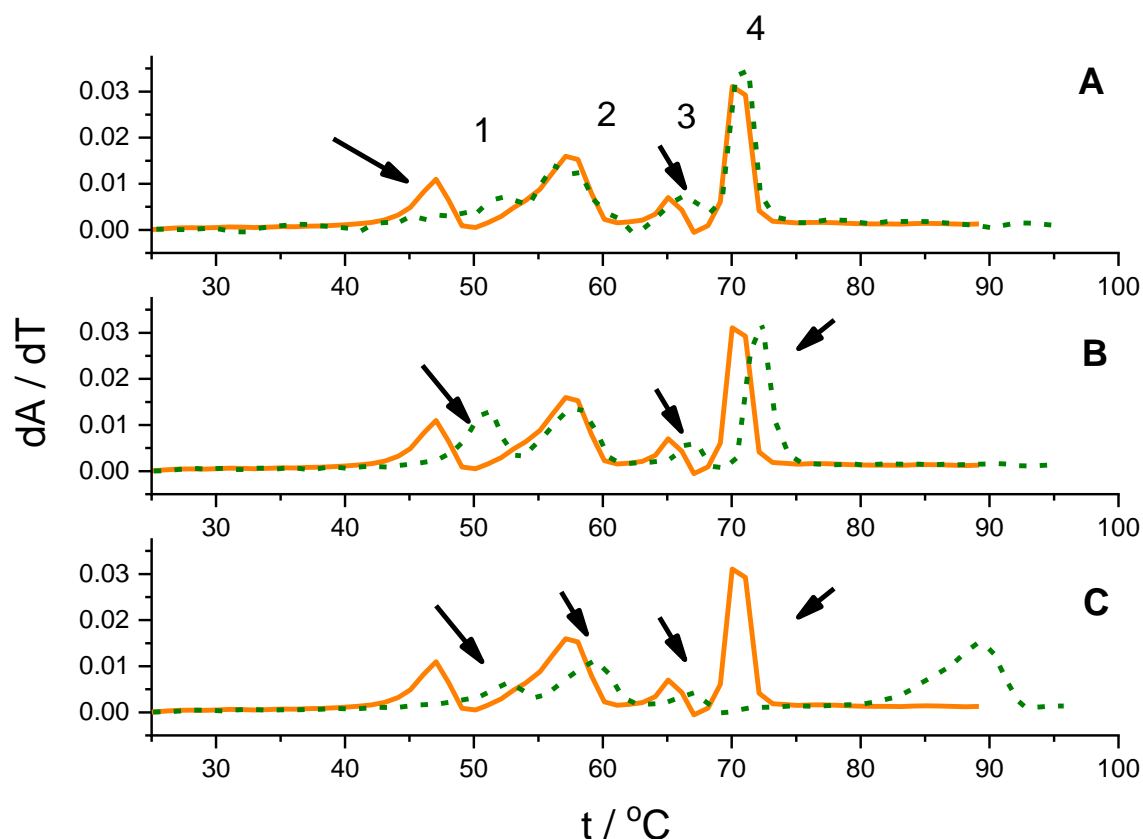


Slika 30. Promjene u fluorescencijskom spektru liganda **B6** ( $c = 1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 342 \text{ nm}$ ) nakon titracije s trolančanim oligo-dAdTdT, 26 tripleta baza ( $c = 5 \times 10^{-7} - 6,36 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ); Umetak: Eksperimentalni (●) i izračunati (–) (prema Scatchardovoj jednadžbi) intenziteti fluorescencije liganda **B6** pri  $\lambda_{\text{max}} = 430 \text{ nm}$  nakon dodatka dAdTdT koja se sastoji od 26 tripleta baza (pH = 7,0; natrijev kakodilatni pufer s dodatkom  $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  EDTA,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).

## 4.2.2.3. Temperaturno mekšanje

Za ispitivanje benzotiazolnih derivata korišten je tipični eksperiment temperaturnog mekšanja (ligand se prati u odnosu na jednu strukturu nukleinske kiseline)<sup>127</sup> i prošireni eksperiment temperaturnog mekšanja (istovremena procjena stabilizacijskog učinka liganda u odnosu na niz različitih struktura nukleinskih kiselina).<sup>161</sup>

U proširenom eksperimentu, selektivnost našeg liganda je proučavana sa smjesom četiriju različitih dvolančanih polinukleotida, DNA (poli dA-poli dT), RNA (poli rA-poli rU) i dvije DNA:RNA hibridne strukture (poli rA-poli dT i poli dA-poli rU) (slika 31). Budući da je rezultatima kompeticijske dijalize utvrđena preferencijalno vezanje ispitivanih liganda na hibridne i višelančane strukture nukleinskih kiselina (**B1**-dAdTdT, **B1**-poli rA-poli dT, **B6**-dAdTdT, **B6**-poli dA-poli rU i **B5**-dAdTdT), u proširenom eksperimentu provjerena je selektivnost prema hibridnim strukturama u odnosu na regularne (nehibridne) strukture DNA i RNA.



Slika 31. Prošireni eksperiment temperaturnog mekšanja smjese četiriju različitih dvolančanih polinukleotida (0,05 mol dm<sup>-3</sup> pufer natrijevog kakodilata s dodatkom 0,05 mol dm<sup>-3</sup> NaCl i 1 × 10<sup>-3</sup> mol dm<sup>-3</sup> EDTA); narančasta linija prikazuje profil temperaturnog

taljenja smjese polinukleotida bez dodatka liganda: hibridna struktura DNA:RNA [poli dA-poli rU; **1**], RNA [poli rA-poli rU; **2**], hibridna struktura RNA:DNA [poli rA-poli dT; **3**] i DNA [poli dA-poli dT; **4**]; koncentracija svakog polinukleotida je  $2 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> (parova baza), a ukupna koncentracija polinukleotida je  $8 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> (parova baza). Isprekidana, zelena linija prikazuje stabilizacijski efekt nakon dodatka liganda (A) **B6** (B) **B5** (C) **B1** u koncentraciji  $2 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>.

Vrijednosti stabilizacija proučavanih struktura nukleinskih kiselina dane su i u tablici 6 i na slici D.8.10. (Dodatak).

Tablica 6. Vrijednosti  $^a\Delta T_m$  (°C) u proširenom eksperimentu temperaturnog mekšanja (poli rA-poli dT, poli rA-poli rU, poli dA-poli rU, poli dA-poli dT)<sup>b</sup> nakon dodatka liganda **B1**, **B5** i **B6** u omjeru  $^c r = 0,025$  u smjesu polinukleotida; pH = 7,0 (natrijev kakodilatni pufer s dodatkom  $1 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup> EDTA,  $I = 0,1$  mol dm<sup>-3</sup>).

polinukleotid	<b>B1</b>	<b>B5</b>	<b>B6</b>
<b>poli dA-poli rU</b>	5,6	4	5,5
<b>poli rA-poli rU</b>	2,2	1	0
<b>poli rA-poli dT</b>	1,7	1,7	1,5
<b>poli dA-poli dT</b>	19,1	2,1	0

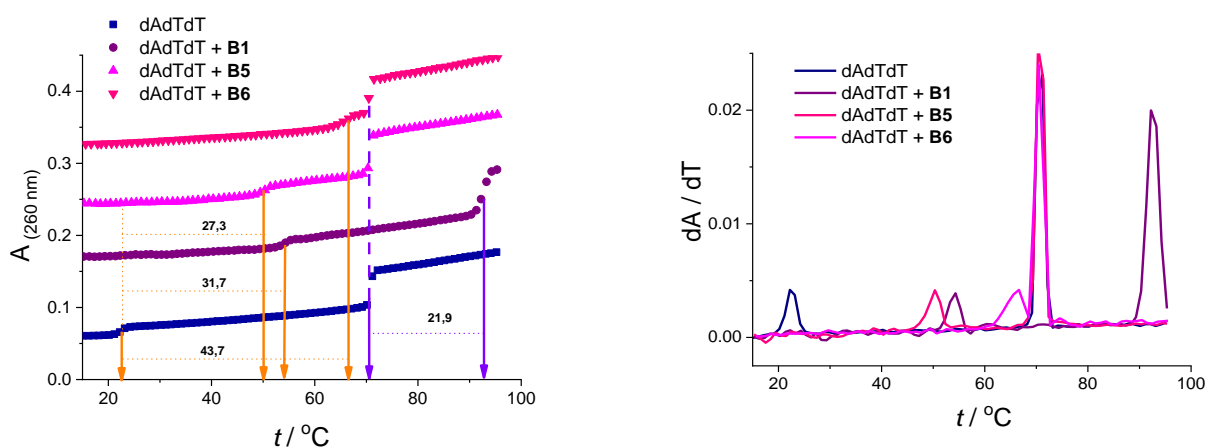
<sup>a</sup>  $\Delta T_m = T_m$  (kompleks ligand-polinukleotid) –  $T_m$  (polinukleotid); pogreška u  $\Delta T_m$ :  $\pm 0,5$  °C; <sup>b</sup>  $T_m$  mješavine polinukleotida bez dodatka liganda, poli dA-poli rU = 47 °C; poli rA-poli rU = 57,4 °C; poli rA-poli dT = 65,3 °C; poli dA-poli dT = 70,6 °C.; <sup>c</sup>  $r = [\text{ligand}]/[\text{polinukleotid}]$ . <sup>d</sup> Sva su mjerenja izvedena pri pH 7,0 (natrijev kakodilatni pufer s dodatkom  $1 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup> EDTA,  $I = 0,1$  mol dm<sup>-3</sup>).

U proširenom eksperimentu temperaturnog mekšanja vidljivo je da su ligandi **B1** i **B5** pokazali stabilizacijski efekt za sva četiri proučavana dvolančana polinukleotida. Osim toga, ova dva spoja pokazala su bolji stabilizacijski učinak na hibridnu strukturu poli dA-poli rU nego na poli rA-poli dT. Zanimljivo je da među ispitivanim dvolančanim strukturama ligand **B6** pokazuje preferencijalnu stabilizaciju hibridne dvolančane strukture, poli dA-poli rU.

Poznato je da stabilnost dvolančanih hibridnih struktura, sastavljenih od homopurinskih i homopirimidinskih lanaca, ovisi o nekoliko čimbenika: udio deoksiribo(pirimidina) u svakom od lanaca, duljini oligomera i postotku sadržaja nukleobaza (A)n:(T ili U)n.<sup>161</sup>



Na primjer, hibridna dvolančana struktura koja sadrži purinski lanac DNA i pirimidinski lanac RNA [d(purin):r(pirimidin)], poput poli dA-poli rU, pokazuje mnogo manju toplinsku stabilnost u usporedbi sa strukturom tipa r(purin):d(pirimidin), poput poli rA-poli dT. Upravo bi manja toplinska stabilnost mogla biti razlog većeg stabilizacijskog efekta s hibridnom strukturom poli dA-poli rU u usporedbi s poli rA-poli dT prilikom interakcije s ligandima **B1**, **B5** i **B6**. Od svih ispitivanih liganda, **B1** je pokazao najznačajniji stabilizacijski učinak s dvolančanom hibridnom strukturom poli dA-poli rU, a posebno s dvolančanim polinukleotidom, poli dA-poli dT (tablica 6). Spoj **B1** ima veći broj (+2) neto pozitivnih naboja za razliku od spojeva **B5** i **B6** (+1) što bi mogao biti uzrok stabilizacijskom učinku. Nadalje, rezultati kompeticijske dijalize pokazali su iznimnu selektivnost liganada prema trolančanoj strukturi DNA-dAdTdT (slika 25). Zbog toga su provedeni klasični eksperimenti temperaturnog mekšanja s ligandima **B1**, **B5**, **B6** i strukturom dAdTdT (slika 32).



Slika 32. Lijevo: Krivulja mekšanja trolančane strukture DNA-dAdTdT nakon dodatka liganada **B1**, **B5** i **B6** u omjeru  $r$  ( $[\text{ligand}]/[\text{polinukleotid}] = 0,1$  pri  $\text{pH} = 7,0$  (natrijev kakodilatni pufer s dodatkom  $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  EDTA,  $I = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ); Desno: prva derivacija apsorbancije (260 nm) u ovisnosti o temperaturi.

Na slici 32 prikazana je krivulja mekšanja trolančane strukture-dAdTdT na kojoj se može vidjeti dvostruki prijelaz. Prvi prijelaz ( $T_{m1}$ ) na temperaturi od 22,6 °C odgovara disocijaciji trećeg lanca (dT) koji je povezan Hoogsteen-ovim vodikovim vezama s dvolančanom molekulom poli dA-poli dT, dok drugi prijelaz ( $T_{m2}$ ) na 70,7 °C odgovara disocijaciji Watson-Crick-ovih parova baza u molekuli poli dA-poli dT.<sup>165,166</sup> Ligand **B5** stabilizirao je isključivo prvi prijelaz trolančane strukture za 27,3 °C dok je drugi prijelaz ostao nepromijenjen. Također na isti način je djelovao i ligand **B6**, samo je njegova stabilizacija

prvog prijelaza veća i iznosi 43,7 °C. Međutim, ligand **B1** stabilizirao je oba prijelaza, prvi prijelaz za 31,7 °C, a drugi prijelaz za 21,9 °C. Ti rezultati su u skladu s rezultatima proširenog eksperimenta temperaturnog mekšanja (tablica 6) u kojem ligand **B1** značajno stabilizira dvolančanu molekulu poli dA-poli dT, dok druga dva liganda pokazuju jako malu ili nikakvu stabilizaciju.

Budući da je svaki od liganda stabilizirao trolančanu strukturu dAdTdT pri omjeru 0,1 provedeni su eksperimenti i s drugim omjerima  $r$  (tablica 7; Dodatak, slike D.8.11. – D.8.13.). Najveću stabilizaciju pokazao je ligand **B6**, koji je značajno stabilizirao trolančanu strukturu dAdTdT čak i pri vrlo niskim omjerima  $r$  ( $r = 0,025$ ).

Tablica 7. Vrijednosti  $^a\Delta T_m$  (°C) stabilizacije  $^b$ trolančane strukture DNA-dAdTdT nakon dodatka liganada **B1**, **B5** i **B6** u omjeru  $^c r = [\text{ligand}]/[\text{polinukleotid}]$  pri pH 7,0 (natrijev kakovilnatni pufer s dodatkom  $1 \times 10^{-3}$  mol dm $^{-3}$  EDTA,  $I = 0,1$  mol dm $^{-3}$ ).

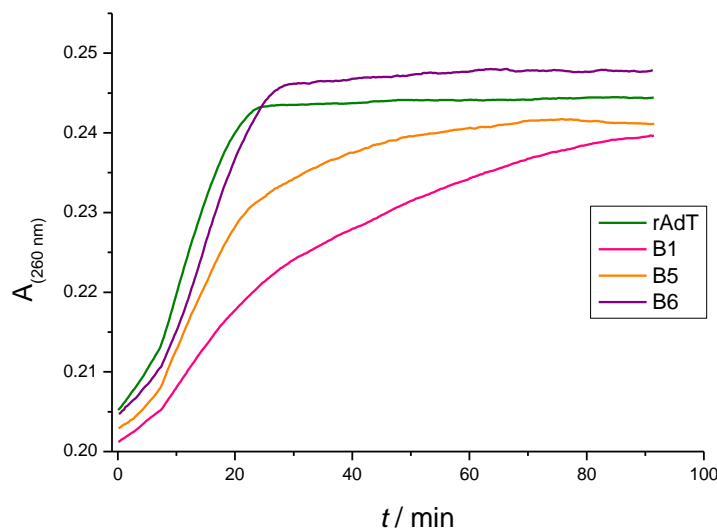
<b>B1</b>			<b>B5</b>			<b>B6</b>		
0,1	0,2	0,3	0,1	0,2	0,3	0,025	0,05	0,1
31,7/21,9	32,5/23,9	-	27,3/0	30,1/0	32,8/0	36,7/0	42,0/0	43,7/0

<sup>a</sup> Pogreška u  $\Delta T_m$ :  $\pm 0,5$  °C; <sup>b</sup>  $T_m$  vrijednosti za bifaznu krivulju mekšanja DNA tripleksa-dAdTdT bez dodatka liganada,  $T_{m1} = 22,6$ ;  $T_{m2} = 70,7$ ; <sup>c</sup>  $r = [\text{ligand}]/[\text{fosfat}]$ .

#### 4.2.2.4. RNaza H test

Sva tri liganda (**B1**, **B5** i **B6**) pokazala su stabilizaciju obje hibridne strukture DNA:RNA (slika 31, tablica 6) te je ispitana njihova sposobnost inhibicije RNaze H. RNaza H test omogućuje brzi probir liganada koji se vežu na hibridne strukture i mogu biti biološki relevantni kao inhibitori RNaze H.<sup>4,134</sup> Ovaj test korišten je kao dodatak metodi temperaturnog mekšanja smjesa.

Eksperiment se provodi pomoću UV/Vis spektrofotometra pri apsorbciji od 260 nm. Razdvajanje RNA lanca u hibridnoj molekuli dovodi do povećanja apsorbcije pri 260 nm (slika 33).



Slika 33. Porast apsorbancije uslijed odvajanja lanca RNA iz kompleksa ligand (**B1**, **B5** i **B6**)/hibridna struktura (poli rA-poli dT) u RNaza H testu. Koncentracija hibridne nukleinske kiseline je  $1 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> (parovi baza), a liganada **B1**, **B5** i **B6** je  $3 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>.

Benzotiazolni derivat **B1** je najbolje inhibirao i usporio djelovanje RNaze H jer je povećao stabilnost hibridne molekule poli rA-poli dT. Podaci dobiveni ovim testom pokazuju dobru korelaciju s rezultatima proširenog eksperimenta temperaturnog mekšanja (tablica 6).

#### 4.2.2.5. Cirkularni dikroizam

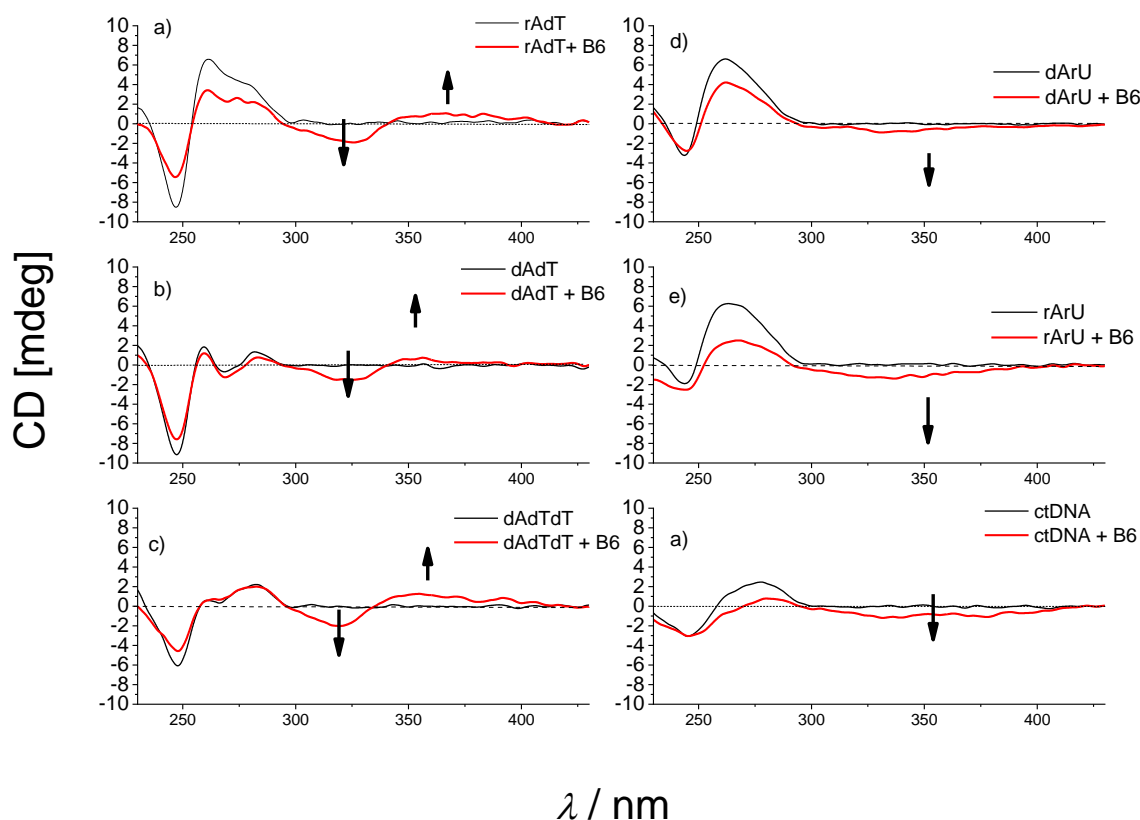
Kompleksi liganada i nukleinske kiseline, odabrani na temelju rezultata kompeticijske dijalize, također su ispitivani metodom cirkularnog dikroizma. Eksperimenti cirkularnog dikroizma rađeni su s predstavnicima A- i B-uzvojnica nukleinskih kiselina.

Praćene su promjene u CD spektrima nakon interakcije liganada **B1**, **B5** i **B6** s *ct*DNA koja ima mješoviti sastav parova baza i predstavnik je struktura nukleinskih kiselina s B-uzvojnicom. U mjerenju je korištena i struktura poli dA-poli dT koju karakterizira puno uži i dublji mali utor u usporedbi s uobičajenim B-uzvojnica. Kao model A-uzvojnice upotrijebljena je dvolančana struktura RNA, poli rA-poli rU, koju karakterizira širok i plitak manji utor te dubok i uzak veliki utor.<sup>25,167</sup> Interakcije su također proučavane s dvije dvolančane hibridne strukture DNA:RNA, poli dA-poli rU i poli rA-poli dT, te trolančanom strukturom DNA-dAdTdT. Mnoge eksperimentalne tehnike (NMR, difrakcija rendgenskog zračenja, Ramanova spektroskopija) kojima je proučavana konformacija hibridne strukture poli rA-poli

dT u uvjetima visoke vlage, ukazuju na strukturu B-uzvojnice.<sup>168</sup> Također, potvrđeno je da na globalnu konformaciju strukture poli dA-poli rU znatno više utječe ribopirimidinski lanac, što rezultira strukturom A-uzvojnice, slične onoj kod molekule RNA.<sup>168</sup> Nadalje, NMR i IR podaci sugeriraju da prema strukturnim karakteristikama, trolančana struktura dAdTdT više sliči B-uzvojnici.<sup>169–171</sup>

Dodatak liganada **B1**, **B5** i **B6** uglavnom je uzrokovao smanjenje CD intenziteta polinukleotida DNA i RNA na njihovim maksimalnim vrijednostima (*ctDNA* na 275 nm; poli dA-poli dT, poli dA-poli rU i hibridnim strukturama DNA:RNA na 260 nm). Međutim, inducirani CD spektri ovih spojeva, koji su se mijenjali s povećanjem omjera (*r*), dali su informaciju o njihovom načinu vezanja na ispitivane nukleinske kiseline.

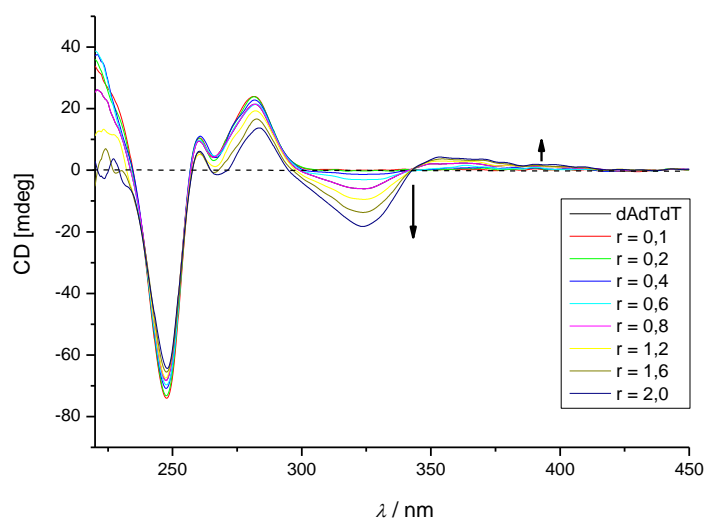
Pri  $r \leq 0,1$ , ligand **B6** uzrokovao je zanemarive ili slabe negativne ICD signale (oko 320 nm) sa svim polinukleotidima (Dodatak, slika D.8.14.). Međutim, pri  $r > 0,1$  ovaj spoj je uzrokovao različite ICD spektre za A- i B-uzvojnici što ukazuje i na različite načine vezanja na te strukture (slika 34).



Slika 34. CD titracije (a) poli rA-poli dT, (b) poli dA-poli dT, (c) trolančana struktura DNA-dAdTdT, (d) poli dA-poli rU, (e) poli rA-poli rU i (f) *ctDNA* ( $c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s ligandom **B6** u molarnom omjeru  $r$  ( $[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}] = 0,3$ ) (pH = 7,0; natrijev

kakodilatni pufer s dodatkom  $1 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup> EDTA,  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>, za sve titracije osim poli dA-poli rU gdje je ionska jakost viša ( $I = 0,2$  mol dm<sup>-3</sup>)).

Pojava negativnih induciranih signala cirkularnog dikroizma (oko 340 nm) pri  $r > 0,1$  ukazuje na interkalaciju liganda **B6** u strukture A-uzvojnice (poli dA-poli rU i poli rA-poli rU). Pojava bisignatnog ICD signala ukazuje da ligand **B6** najvjerojatnije stvara dimer unutar manjeg utora predstavnika strukture B-uzvojnice (poli rA-poli dT, poli dA-poli dT i trolančane strukture dAdTdT).<sup>119</sup> Spoj **B6** nije se vezao u obliku dimera na *ctDNA* (B-uzvojnica). U interakciji s *ctDNA* ligand **B6** dao je negativni ICD signal što je indikativno za interkalativni način vezanja (slika 34). Interkaliranje se vjerojatno može povezati sa sastavom *ctDNA* koji osim AT parova baza sadrži i 42 % GC parova baza. Zbog amino skupina gvanina u malom utoru DNA sterički je otežano vezanje u utor, te je kod GC sekvenci interkaliranje preferirano u odnosu na vezanje u utor.<sup>167</sup> Interakcije spoja **B6** dodatno su ispitane s trolančanom oligo strukturom dAdTdT (26 tripleta baza) fluorimetrijskom (slika 30) i spektroskopijom cirkularnog dikroizma kako bi se procijenio utjecaj duljine dAdTdT polimera na jačinu vezanja (slika 35).

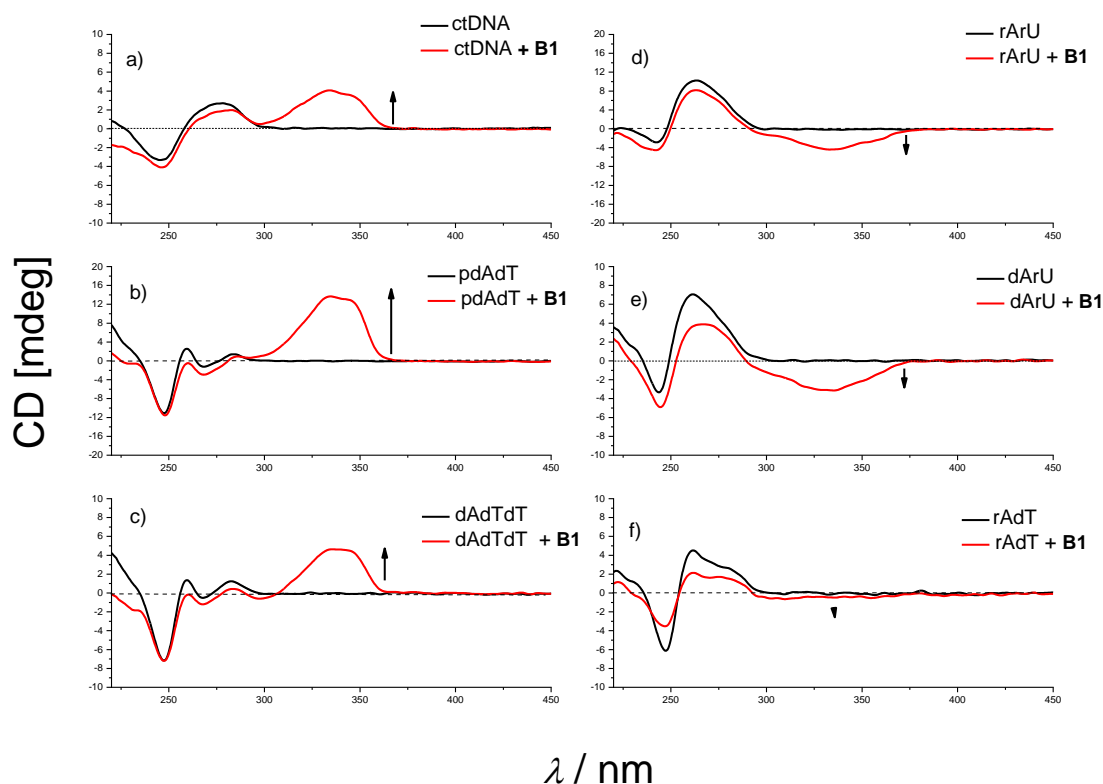


Slika 35. CD titracija trolančane oligo strukture-dAdTdT ( $c = 3,0 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>) s ligandom **B6** u različitim molarnim omjerima,  $r$  ([spoj]/[polinukleotid]); (pH = 7,0; natrijev kakodilatni pufer s dodatkom  $1 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup> EDTA,  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>).

CD titracija liganda **B6** s trolančanom oligo strukturom-dAdTdT dala je sličan bisignatni ICD signal, kao u CD titraciji s dAdTdT polinukleotidom, što sugerira da duljina dAdTdT polimera nije utjecala na način vezanja.<sup>119</sup>

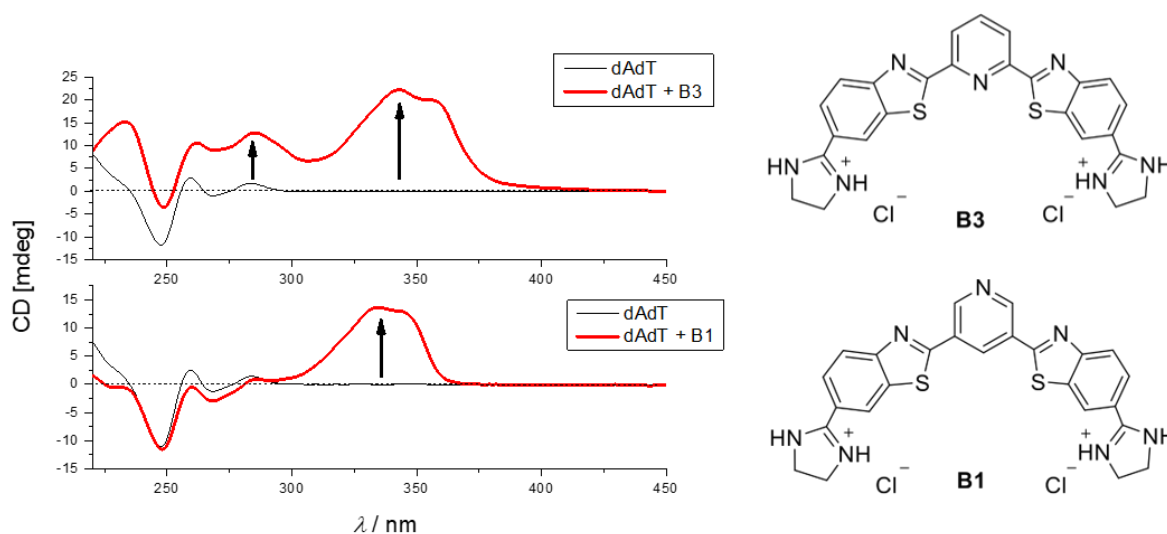
Za razliku od liganda **B6**, ligand **B5** nije pokazao sposobnost da prema tipu vezanja može razlikovati A- i B-uzvojniju. Njegov dodatak uzrokovao je pojavu bisignatnih ICD signala sa svim proučavanim strukturama nukleinskih kiselina (Dodatak, slika D.8.15.). Takve promjene upućuju na stvaranje dimera i/ili agregata u manjem utoru trolančane strukture-dAdTdT, poli dA-poli dT, rAdT i *ctDNA* i u velikom utoru poli rA-poli rU i dArU.

S druge strane, bis-benzotiazolil-piridin **B1**, koji je voluminozniji u usporedbi sa spojevima **B5** i **B6**, izazvao je jaki pozitivni ICD signal (na 340 nm) pri  $r \leq 0,1$  što ukazuje na vezanje unutar manjeg utora *ctDNA*, poli dA-poli dT i trolančane strukture-dAdTdT. Kod strukture poli rA-poli rU i obje hibridne strukture DNA:RNA negativni ICD signali (oko 340 nm) pri  $r \leq 0,1$  upućuju na interkalativno vezanje (slika 36).



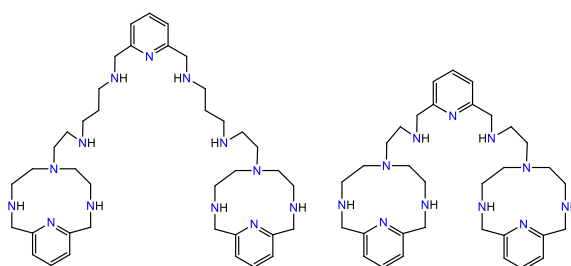
Slika 36. CD titracije (a) *ctDNA*, (b) poli dA-poli dT, (c) trolančana struktura-dAdTdT, (d) poli rA-poli rU, (e) poli dA-poli rU i (f) poli rA-poli dT ( $c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s ligandom **B1** u molarnom omjeru  $r$  ( $[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}] = 0,1$  ( $\text{pH} = 7,0$ ; natrijev kakodilatni pufer s dodatkom  $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  EDTA,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$  za sve titracije osim poli dA-poli rU gdje je ionska jakost viša ( $I = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ )).

Zbog velikih promjena u CD spektrima pri titracijama spoja **B1** s trolančanom strukturom DNA-dAdTdT i dvolančanom dAdT, ispitana je interakcija njegovog regioizomera **B3** s tim strukturama kako bi se vidjelo utječe li položaj imidazolil-benzotiazolnih lanaca u odnosu na dušikov atom piridinskog prstena na interakciju s polinukleotidom. Zanimljivo je da je spoj **B3**, za razliku od njegovog regioizomera **B1**, izazvao snažan porast intenziteta maksimuma CD spektra trolančane strukture-dAdTdT, dvolančanog polinukleotida poli dA-poli dT i ctDNA (ctDNA na 275 nm, poli dA-poli dT na 260 i 282 nm, i dAdTdT na 282 nm), te je baš kao i regioizomer **B1** izazvao i jaki pozitivni ICD signal na 350 nm (slika 37; Dodatak, slika D.8.16.).



Slika 37. (lijevo) CD titracije dvolančanog polinukleotida poli dA-poli dT ( $c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s ligandima **B3** (gore) i **B1** (dolje) pri molarnim omjerima  $r$  ( $[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}] = 0,4$  odnosno  $0,1$  ( $\text{pH} = 7,0$ ; natrijev kakodilatni pufer s dodatkom  $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  EDTA,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ); (desno) strukture ispitivanih liganda.

Slične velike promjene u CD spektrima polinukleotida primijećene su s derivatima bis-poliaza piridinofana (slika 38) koji, slično spoju **B3**, imaju dva lanca vezana na piridinski prsten (pozicija 2 i 6).<sup>172</sup>

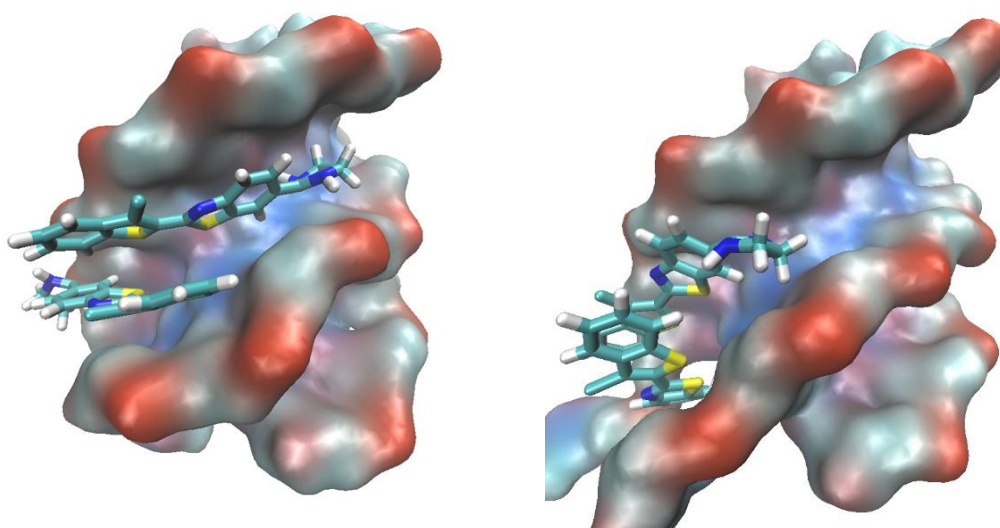


Slika 38. Derivati bis-poliaza piridinofana.

Za razliku od **B1**, spoj **B3** izazvao je promjene slične kondenzaciji vjerojatno zbog različitog položaja lanaca na piridinskom prstenu u odnosu na piridinski atom dušika. Za razliku od liganda **B1**, ligand **B3** i derivati bis-poliaza piridinofana imaju dva lanca vezana na piridinski prsten na istim pozicijama.

#### 4.2.3. Molekulsko modeliranje

U suradnji s prof. dr. sc. Sanjom Tomić ispitano je vezanje liganda **B6** u mali utor trolančane strukture DNA-dAdTdT molekulskim modeliranjem (slika 39).



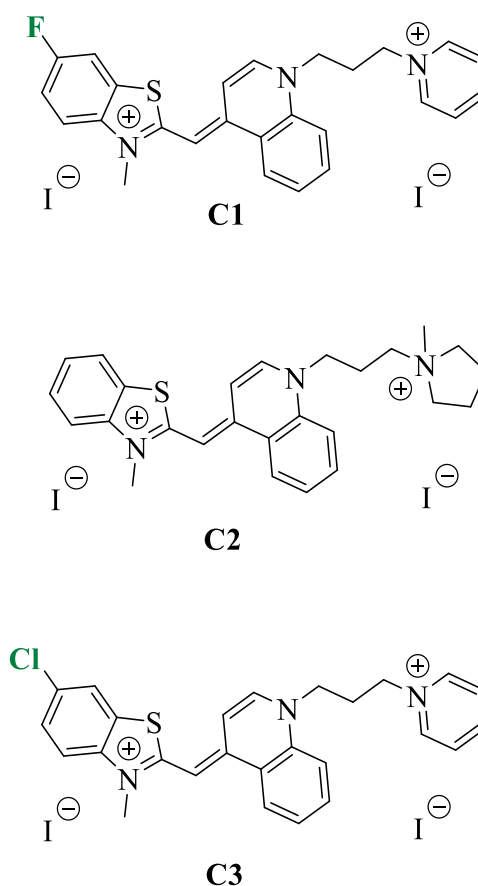
Slika 39. Kompleks između trolančane strukture-dAdTdT i liganda **B6** dobiven nakon 200 ns MD simulacije u vodi. Trolančana struktura predstavljena je svojom površinom dostupnom otapalu, a ligand je prikazan u obliku štapića (kompleksi su izgrađeni u PyMOL-u, pri čemu je početni položaj liganada određen iz spektroskopskih podataka). Parametrizacija je provedena pomoću ANTECHAMBER<sup>173</sup> i Leap, modula dostupnih unutar paketa programa AMBER16<sup>174,175</sup> koristeći GAFF<sup>176</sup> za ligand i (lijevo) bsc1<sup>177</sup> i (desno) OL15<sup>175</sup> za dAdTdT. Neutralizirani i solvatizirani kompleksi minimizirani su, ekvilibrirani i simulirani tijekom 200 ns korištenjem programa sander i pmemd.

Molekulsko modeliranje potvrdilo je vezanje dimera **B6** u utor trolančane strukture dAdTdT kao vjerojatni način vezanja, u skladu s eksperimentalnim spektroskopskim rezultatima.



### 4.3. Cijaninske boje

U ovom dijelu rada okarakterizirane su tri cijaninske boje (slika 40) koje su derivati spoja tiazol-narančasto te sadrže fluor ili klor supstituente na položaju šest benzotiazolnog prstena.



Slika 40. Strukture ispitivanih cijaninskih boja.

Također, spojevi imaju dodatni pozitivni naboj, kao rezultat uvođenja supstituenata poput piridina/pirolidina na kinolinski prsten. Uvođenjem dodatnih pozitivnih naboja poboljšava se topljivost cijaninskih boja kao i afinitet prema nukleinskim kiselinama.<sup>17,18,107</sup> Istražen je utjecaj uvedenih supstituenata (fluor, klor, piridin/pirolidin) na prepoznavanje različitih jednolančanih, dvolančanih i trolančanih struktura DNA i RNA korištenjem nekoliko biofizičkih metoda, uključujući kompeticijsku dijalizu, eksperimente temperaturnog mekšanja, fluorescenciju i cirkularni dikroizam. Konfokalna mikroskopija i MTT test primijenjeni su za *in vitro* studiju kako bi se pokazao potencijal i bioprimjenjivost postojećih fluorofora.

## 4.3.1. Spektroskopska karakterizacija cijaninskih boja

Apsorbancije proučavanih spojeva bile su proporcionalne njihovim koncentracijama do  $c = 4 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  (Dodatak, slika D.8.17.). Ekscitacijski spektri odgovaraju UV/Vis spektrima spojeva u području gdje se spektri emisije i ekscitacije ne preklapaju. Apsorpcijski maksimumi, odgovarajući molarni apsorpcijski koeficijenti ( $\epsilon$ ) i kvantni prinosi fluorescencije (QY) istraživanih cijaninskih boja u prisutnosti polinukleotida sažeti su u tablici 8.

Tablica 8. Prikaz apsorpcijskih maksimuma, odgovarajućih molarnih apsorpcijskih koeficijenata i kvantnih prinosa fluorescencije ( $\Phi_f$ ) liganada **C1** – **C3** te kompleksa ligand-nukleinska kiselina<sup>a</sup> (natrijev kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH = 7,0)

ligand	UV/Vis $\lambda_{\text{max}}$ (nm)	$\epsilon$ ( $\text{mmol}^{-1}$ $\text{cm}^2$ )	$\Phi_f$ (%) C1 – C3 + poli dA-poli dT	$\Phi_f$ (%) C1 – C3 + p(dAdT) <sub>2</sub>	$\Phi_f$ (%) C1 – C3 + p(dGdC) <sub>2</sub>	$\Phi_f$ (%) C1 – C3 + poli rA-poli rU	$\Phi_f$ (%) C1 – C3 + dAdTdT
<b>C1</b>	508	78134	3,0	2,7	2,3	2,0	3,9
<b>C2</b>	507	74181	2,4	3,1	1,9	3,6	3,7
<b>C3</b>	510	71631	3,6	4,9	4,5	3,5	1,7

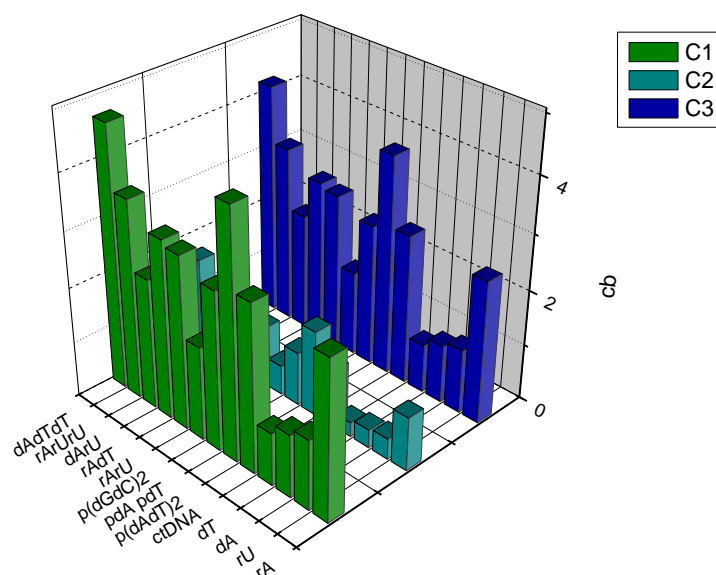
<sup>a</sup> Otopine za određivanje apsolutnog kvantnog prinosa bile su propuhane argonom prije mjerenja, pogreška instrumenta za vrijednosti kvantnog prinosa iznosi  $\pm 0,5 \%$ <sup>159</sup>; vrijednost kvantnih prinosa ispitivanih spojeva bez polinukleotida < 1 %.

Linearne ovisnost apsorbcije o koncentraciji pokazuje da s porastom koncentracije ( $5 \times 10^{-7} - 4 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) proučavani spojevi ne tvore agregate međumolekulskim interakcijama. Koncentracija spojeva za fluorescencijske titracije bila je  $2 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ , pri čemu su spojevi pretežno prisutni u obliku monomera. Međutim, titracije cirkularnog dikroizma provedene su u većem rasponu koncentracija ( $c(\text{spoj}) = 1,5 \times 10^{-6} - 1,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ), gdje spoj može biti prisutan u obliku dimera i agregata. Stoga su provedeni pokusi mjerenja apsorbcije za koncentracije do  $7 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ . Apsorbancija je linearno ovisna o koncentraciji do  $c = 1,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ , a odstupanje od linearnog raspona bilo je vidljivo pri višim koncentracijama (Dodatak, slika D.8.18.).

### 4.3.2. Interakcije cijaninskih boja s različitim nukleinskim kiselinama

#### 4.3.2.1. Kompeticijska dijaliza

Sve tri cijaninske boje ispitane su kompeticijskom dijalizom kao metodom brzog probira. Istovremeno su ispitivana sva tri spoja s 13 različitih struktura nukleinskih kiselina (jednolančane, dvolančane, hibridne molekule DNA:RNA te trolančane strukture DNA i RNA) i rezultati su prikazani dijagramom (slika 41). Za razliku od prethodne skupine u ovoj metodi smo umjesto intenziteta fluorescencije pratili apsorbanciju spojeva na valnoj duljini njihovih maksimuma.

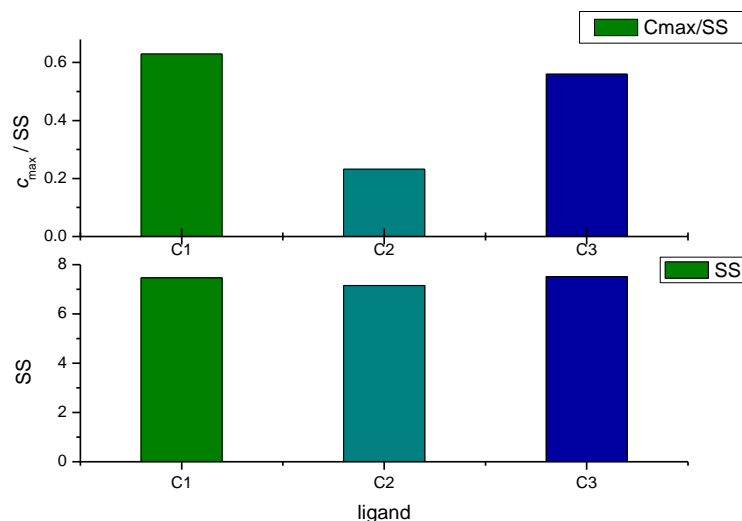


Slika 41. Sumirani prikaz rezultata kompeticijske dijalize triju liganada (C1 – C3) koji se vežu na 13 struktura nukleinskih kiselina ( $c_{\text{bound}}$  = koncentracija liganda vezanog za svaku strukturu nukleinske kiseline u  $10^{-6}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ); ispitivanja su provedena u puferu natrijevog kakodilata s dodatkom  $1 \times 10^{-3}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  EDTA,  $I = 0,05$  mol  $\text{dm}^{-3}$ , pH = 7,0.

Od jednolančanih polinukleotida, sva tri spoja su pokazala najjače vezanje za jednolančanu strukturu poli rA. Također, svi su ligandi pokazali jako vezanje za trolančanu strukturu DNA-dAdTdT, dok su kod dvolančanih polinukleotida najviši afiniteti zamijećeni prema alternirajućem polinukleotidu poli(dAdT)<sub>2</sub>. Što se tiče hibridnih struktura DNA:RNA, spojevi

su pokazali jače vezanje prema hibridnoj strukturi poli rA-poli dT nego prema strukturi poli dA-poli rU. Ligand **C2** je u usporedbi sa druga dva liganda imao niže afinitete.

Prema slici 42 vidljivo je da spojevi prema svim tipovima polinukleotida stvaraju komplekse slične stabilnosti.



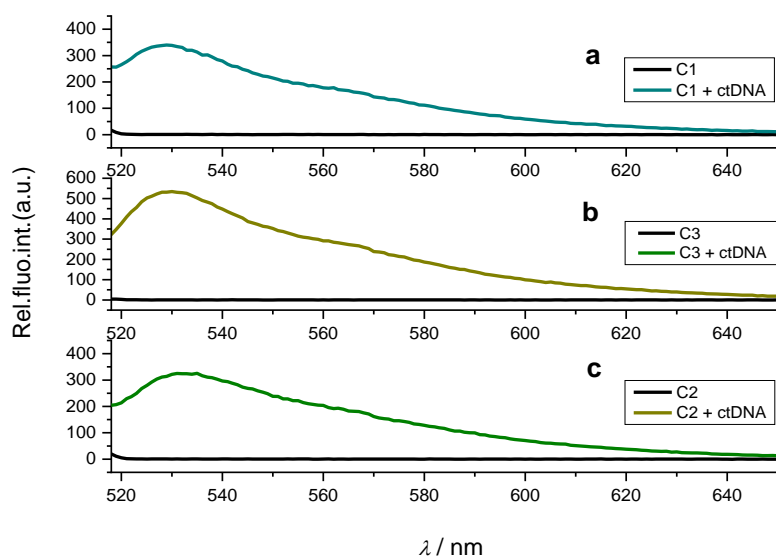
Slika 42. Zbroj specifičnosti SS (dolje) i omjer  $c_{\max}/SS$  (gore) za tri cijaninske boje.

Identifikacija spojeva s najboljom kombinacijom selektivnosti i afiniteta može se dobiti usporedbom vrijednosti SS i  $c_{\max}/SS$ . Na temelju ovih vrijednosti, **C1** i **C3** identificirani su kao spojevi s dobrom kombinacijom selektivnosti i afiniteta.

Međutim sva tri liganda pokazala su agregiranje unutar 24 sata eksperimenta. Upravo zbog agregiranja ispitivanih liganada unutar 24 sata, rezultati dobiveni ovom metodom nisu pouzdani jer nije ispunjen jedan od glavnih uvjeta za provedbu eksperimenta. Iz tog razloga je ispitivanje interakcija svih cijaninskih boja s različitim strukturama nukleinskih kiselina nastavljeno klasičnim metodama.

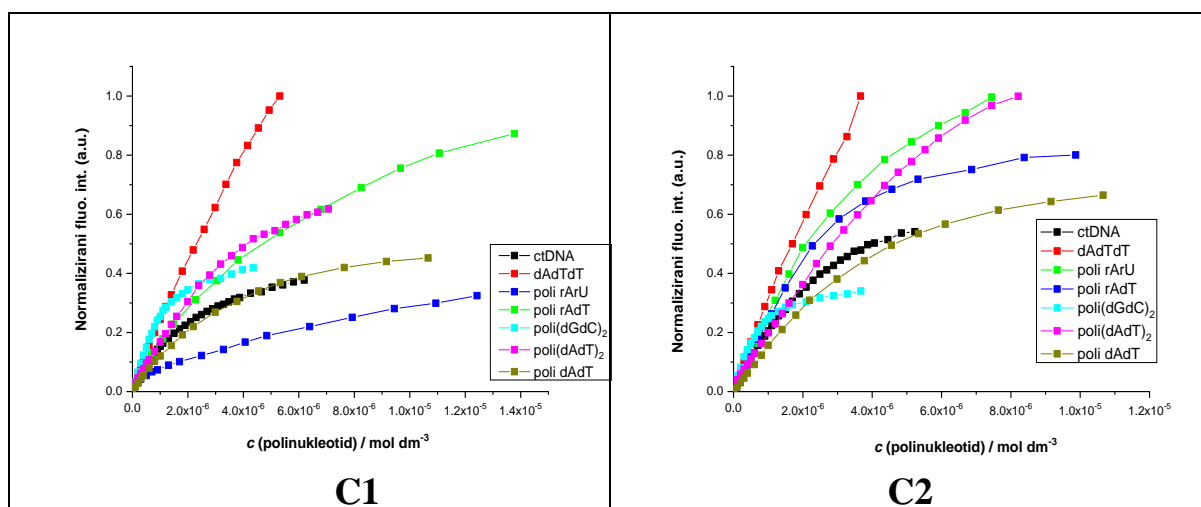
#### 4.3.2.2. Fluorescencijska spektroskopija

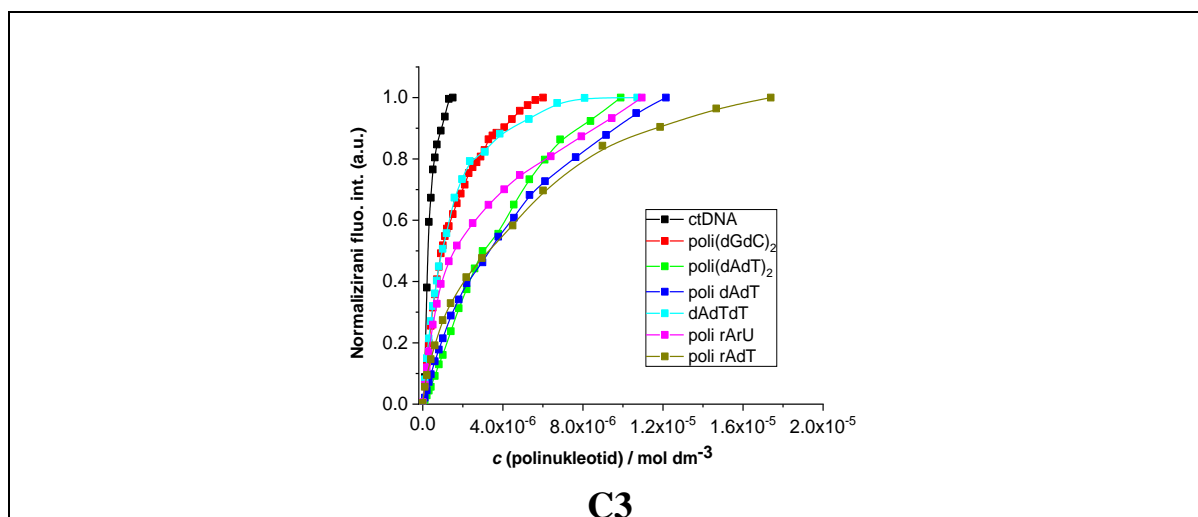
Derivati cijaninskih boja pri koncentraciji  $c = 1 \times 10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup>, pokazuju zanemarivu fluorescenciju kada su pobuđeni na odgovarajućim maksimumima apsorbancije ( $\lambda_{\text{exc}}(\mathbf{C1}) = 508$ ;  $\lambda_{\text{exc}}(\mathbf{C2}) = 507$ ;  $\lambda_{\text{exc}}(\mathbf{C3}) = 510$  nm). Međutim, nakon dodavanja nukleinskih kiselina, uočen je značajan porast intenziteta njihove fluorescencije (slika 43).



Slika 43. Promjena u fluorescencijskom spektru liganda **C1** (a), **C2** (b) i **C3** (c) ( $c = 1 \times 10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup>) nakon dodatka *ctDNA* (pH = 7,0; natrijev kakodilatni pufer,  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>).

Sve tri cijaninske boje pokazale su slične fluorimetrijske odgovore za većinu provedenih titracija s različitim strukturama DNA i RNA (slika 44).





Slika 44. Promjene fluorescencije derivata **C1 – C3** ( $c = 2 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ) normalizirane na posljednju točku titracije (najveći intenzitet emisije) nakon dodatka polinukleotida (natrijev kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7,0$ ).

Obrada podataka dobivenih spektroskopijom UV/Vis ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) bila je otežana zbog agregacije cijaninskih boja i mješovitog načina vezanja u tim uvjetima. Međutim, fluorimetrijske titracije su omogućile prikupljanje podataka pri koncentracijama liganda ispod  $5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$  gdje su spojevi prisutni u obliku monomera. Fluorimetrijske titracije izvedene su pri  $c = 2,0 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ , gdje se ligand može vezati na jedan dominantan način na brojna slobodna vezna mjesta na strukturama DNA/RNA ( $r = [\text{C1} - \text{C3}]/[\text{fosfat}] < 0,2$ ). Konstante vezanja  $K_a$  i omjeri  $n$  ( $[\text{vezani spoj}]/[\text{DNA/RNA}]$ ) dobiveni su obradom fluorimetrijskih podataka pomoću Scatchardove<sup>144,145</sup> jednadžbe. Unatoč sličnim afinitetima utvrđenim za većinu struktura DNA i RNA metodom kompeticijske dijalize, spektroskopski rezultati su otkrili preferencijalno vezanje na specifične strukture nukleinskih kiselina (tablica 9).

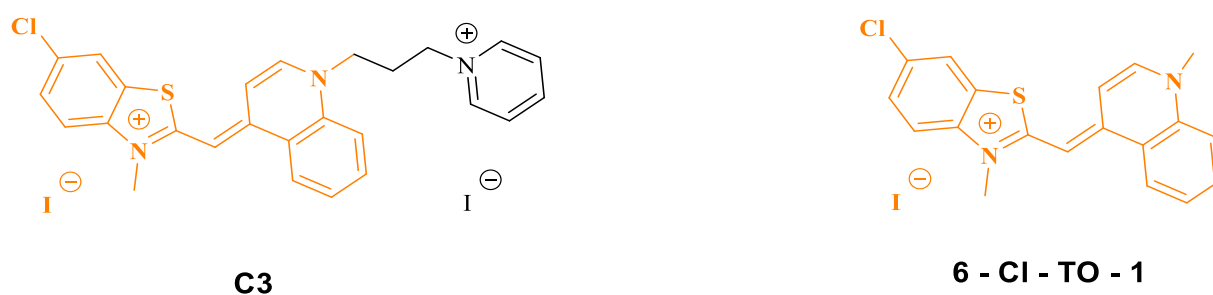
Tablica 9. Konstante vezanja ( $\log K_a$ )<sup>a</sup> dobivene iz fluorimetrijskih titracija liganada **C1 – C3** s različitim strukturama DNA i RNA pri  $\text{pH} = 7,0$  (natrijev kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).

	<i>ctDNA</i>	poli rA- poli rU	poli(dGdC) <sub>2</sub>	poli dA- poli dT	poli(dAdT) <sub>2</sub>	dAdTdT	poli rA- poli dT
	$\log K_a$						
<b>C1</b>	6,5	5,5	7,2	6,2	6,1	5,5	5,7
<b>C2</b>	6,4	6,1	7,5	6,1	5,7	5,5	6,3
<b>C3</b>	7,3 <sup>b</sup>	6,7	6,8	5,9	5,7	6,8	6,1

<sup>a</sup> Podaci su obrađeni korištenjem Scatchardove<sup>144,145</sup> jednadžbe i dobiveni su omjeri  $n$  [vezani ligand]/[fosfat] od 0,1 do 0,4; za lakšu usporedbu svi su podaci preračunati za fiksirani  $n = 0,2$ ; koeficijenti korelacije su  $> 0,99$  za većinu izračunatih  $K_a$ ; <sup>b</sup> u slučaju liganda **C3** s *ct*DNA,  $\log K_a$  vrijednost izračunata je za fiksiranu vrijednost  $n = 0,5$  kako bi se dobili pouzdaniji podaci.

Cijaninske boje **C1** i **C2** pokazale su veći afinitet prema alternirajućem polinukleotidu poli(dGdC)<sub>2</sub> u usporedbi s drugim strukturama DNA i RNA. Naprotiv, klorirani derivat **C3**, pokazao je preferencijalni afinitet prema strukturi poli rA-poli rU (RNA) za razliku od njegova fluoriranog analoga **C1**. Nadalje, cijaninska boja **C3** također je pokazala veći afinitet prema prirodnoj DNA (*ct*DNA) i trolančanoj strukturi DNA-dAdTdT od fluorofora **C1** i **C2**.

Jedan od derivata boje tiazol-narančasto, spoj 6-Cl-TO-1 koji u strukturi sadrži supstituent klora, pokazao je velike afinitete vezanja prema poli(dAdT)<sub>2</sub> ( $\log K_a = 7,3$ ), a posebno poli(dGdC)<sub>2</sub> ( $\log K_a = 8,1$ ) za razliku od strukturno sličnog derivata **C3** koji je pokazao afinitete prema drugim strukturama nukleinskih kiselina (slika 45).<sup>115</sup>



Slika 45. Usporedba strukture cijaninskog derivata **C3** i strukture derivata tiazol-narančasto 6-Cl-TO-1.

#### 4.3.2.3. Temperaturno mekšanje

Eksperimenti temperature mekšanja provedeni su s *ct*DNA i s alternirajućom dvolančanom strukturom poli(dAdT)<sub>2</sub> ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ). Sva tri spoja pokazala su značajni stabilizacijski učinak s oba polinukleotida (tablica 10), ali veći učinak primijećen je ipak kod strukture poli(dAdT)<sub>2</sub> što se vjerojatno može pripisati sastavu baza u strukturi *ct*DNA (58 % AT i 42 % GC parova baza).

Tablica 10. <sup>a</sup> $\Delta T_m$  vrijednosti (°C) ispitivanih dvolančanih polinukleotida nakon dodataka cijaninskih boja u omjeru <sup>b</sup> $r = 0,05; 0,1$  i  $0,2$  pri pH = 7,0 (natrijev kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).

	C1			C2			C3		
<i>r</i>	0,05	0,1	0,2	0,05	0,1	0,2	0,05	0,1	0,2
ctDNA	5	8	10	8	11	- <sup>c</sup>	6	8	12
p(dAdT) <sub>2</sub>	15	17	24	22	27	32	14	17	23

<sup>a</sup> Pogreška u vrijednosti  $\Delta T_m$ :  $\pm 0,5$  °C; <sup>b</sup>  $r = [\text{ligand}]/[\text{polinukleotid}]$ ; <sup>c</sup>  $T_m$  je viša od mogućeg mjerenja na instrumentu ( $T_m > 100$  °C).

Ligand **C2** s pirolidinskom jedinicom pokazao je veću stabilizaciju oba polinukleotida od liganada **C1** i **C3** s piridinskom jedinicom. Dodatno, ispitan je stabilizacijski učinak nealternirajućih purin-pirimidinskih sekvenci, uključujući poli dA-poli dT, DNA:RNA hibrid (poli rA-poli dT) i poli rA-poli rU. Za razliku od ctDNA i alternirajuće strukture poli(dAdT)<sub>2</sub> (tablica 11; Dodatak, slike D.8.19. i D.8.20.), sa svim ispitivanim nealternirajućim sekvencama dobivene su bifazne krivulje interakcijom s cijaninskim bojama (tablica 11; Dodatak, slike D.8.21. – D.8.23.) pri ionskoj jakosti  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>.

Tablica 11. <sup>a</sup> $\Delta T_m$  vrijednosti (°C) ispitivanih nealternirajućih dvolančanih polinukleotida nakon dodataka cijaninskih boja **C1** – **C3** u omjeru <sup>b,c</sup> $r = 0,05$  pri pH = 7,0 (natrijev kakodilatni pufer,  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>).

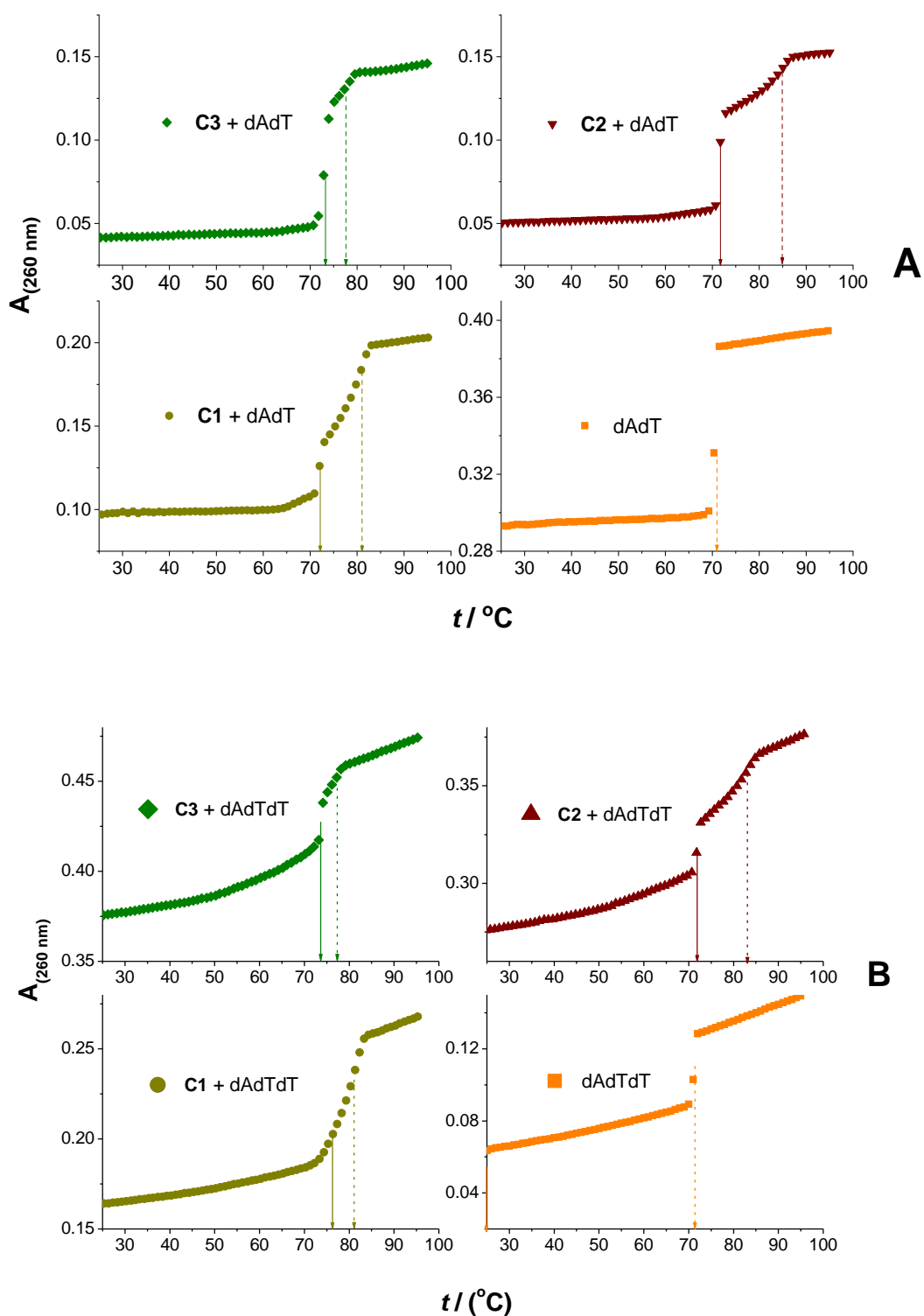
	<sup>b</sup> $r = 0,05$		poli rA-poli dT		poli rA-poli rU	
	$T_m$	$\Delta T_m$	$T_m$	$\Delta T_m$	$T_m$	$\Delta T_m$
	64,8		60,4		52,1	
<b>C1</b>	67,4/84,4 <sup>d</sup>	-19,6	64,0/76,0 <sup>d</sup>	-15,6	51/63,5 <sup>d</sup>	-11,4
<b>C2</b>	66,7/91,2 <sup>d</sup>	-26,7	64,0/85,5 <sup>d</sup>	-25,1	50,7/70,6 <sup>d</sup>	-18,0
<b>C3</b>	67,3/78,4 <sup>d</sup>	-13,6	64,5/77,4 <sup>d</sup>	-16,4	52,8/58,6 <sup>d</sup>	-8,6

<sup>a</sup> Pogreška u vrijednosti  $\Delta T_m$ :  $\pm 0,5$  °C; <sup>b</sup>  $r = [\text{ligand}]/[\text{polinukleotid}]$ ; <sup>c</sup>  $c$  (polinukleotid) =  $3 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>;  $c$  (**C1** – **C3**) =  $1,5 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>; <sup>d</sup> dvofazni prijelazi.

Kako bismo utvrdili potječe li ova bifazna krivulja od dva različita načina vezanja ili indukcije stvaranja trolančane strukture, napravljeni su pokusi s trolančanim strukturama, uključujući strukturu DNA-dAdTdT, hibridnu strukturu DNA:RNA-rAdTdT, i strukturu RNA-rArUrU pri višoj ionskoj jakosti;  $I = 0,1$  mol dm<sup>-3</sup> (slike 46 – 48, B). Za usporedbu, svi eksperimenti su ponovljeni s nealternirajućim dvolančanim strukturama pri istoj ionskoj jakosti;  $I = 0,1$  mol dm<sup>-3</sup> (slike 45 – 48, A).



Kod eksperimenata s trolančanim strukturama obično se mogu uočiti dva prijelaza. Prvi prijelaz strukture dAdTdT ( $T_{m1}$ ) na 24,2 °C odgovara disocijaciji trećeg lanca (poli dT) smještenog u velikom utoru, povezanog Hoogsteen-ovim parovima baza s poli dA-poli dT (slika 45 B, narančasta krivulja). Drugi prijelaz ( $T_{m2}$ ) na 71,3 °C povezan je s disocijacijom Watson-Crick-ovih parova baza dvolančane strukture poli dA-poli dT (slika 45B, narančasta krivulja, slika 45A, narančasta krivulja).<sup>110,166</sup>



Slika 45. Krivulja mekšanja A) dvolančanog polinukleotida poli dA-poli dT i B) trolančane strukture-dAdTdT nakon dodatka cijaninskih boja **C1** – **C3** pri omjeru  $r$  ( $[\text{ligand}]/[\text{polinukleotid}] = 0,05$  pri  $\text{pH} = 7,0$  (natrijev kakodilatni pufer +  $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$

EDTA,  $I = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ); pune strelice označuju prvi prijelaz dok isprekidane označuju drugi prijelaz.

Vrijednosti temperature mekšanja dobivenih za komplekse **C1** – **C3** s dvolančanom strukturom poli dA-poli dT (tablica 12, lijevo) savršeno su se slagale s vrijednostima dobivenim s trolančanom strukturom-dAdTdT (tablica 12, desno).

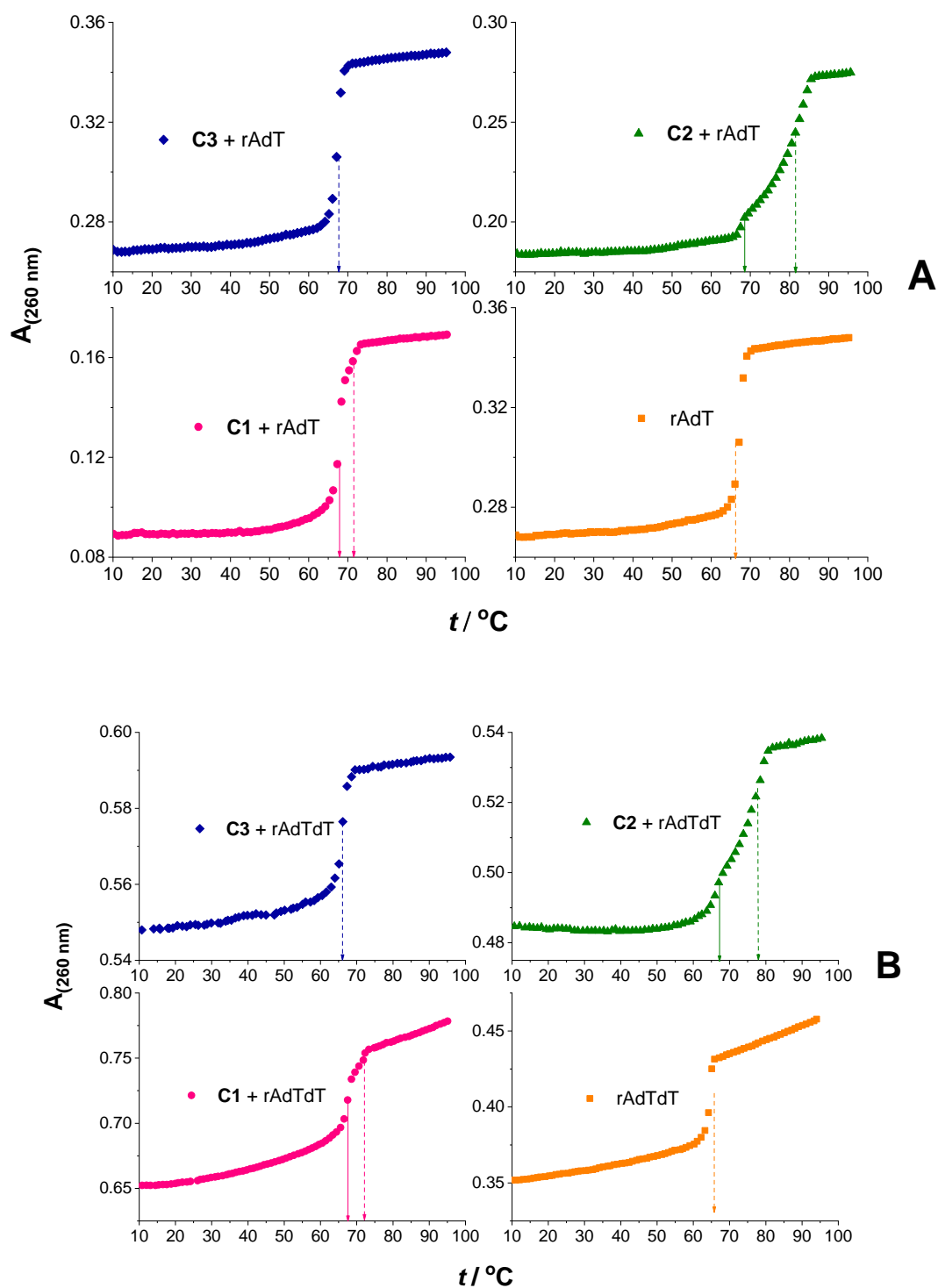
Tablica 12. <sup>a</sup> $T_m$  i  $\Delta T_m$  vrijednosti ( $^{\circ}\text{C}$ ) dvolančanog polinukleotida poli dA-poli dT i trolančane strukture dAdTdT nakon dodatka liganada **C1** – **C3** u omjeru <sup>b,c</sup> $r = 0,05$  ( $\text{pH} = 7,0$ ; natrijev kakodilatni pufer,  $I = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ).

	<sup>b</sup> $r = 0,05$		dAdTdT	
	poli dA-poli dT dvolančana struktura		trolančana struktura	
	$T_m$	$\Delta T_m$	$T_m$	$\Delta T_m$
	70,7	-	24,2/71,3 <sup>d</sup>	-
<b>C1</b>	72,1/81,0 <sup>e</sup>	-/10,3	75,8/81,6 <sup>e</sup>	51,6/10,3 <sup>e</sup>
<b>C2</b>	71,6/85,0 <sup>e</sup>	-/14,3	72,0/83,5 <sup>e</sup>	47,8/12,2 <sup>e</sup>
<b>C3</b>	73,1/77,4 <sup>e</sup>	-/6,7	74,1/77,4 <sup>e</sup>	49,9/6,1 <sup>e</sup>

<sup>a</sup> Pogreška u  $\Delta T_m$ :  $\pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ; <sup>b</sup>  $r = [\text{ligand}]/[\text{polinukleotid}]$ ; <sup>c</sup> ( $\text{polinukleotid}$ ) =  $3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ; <sup>e</sup> (**C1** – **C3**) =  $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ; <sup>d</sup> dvofazni prijelazi čiste trolančane strukture  $T_{m1} = 24,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{m2} = 71,3 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ; <sup>e</sup> dvofazni prijelazi nakon dodatka liganda.

Sva tri spoja preferencijalno stabiliziraju trolančanu strukturu dAdTdT u usporedbi s dvolančanim polinukleotidom ( $T_{m1} \gg T_{m2}$ ). Zanimljivo je da je fluorirani cijaninski ligand **C1** pokazao bolju stabilizaciju dvolančanog polinukleotida nego klorirani derivat **C3**.

Kod ispitivanja mekšanja trolančane hibridne strukture-rAdTdT drugi prijelaz (disocijacija Watson-Crick-ovih parova baza dvolančanog poli rA-poli dT) bio je vidljiv na  $65,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$  u odsutnosti liganda, dok prvi prijelaz (disocijacija trećeg lanca poli dT) nije uočen, što odgovara literaturnim podacima<sup>166</sup> (slika 46B, narančasta krivulja, tablica 13).



Slika 46. Krivulja mekšanja A) dvolančane hibridne strukture poli rA-poli dT i B) tročlančane hibridne strukture-rAdTdT nakon dodatka cijaninskih boja **C1** – **C3** pri omjeru  $r$  ( $[\text{ligand}]/[\text{polinukleotid}] = 0,05$ ;  $\text{pH} = 7,0$  (natrijev kakodilatni pufer s dodatkom  $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  EDTA,  $I = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ); pune strelice označuju prvi prijelaz dok isprekidane označuju drugi prijelaz.

Tablica 13. <sup>a</sup> $T_m$  i  $\Delta T_m$  vrijednosti ( $^{\circ}\text{C}$ ) dvolančanog hibrida poli rA-poli dT i trolančane hibridne strukture-rAdTdT nakon dodatka liganada **C1** – **C3** u omjeru <sup>b,c</sup> $r = 0,05$  ( $\text{pH} = 7,0$ ; natrijev kakodilatni pufer,  $I = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ).

<sup>b</sup> $r = 0,05$	poli rA-poli dT dvolančana struktura		rAdTdT trolančana struktura	
	$T_m$	$\Delta T_m$	$T_m$	$\Delta T_m$
	65,5	-	10/65,5 <sup>d</sup>	-
<b>C1</b>	67,8/71,4 <sup>e</sup>	-/5,9	67,6/72 <sup>e</sup>	57,6/6,5
<b>C2</b>	67,8/81,5 <sup>e</sup>	-/16,0	67,0/79,1 <sup>e</sup>	57,0/13,6
<b>C3</b>	67,6 <sup>f</sup>	-	66,8 <sup>f</sup>	-

<sup>a</sup> Pogreška u  $\Delta T_m$ :  $\pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ; <sup>b</sup>  $r = [\text{ligand}]/[\text{polinukleotid}]$ ; <sup>c</sup> (polinukleotid) =  $2,3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ; <sup>e</sup> (**C1** – **C3**) =  $1,15 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ; <sup>d</sup> dvofazni prijelazi čiste trolančane strukture:  $T_{m1}$  je vrijednost denaturacije strukture rAdTdT koja nije bila vidljiva u ovom eksperimentu zbog disocijacije lanaca pri niskim temperaturama;  $T_{m2} = 65,6 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $T_{m1}$  određena je pod pretpostavkom da je vrijednost  $T_{m1}$  slobodne nukleinske kiseline  $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ; <sup>144</sup> <sup>e</sup> dvofazni prijelazi nakon dodatka liganada; <sup>f</sup> pri ovoj ionskoj koncentraciji nije moguće odrediti koja vrijednost za  $T_{m1}$  i  $T_{m2}$ .

Učinci stabilizacije hibridne trolančane strukture DNA:RNA-rAdTdT bili su slični onima kod trolančane strukture DNA-dAdTdT (tablica 12). Indukcija stvaranja trolančane strukture nije primijećena samo kod cijaninske boje **C3**. Pretpostavka je da su pri ovoj ionskoj jakosti  $T_m$  vrijednosti prvog i drugog prijelaza bile preblizu da bi se mogle razlikovati. Unatoč tome, indukcija stvaranja trolančane strukture-rAdTdT ligandom **C3** primijećena je pri nižoj ionskoj jakosti,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$  (tablica 11 i Dodatak, slika D.8.23.).

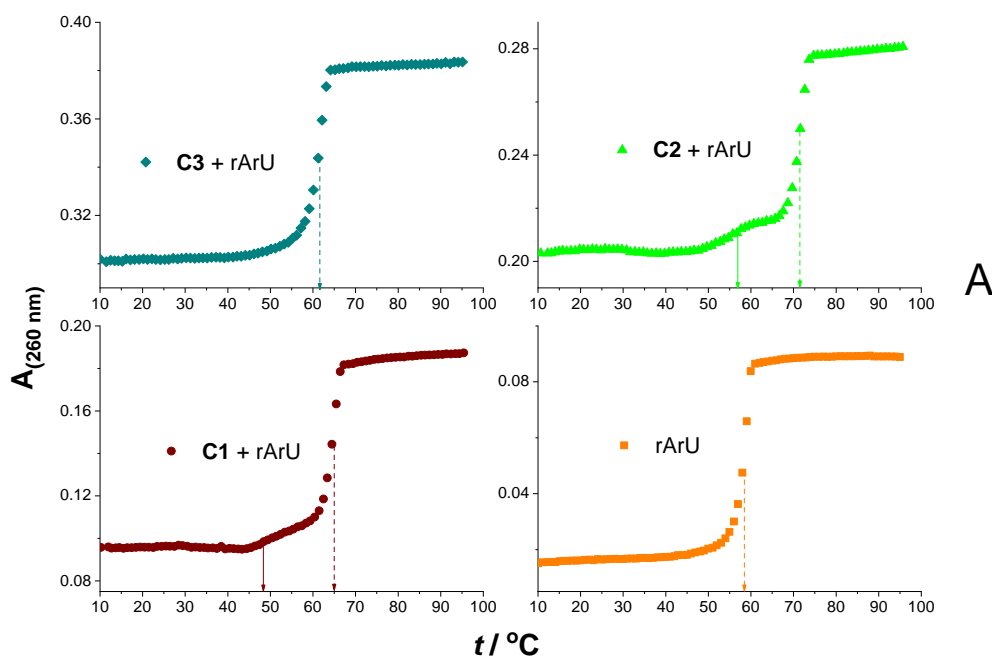
Rezultati eksperimenta temperaturnog mekšanja s dvolančanom molekulom RNA, poli rA-poli rU (tablica 14 lijevo, slika 47A narančasta krivulja) slagali su se s vrijednostima  $T_m$  dobivenim s trolančanom strukturom RNA, rArUrU gdje je usporedba bila moguća (tablica 14 desno, slika 47B narančasta krivulja).<sup>178</sup> Prvi prijelaz ( $T_{m1}$ ) nije bio dovoljno vidljiv u krivulji mekšanja strukture rArUrU u prisutnosti cijaninskih boja **C1** i **C2** (tablica 14, desno). Nasuprot tome, indukcija stvaranja trolančane strukture (tablica 14, lijevo) bila je vidljiva samo s ligandima **C1** i **C2**.

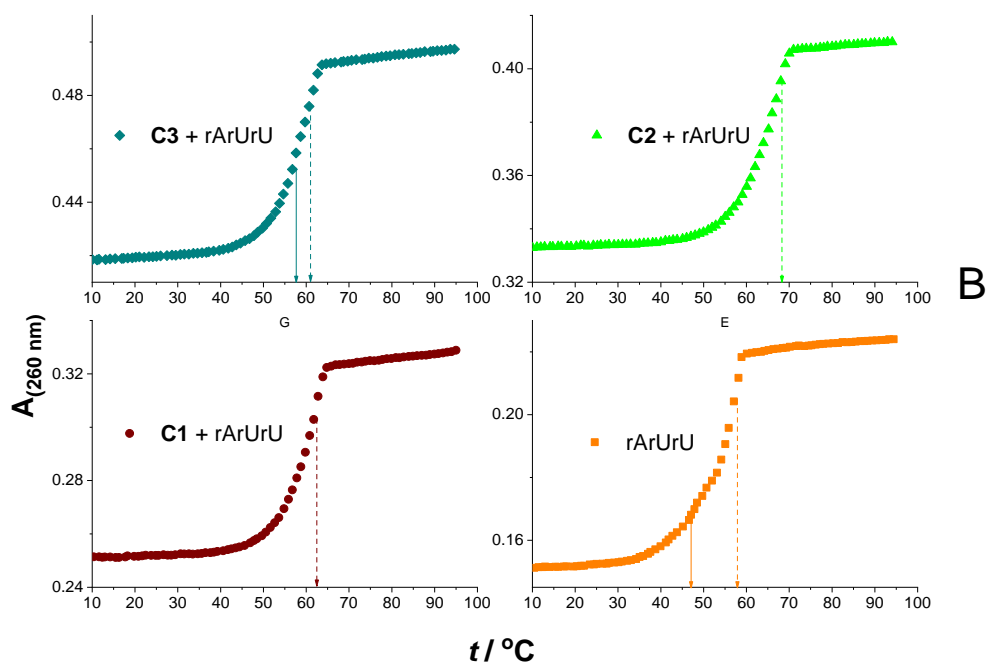
Tablica 14. <sup>a</sup>  $T_m$  i  $\Delta T_m$  vrijednosti ( $^{\circ}\text{C}$ ) dvolančane, poli rA-poli rU, i trolančane, rArUrU, strukture RNA nakon dodatka liganada **C1** – **C3** u omjeru <sup>b,c</sup> $r = 0,05$  ( $\text{pH} = 7,0$ ; natrijev kakodilatni pufer,  $I = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ).

$b_r = 0,05$	poli rA-poli rU dvolančana struktura		rArUrU trolančana struktura	
	$T_m$	$\Delta T_m$	$T_m$	$\Delta T_m$
	58,9	-	47,4/58,2 <sup>d</sup>	-
<b>C1</b>	48/64,8 <sup>e</sup>	-/5,9	- <sup>f</sup> /62,6	-/4,4
<b>C2</b>	57/71,4 <sup>e</sup>	-/12,5	- <sup>f</sup> /68,2	-/10,0
<b>C3</b>	61,6 <sup>e</sup>	-/2,7	57,7/61,2 <sup>e</sup>	10,3/3,0

<sup>a</sup> Pogreška u  $\Delta T_m$ :  $\pm 0.5$  °C; <sup>b</sup>  $r = [\text{ligand}]/[\text{polinukleotid}]$ ; <sup>c</sup>  $c$  (polinukleotid) =  $2,2 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>;  $c$  (**C1** – **C3**) =  $1,1 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>; <sup>d</sup> dvofazni prijelazi čiste trolančane strukture:  $T_{m1} = 47,4$  °C (denaturacija trolančane strukture rArUrU), dok je druga temperatura  $T_{m2} = 58,2$  °C (denaturacija dvolančane strukture RNA, poli rA-poli rU); <sup>e</sup> dvofazni prijelazi nakon dodatka liganda; <sup>f</sup>  $T_{m1}$  nije bilo moguće očitati.

Kumulativni rezultati tablice 14 (slika 47) pokazuju da je cijaninska boja **C3** preferencijalno stabilizirala trolančanu strukturu RNA dok su cijaninske boje **C1** i **C2** preferirale dvolančanu strukturu RNA.





Slika 47. Krivulja mekšanja A) dvolančane strukture RNA, poli rA-poli rU i B) trolančane strukture RNA, rArUrU nakon dodatka cijaninskih boja **C1** – **C3** pri omjeru  $r$  ( $[\text{ligand}]/[\text{polinukleotid}] = 0,05$  pri  $\text{pH} = 7,0$  (natrijev kakodilatni pufer s dodatkom  $1 \times 10^{-3}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  EDTA,  $I = 0,1$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ); pune strelice označuju prvi prijelaz dok isprekidane označuju drugi prijelaz.

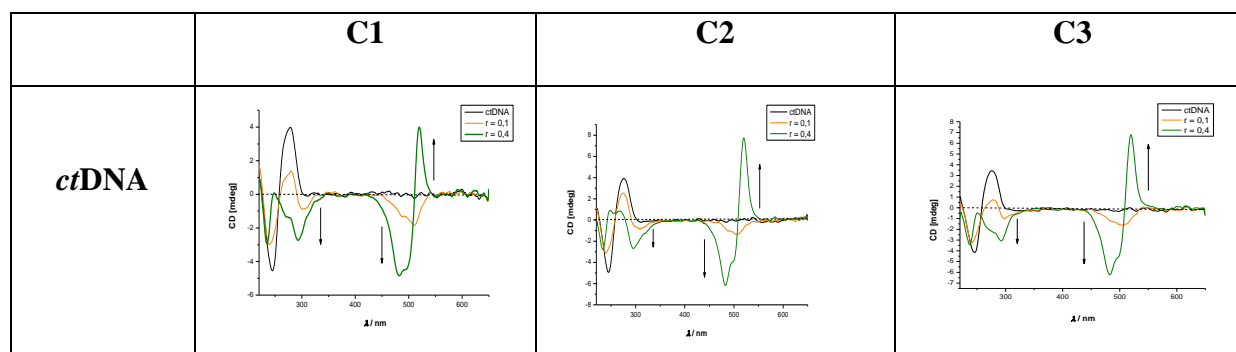
U svim provedenim eksperimentima temperaturnog mekšanja jasno se vidi da su cijaninske boje **C1** – **C3** inducirale stvaranje trolančanih uzvojnica tijekom interakcije s nealternirajućim dvolančanim strukturama koje sadrže poli rA ili poli dA lanac (tablice 12 – 14).

U literaturi je pronađeno da je isti učinak primijećen u eksperimentima temperaturnog mekšanja polinukleotida s berenilom (UV i CD spektroskopija).<sup>179</sup> Neomicin je vrlo učinkovito stabilizirao novonastalu, trolančanu hibridnu strukturu rAdTdT ( $\Delta T_{m1} = 45$  °C pri  $r = 0,66$ ).<sup>179</sup> Vrijednosti  $\Delta T_m$  u eksperimentima temperaturnog mekšanja s cijaninskim bojama **C1** – **C3** i trolančanim strukturama bile su uglavnom usporedive s onima navedenim u literaturi.<sup>180,181,182</sup> Na primjer, derivat benzotiazola s klorobenzotiofenom kao supstituentom (ligand **B6**, ranije naveden u poglavlju 4.2.) pokazao je značajan stabilizacijski učinak ( $\Delta T_{m1} = 43,7$  °C) na trolančanu molekulu DNA-dAdTdT u sličnim eksperimentalnim uvjetima (slika 32). Do sada u literaturi nije pronađen podatak da cijaninske boje imaju potencijal induciranja trolančanih struktura iz nealternirajućih sekvenci koje sadrže rA ili dA lanac.

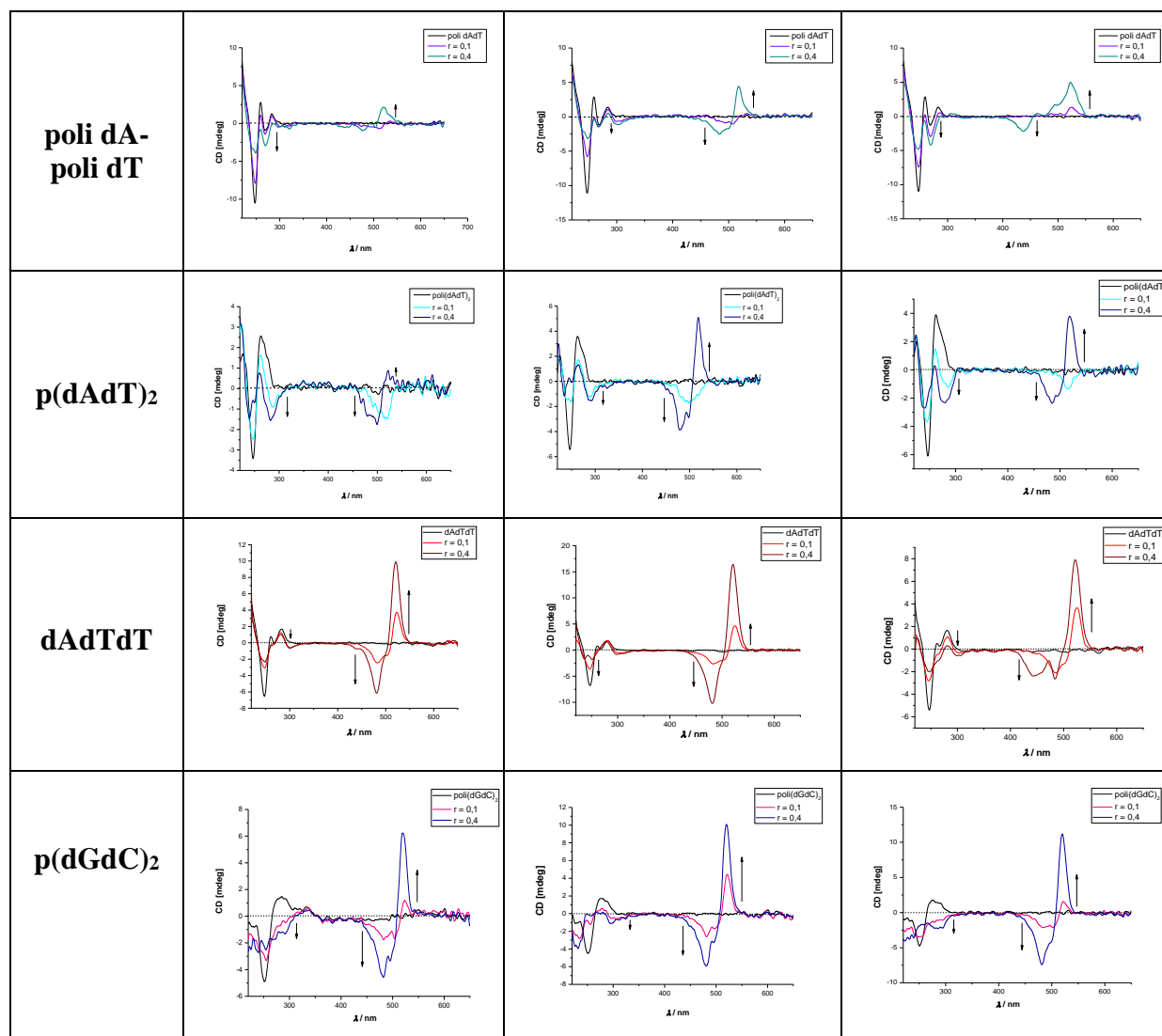
Zanimljivo je da derivat tiazol-narančasto, 6-Cl-TO-1, sličan derivatu **C3** (slika 45), nije inducirao stvaranje trolančane strukture u interakcijama s dvolančanim sekvencama poli dA-poli dT i poli rA-poli rU.<sup>115</sup> Razlog tome je vjerojatno u strukturi 6-Cl-TO-1 koja ne sadrži dodatnu pozitivno nabijenu jedinicu (piridin).

#### 4.3.2.4. Cirkularni dikroizam

Dodatak spojeva **C1** – **C3** rezultirao je smanjenjem intenziteta CD vrpce svih ispitivanih polinukleotida (260 – 275 nm), što ukazuje na značajnu interakciju sa sekundarnim strukturama DNA i RNA. Štoviše, pojavile su se intenzivne ICD vrpce u području koje odgovara apsorpcijskom rasponu spoja između 300 i 570 nm (slika 48 – 50). Analizom spektara može se primjetiti da cijaninske boje uzrokuju različite ICD profile sa strukturama A- i B-uzvojnica. U većini titracija s B-uzvojnica (*ct*DNA, p(dAdT)<sub>2</sub>, p(dGdC)<sub>2</sub>, poli dA-poli dT, dAdTdT) pri nižem omjeru,  $r \leq 0,1$  slabi negativni ICD signali vidljivi su oko 300 nm i u rasponu od 505 do 515 nm, što je pokazatelj interkalativnog načina vezivanja. Međutim, moguće je da takvi signali upućuju i na djelomično interkaliranje cijaninskih boja između parova baza DNA.<sup>183</sup> Pri višem omjeru ( $r \geq 0,1/0,2$ ) pojavljuju se bisignatni pozitivni/negativni ICD signali (+ 520/– 480 nm), što ukazuje na dimerizaciju ili agregaciju cijaninske boje unutar polinukleotidnih utora.<sup>119</sup> Točka prijelaza bisignatnih CD signala bila je u području između 507 i 510 nm, što se dobro slaže s maksimumima apsorpcije proučavanih spojeva. Slabi negativni ICD signali centrirani oko 300 – 320 nm, indikativni za interkalaciju, nisu se smanjili pri povećanom omjeru,  $r \geq 0,1/0,2$ . Takve promjene ukazuju na postojanje mješovitog načina vezanja (slika 48).

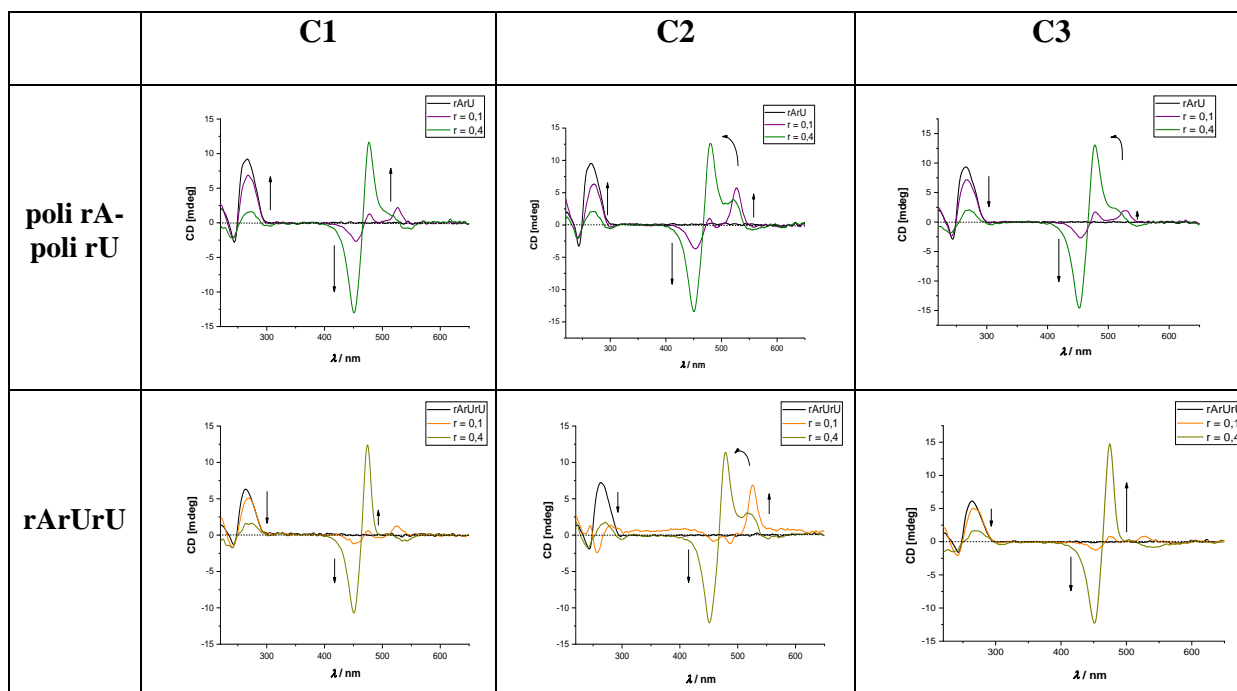






Slika 48. Prikaz CD titracija različitih struktura: *ct*DNA, nealternirajuća poli dA-poli dT, alternirajuća  $p(dAdT)_2$ , trolančana struktura-dAdTdT i alternirajuća  $p(dGdC)_2$  ( $c = 3,0 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>) s ligandima **C1** – **C3** u molarnom omjeru  $r$  ( $[spoj]/[polinukleotid] = 0,1$  i  $0,4$  ( $pH = 7,0$ ; natrijev kakodilatni pufer,  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>)).

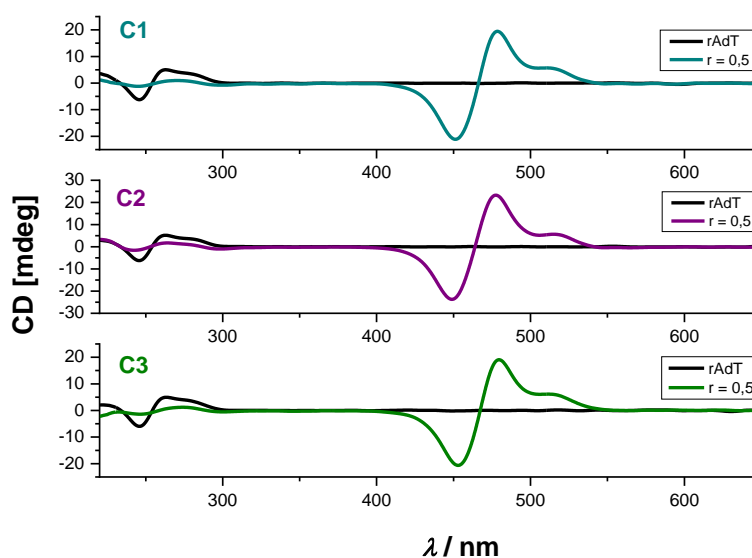
U titracijama sa strukturama A-uzvojnica (rArU i rArUrU), cijaninske boje inducirale su bisignatne pozitivne/negativne signale koji su hipsokromno pomaknuti (+ 480/– 450 nm) u usporedbi s onima opaženim u titracijama sa strukturama B-uzvojnica (+ 520/– 480 nm). Uz te promjene, u titracijama sa strukturama A-uzvojnica vidljivi su i pozitivni ICD signali oko 525 nm. Slično rezultatima dobivenim s B-uzvojnica, negativni ICD signali bili su vidljivi oko 305 nm (slika 49).



Slika 49. Prikaz CD titracije dvolančane strukture poli rA-poli rU i trolančane strukture-  
rArUrU ( $c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s ligandima **C1** – **C3** u molarnom omjeru  $r$   
( $[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}] = 0,1 \text{ i } 0,4$  ( $\text{pH} = 7,0$ ; natrijev kacidilati pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )).

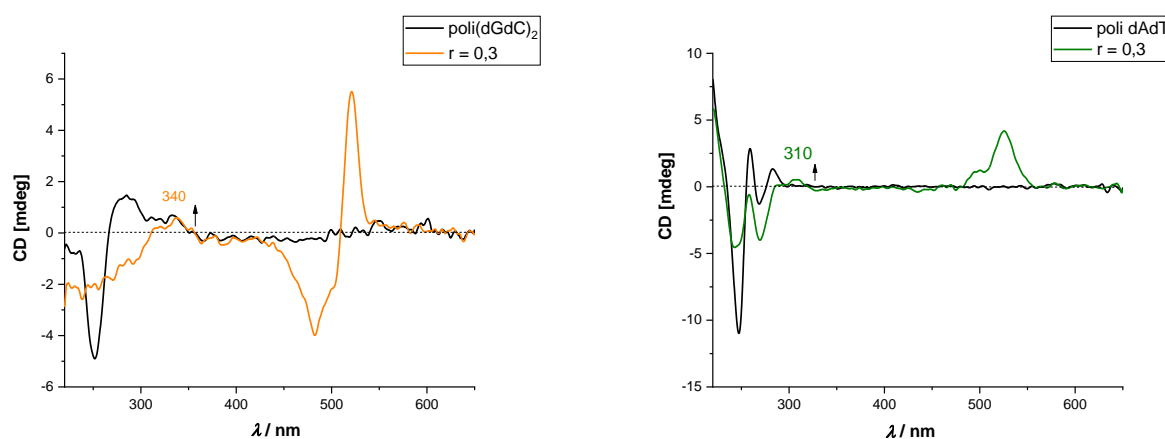
Takvi inducirani signali upućuju na postojanje mješovitog načina vezanja, interkalacije i stvaranja agregata cijaninskih boja unutar velikog utora. Prema tome, ligandi **C1** – **C3** mogu učinkovito prepoznati sekundarne strukture DNA i RNA, posebno njihove utore (manji utor DNA i veliki utor RNA). Općenito, male molekule se ne vežu unutar manjeg utora RNA jer je širok i plitak.<sup>167,20</sup> Prikladnije mjesto vezivanja je veliki utor, koji je uži i dublji od manjeg utora DNA. Veliki utor omogućuje bolji smještaj **C1** – **C3** agregata višeg reda i učinkovitije hidrofobne i van der Waalsove interakcije.<sup>25</sup>

Slične promjene dobivene su u titracijama s hibridnom strukturom, poli rA-poli dT. Hibridna struktura ima parametre karakteristične za A- i B-uzvojnica, ali globalna konformacija koju ima u standardnim uvjetima je B-uzvojnica<sup>168</sup> (slika 50).



Slika 50. CD spektri dvolančane hibridne strukture poli rA-poli dT ( $c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s ligandima **C1** – **C3** u molarnom omjeru  $r$  ( $[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}] = 0,5$ ) (pH = 7,0; natrijev kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).

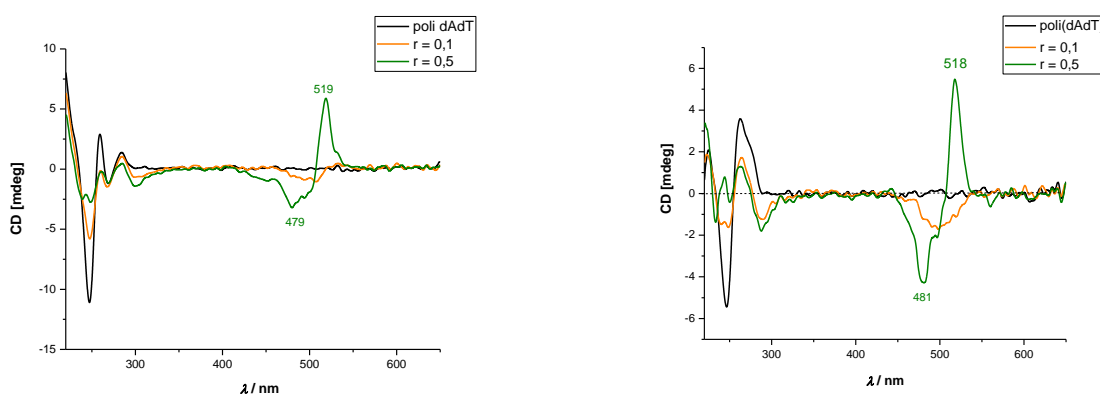
Titracije spoja **C1** s poli(dGdC)<sub>2</sub> i spoja **C3** s poli dA-poli dT otkrile su pozitivno inducirane CD spektre (ICD) na 340 nm, odnosno 310 nm. Ova promjena ukazuje na interkalativno vezanje, gdje je ligand orijentiran „okomito“ na dugu os susjednih parova baza (slika 51).<sup>155</sup>



Slika 51. CD spektri dvolančane alternirajuće strukture p(dGdC)<sub>2</sub> s ligandom **C1** (lijevo); nealternirajuće strukture poli dA-poli dT s ligandom **C3** (desno), ( $c_{\text{polinukleotida}} = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u molarnom omjeru  $r$  ( $[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}] = 0,5$ ) (pH = 7,0; natrijev kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).

Razlog za različite orijentacije kromofora **C1** i **C3** mogao bi se pripisati prisutnosti atoma halogena na benzotiazolskom prstenu.<sup>153</sup>

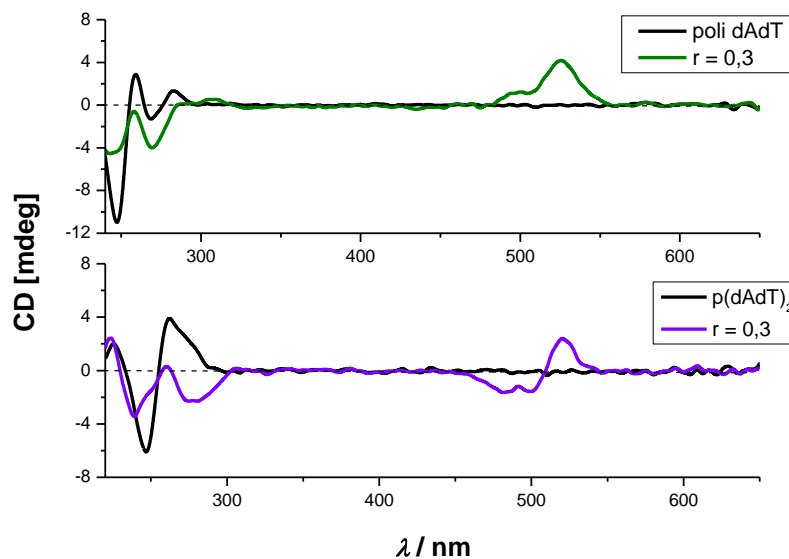
Spoj **C2** s pozitivno nabijenim pirolidinom pokazao je iste ICD profile s alternirajućom i nealternirajućom AT-DNA, negativne ICD signale do omjera  $r < 0,2$  i bisignatne pozitivne/negativne ICD signale (+ 520/− 480 nm) pri višim omjerima (slika 52).



Slika 52. Lijevo: prikaz CD titracije dvolančane nealternirajuće strukture poli dA-poli dT; desno: alternirajuće strukture  $p(dAdT)_2$  ( $c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s ligandom **C2** u molarnom omjeru  $r$  ( $[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}] = 0,1$  i  $0,5$  ( $\text{pH} = 7,0$ ; natrijev kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )).

Za razliku od alternirajuće AT-DNA ( $p(dAdT)_2$ ), **C1** i **C3** nisu pokazali bisignatne pozitivne/negativne ICD signale (+ 520/− 480 nm) s nealternirajućom poli dA-poli dT. **C1** je izazvao nastanak negativnih ICD signala oko 510 nm pri omjeru  $r \leq 0,2$  i pozitivne signale oko 520 nm pri višim omjerima, dok je **C3** pokazao samo pozitivne ICD signale na 520 nm.

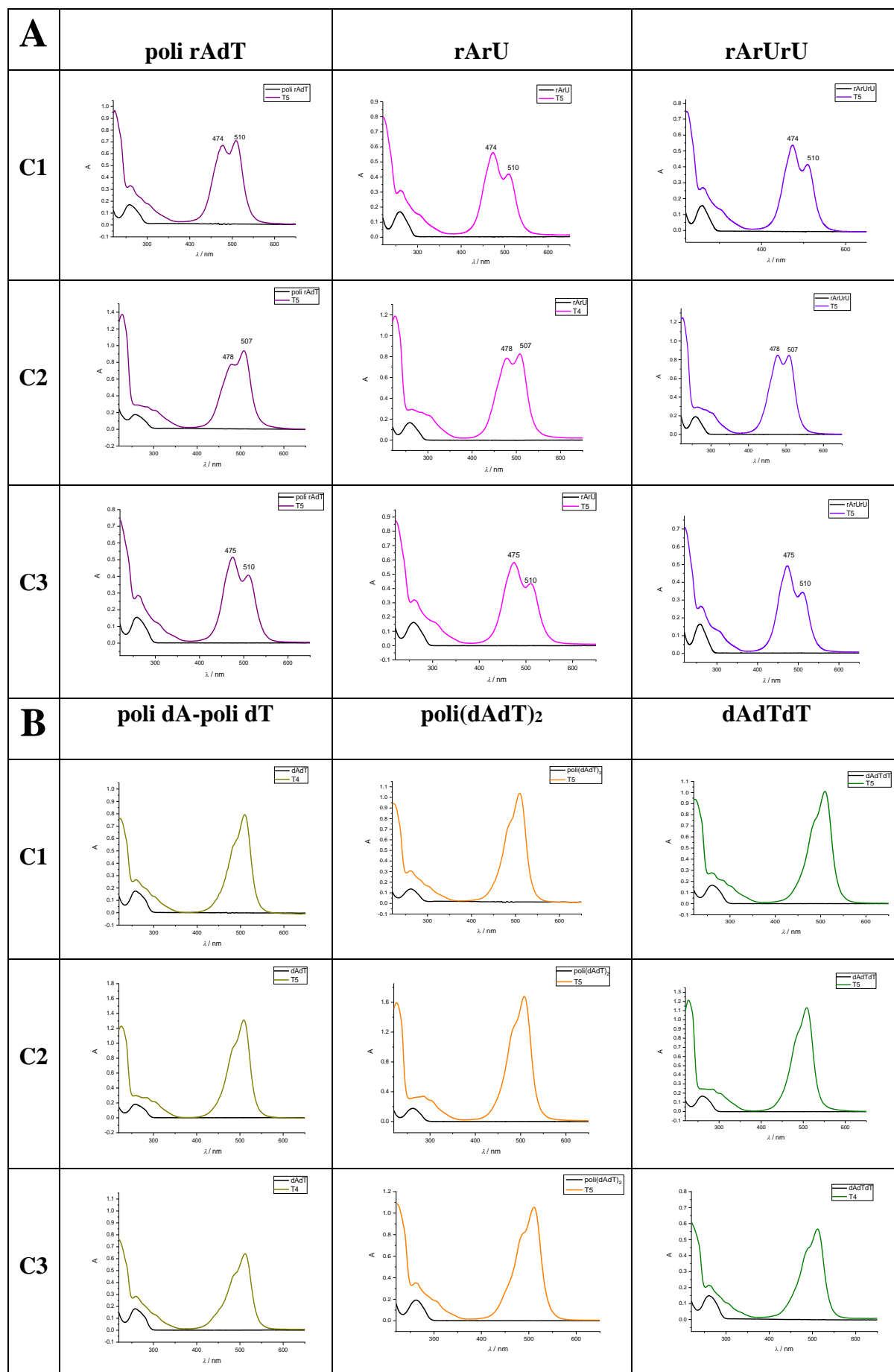
Razlika u ICD profilima spojeva **C1** i **C3** s alternirajućim i nealternirajućim AT-DNA vjerojatno je rezultat dvaju čimbenika: konformacije polinukleotida i strukture cijaninske boje (slika 53).



Slika 53. Razlika u CD spektrima alternirajuće i nealternirajuće sekvence AT-DNA sa spojem **C3** ( $c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u molaranom omjeru  $r$  ( $[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}] = 0,5$  ( $\text{pH} = 7,0$ ; natrijev kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )).

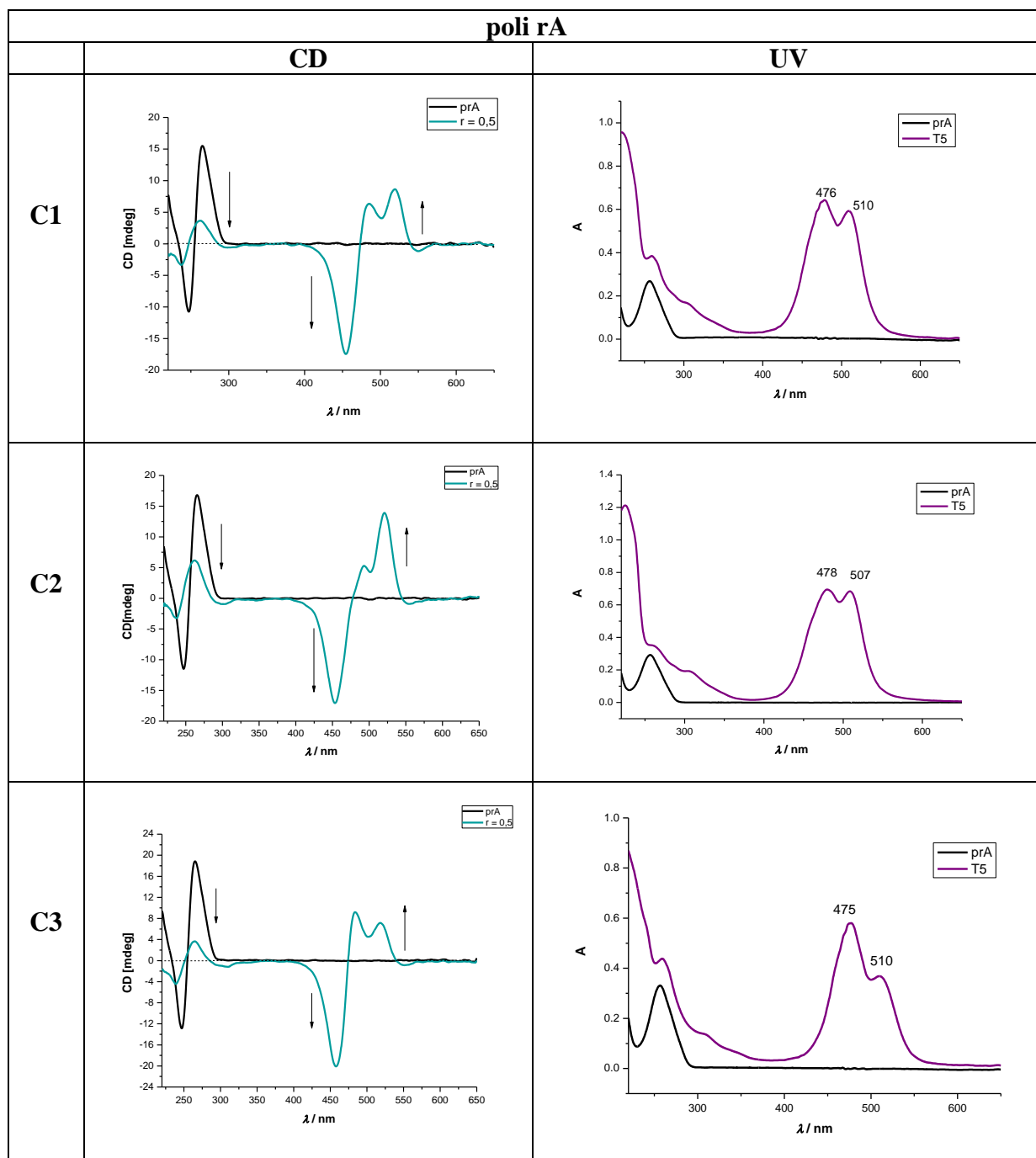
Nealternirajuća sekvenca poli dA-poli dT tvori sekundarnu strukturu koju karakteriziraju mnogo uži i dublji manji utori<sup>184</sup> u usporedbi s klasičnom strukturom B-uzvojnice koju ima alternirajuća sekvenca poli(dAdT)<sub>2</sub>.<sup>172</sup> Moguće je da su cijaninske boje **C1** i **C3** bile vezane u monomernom obliku unutar manjeg utora poli dA-poli dT i kao dimer ili agregirani oblik unutar utora alternirajuće sekvence poli(dAdT)<sub>2</sub>.

Kako bi se dobio bolji uvid u vrstu agregata nastalih kompleksa **C1** – **C3** i polinukleotida, uz CD spektre snimljeni su i apsorpcijski spektri (slika 54).



Slika 54. A) UV/Vis apsorpcijski spektri struktura koje sadrže rA lanac (poli rA-poli dT, poli rA-poli rU i trolančane strukture rArUrU) i B) UV/Vis apsorpcijski spektri struktura koje sadrže dA lanac (poli dA-poli dT, poli(dAdT)<sub>2</sub> i trolančane strukture dAdTdT) u titraciji sa spojevima **C1** – **C3** ( $c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u molarnom omjeru  $r$  ( $[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}] = 0,4$  (za komplekse: **C1**/poli dA-poli dT; **C2**/poli rA-poli rU; **C3**/poli dA-poli dT, dAdTdT) i 0,5 (svi ostali) pri pH = 7,0; natrijev kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ . Oznaka T4 označava kompleks cijanina i polinukleotida koji odgovara  $r = 0,4$  dok T5 odgovara  $r = 0,5$ .

Zanimljivo je da polinukleotidi s lancem rA (rAdT, rArU, rArUrU) imaju drugačiji profil apsorpcijskih vrpci od polinukleotida koji sadrže dA lanac (dAdTdT, poli dA-poli dT, poli(dAdT)<sub>2</sub>). Novi hipsokromno pomaknuti apsorpcijski signal pojavio se oko 470 – 480 nm pri omjerima  $r > 0,1$  zajedno s apsorpcijskim signalom pri 510 nm. Ovaj signal najvjerojatnije ukazuje na stvaranje H-agregata<sup>118</sup> (opisani u potpoglavlju 2.5.2., slika 7), smještenih unutar glavnog žlijeba struktura koje imaju rA lanac.<sup>116,118,185</sup> Kako bi se vidjelo je li stvaranje H-agregata povezano s prepoznavanjem konformacije ili prepoznavanjem sekvence, provedeni su eksperimenti cirkularnog dikroizma i apsorpcijske spektroskopije s jednolančanim polinukleotidom (poli rA) i ligandima **C1** – **C3** (slika 55).

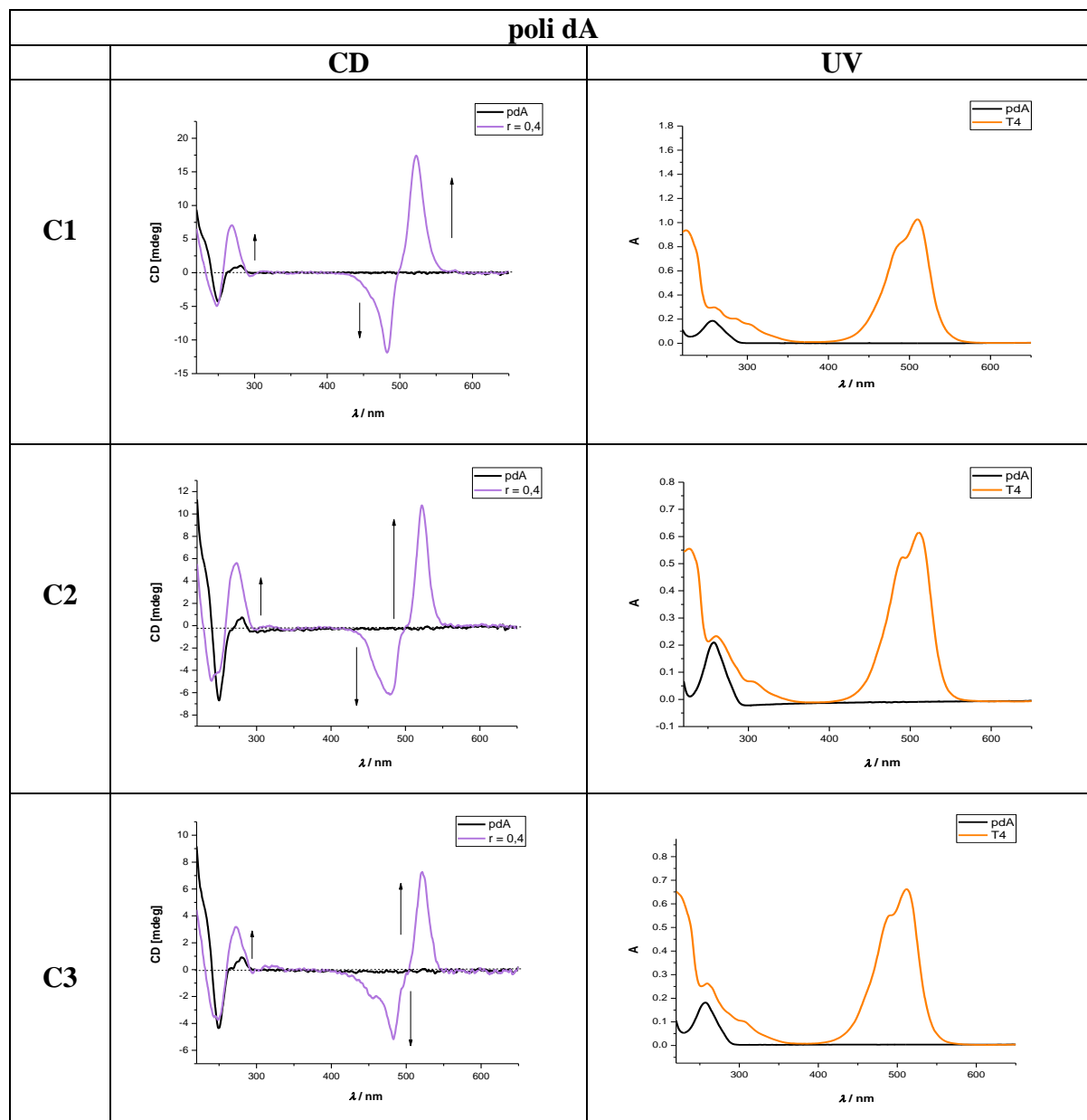


Slika 55. Usporedni prikaz UV/Vis spektara (T5-kompleks cijanina i polinukleotida koji odgovara  $r = 0,5$ ) i spektara cirkularnog dikroizma jednolančane sekvence poli rA pri titraciji sa spojevima **C1** – **C3** ( $c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u molarnom omjeru  $r$  ( $[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}] = 0,5$ ) pri  $\text{pH} = 7,0$ ; natrijev kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ .

ICD profili apsorpcijskih vrpca s jednolančanim strukturama poli rA bili su slični onima s dvolančanim i trolančanim polinukleotidima koji sadrže lanac rA. Budući da apsorpcijski signal na 475 nm nije bio vidljiv u UV/Vis spektru prilikom titracija liganda **C1** – **C3** s



dvolančanim i trolančanim polinukleotidom koji sadrži dA lanac, snimljen je apsorpcijski i CD spektar jednolančanog DNA polinukleotida poli dA sa spojevima **C1** – **C3** (slika 56).



Slika 56. Usporedni prikaz UV/Vis spektara (T4-kompleks cijanina i polinukleotida koji odgovara  $r = 0,4$ ) i spektara cirkularnog dikroizma jednolančane sekvence poli dA pri titraciji sa spojevima **C1** – **C3** ( $c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u molarnom omjeru  $r$  ([spoj]/[polinukleotid]) = 0,4 pri pH = 7,0; natrijev kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ .

Hipsokromno pomaknuti apsorpcijski signal na 470 – 480 nm nije opažen u titracijama **C1** – **C3** s poli dA. ICD profil jednolančanog dA s ligandima **C1** – **C3** bio je sličan ICD signalima dvolančanih polinukleotida koji sadrže dA lanac-bisignatni pozitivni/negativni ICD signali (+

520/– 480 nm). S druge strane, ICD profil titracije jednolančanog rA bio je sličniji ICD profilima dobivenih u titracijama dvolančanih polinukleotida koji sadrže rA lanac, posebno s cijaninskom bojom **C3**. Cijaninske boje **C1** i **C2** pokazale su kombinirani ICD profil: bisignatne ICD signale na + 520/– 480 nm pri omjeru,  $r \leq 0,4$  i bisignatne ICD signale oko + 480/– 450 nm pri omjerima  $r \geq 0,4$  (slika 55; Dodatak, slika D.8.24.).

Rezultati sugeriraju da je cijaninska boja **C3** prisutna u obliku H-agregata u kompleksu s lancem rA. Cijaninske boje **C1** i **C2** najvjerojatnije postoje kao kombinacija dimera i monomera u kompleksima s rA. Pri višim omjerima  $r \geq 0,4$  preferiran je agregirani oblik. Na temelju toga može se zaključiti da je nastanak H-agregata uvjetovan prisutnošću rA lanca bilo u obliku jednolančanog polinukleotida ili u sklopu dvolančanog ili trolančanog polinukleotida.

#### 4.3.3. Biološka ispitivanja

Konfokalna mikroskopija i MTT test primijenjeni su za *in vitro* studiju kako bi se pokazao potencijal i bioprimjenjivost postojećih fluorofora. MTT test proveden je u suradnji s dr. sc. Anamariom Brozović i dr. sc. Juranom Kraljem (Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković), dok su eksperimenti na konfokalnom mikroskopu provedeni u suradnji s dr. sc. Anom Tomašić Paić (Zavod za organsku kemiju i biokemiju, Institut Ruđer Bošković) i Lucijom Horvat (Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković).

##### 4.3.3.1. MTT test

Ispitan je utjecaj spojeva **C1** – **C3** na vitalnost stanica korištenjem različitih tumorskih staničnih linija: vrata maternice (HeLa), dojke (MDA-MB-213), jajnika (MES-OV), melanoma (RPMI-7951), karcinoma pluća (A549) i normalne stanične linije (ljudski fibroblasti). Vrijednosti  $IC_{50}$  prikazane su u tablici 15.

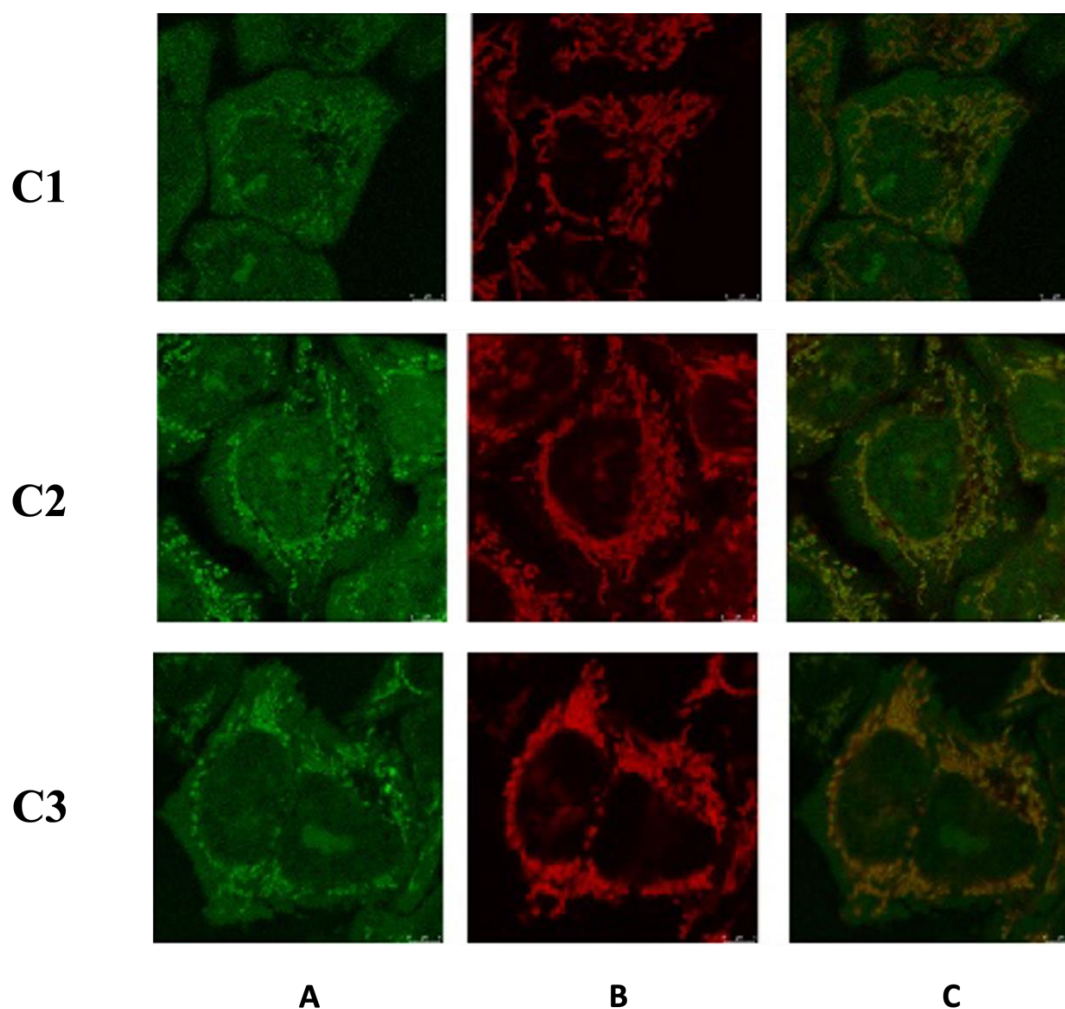
Tablica 15. Citotoksična aktivnost ispitivanih liganada **C1** – **C3** i doksorubicina s različitim staničnim linijama: HeLa, MDA-MB-231, MES-OV, RPMI-7951, A549 i fibroblastima.  $IC_{50}$  ( $IC_{50} (10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}) \pm SD$ ) vrijednosti izračunate su nakon 72 satne inkubacije ligandima **C1** – **C3**. Citotoksičnost je izmjerena MTT testom.

	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>doksorubicin</b>
<b>HeLa</b>	19,4 ± 5,78	12,09 ± 0,97	5,96 ± 1,73	0,01 ± 0,00
<b>MDA-MB-231</b>	24,80 ± 3,00	11,35 ± 0,22	7,71 ± 1,97	0,48 ± 0,11
<b>MES-OV</b>	21,83 ± 3,52	11,25 ± 0,47	6,87 ± 0,39	0,05 ± 0,05
<b>RPMI-7951</b>	16,11 ± 3,48	10,72 ± 3,57	8,04 ± 1,71	0,12 ± 0,04
<b>A549</b>	6,26 ± 3,76	6,54 ± 3,50	5,43 ± 0,37	0,09 ± 0,12
<b>fibroblasti</b>	48,27 ± 4,94	36,74 ± 5,74	38,33 ± 0,75	0,92 ± 0,16

Cijaninska boja **C3** pokazala je najizraženiji učinak na stanične linije A549 i HeLa. Kao što se može primijetiti, stanična linija A549 je najosjetljivija na sve testirane spojeve. Vrijednosti  $IC_{50}$  svih spojeva za normalne ljudske stanične linije bile su znatno veće u odnosu na tumorske stanične linije. Učinak doksorubicina na održivost staničnih linija bio je veći u usporedbi s cijaninskim bojama (tablica 15). Međutim, citotoksični utjecaj doksorubicina bio je sličan za zdrave i tumorske stanične linije.

#### 4.3.3.2. Konfokalna mikroskopija

Eksperimenti konfokalne mikroskopije provedeni su kako bi se ispitaio unos cijaninskih boja u stanice i vizualizirao njihov unutarstanični položaj. Unos spojeva je praćen u živim HeLa stanicama nakon 60 minutne inkubacije. Tijekom testiranog razdoblja sva tri spoja prošla su kroz staničnu membranu stanica HeLa. Intenzivna zelena fluorescencija bila je vidljiva u mitohondrijima, što je potvrđeno kolokalizacijom s bojom MitoTracker Deep Red (slika 57).



Slika 57. Unutarstanična distribucija cijaninskih boja **C1** – **C3** u usporedbi s MitoTrackerom. Konfokalna mikroskopija živih HeLa stanica snimljenih konfokalnim mikroskopom Leica SP8 X, obojenih s  $1 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup> spoja **C1** – **C3**; A) kanal koji pokazuje emisiju liganda **C1** – **C3** ( $\lambda_{\text{exc}} = 508$  (**C1**),  $507$  (**C2**),  $510$  (**C3**) nm,  $\lambda_{\text{em}} = 530 - 600$  nm); B) MitoTracker kanal ( $\lambda_{\text{exc}} = 644$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 665 - 700$  nm); C) preklapanje dvaju kanala.

Pearsonov koeficijent korelacije (PCC),<sup>186</sup> korigiran je za šum<sup>187</sup> i korišten je za kvantificiranje kolokalizacije. Rezultati su pokazali umjerenu kolokalizaciju cijaninskih boja **C1** – **C3** s komercijalnim mitohondrijskim tragačem (tablica 16).

Tablica 16. Korelacija kolokalizacije, PCC vrijednosti korigirane za šum metodom RBNCC.

<b>kombinacija</b>	<b>PCC ± SD</b>
<b>C1:MitoTracker</b>	0,25 ± 0,07245
<b>C2:MitoTracker</b>	0,678 ± 0,0629
<b>C3:MitoTracker</b>	0,579 ± 0,0083
<b>C1:LysoTracker</b>	0,378 ± 0,0639
<b>C2:LysoTracker</b>	0,164 ± 0,1164
<b>C3:LysoTracker</b>	0,228 ± 0,0139

Također je provedena kolokalizacija s bojom LysoTracker budući da je i u lizosomima uočena zelena fluorescencija (tablica 16). Osim nakupljanja u mitohondrijima, vidljiva je i slabija fluorescencija cijaninskih boja unutar jezgre, najvjerojatnije unutar jezgrice. Unutar kontrolnih, netretiranih stanica nije uočena fluorescencija. Dobiveni rezultati ukazuju da se fluorofori **C1** – **C3** dominantno nakupljaju u mitohondrijima, a manje u lizosomima. Važno je napomenuti da se strukturno slični derivati TO i TOTO, koji su tipični DNA interkalatori, mogu vizualizirati samo u jezgri.<sup>188</sup> Derivati **C2** i **C3** pokazuju značajne učinke na vitalnost stanica što ih, zajedno s mitohondrijskim fluorescentnim označavanjem, čini obećavajućim teranostičkim agensima.

## § 5. ZAKLJUČAK

Pripravljena su četiri nova fenantridinska derivata kod kojih je triptofan vezan amidnom vezom na fenantridinsku jezgru te su ispitana njihova spektroskopska svojstva u puferu natrijevog kakodilata. Spojevi *tert*-butil-((2*S*)-3-(1*H*-indol-3-il)-1-((6-metilfenantridin-8-il)amino)-1-oksopropan-2-il)karbamat (**A1**) i (2*S*)-3-(1*H*-indol-3-il)-1-[(6-metilfenantridin-8-il)amino]-1-oksopropan-2-aminijev trifluoracetat (**A2**) pokazali su dobro vezanje na strukturu *ct*DNA. Rezultati bioloških istraživanja u skladu su sa spektroskopskim eksperimentima. Pokazano je da spojevi **A1** i **A2** imaju izražen citotoksični učinak, s tim da je taj učinak 100 %-tan samo u slučaju spoja **A2**.

Kompeticijskom dijalizom, kao brzom metodom probira, od devet benzotiazolnih liganda izdvojena su tri spoja (**B1**, **B5** i **B6**) s preferencijalnim vezanjem na hibridne DNA:RNA strukture i trolančanu strukturu DNA-dAdTdT u odnosu na regularne (nehibridne) dvolančane i jednolančane strukture DNA i RNA. RNaza H testom potvrđeni su rezultati dobiveni proširenim eksperimentom temperaturnog mekšanja: ligand **B1** stabilizira hibridnu strukturu poli rA-poli dT čime je identificiran kao potencijalni inhibitor RNaze H za razdvajanje hibridne strukture poli rA-poli dT. Sva tri spoja (**B1**, **B5** i **B6**) pokazala su jaki stabilizacijski učinak na trolančanu strukturu DNA-dAdTdT. Ligand **B6** sa supstituentom klorobenzotiofen pokazao je najveći stabilizacijski učinak ( $\Delta T_m = 44$  pri  $r = 0,1$ ) i preferencijalno vezanje na trolančanu strukturu dAdTdT u odnosu na dvolančanu strukturu poli dA-poli dT. Ovakva selektivnost i stabilizacija mogla bi se iskoristiti u antitumorskim istraživanjima.

Spoj **B6** veže se unutar manjeg utora strukture dAdTdT u obliku dimera što je potvrđeno spektroskopijom CD i molekulskim modeliranjem. Rezultati vezanja u mali tor trolančane strukture dobiveni su s polinukleotidima ( $\geq 500$  parova baza), a visoki afinitet i selektivnost liganda na trolančanu strukturu dAdTdT potvrđeni su i s kraćom sekvencom, oligomerom od 26 nukleotida. Ovim eksperimentima potvrđeno je da ligand **B6** prepoznaje sekvencu dAdTdT bez obzira na duljinu nukleotidnog lanca. Za razliku od ostala dva spoja, ligand **B6** različito se veže na A- i B-uzvojnici. Na strukture poli dA-poli rU i poli rA-poli rU, koje pripadaju A-uzvojnici, veže se kao interkalator. Bisignatni CD signal koji se pojavljuje u CD titracijama s poli rA-poli dT, poli dA-poli dT i dAdTdT implicira vezanje liganda **B6** u obliku dimera unutar manjeg utora B-uzvojnice. Ligand **B1**, koji je voluminozniji u usporedbi sa spojevima **B5** i **B6**, izazvao je nastanak jakog pozitivnog ICD signala što ukazuje na vezanje spoja **B1** unutar manjeg utora *ct*DNA, poli dA-poli dT i trolančane strukture-dAdTdT. Budući

da je ligand **B1** izazvao značajne promjene u interakciji s trolančanom strukturom DNA-dAdTdT, ispitane su interakcije s njegovim regioizomerom **B3** i strukturama koje su bogate AT-sekvencama. Za razliku od svog regioizomera **B1**, ligand **B3** je izazvao značajni porast intenziteta CD signala kod AT-bogatih sekvenci i jake pozitivne ICD signale oko 350 nm. Takve promjene strukture nukleinske kiseline slične su kondenzaciji, te su od velikog interesa za primjenu u farmaceutici.

Rezultati dobiveni spektroskopijom cirkularnog dikroizma sugeriraju djelomično ili potpuno interkaliranje treće ispitivane skupine spojeva, derivata tiazol-narančastog **C1 – C3**, u strukture DNA/RNA pri nižim koncentracijama spoja, a pri višim omjerima vezanje u manji utor unutar B-uzvojnice DNA ili u veći utor unutar A-uzvojnice RNA. Sve tri cijaninske boje inducirale su stvaranje trolančane strukture prilikom interakcije s nealternirajućim dvolančanim polinukleotidima koji sadrže lanac rA ili dA. Stabilizacijski učinak hibridne trolančane strukture DNA:RNA i DNA (dAdTdT, rAdTdT) veći je od stabilizacijskog učinka na dvolančane strukture (poli dA-poli dT, poli rA-poli dT). Samo je klorirani derivat (**C3**) preferencijalno stabilizirao trolančanu strukturu RNA (rArUrU) u odnosu na odgovarajuću dvolančanu strukturu (poli rA-poli rU). Za razliku od fluoriranog analoga **C1**, klorirani derivat **C3** inducirao je stvaranje trolančane strukture poli rA-poli dT samo pri nižoj ionskoj jakosti,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ .

Rezultatima pokusa temperaturnog mekšanja pokazano je da su stabilizacijski učinci na nealternirajuće sekvence nukleinskih kiselina bolji ili usporedivi s podacima drugih literaturno poznatih spojeva koji se vežu na ove sekvence. Prisutnost rA sekvence, bilo u jednolančanoj, dvolančanoj ili trolančanoj strukturi, inducira pojavu H-agregata cijaninskih liganada. To dovodi do zaključka da je stvaranje H-agregata cijanina povezano s prepoznavanjem sekvence, a ne s prepoznavanjem strukture/konformacije. Stvaranje H-agregata najviše je izraženo u kompleksima nukleinskih struktura s rA lancem i liganda **C3**. Prema dostupnoj literaturi, to je prvi primjer stvaranja H-agregata cijanina uvjetovanog prisutnošću rA sekvence. Indukcija stvaranja trolančane strukture iz dvolančanih supstrata koji sadrže rA i dA lance kao i pojava H-agregata uvjetovana prisutnošću rA lanca mogla bi biti značajna u vitalnim procesima unutar stanica. Novosintetizirani fluorofori **C1 – C3** imali su značajan učinak na vijabilnost svih ispitivanih tumorskih staničnih linija, posebno prema staničnim linijama HeLa i A549. Studije kolokalizacije pokazuju da se derivati **C2** i **C3** dominantno akumuliraju u mitohondrijima što ih, uz dokazani utjecaj na vitalnost stanica, čini obećavajućim teranostičkim agensima. Posebno je za daljnje istraživanje zanimljiv klorirani derivat **C3** jer može inducirati stvaranje

trolančane strukture iz dvolančanih supstrata koji sadrže rA i dA lance te se odlikuje dobrom selektivnošću na vijabilnost stanica između zdravih i tumorskih staničnih linija. Također, zanimljiv je fenomen da prisutnost rA lanaca potiče stvaranje H-agregata cijanina.



## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

A – adenin

Ar – argon

AT – adenin-timin bogata regija

A549 – stanice raka pluća

Bn – benzilna skupina

Boc – *tert*-butiloksikarbonilna zaštitna skupina

Boc-Trp – aminokiselina triptofan kojoj je NH kraj zaštićen *tert*-butiloksikarbonilnom zaštitnom skupinom

br-s – široki singlet u NMR spektroskopiji

C – citozin

CD – cirkularni dikroizam

COSY – engl. *correlation spectroscopy*

ctDNA – engl. *calf thymus* DNA

d – dublet u NMR spektroskopiji

dAdTdT – trolančana DNA struktura koja se sastoji od dva lanca timina i jednog lanca adenina

dd – dublet dubleta u NMR spektroskopiji

DMEM – engl. *Dulbecco's modified Eagle's*

DMF – N,N-dimetilformamid

DMSO – dimetilsulfoksid

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

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

EtBr – etidijev bromid

*E. coli* – lat. *Escherichia coli*

ESI – engl. *electrospray ionization* (ionizacija raspršenjem)

Et<sub>3</sub>N – trietilamin

EtOH – etanol

FBS – fetalni goveđi serum

FTIR – engl. *Fourier transform infrared*

G – gvanin

GC – gvanin-citozin bogata regija

- HAS – homolitička aromatska supstitucija (engl. *Intramolecular homolytic aromatic substitution*)
- HBTU – 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronijev heksafluorofosfat
- HeLa – stanice adenokarcinoma vrata maternice
- HIV – engl. *human immunodeficiency virus*
- HOBt – hidroksibenzotriazol
- HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography*)
- HRMS – engl. *high resolution mass spectrometry*
- ICD – inducirani cirkularni dikroizam
- IR – engl. *infrared* (infracrveno elektromagnetsko zračenje)
- ITC – izotermalna titracijska kalorimetrija
- $K_a$  – konstanta vezanja (engl. *association constant*)
- LC-MS – engl. *Liquid chromatography-mass spectrometry*
- LED – engl. *light-emitting diode*
- m – multiplet u NMR spektroskopiji
- MALDI-TOF/TOF – matricom potpomognuta ionizacija desorpcijom laserskog zračenja analizator masa s vremenom leta
- MDA-MB-231 – stanice raka dojke
- MES-OV – stanice raka jajnika
- MS – spektrometrija masa
- MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid
- NMR – engl. *nuclear magnetic resonance* (nuklearna magnetska rezonancija)
- o* – orto položaj na benzenu
- PCC – Pearsonov koeficijent korelacije
- p(dAdT)<sub>2</sub> – alternirajući polinukleotid AT parova baza
- p(dGdC)<sub>2</sub> – alternirajući polinukleotid GC parova baza
- Phen – fenantridin
- Ph – fenilna skupina
- poli dA (dA) – jednolančana struktura adenina koja ima šećer deoksiribozu
- poli dA-poli dT (dAdT) – dvolančani polinukleotid koji se sastoji od lanca adenina i timina
- poli dA-poli rU (dArU) – dvolančana hibridna struktura koja se sastoji od adeninskog lanca molekule DNA i uracilnog lanca molekule RNA
- poli dG-poli dC (dGdC) – dvolančani polinukleotid koji se sastoji od lanca gvanina i citozina

- poli dT (dT) – jednolančana struktura timina koja ima šećer deoksiribozu
- poli rA (rA) – jednolančana struktura adenina koja ima šećer ribozu
- poli rA-polni dT (rAdT)– dvolančana hibridna struktura koja se sastoji od lanca adenina molekule RNA i timina molekule DNA
- poli rA-polni rU (rArU)– dvolančana molekula koja sadrži uzvojnica adenina i uzvojnica uracila
- poli rU (rU) – jednolančana struktura uracila koja ima šećer ribozu
- rArUrU – trovančana molekula koja sadrži uzvojnica adenina i dvije uzvojnice uracila
- Rf – engl. *retention factor* (faktor zadržavanja analita u kromatografiji)
- RNA – engl. *ribonucleic acid* (ribonukleinska kiselina)
- ROS – reaktivne kisikove vrste (engl. *reactive oxygen species*)
- RPMI – 7951 – stanice melanoma ljudske kože
- s – singlet u NMR spektroskopiji
- SDS – natrijev dodecil sulfat
- SS – zbroj specifičnosti (engl. *specificity sum*)
- t – triplet u NMR spektroskopiji
- T – timin
- t*-BuO• – tert-butoksi radikal
- TFA – engl. *trifluoroacetic acid* (trifluoroctena kiselina)
- THF – tetrahidrofuran
- TLC – engl. *thin layer chromatography* (tankoslojna kromatografija)
- $T_m$  – temperatura mekšanja polinukleotida
- TMS – tetrametilsilan
- Trp – triptofan
- Ts – tosilna skupina
- T.t.* – temperatura tališta
- U – uracil
- UV – engl. *ultraviolet* (ultraljubičasto elektromagnetsko zračenje)
- UV/Vis – engl. *ultraviolet/visible* (ultraljubičasto / vidljivo elektromagnetsko zračenje)
- Q-TOF – engl. *Quadrupole Time-of-Flight*
- YO – oksazol žuto cijaninska boja ( engl. *Oxazole yellow cyanine dye*)
- $\delta$  – oznaka za kemijski pomak u NMR spektroskopiji

## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. J. B. Chaires, *Curr Opin Struct Biol.* **8** (1998) 314-320.
2. L. H. Hurley, *Nat Rev Cancer.* **2** (2002) 188-200.
3. A. Rich, *Gene.* **135** (1993) 99-109.
4. R. T. Wheelhouse, J. B. Chaires, *Methods Mol Biol.* **613** (2010) 55-70.
5. A. Noy, A. Pérez, M. Márquez, F. J. Luque, M. Orozco, *J Am Chem Soc.* **127** (2005) 4910-4920.
6. R. Rohs, X. Jin, S. M. West, R. Joshi, B. Honig, R. S. Mann, *Annu Rev Biochem.* **79** (2010) 233-269.
7. C. M. Barbieri, T. K. Li, S. Guo et al., *J Am Chem Soc.* **125** (2003) 6469-6477.
8. J. Ren, X. Qu, N. Dattagupta, J. B. Chaires, *J Am Chem Soc.* **123** (2001) 6742-6743.
9. N. N. Shaw, D.P. Arya, *Biochimie.* **90** (2008) 1026-1039.
10. P. Setny, J. Trylska, *J Chem Inf Model.* **49** (2009) 390-400.
11. L. M. Tumir, M. Radić Stojković, I. Piantanida, *Beilstein J Org Chem* **10** (2014) 2930-2954.
12. I. Kock, D. Heber, M. Weide, U. Wolschendorf, B. Clement, *J Med Chem.* **48** (2005) 2772-2777.
13. S. Bhaduri, N. Ranjan, D. P. Arya, *Beilstein J Org Chem.* **14** (2018) 1051-1086.
14. M. Abdel-Aziz, K. Matsuda, M. Otsuka, M. Uyeda, T. Okawara, K. Suzuki, *Bioorg Med Chem Lett.* **14** (2004) 1669-1672.
15. C. Liu, J. Lin, S. Pitt et al. *Bioorg Med Chem Lett.* **18** (2008) 1874-1879.
16. J. L. Seifert, R. E. Connor, S. A. Kushon, M. Wang, B. A. Armitage, *J Am Chem Soc.* **121** (1999) 2987-2995.
17. M. I. Kandinska, D. V. Cheshmedzhieva, A. Kostadinov et al. *J Mol Liq.* **342** (2021) 117501.
18. A. A. Vasilev, M. I. Kandinska, S. S. Stoyanov et al. *Beilstein J Org Chem.* **13** (2017) 2902-2914.
19. J. B. Chaires, *Top Curr Chem* **253** (2019) 33-53.
20. D. W. Ussery, *in ELS.* **1** (2002).
21. J. D. Watson, T. A. Baker, S. P. Bell, A. Gann, M. Levine, R. Losick, *Molecular Biology of the Gene*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, San Francisco, 2004, str. 100-150.

22. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, W.H. Freeman, 2015, str. 200-220.
23. S. Neidle, *J Biol Chem.* **296** (2021) 100553.
24. S. Neidle, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Elsevier: Academic Press, 2008, str. 20-33, 163.
25. W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer New York, 1984, str. 220-240.
26. N. N. Shaw, H. Xi, D.P. Arya, *Bioorg Med Chem Lett.* **18** (2008) 4142-4145.
27. P. P. Lestienne, *Biochimie* **91** (2009) 1523-1530.
28. D. P. Arya, *Acc Chem Res.* **44** (2011) 134-146.
29. M. Duca, P. Vekhoff, K. Oussedik, L. Halby, P. B. Arimondo, *Nucleic Acids Res.* **36** (2008) 5123-5138.
30. G. C. Silver, J. S. Sun, C. H. Nguyen, A. S. Boutorine, E. Bisagni, C. Hélène, *J Am Chem Soc.* **119** (1997) 263-268.
31. Q. Cao, Y. Li, E. Freisinger, P. Z. Qin, R. K. O. Sigel, Z. W. Mao, *Inorg Chem Front.* **4** (2017)10-32.
32. R. T. Wheelhouse, N. C. Garbett, N. J. Buurma, J. B. Chaires, *Angew Chem - Int Ed.* **49** (2010) 3207-3210.
33. A. Altieri, M. Franceschin, D. Nocioni et al. *Eur J Org Chem.* **1** (2013) 191-196.
34. I. Piantanida, *Kem Ind.* **52** (2003) 545-552.
35. K. R. Sangeetha Gowda, M. Blessy Baby, C. N. Sudhamani, H. S. Bhojya Naik, *Biomed Biotechnol.* **2** (2014) 1-9.
36. P. Dervan, *Bioorg Med Chem.* **9** (2001) 2215-2235.
37. D. E. Graves, L. M. Velea, *Curr Org Chem.* **4** (2000) 915-929.
38. Y. Jaiswal, Y. Kumar, J. Pal, R. Subramanian, A. Kumar, *Chem Commun.* **54** (2018) 7207-7210.
39. A. D. C. Parenty, L. V. Smith, K. M. Guthrie et al. *J Med Chem.* **48** (2005) 4504-4506.
40. J. Matić, N-sulfonilpurini i peptidni derivati fenantridina – sinteza, interakcije s polinukleotidima i biološka ispitivanja, Doktorski rad, Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci, 2016, str. 21.
41. A. Pictet, H. J. Ankersmit, *Justus Liebigs Ann Chem.* **266** (1891) 138-153.
42. G. T. Morgan, L. P. Walls, *J Chem Soc.* (1931) 2447-2456.
43. G. Fodor, S. Nagubar, *Tetrahedron* **36** (1980) 1279-1300.

44. M. Lysén, J. L. Kristensen, P. Vedsø, M. Begtrup, *Org Lett.* **4** (2002) 257-259.
45. P. Mamalis, V. Petrow, *J Chem Soc.* (1950) 703-711.
46. P. De Mayo, W. Rigby *Nature.* **166** (1950) 1075.
47. N. S. Narasimhan, P. S. Chandrachood, N. R. Siwie, *Tetrahedron* **37** (1981) 825-827.
48. R. Leardini, A. Tundo, G. Zanardi, *Communications* (1985) 107-110.
49. I. Deb, N. Yoshikai, *Org Lett.* **15** (2013) 4254-4257.
50. R. W. Bowman, J. E. Lyon, G. J. Pritchard, *ARKIVOC.* **7** (2012) 210-227.
51. Y. Li, J. Zhu, L. Zhang, Y. Wu, Y. Gong, *Chem - Eur J.* **19** (2013) 8294-8299.
52. A. R. Katritzky, B. Yang, *J Heterocycl Chem.* **33** (1996) 607-610.
53. A. R. Katritzky, W. Du, Y. Matsukawa, I. Ghiviriga, S. N. J. Denisenko, *NJ Heterocycl Chem.* **36** (1999) 927-932.
54. R. T. McBurney, A. M. Z. Slawin, L. A. Smart, Y. Yu, J. C. Walton, *Chem Commun.* **47** (2011) 7974-7976.
55. H. Jiang, Y. Cheng, R. Wang, M. Zheng, Y. Zhang, S. Yu, *Angew Chem - Int Ed.* **52** (2013) 13289-13292.
56. L. M. Tumir, I. Piantanida, *Mini-Rev Med Chem.* **10** (2010) 299-308.
57. R. Pearson, S. Zhang, G. He, N. Edwards, G. Chen, *Beilstein J Org Chem.* **9** (2013) 891-899.
58. M. Ghosh, A. Ahmed, S. Dhara, J. K. Ray, *Tetrahedron Lett.* **54** (2013) 4837-4840.
59. M. Tobisu, K. Koh, T. Furukawa, N. Chatani, *Angew Chem - Int Ed.* **51** (2012) 11363-11366.
60. L. S. Lerman, *J. Mol. Biol.* **3** (1961) 18-30.
61. C. Prunkl, M. Pichlmaier, R. Winter, V. Kharlanov, W. Rettig, H. A. Wagenknecht, *Chem - Eur J.* **16** (2010) 3392-3402.
62. T. Kubař, M. Hanus, F. Ryjáček, P. Hobza, *Chem - Eur J.* **12** (2006) 280-290.
63. S. C. Jain, H. M. Sobell, *J Biomol Struct Dyn.* **1** (1984) 1179-1194.
64. N. C. Garbett, N. B. Hammond, D. E. Graves, *Biophys J.* **87** (2004) 3974-3981.
65. J. Olmsted, D. R. Kearns, *Biochemistry* **16** (1977) 3647-3654.
66. N. W. Luedtke, Q. Liu, Y. Tor, *Bioorg Med Chem.* **11** (2003) 5235-5247.
67. N. W. Luedtke, Q. Liu, Y. Tor, *Chem - Eur J.* **11** (2005) 495-508.

68. D. Saftić, Ž. Ban, J. Matić, L.-M. Tumir, I. Piantanida, *Curr Med Chem.* **26** (2019) 5609-5624.
69. J. Matić, L.-M. Tumir, M. Radić Stojković, I. Piantanida, *Curr Protein Pept Sci.* **17** (2016) 127-134.
70. C. Bailly, R. K. Arafa, F. A. Tanious et al. *Biochemistry* **44** (2005) 1941-1952.
71. M. Radić Stojković, S. Miljanić, K. Mišković, L. Glavaš-Obrovac, I. Piantanida, *Mol Biosyst.* **7** (2011) 1753.
72. L. M. Tumir, I. Piantanida, I. Juranović Cindrić, T. Hrenar, Z. Meić, M. Žinić, *J Phys Org Chem.* **16** (2003) 891-899.
73. L. M. Tumir, I. Piantanida, P. Novak, M. Žinić, *J Phys Org Chem.* **15** (2002) 599-607.
74. I. Juranović, Z. Meić, I. Piantanida, L. M. Tumir, M. Žinić, *Chem Commun.* **2** (2002) 1432-1433.
75. L. M. Tumir, I. Piantanida, I. Juranović, Z. Meić, S. Tomić, M. Žinić, *Chem Commun.* **20** (2005) 2561-2563.
76. M. Dukši, D. Baretić, I. Piantanida, *Acta Chim Slov.* **59** (2012) 464-472.
77. M. Dukši, D. Baretić, V. Čaplar, I. Piantanida, *Eur J Med Chem.* **45** (2010) 2671-2676.
78. C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron* **61** (2005) 10827-10852.
79. A. K. Ghose, V. N. Viswanadhan, J. J. Wendoloski, *J Comb Chem.* **1** (1999) 55-68.
80. S. Barik, *Int J Mol Sci.* **21** (2020) 8776.
81. S. Khemaissa, S. Sagan, A. Walrant, *Crystals* **11** (2021) 1032.
82. I. Krošl, M. Koščak, K. Ribičić et al. *Int J Mol Sci.* **23** (2022) 7006.
83. C. M. Baker, G. H. Grant, *Biopolymers* **85** (2007) 456-470.
84. A. Rescifina, C. Zagni, M. G. Varrica, V. Pistarà, A. Corsaro, *Eur J Med Chem.* **74** (2014) 95-115.
85. L. Racané, M. Cindrić, I. Zlatar et al. *J Enzyme Inhib Med Chem.* **36** (2021) 163-174.
86. L. Racané, I. Zlatar, N. Perin et al. *Molecules.* **26** (2021) 4935.
87. L. Racané, L. Ptiček, M. Sedić et al. *Mol Divers.* **22** (2018) 723-741.
88. V. Rep Kaulić, L. Racané, M. Leventić et al. *Int J Mol Sci.* **23** (2022) 15843.
89. L. Racané, V. Rep, S. Kraljević Pavelić et al. *J Enzyme Inhib Med Chem.* **36** (2021) 1952-1967.
90. A. Kamal, M. A. H. Syed, S. M. Mohammed, *Expert Opin Ther Pat.* **25** (2015) 335-349.

91. L. Racané, S. K. Pavelić, R. Nhili et al. *Eur J Med Chem.* **63** (2013) 882-891.
92. A. Rouf, C. Tanyeli, *Eur J Med Chem.* **97** (2015) 911-927.
93. L. Racané, R. Stojković, V. Tralić-Kulenović et al. *Eur J Med Chem.* **86** (2014) 406-419.
94. L. Racané, V. Tralić-Kulenović, S. Kraljević Pavelić et al. *J Med Chem.* **53** (2010) 2418-2432.
95. I. Hutchinson, T. D. Bradshaw, C. S. Matthews, M. F. G. Stevens, A. D. Westwell, *Bioorg Med Chem Lett.* **13** (2003) 471-474.
96. L. Racané, S. Kraljević Pavelić, I. Ratkaj et al. *Eur J Med Chem.* **55** (2012) 108-116.
97. E. M. Lourie, W. Yorke, *Ann Trop Med Parasitol.* **33** (1939) 289-304.
98. H. King, E. M. Lourie, W. Yorke, *Ann Trop Med Parasitol.* **32** (1938) 177-192.
99. D. F. Shi, T. D. Bradshaw, S. Wrigley et al. *J Med Chem.* **39** (1996) 3375-3384.
100. C. G. Mortimer, G. Wells, J. P. Crochard et al. *J Med Chem.* **49** (2006) 179-185.
101. M. Cindrić, S. Jambon, A. Harej et al. *Eur J Med Chem.* **136** (2017) 468-479.
102. M. Hranjec, I. Piantanida, M. Kralj, L. Šuman, K. Pavelić, G. Karminski-Zamola, *J Med Chem.* **51** (2008) 4899-4910.
103. V. Lobo, A. Patil, A. Phatak, N. Chandra, *Pharmacogn Rev.* **4** (2010) 118.
104. B. M. Mistry, R. V. Patel, Y.S. Keum, D. H. Kim, *Bioorg Med Chem Lett.* **25** (2015) 5561-5565.
105. G. H. G. Williams *Trans R Soc Edinb.* Published online **21** (1856) 377.
106. A. Kurutos, I. Orehovec, D. Saftić et al. *Dyes Pigments.* **158** (2018) 517-525.
107. R. Nanjunda, E. A. Owens, L. Mickelson et al. *Bioorg Med Chem.* **20** (2012) 7002-7011.
108. F. Würthner, T. E. Kaiser, C. R. Saha-Möller, *Angew Chem Int Ed.* **50** (2011) 3376-3410.
109. B. A. Armitage, *Topics in Current Chemistry* **253** (2005) 55-76.
110. G. L. Silva, V. Ediz, D. Yaron, B. A. Armitage, *J Am Chem Soc.* **129** (2007) 5710-5718.
111. R. R. Gupta, L. Streckowski, eds. *Heterocyclic Polymethine Dyes: Synthesis, Properties and Applications.* Springer Berlin Heidelberg, 2008, str. 11-27.
112. A. Fürstenberg, M. D. Julliard, T. G. Deligeorgiev, N. I. Gadjev, A. A. Vasilev, E. Vauthey, *J Am Chem Soc.* **128** (2006) 7661-7669.
113. J. T. Petty, J. A. Bordelon, M. E. Robertson, *J Phys Chem B.* **104** (2000) 7221-7227.



114. I. Crnolatac, L.-M. Tumor, N. Y. Lesev et al. *ChemMedChem*. **8** (2013) 1093-1103.
115. A. Rožman, I. Crnolatac, T. Deligeorgiev, I. Piantanida, *J Lumin*. **205** (2019) 87-96.
116. S. Das, P. Purkayastha *ACS Omega*. **2** (2017) 5036-5043.
117. J. L. Bricks, Y. L. Slominskii, I. D. Panas, A. P. Demchenko *Methods Appl Fluoresc*. **6** (2017) 012001.
118. M. Wang, G. L. Silva, B. A. Armitage, *J Am Chem Soc*. **122** (2000) 9977-9986.
119. T. Šmidlehner, I. Piantanida, G. Pescitelli, *Beilstein J Org Chem*. **14** (2017) 84-105.
120. P. A. Ragazzon, N. C. Garbett, J. B. Chaires, *Methods* **42** (2007) 173-182.
121. J. B. Chaires, *Curr Protoc Nucleic Acid Chem*. John Wiley & sons, Inc., 2002, 8.3.1-8.3.8.
122. J. Ren, J. B. Chaires, *Methods Enzymol*. **340** (1999) 99-108.
123. J. B. Chaires, *Curr Med Chem - Anti-Cancer Agents*. **5** (2005) 339-352.
124. W. Muller, D. M. Crothers, *Eur J Biochem*. **54** (1975) 267-277.
125. J. B. Chaires, *Top Curr Chem*. **253** (2005) 33-53.
126. J. Ren, J. B. Chaires, *Methods in Enzymology* **340** (2001) 99-108.
127. J. L. Mergny, L. Lacroix, *Oligonucleotides* **13** (2003) 515-537.
128. W. D. Wilson, F. A. Tanious, M. Fernandez-Saiz, C. T. Rigl, *Drug-DNA Interaction Protocols*. Humana Press, Totowa NJ, 1997, 219-240.
129. D. M. Crothers, *Biopolymers* **6** (1968) 1391-1404.
130. X. Shi, J. B. Chaires, *Nucleic Acids Res*. **34** (2006) 1-7.
131. M. J. Waring, *Sequence-Specific DNA Binding Agents*, RSC Publishing, 2006, str. 131-148.
132. W. O. Foye, T. L. Lemke, D. A. Williams, *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2008, str. 191-196.
133. J. Ren, X. Qu, N. Dattagupta, J. B. Chaires, *J Am Chem Soc*. **123** (2001) 6742-6743.
134. T. M. Raschke, J. Kho, S. Marqusee, *Nat Struct Biol*. **6** (1999) 825-831.
135. J. Cymerman, W. F. Short, *J Chem Soc*. **0** (1949) 703-707.
136. L. P. Walls, *J Chem Soc* **0** (1947) 67-74.
137. O. Keller, W. E. Keller, G. van Look, G. Wersin, *Org Synth*. **63** (1985) 160.

138. V. Dourtoglou, B. Gross, V. Lambropoulou, C. Zioudrou, *Synthesis* **7** (1984) 572-574.
139. I. Zonjić, L. M. Tumir, I. Crnolatac et al. *Biomolecules*. **12** (2022) 374.
140. I. Zonjić, A. Kurutos, P. Mihovilović et al. *Dyes Pigments* **207** (2022) 110715.
141. J. B. Chaires, N. Dattagupta, D. M. Crothers *Biochemistry* **21** (1982) 3933-3940.
142. J. L. Bresloff, D. M. Crothers, *Biochemistry* **20** (1981) 3547-3553.
143. T. V. Chalikian, J. Völker, G. E. Plum, K. J. Breslauer *Proc Natl Acad Sci*. **96** (1999) 7853-7858.
144. J. D. Mcghee, P. H. von Hippel, *J. Mol. Biol.* **86** (1974) 469-489.
145. G. Scatchard, *Ann N Acad Sci*. **51** (1949) 660-672.
146. Origin, 2001. Origin 7.0. OriginLab Corp., Northampton, MA., USA.
147. Origin, 2003. Origin 7.5. OriginLab Corp., Northampton, MA., USA.
148. G. Mickisch, S. Fajta, G. Keilhauer, E. Schlick, R. Tschada, P. Alken, *Urol Res*. **18** (1990) 131-136.
149. J. W. Lown, B. C. Gunn, K. C. Majumdar, E. McGoran, *Can J Chem*. **57** (1979) 2305-2313.
150. Z. Wang, *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*, John Wiley & Sons, 2009, str. 1971-1973.
151. E. Valeur, M. Bradley, *Chem Soc Rev*. **38** (2009) 606-631.
152. L. A. Carpino, H. Imazumi, A. El-Faham et al. *Angew Chem Int Ed*. **41** (2002) 441-445.
153. M. Koščak, I. Krošl, B. Žinić, I. Piantanida, *Chemosensors* **10** (2022) 34.
154. R. L. Jones, W. D. Wilson, *Biopolymers*. **20** (1981) 141-154.
155. N. Berova, P. L. Polavarapu, K. Nakanishi, R. W. Woody, *Comprehensive Chiroptical Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Inc., 2012, str. 65-70.
156. M. Eriksson, B. Nordén. *Methods Enzymol*. **340** (2001) 68-98.
157. N. Berova, L. Di Bari, G. Pescitelli, *Chem Soc Rev*. **36** (2007) 914-931.
158. E. Chacon, D. Acosta, J. Lemasters, *In Vitro Methods in Pharmaceutical Research*, (1997) 209-223.
159. <https://www.edinst.com/quantum-yield-measurements/> (preuzeto 12. svibnja 2023.).
160. J. Chaires *Curr Med Chem-Anti-Cancer Agents* **5** (2005) 339-352.
161. P. Ragazzon, J. B. Chaires, *Methods* **43** (2007) 313-323.

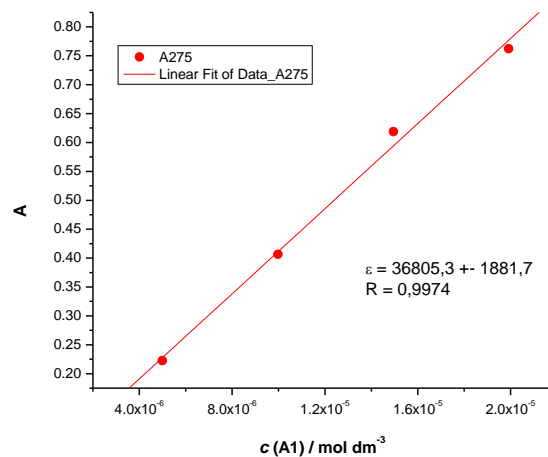
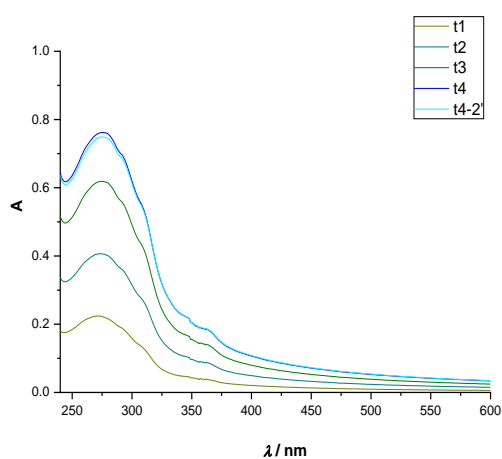
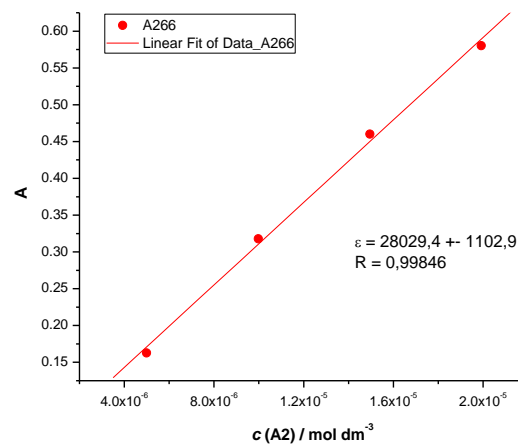
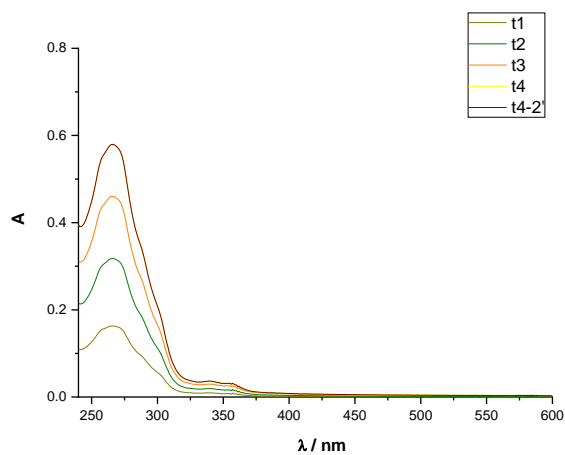
162. R. T. Wheelhouse, N. C. Garbett, N. J. Buurma, J. B. Chaires, *Angew Chem Int Ed.* **49** (2010) 3207-3210.
163. A. K. Bronowska, *Thermodynamics - Interaction Studies - Solids, Liquids and Gases.* InTech, 2011.
164. J. B. Chaires. *Arch Biochem Biophys.* **453** (2006) 26-31.
165. B. H. Choi, G. Y. Yeo, J. Jung, B. W. Lee, S. W. Han, T. S. Cho, *Bull. Korean Chem. Soc.* **30** (2011) 2691.
166. D. P. Arya, R. L. Coffee, B. Willis, A. I. Abramovitch, *J Am Chem Soc.* **123** (2001) 5385-5395.
167. C. R. Canthor, P. R. Schimmel, *Biophysical chemistry*, W. H. Freeman & co., San Francisco, 1980, str. 176-186.
168. O.Y. Fedoroff, M. Salazar, B R. Reid, *Mol Biol.* **233** (1993) 509-523.
169. I. Radhakrishnan, D. J. Patel, *Structure*, **1** (1993) 135-152.
170. G. Raghunathan, H. Todd Miles, V. Sasisekharan, *Biochemistry* **32** (1993) 455-462.
171. M. Esguerra, L. Nilsson, A. Villa, *Nucleic Acids Res.* **42** (2014) 11329-11338.
172. M. Radić Stojković, J. Gonzalez-Garcia, F. Šupljika, et al. *Int J Biol Macromol.* **109** (2018) 143-151.
173. J. Wang, W. Wang, P. A. Kollman, D. A. Case, *J Mol Graph Model.* **25** (2006) 247-260.
174. D. Case, R. Betz, D.S. Cerutti, T. Cheatham, T. Darden, R. Duke et al. Amber 16. In: *Amber 16.* University of California: San Francisco, CA, USA, 2016.
175. M. Zgarbová, J. Šponer, M. Otyepka, T. E. Cheatham, R. Galindo-Murillo, P. Jurečka, *J Chem Theory Comput.* **11** (2015) 5723-5736.
176. J. Wang, R. M. Wolf, J.W. Caldwell, P.A. Kollman, D.A. Case, *J Comput Chem.* **25** (2004) 1157-1174.
177. I. Ivani, P. D. Dans, A. Noy et al., *Nat Methods* **13** (2016) 55-58.
178. A. Ray, S. G. Kumar, S. Das, M. Maiti, *Biochemistry* **38** (1999) 6239-6247.
179. D. P. Arya, R. L. Coffee, I. Charles, *J Am Chem Soc.* **123** (2001) 11093-11094.
180. J. Ren, J.B. Chaires, *J Am Chem Soc.* **122** (2000) 424-425.
181. A. Granzhan, H. Ihmels, *ChemBioChem.* **7** (2006) 1031-1033.
182. R. Sinha, G. S. Kumar, *J Phys Chem B.* **113** (2009) 13410-13420.
183. S. M. Yarmoluk, S. S. Lukashov, T. Yu Ogul'Chansky, M. Yu Losytskyy, O. S. Korniyushyna, *Biopolymers* **62** (2001) 219-227.

184. W. D. Wilson, Y. H. Wang, C. R. Krishnamoorthy, J. C. Smith, *Biochemistry* **24** (1985) 3991-3999.
185. O. Suss, L. Motiei, D. Margulies, *Molecules* **26** (2021) 2828.
186. K. W. Dunn, M. M. Kamocka, J. H. McDonald, *Am J Physiol-Cell Physiol.* **300** (2011) C723-C742.
187. J. Adler, S. N. Pagakis, I. Parmryd, *J Microsc.* **230** (2008) 121-133.
188. A. S. Tatikolov, *J Photochem Photobiol C Photochem Rev.* **13** (2012) 55-90.

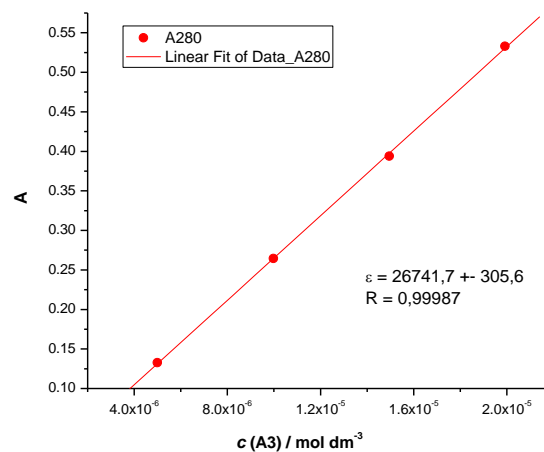
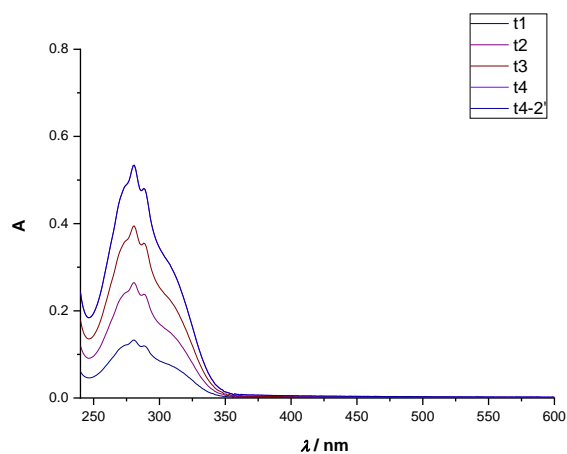
## § 8. DODATAK

### 8.1. Dodatak – Fenantridinski derivati

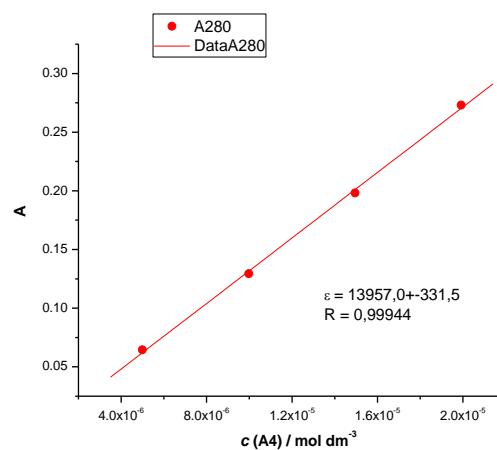
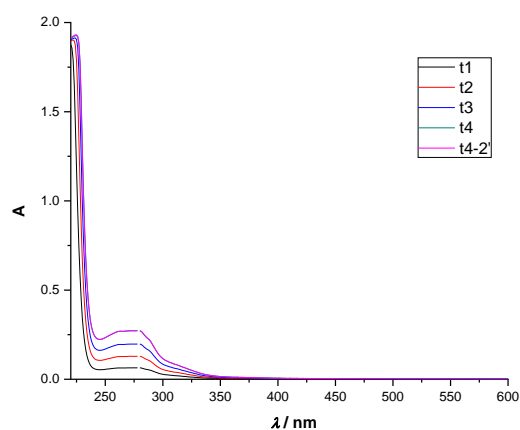
#### 8.1.1. Dodatak poglavlju 4.1.2.

**A1****A2**

## A3

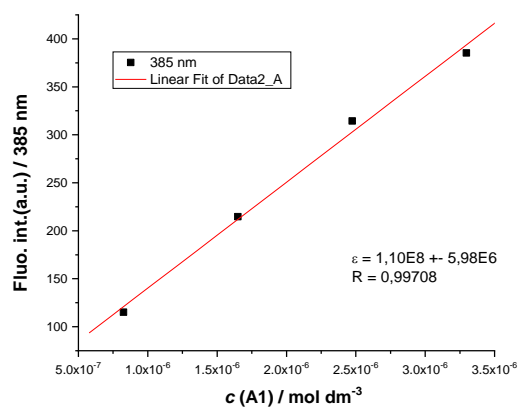
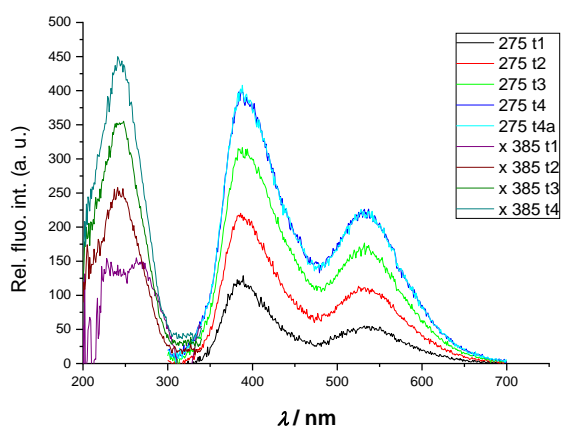


## A4

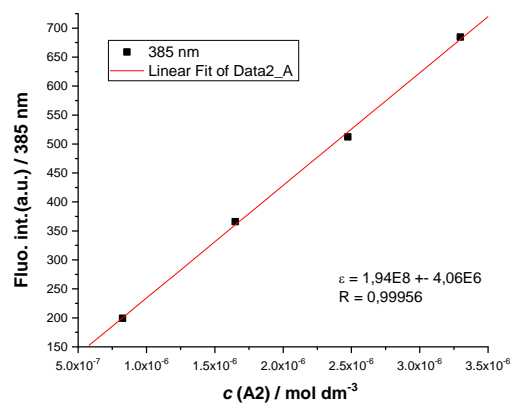
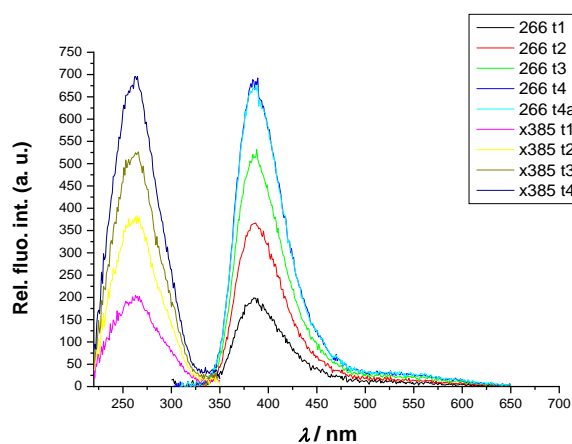


Slika D.8.1. Lijevo: promjene u UV/Vis spektrima četiri fenantridinska derivata pri različitim koncentracijama (raspon koncentracija:  $5 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); desno: linearna ovisnost (—) maksimuma apsorbancije (■) o koncentraciji liganada (pH = 7,0; natrijev kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).

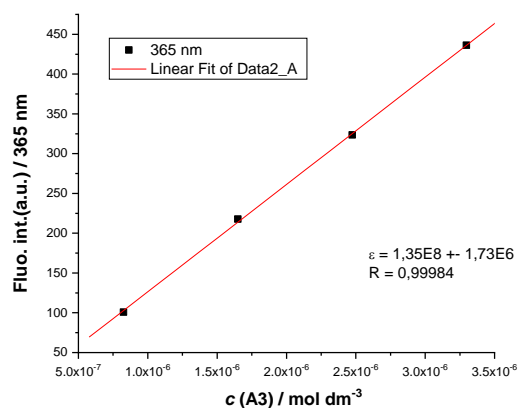
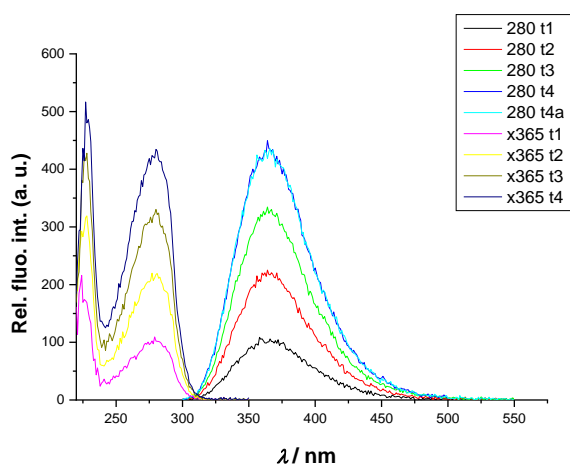
A1



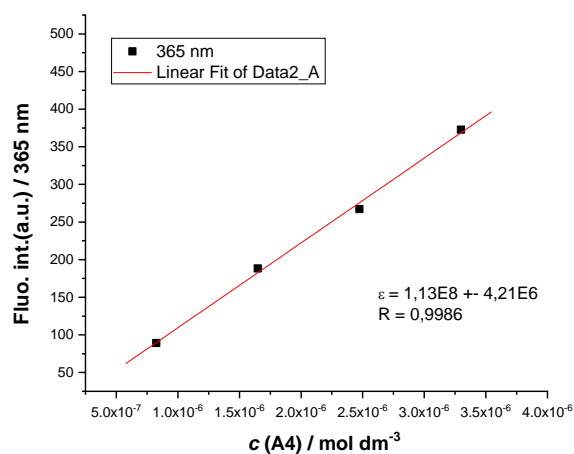
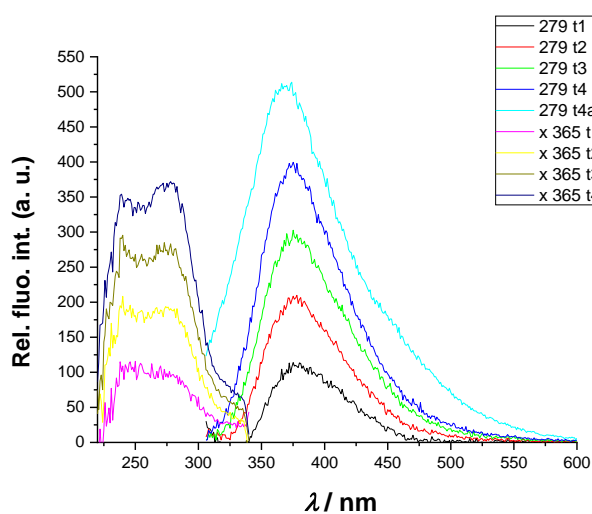
A2



## A3

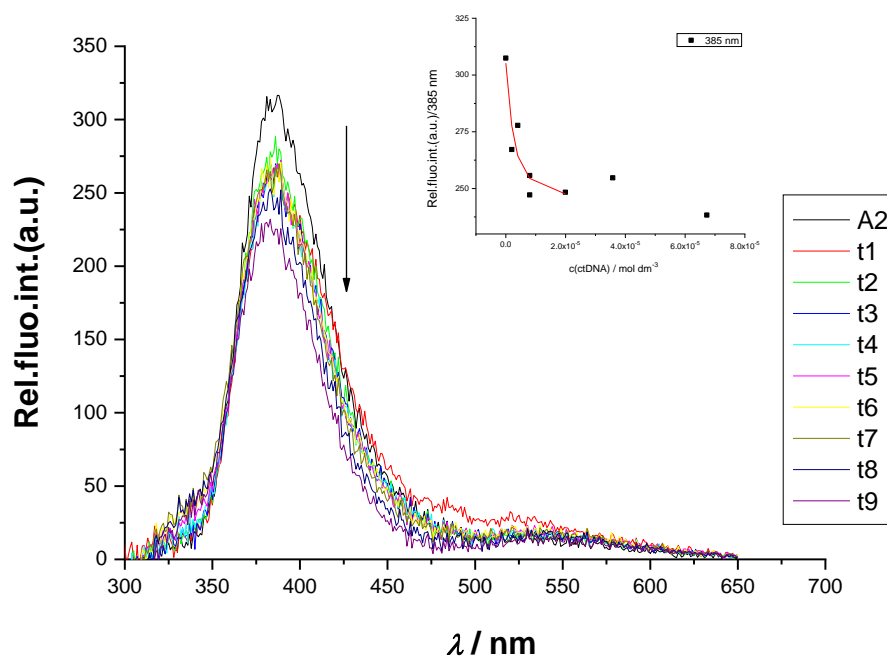


## A4

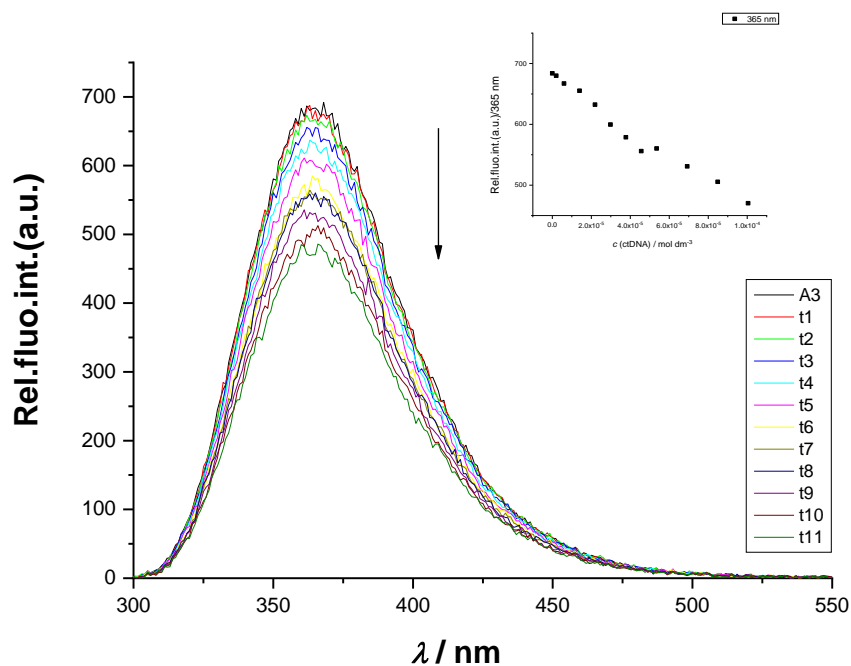


Slika D.8.2. Lijevo: promjene u spektrima emisije i eksitacije sva četiri fenantridinska derivata pri različitim koncentracijama i odgovarajućoj eksitaciji (raspon koncentracija:  $5 \times 10^{-7} - 2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ); desno: linearna ovisnost (—) maksimuma emisije (■) o koncentraciji liganada (pH = 7,0; natrijev kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).

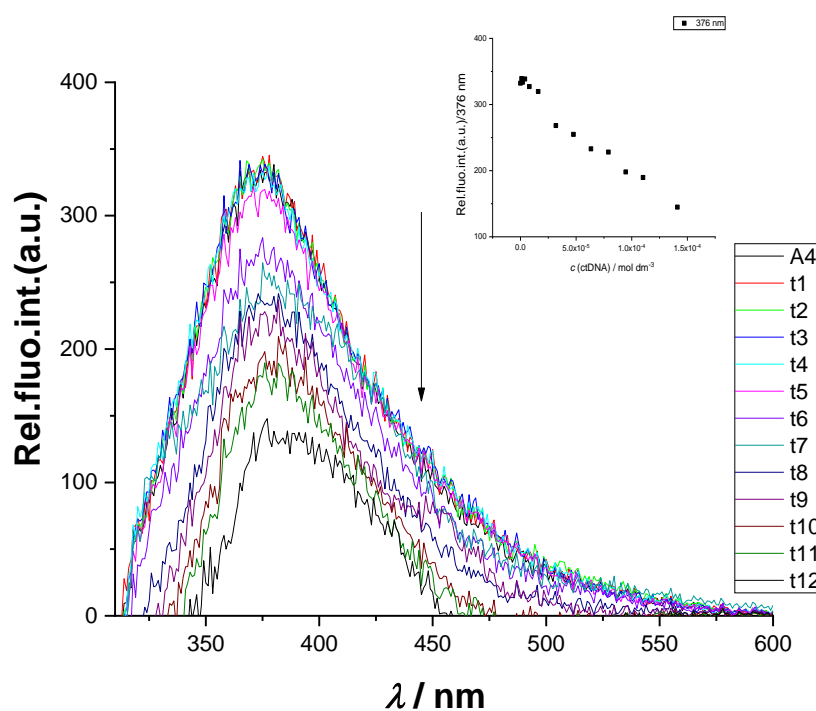




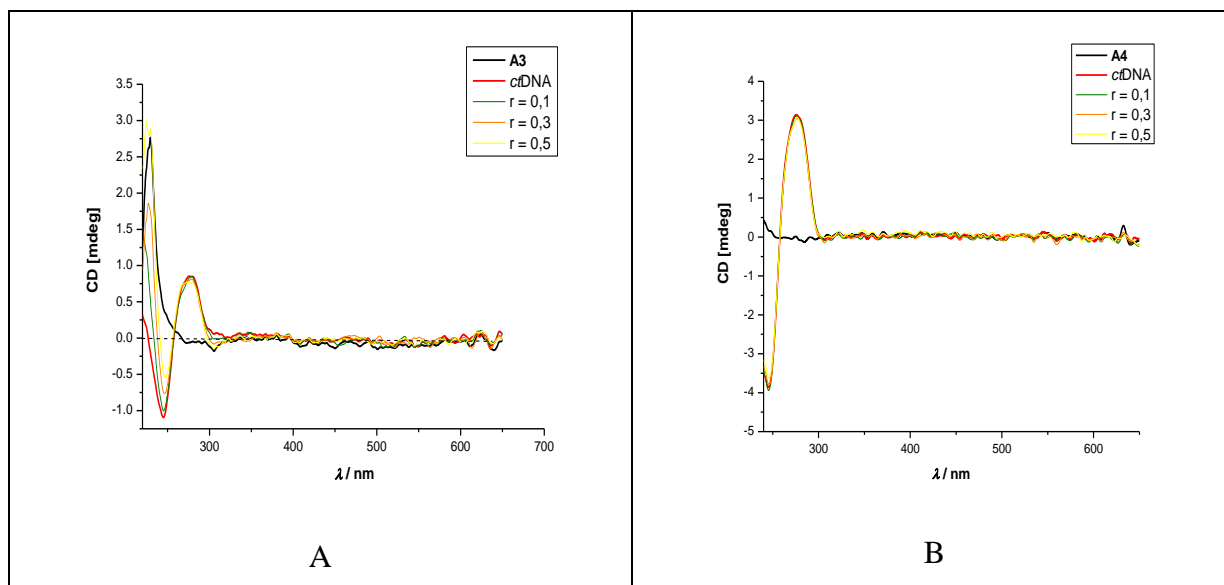
Slika D.8.3. Promjene u fluorescencijskom spektru liganda **A2** ( $c = 1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 266 \text{ nm}$ ) prilikom titracije sa strukturom *ctDNA* ( $c = 1,9 \times 10^{-6} - 9,8 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); umetnuta slika: ovisnost apsorbancije liganda **A2** pri  $\lambda_{\text{max}} = 385 \text{ nm}$  o  $c(\text{ctDNA})$ , pH = 7,0; natrijev kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ .



Slika D.8.4. Promjene u fluorescencijskom spektru liganda **A3** ( $c = 1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ ) prilikom titracije sa strukturom *ctDNA* ( $c = 1,9 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ); umetnuta slika: ovisnost apsorbancije liganda **A3** pri  $\lambda_{\text{max}} = 365 \text{ nm}$  o  $c(\text{ctDNA})$ , pH = 7,0; natrijev kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ .



Slika D.8.5. Promjene u fluorescencijskom spektru liganda **A4** ( $c = 1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 279 \text{ nm}$ ) prilikom titracije sa strukturom *ctDNA* ( $c = 9,9 \times 10^{-7} - 1,4 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ); umetnuta slika: ovisnost apsorbancije liganda **A4** pri  $\lambda_{\text{max}} = 376 \text{ nm}$  o  $c(\text{ctDNA})$ , pH = 7,0; natrijev kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ .

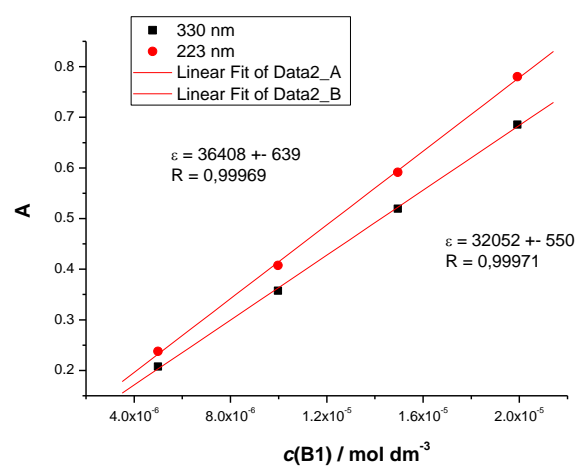
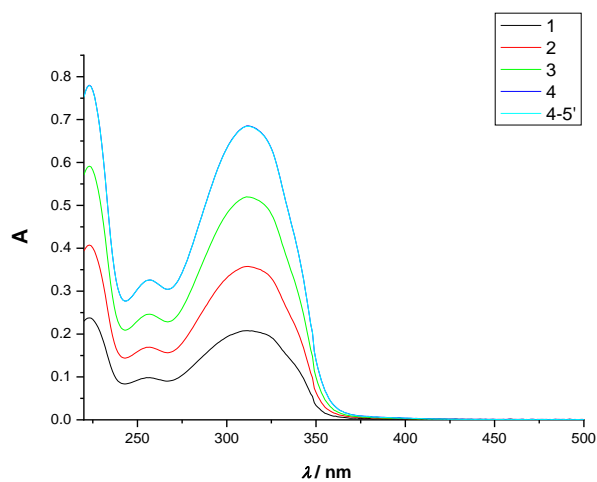


Slika D.8.6. CD titracija *ctDNA* s ligandom **A3** (A) i **A4** (B) u molarnim omjerima,  $r =$  [ligand]/[polinukleotid] pri pH = 7,0; natrijev kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ .

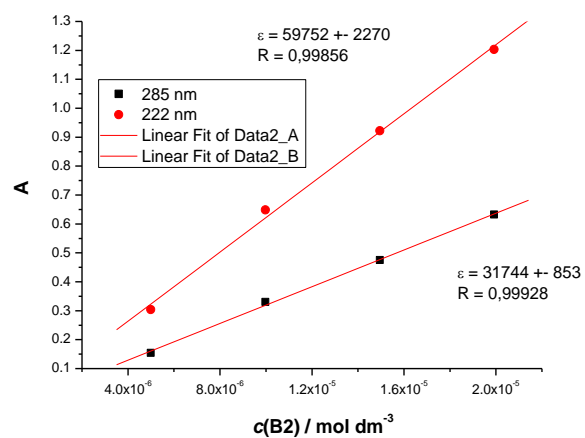
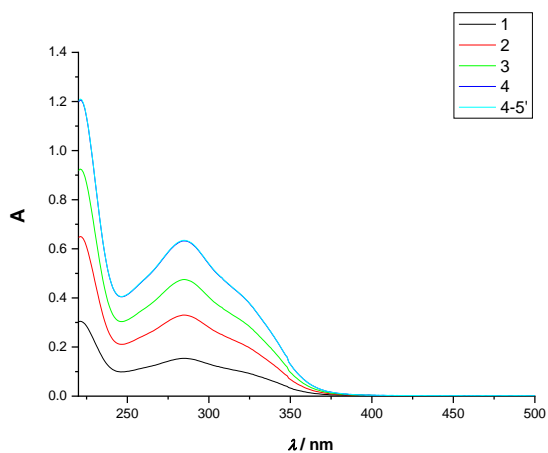
## 8.2. Dodatak – Benzotiazolni derivati

### 8.2.1. Dodatak poglavlju 4.2.1.

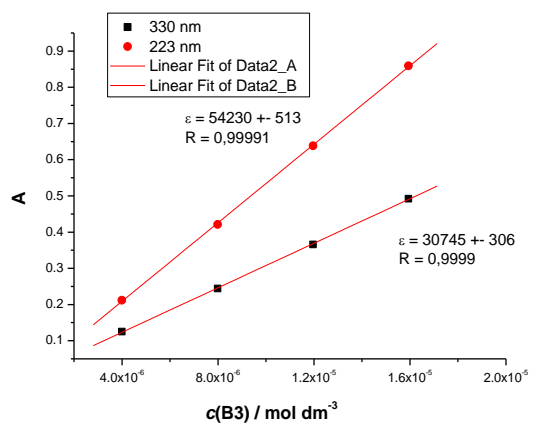
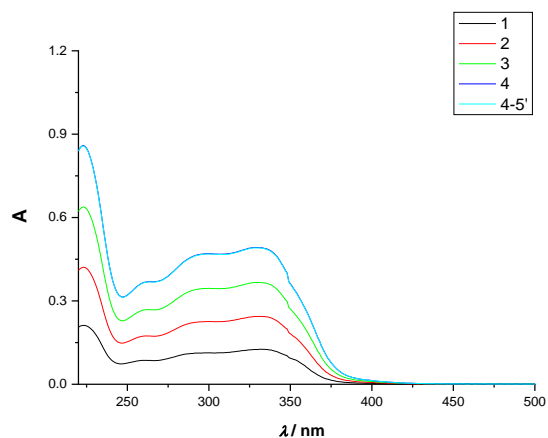
#### B1



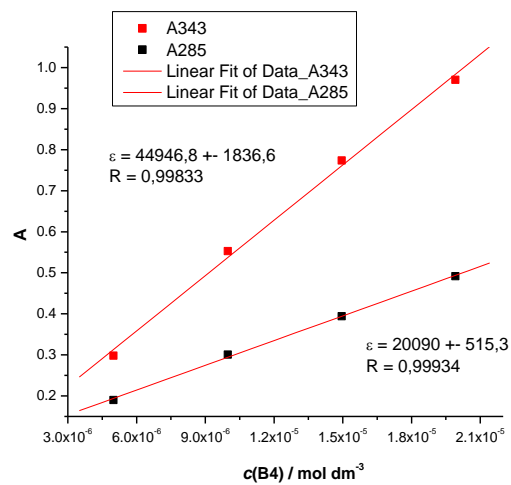
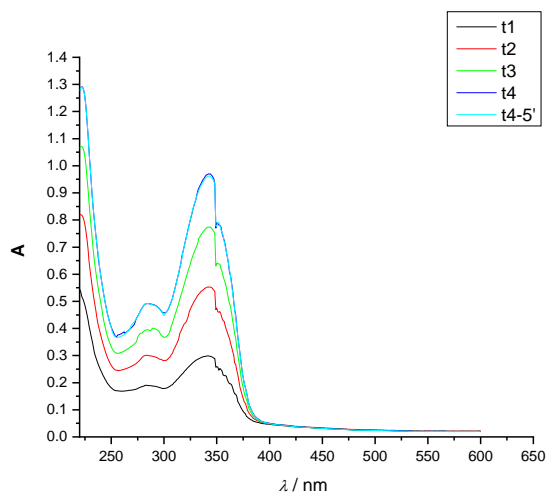
## B2



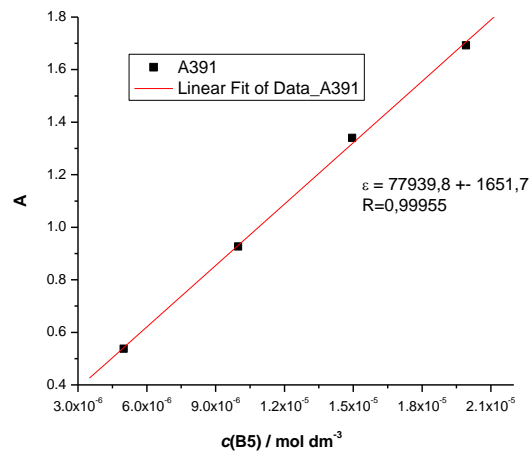
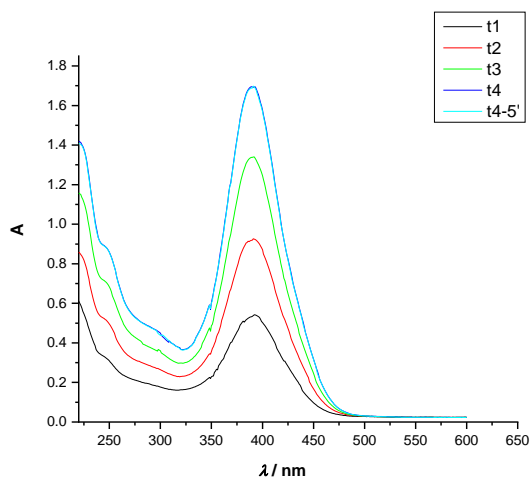
## B3



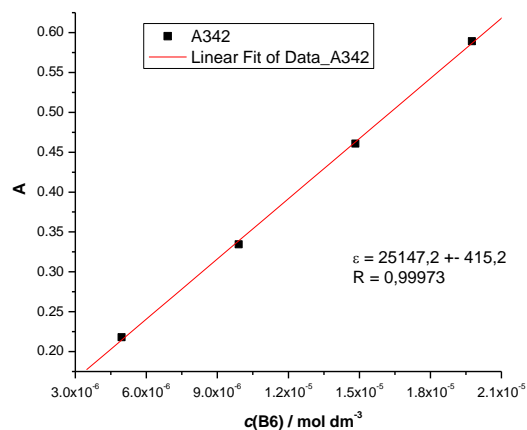
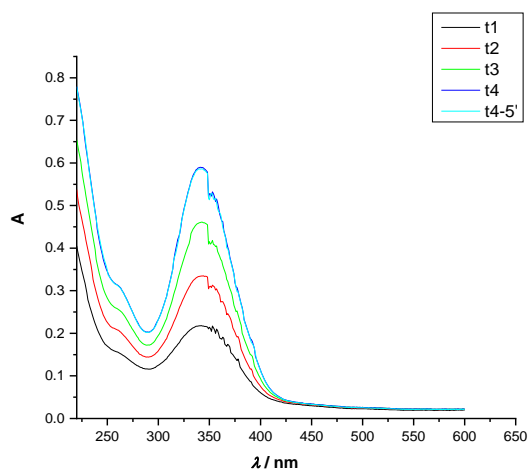
**B4**



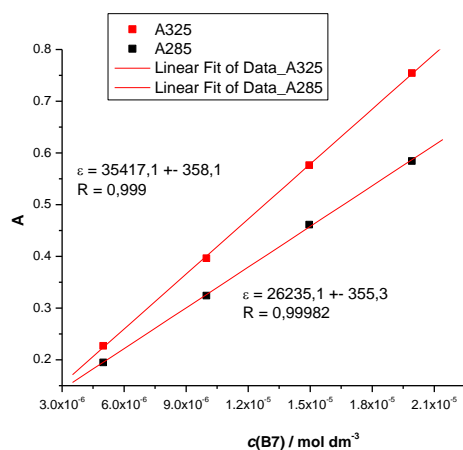
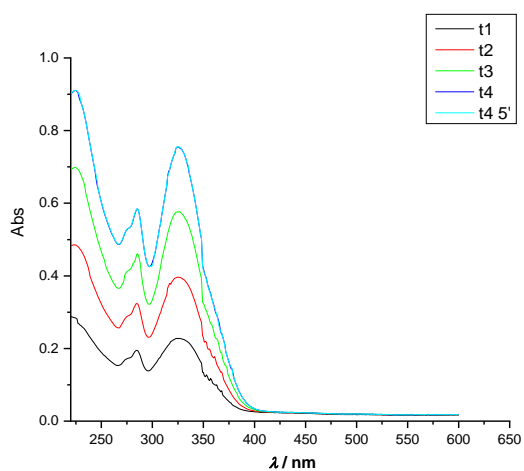
**B5**



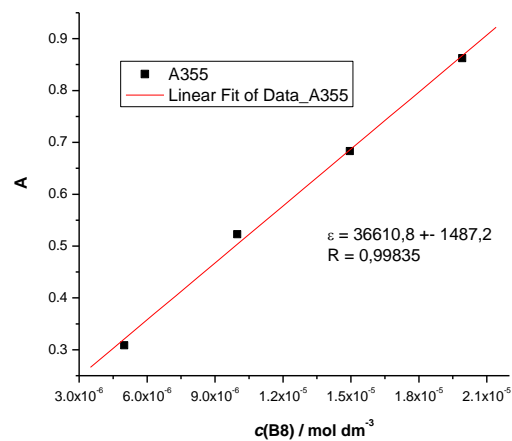
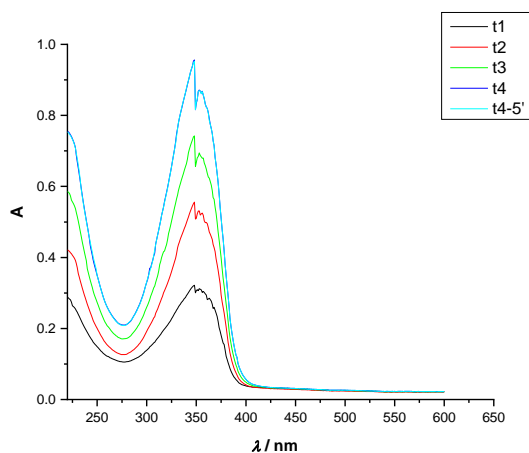
**B6**



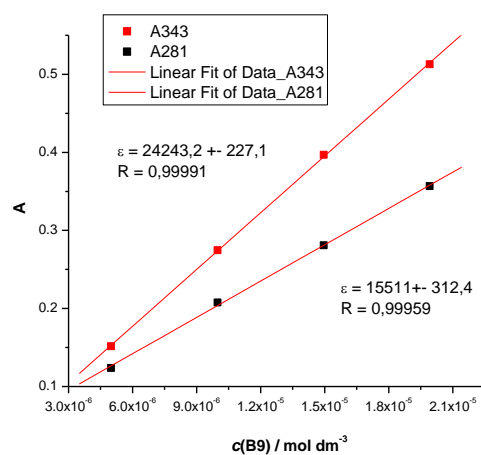
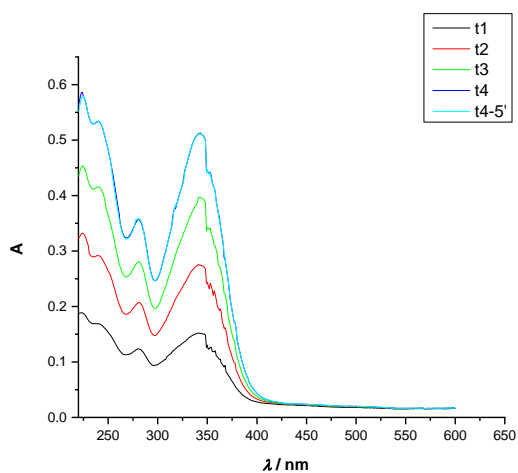
**B7**



## B8

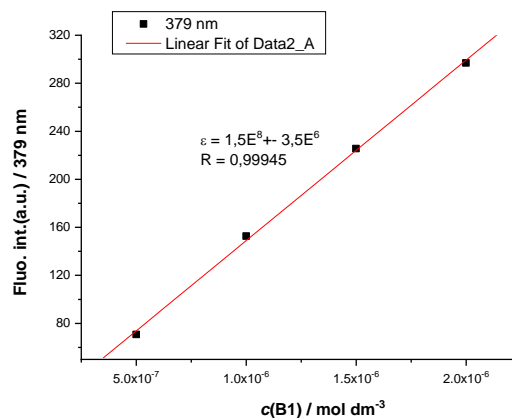
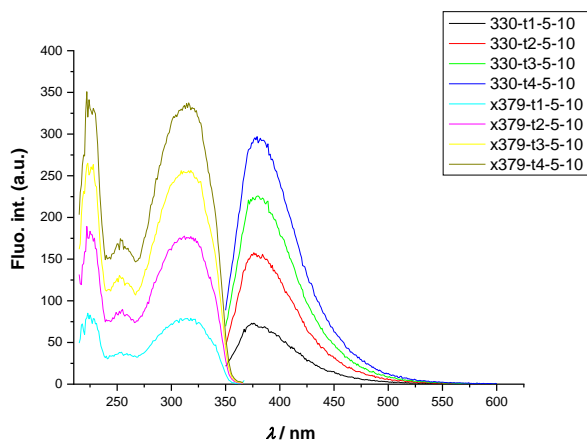


## B9

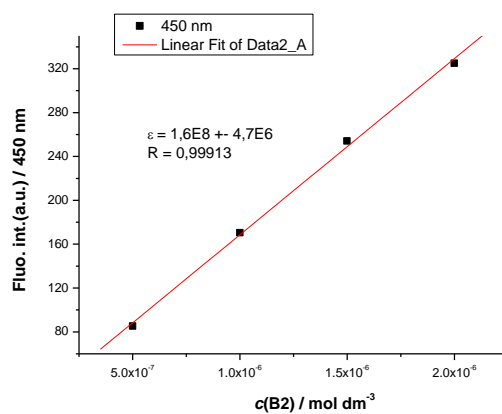
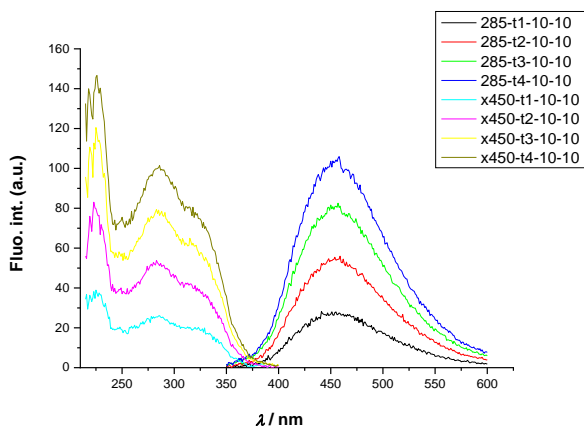


Slika D.8.7. Lijevo: promjene u UV/Vis spektrima svih devet benzotiazolnih derivata pri različitim koncentracijama (raspon koncentracija:  $5 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); desno: linearna ovisnost (—) maksimuma apsorbancije (■) o koncentraciji liganada (pH = 7,0; natrijev kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).

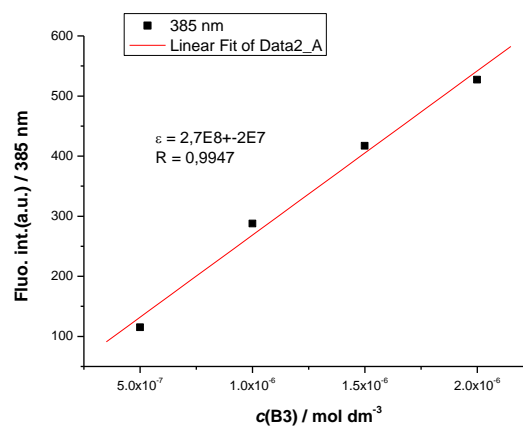
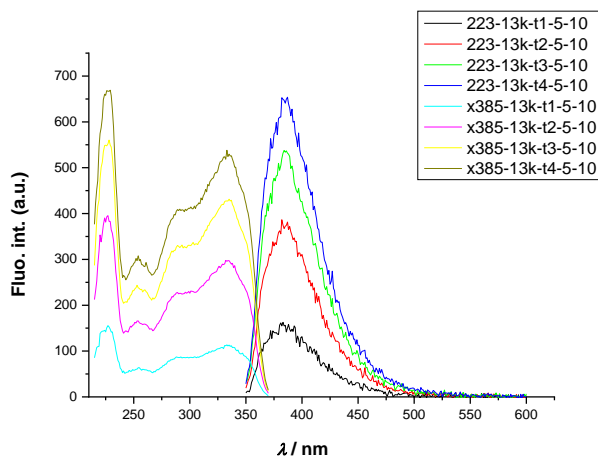
**B1**



**B2**

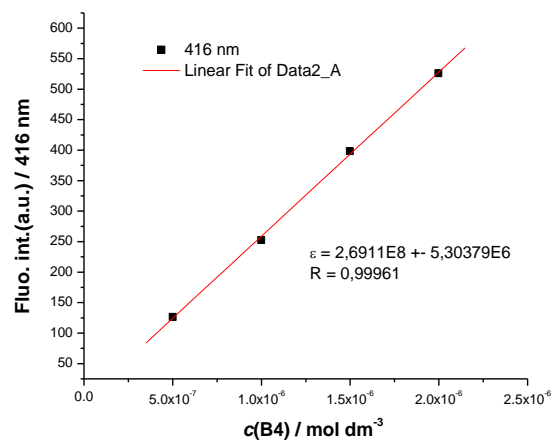
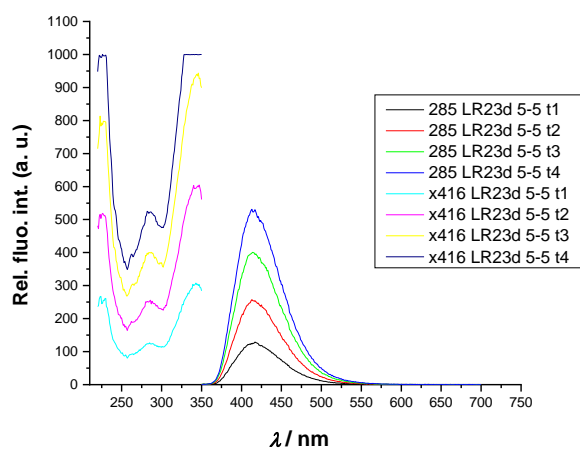


**B3**

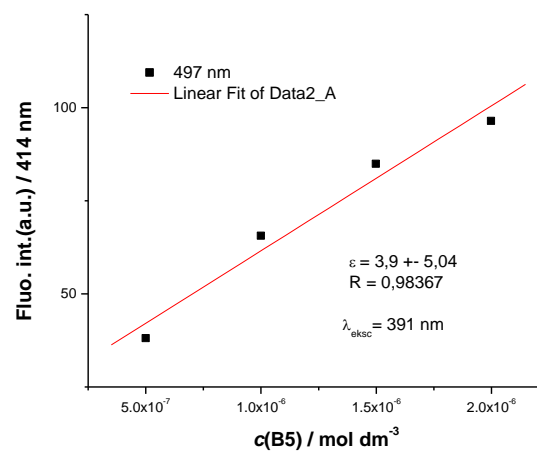
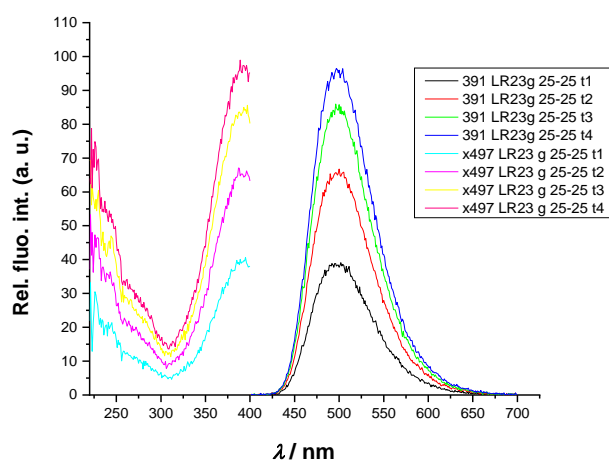




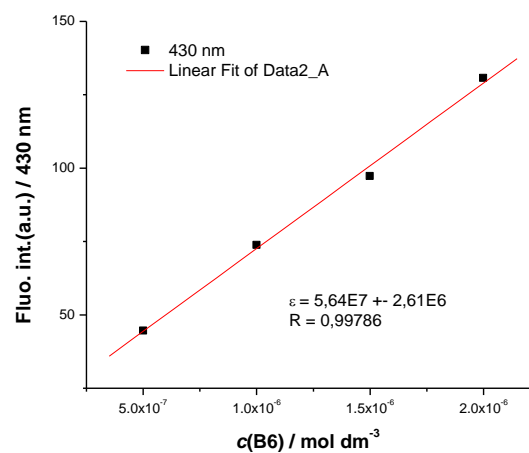
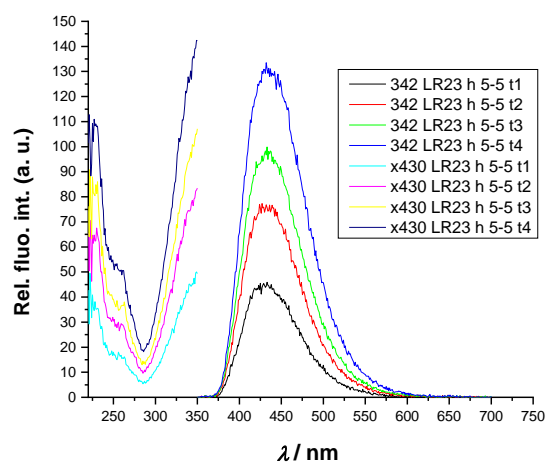
**B4**



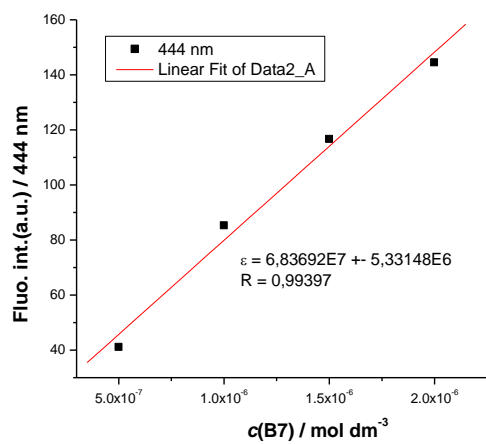
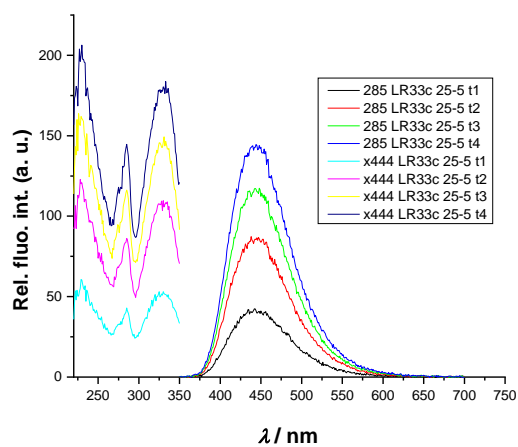
**B5**



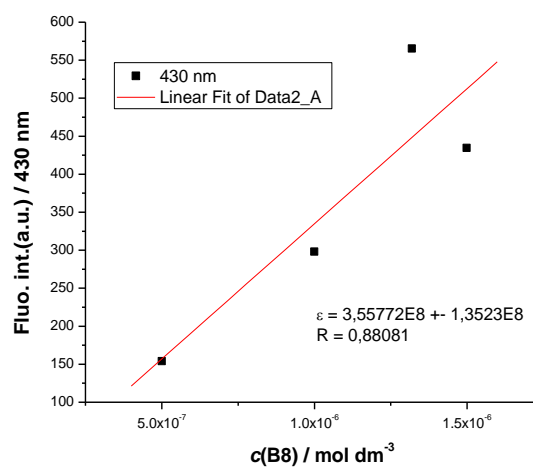
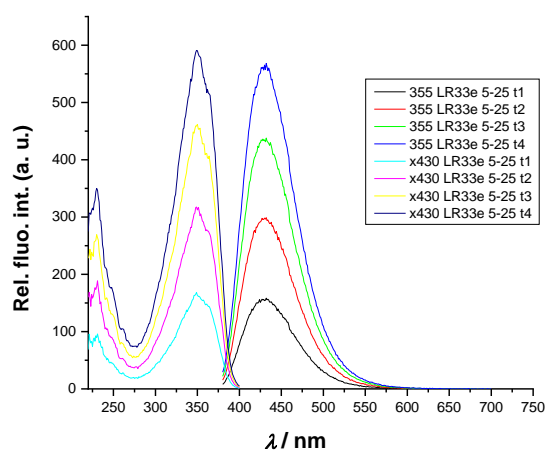
## B6



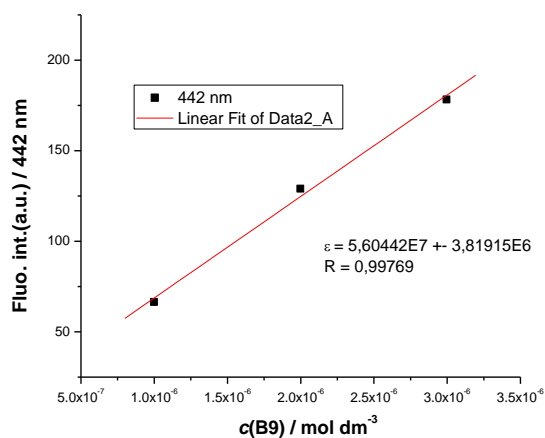
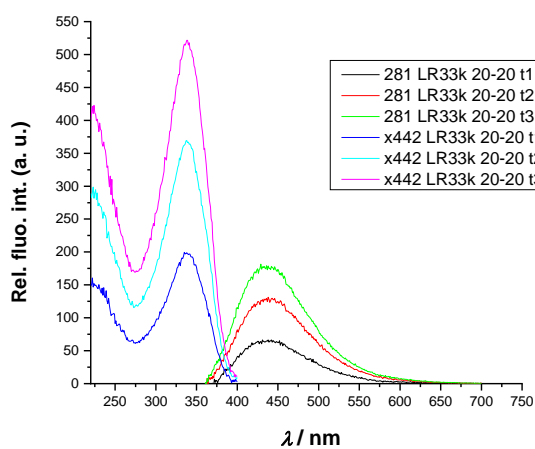
## B7



## B8

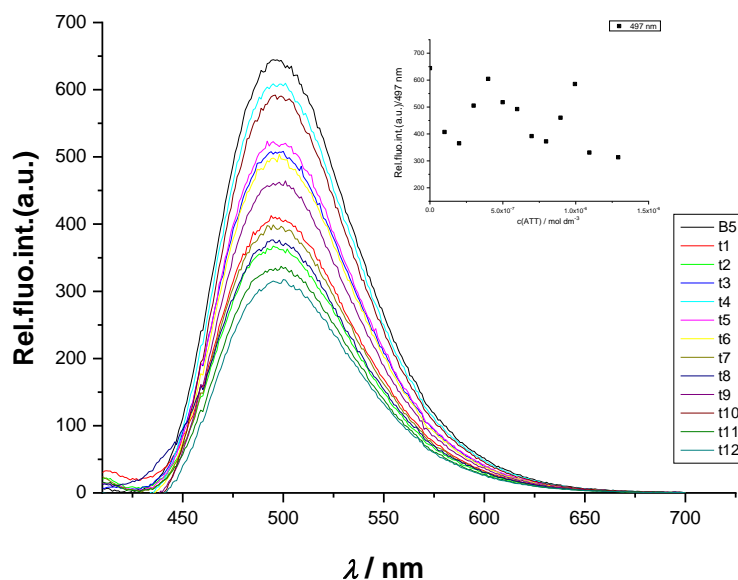


## B9

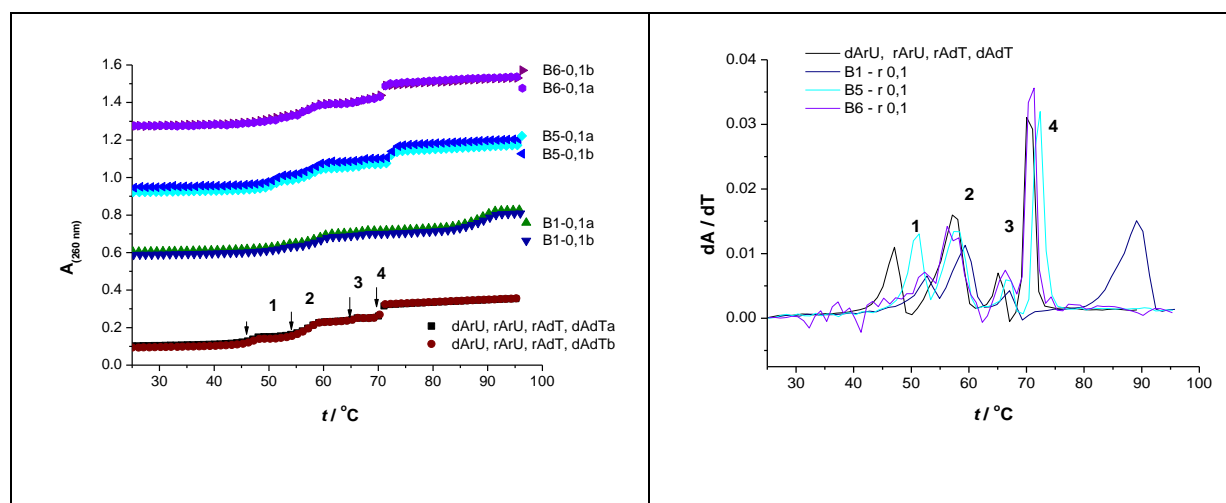


Slika D.8.8. Lijevo: promjene spektra emisije i ekscitacije svih devet benzotiazolnih derivata pri različitim koncentracijama i odgovarajućoj ekscitaciji (raspon koncentracija:  $5 \times 10^{-7} - 2 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>); desno: linearna ovisnost (—) maksimuma emisije (■) o koncentraciji liganada (pH = 7,0; natrijev kakodilatni pufer,  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>).

## 8.2.2. Dodatak poglavlju 4.2.2.

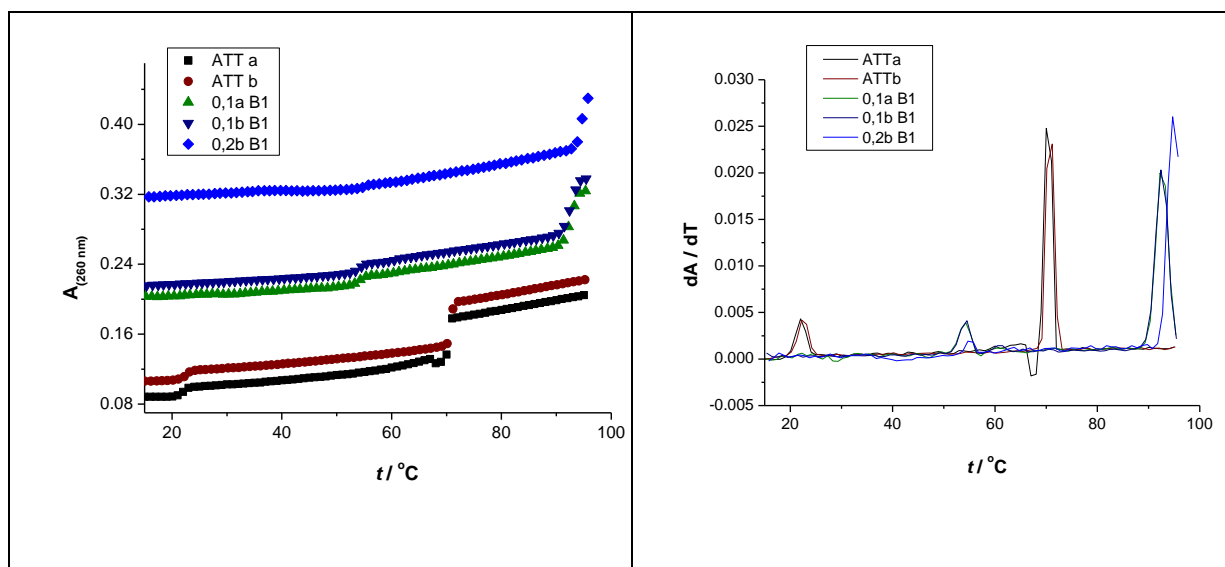


Slika D.8.9. Promjene u fluorescencijskom spektru liganda **B5** ( $c = 2 \times 10^{-7}$  mol dm $^{-3}$ ,  $\lambda_{exc} = 390$  nm) prilikom titracije s trolančanom strukturom – dAdTdT ( $c = 9,9 \times 10^{-8} - 1,3 \times 10^{-6}$  mol dm $^{-3}$ ); umetnuta slika: ovisnost apsorbancije liganda **B5** pri  $\lambda_{max} = 497$  nm o  $c$  (dAdTdT), pH = 7,0; natrijev kakodilatni pufer,  $I = 0,05$  mol dm $^{-3}$ .

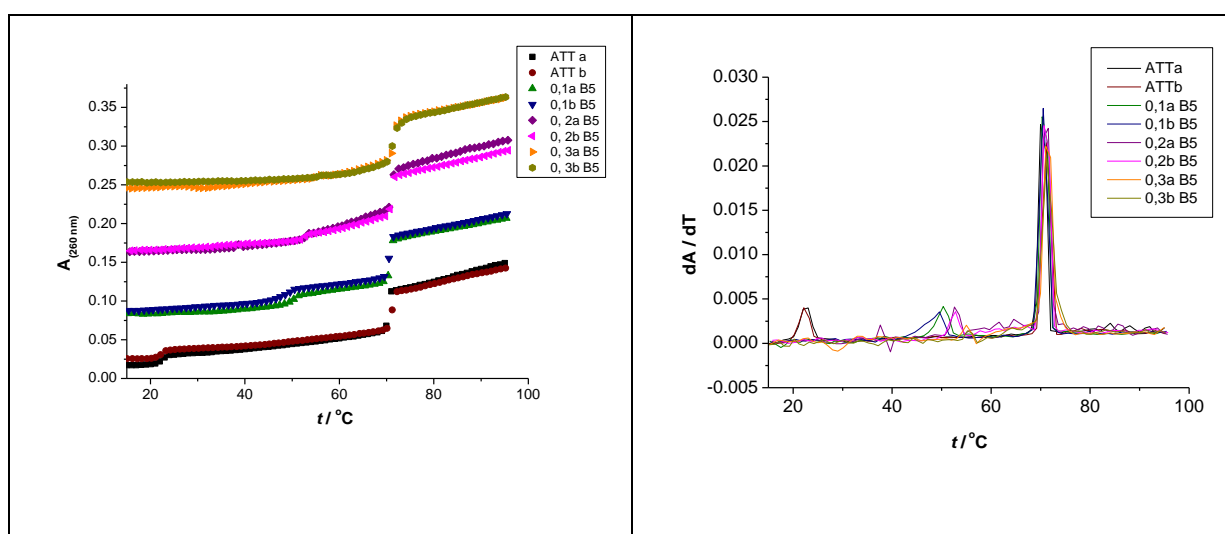


Slika D.8.10. Lijevo: prošireni eksperiment temperaturnog mekšanja četiri različita polinukleotida ( $0,05$  mol dm $^{-3}$  pufer natrijevog kakodilata s  $0,05$  mol dm $^{-3}$  NaCl i  $1 \times 10^{-3}$  mol dm $^{-3}$  EDTA); DNA:RNA hibrid [poli dA-poli rU; **1**], RNA [poli rA-poli rU; **2**],

RNA:DNA hibrid [poli rA-poli dT; **3**] i DNA [poli dA-poli dT; **4**]; koncentracija svake strukture polinukleotida je  $2 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> (parova baza), a ukupna koncentracija polinukleotida je  $8 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> (parova baza). Prikazan je učinak dodavanja liganda **B1**, **B5** i **B6** ( $2 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>) u smjesu polinukleotida, u omjeru,  $r$  ([spoj]/[polinukleotid]) = 0,1. Desno: prva derivacija apsorbancije (260 nm) u ovisnosti o temperaturi.

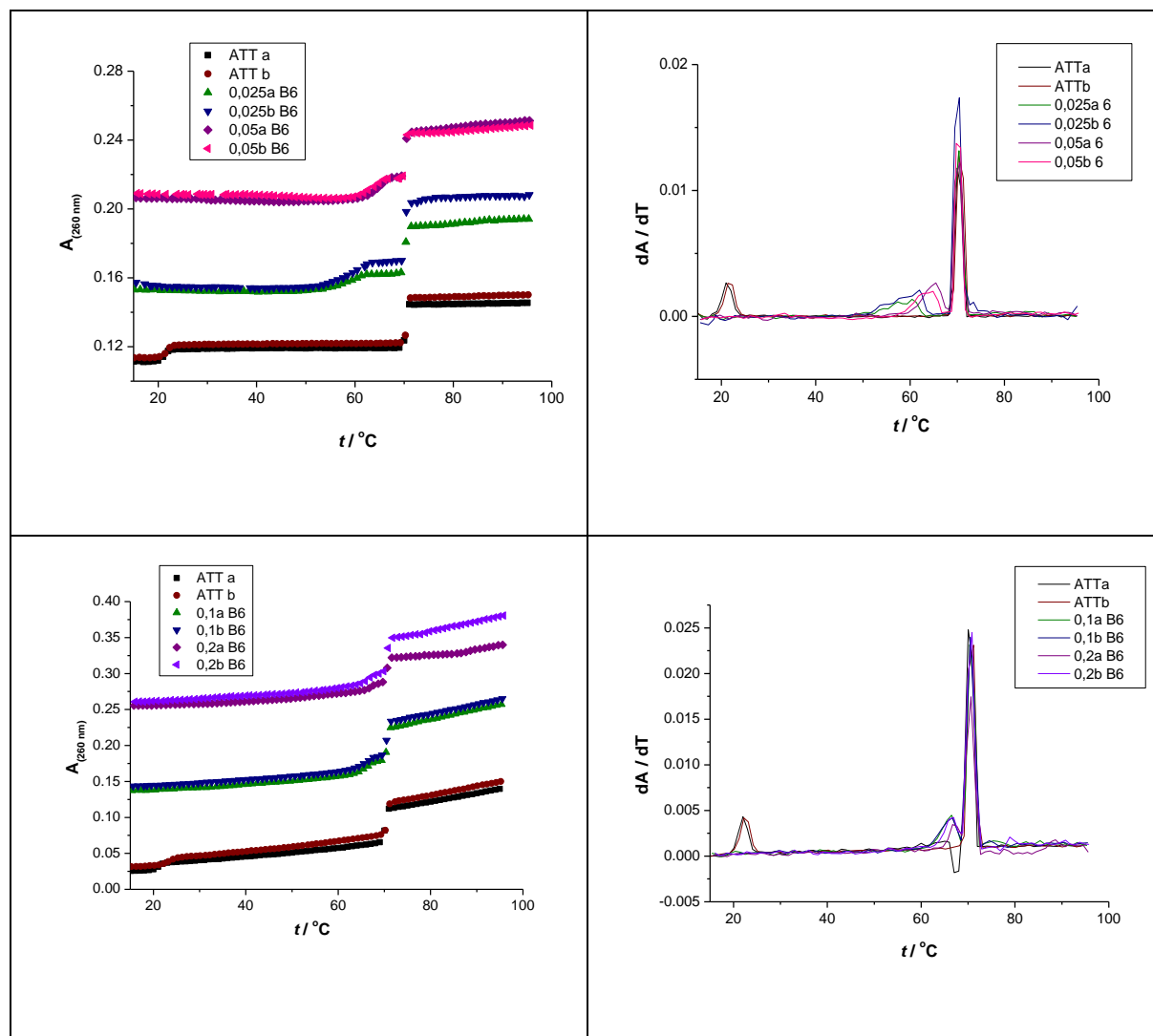


Slika D.8.11. Lijevo: krivulja temperaturnog mekšanja trolančane strukture dAdTdT nakon dodavanja liganda **B1** u omjeru,  $r$  ([spoj]/[polinukleotid]) = 0,1 pri pH = 7,0 (pufer natrijevog kakodilata s dodatkom  $1 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup> EDTA,  $I = 0,1$  mol dm<sup>-3</sup>); Desno: prva derivacija apsorbancije (260 nm) u ovisnosti o temperaturi.

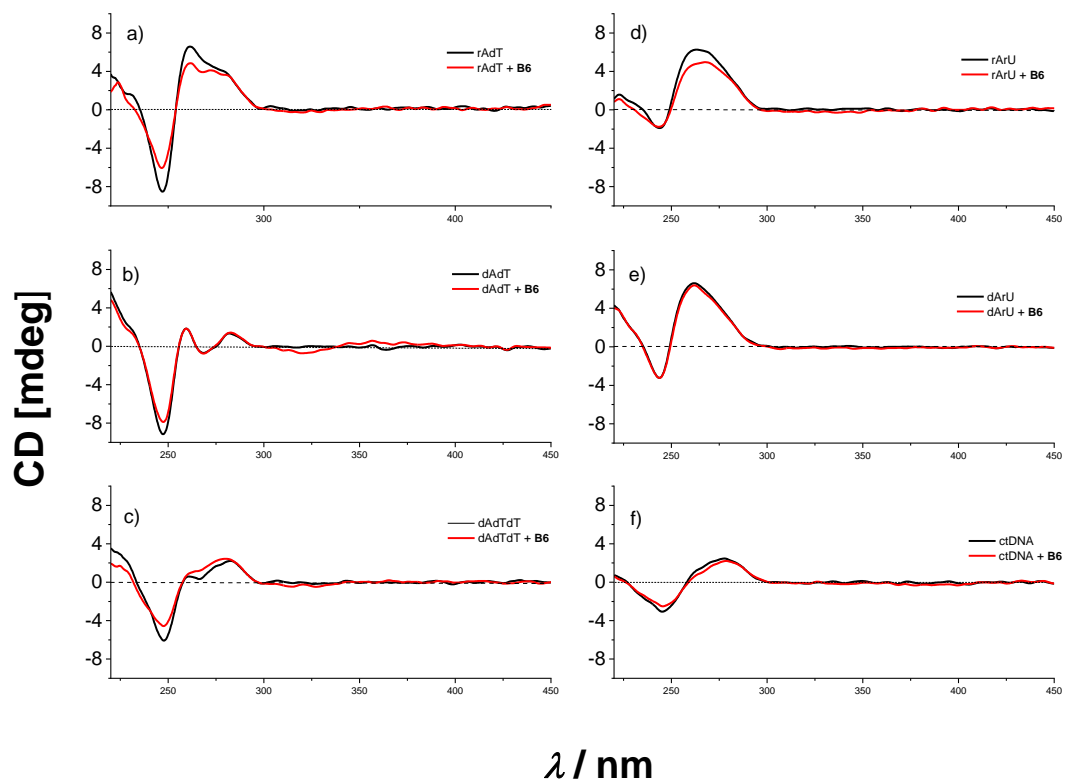


Slika D.8.12. Lijevo: Krivulja temperaturnog mekšanja trolančane strukture dAdTdT nakon dodavanja liganda **B5** u omjeru,  $r$  ([spoj]/[polinukleotid]) = 0,1; 0,2; 0,3 pri pH = 7,0 (pufer

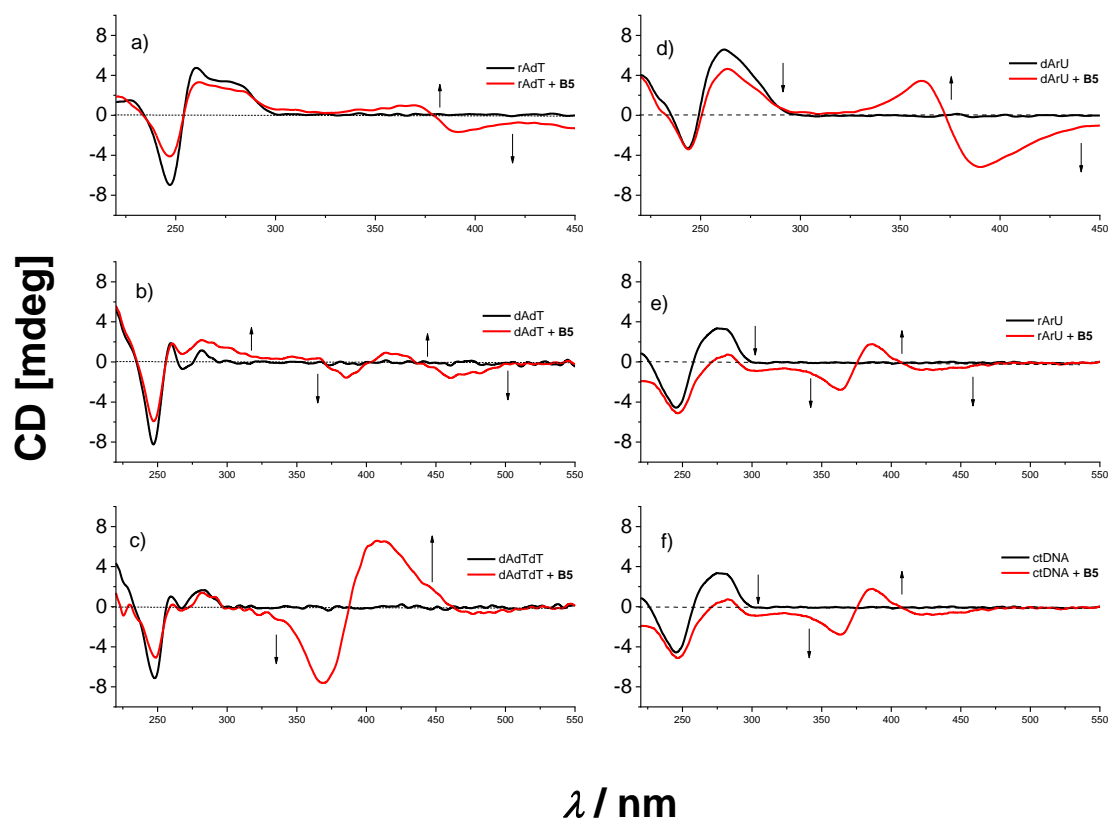
natrijevog kakodilata s dodatkom  $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  EDTA,  $I = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ); Desno: prva derivacija apsorbancije (260 nm) u ovisnosti o temperaturi.



Slika D.8.13. Lijevo: krivulja temperaturnog mekšanja trolančane strukture dAdTdT nakon dodavanja liganda **B6** u omjeru,  $r$  ([spoj]/[polinukleotid]) = 0,025; 0,05; 0,1; 0,2 pri pH = 7,0 (pufer natrijevog kakodilata s dodatkom  $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  EDTA,  $I = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ); Desno: prva derivacija apsorbancije (260 nm) u ovisnosti o temperaturi.

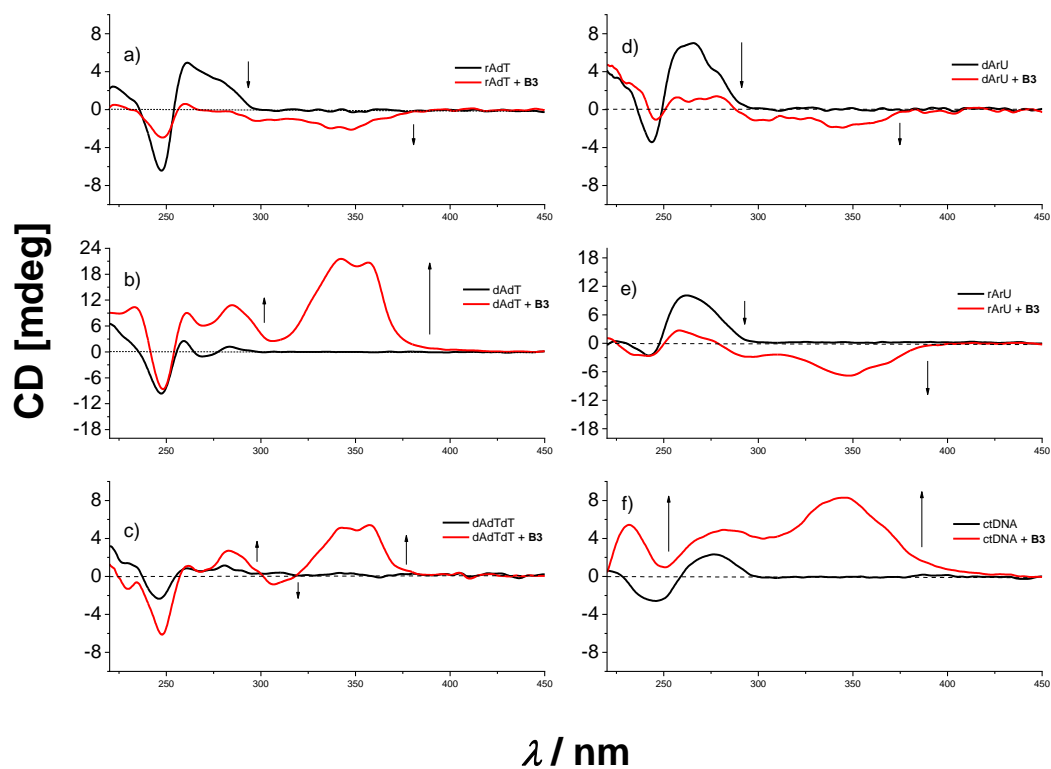


Slika D.8.14. CD titracije (a) poli rA-poli dT, (b) poli dA-poli dT, (c) trovančana struktura DNA-dAdTdT, (d) poli dA-poli rU, (e) poli rA-poli rU i (f) *ct*DNA ( $c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s ligandom **B6** u molarnom omjeru  $r$  ( $[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}] = 0,1$  ( $\text{pH} = 7,0$ ; natrijev kakodilatni pufer s dodatkom  $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  EDTA,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ , za sve titracije osim poli dA-poli rU gdje je ionska jakost viša ( $I = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ )).



Slika D.8.15. CD titracije (a) poli rA-poli dT, (b) poli dA-poli dT, (c) tročlana struktura DNA-dAdTdT, (d) poli dA-poli rU, (e) poli rA-poli rU i (f) *ctDNA* ( $c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s ligandom **B5** u molarnom omjeru  $r$  ( $[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}] = 0,3$  (poli rA-poli rU, poli dA-poli dT);  $0,35$  (*ctDNA*);  $0,4$  (poli rA-poli dT, poli dA-poli rU, dAdTdT); pH = 7,0; natrijev kakodilatni pufer s dodatkom  $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  EDTA,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ , za sve titracije osim poli dA-poli rU gdje je ionska jakost viša ( $I = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ ).



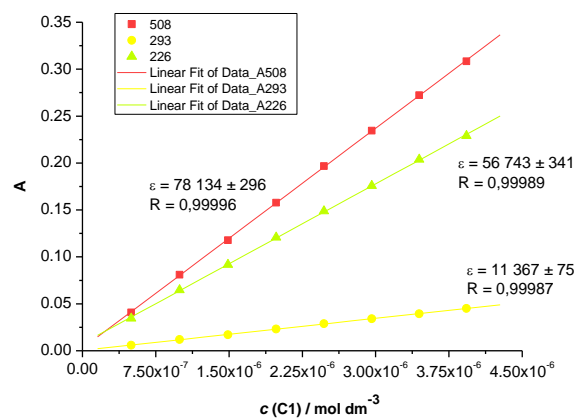
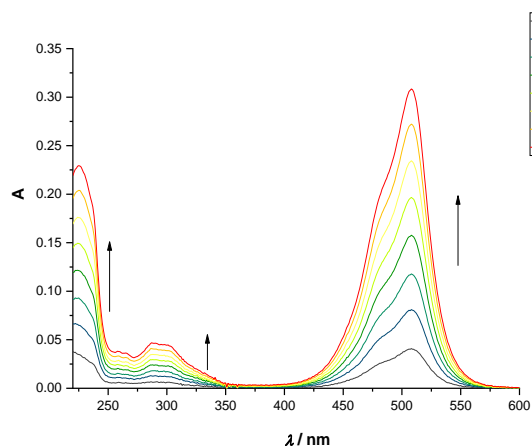


Slika D.8.16. CD titracije (a) poli rA-poli dT, (b) poli dA-poli dT, (c) trolančana struktura DNA-dAdTdT, (d) poli dA-poli rU, (e) poli rA-poli rU i (f) *ctDNA* ( $c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s ligandom **B3** u molarnom omjeru  $r$  ( $[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]$ ) = 0,4 (poli rA-poli dT, poli dA-poli rU); 0,5 (sve ostale strukture); pH = 7,0; natrijev kakodilatni pufer s dodatkom  $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  EDTA,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ , za sve titracije osim poli dA-poli rU gdje je ionska jakost viša ( $I = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ ).

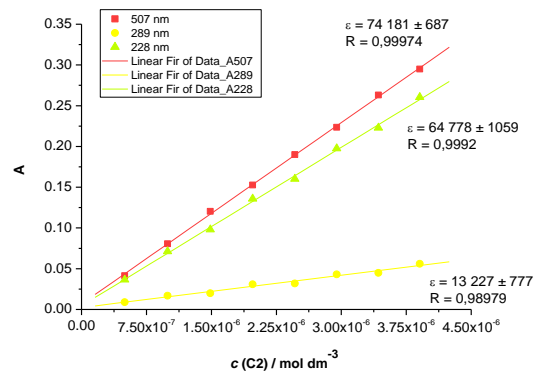
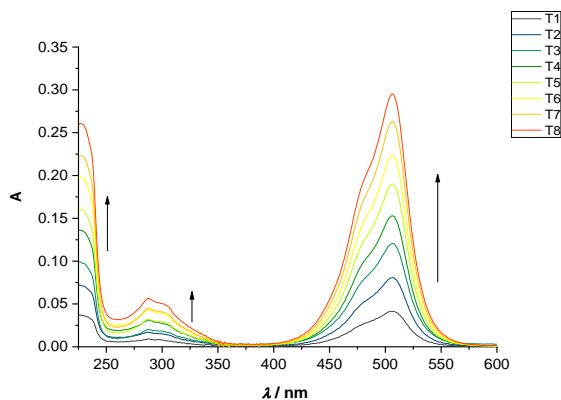
## 8.3. Dodatak – Cijaninske boje

## 8.3.1. Dodatak poglavlju 4.3.1.

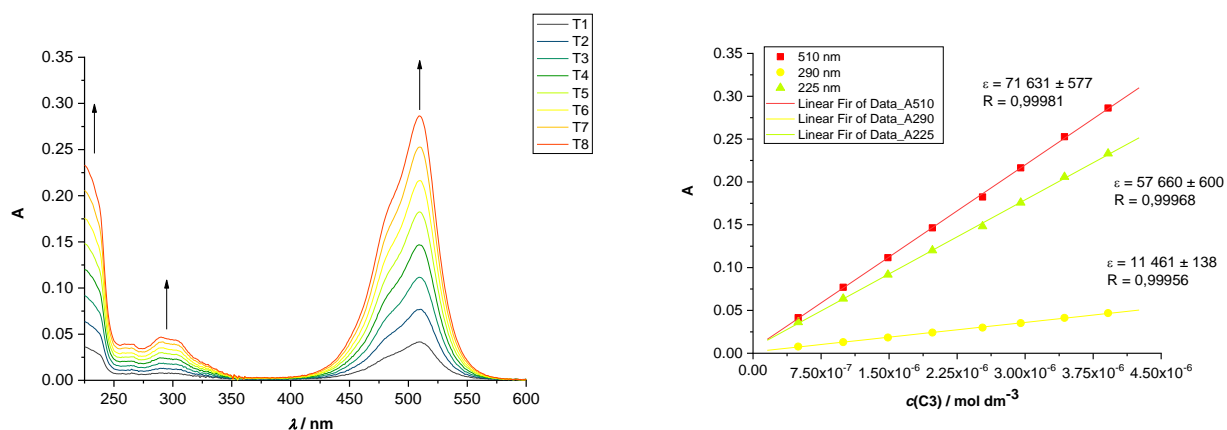
C1



C2

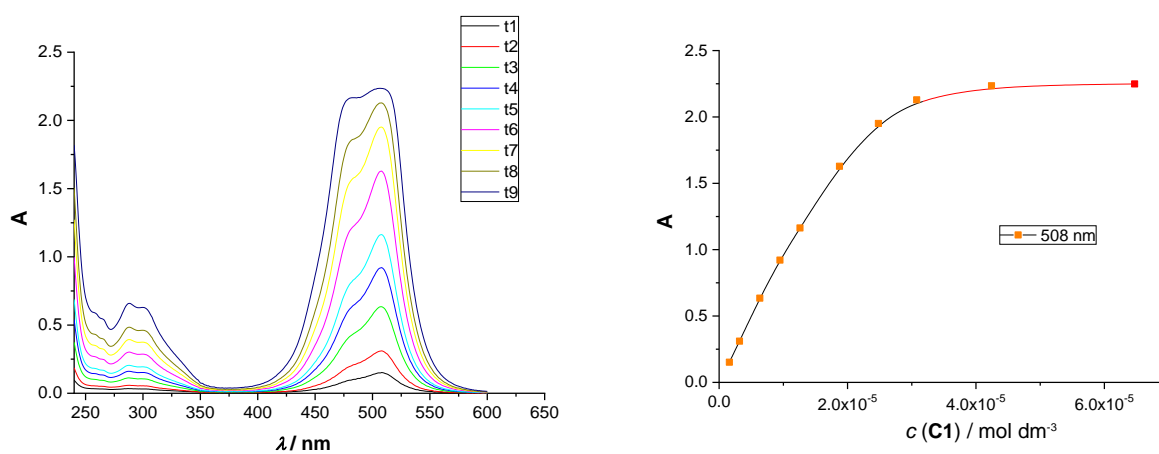


## C3

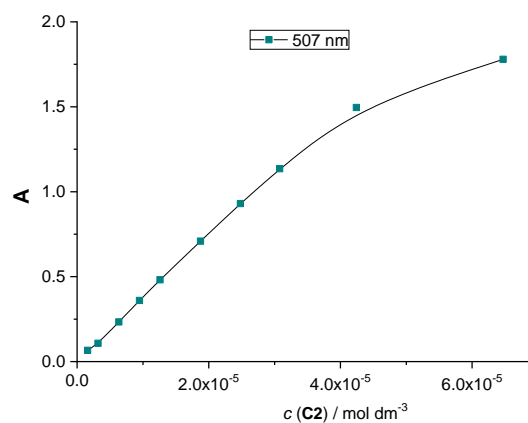
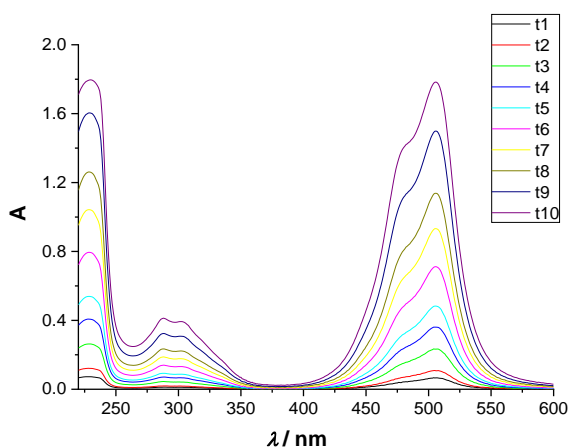


Slika D.8.17. Promjene u UV/Vis spektrima derivata **C1** – **C3** pri različitim koncentracijama (koncentracijski raspon:  $5 \times 10^{-7} - 4 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri pH = 7,0; natrijev kakovilnatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ .

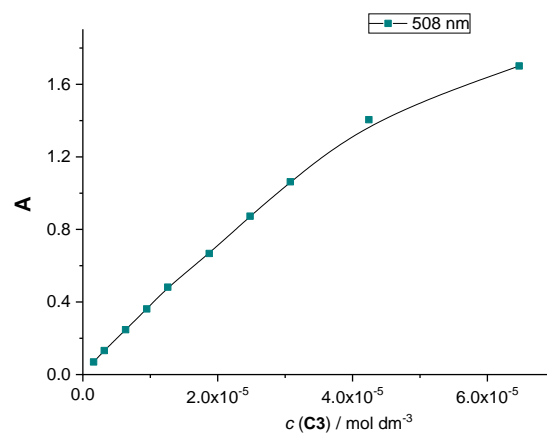
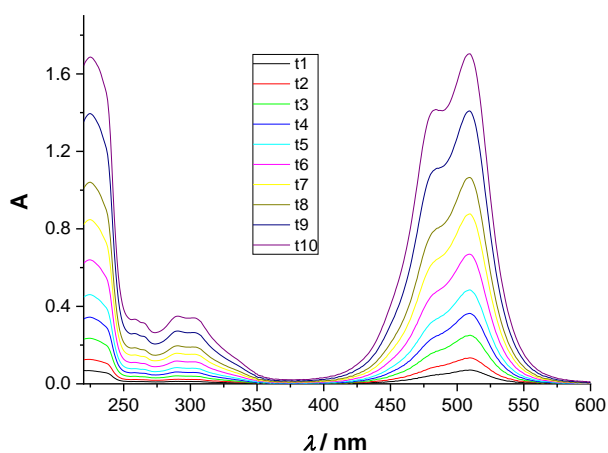
## C1



## C2

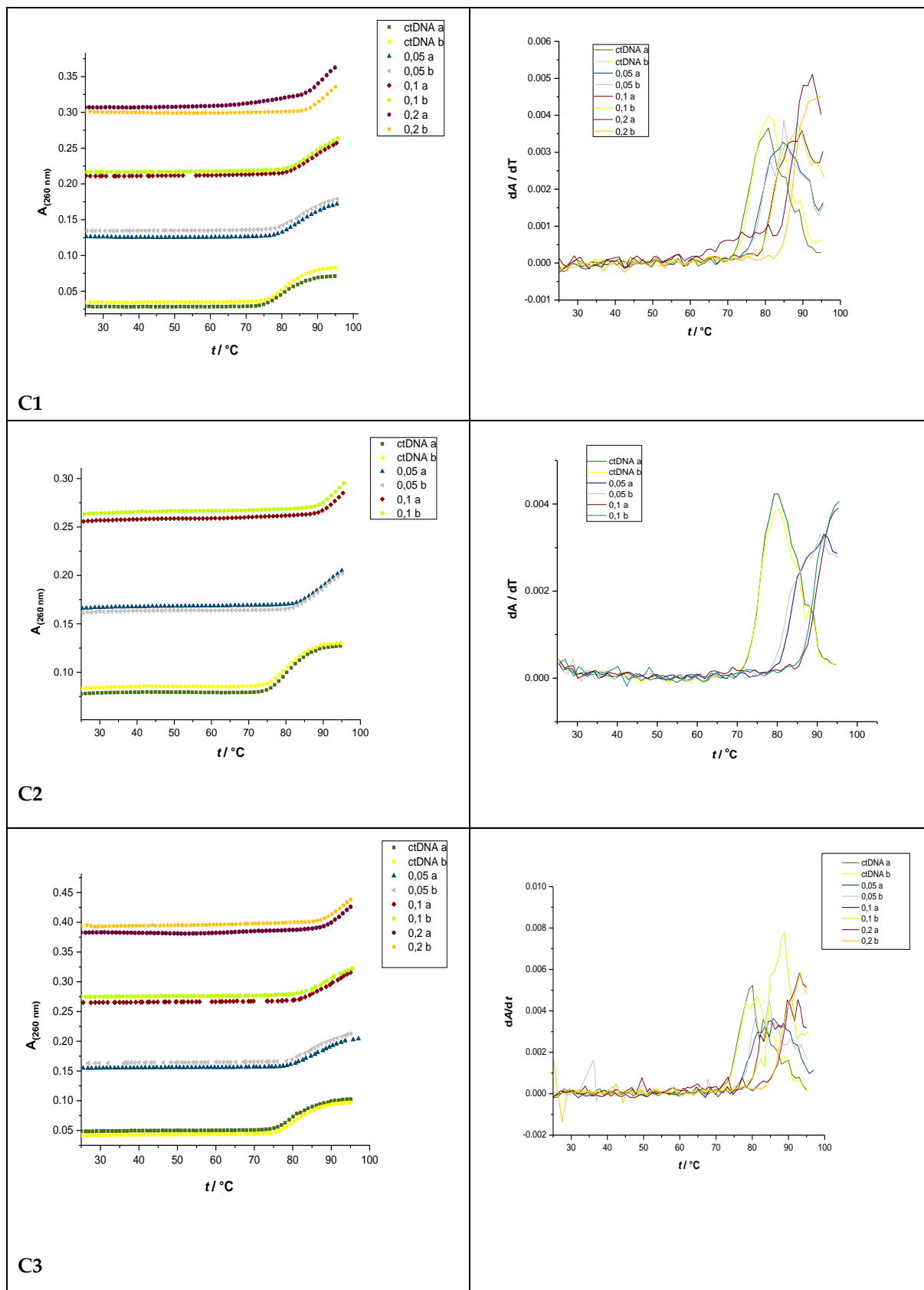


## C3

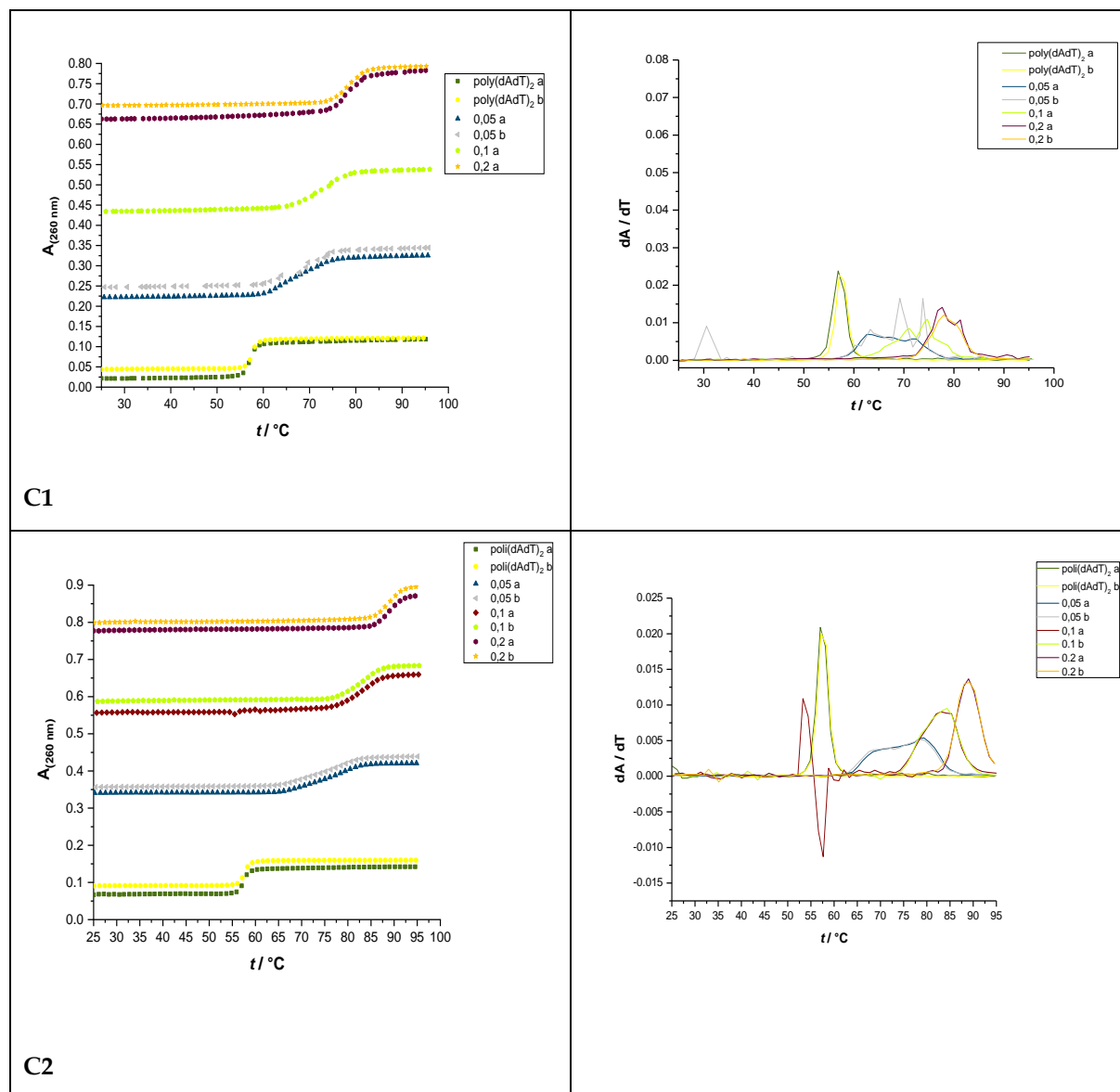


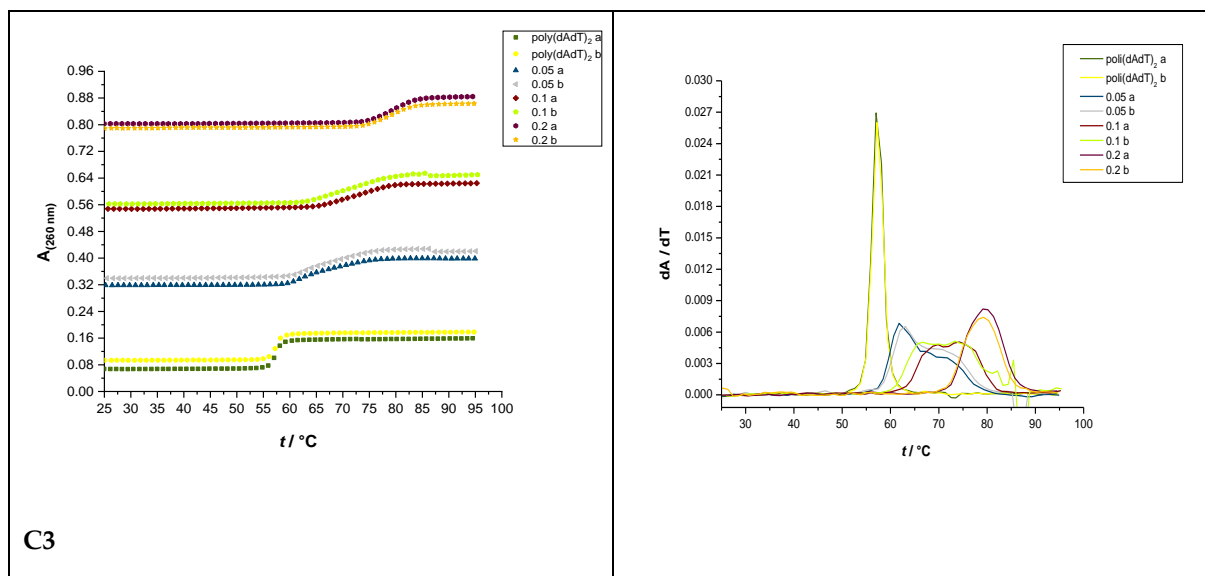
Slika D.8.18. Promjene u UV/Vis spektrima derivata C1 – C3 pri različitim koncentracijama (koncentracijski raspon:  $1,6 \times 10^{-6} - 6,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $\text{pH} = 7,0$ ; natrijev kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ .

8.3.2. Dodatak poglavlju 4.3.2.

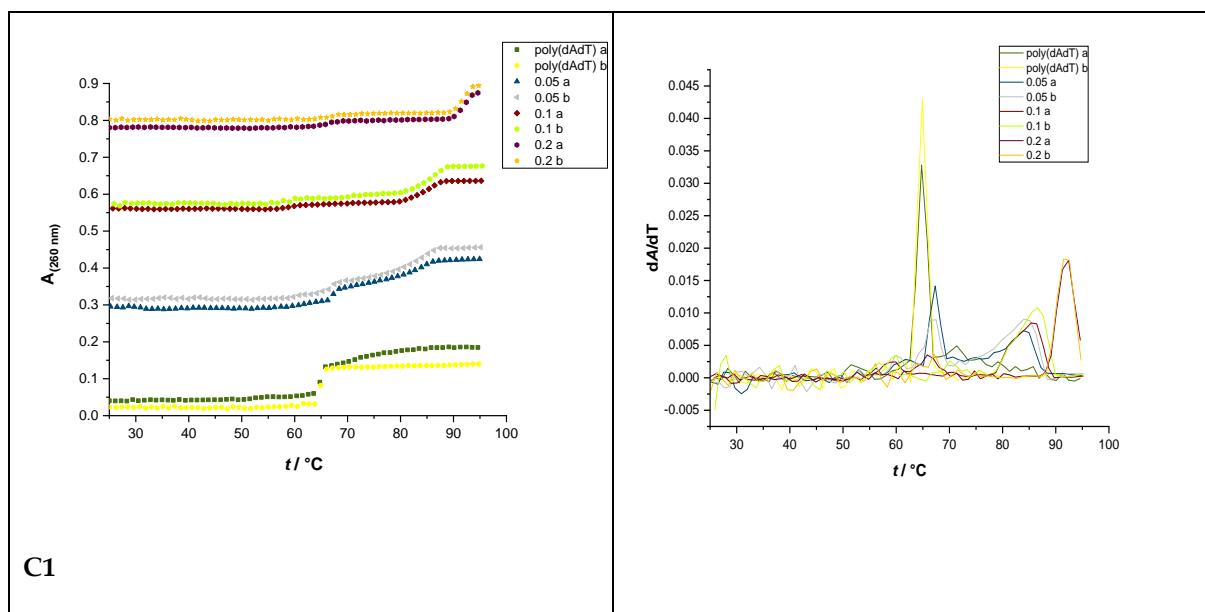


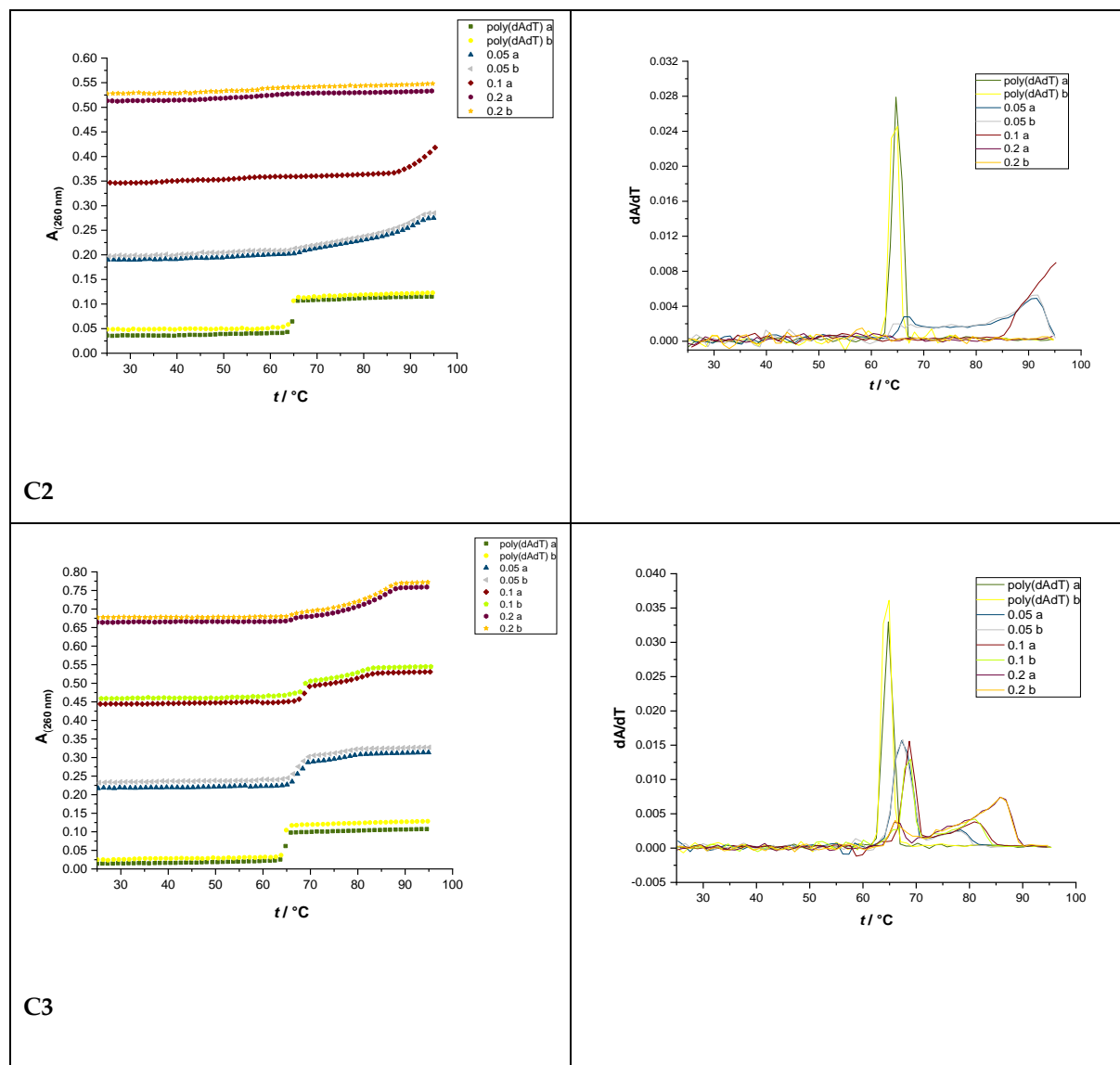
Slika D.8.19. Lijevo: krivulja temperaturnog mekšanja *ct*DNA nakon dodavanja liganada C1 – C3 u različitim omjerima ( $r$  ([spoj]/[polinukleotid])) pri pH = 7,0 (pufer natrijevog kakodilata s dodatkom  $1 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup> EDTA,  $I = 0,1$  mol dm<sup>-3</sup>); Desno: prva derivacija apsorbancije (260 nm) u ovisnosti o temperaturi.





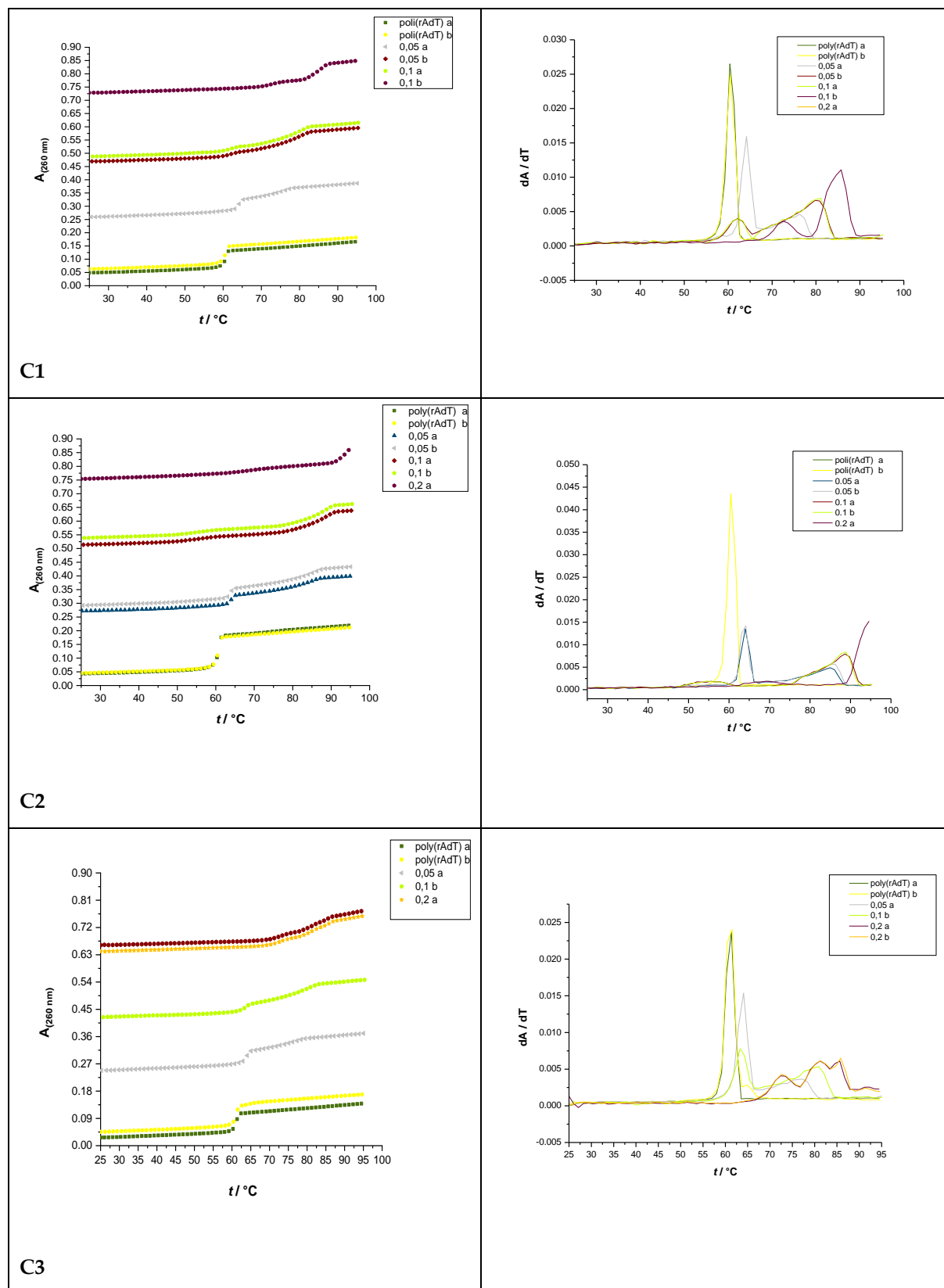
Slika D.8.20. Lijevo: krivulja temperaturnog mekšanja alternirajuće strukture poli (dAdT)<sub>2</sub> nakon dodavanja liganada **C1** – **C3** u različitim omjerima ( $r$  ([spoj]/[polinukleotid])) pri pH = 7,0 (pufer natrijevog kakodilata s dodatkom  $1 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup> EDTA,  $I = 0,1$  mol dm<sup>-3</sup>); Desno: prva derivacija apsorbancije (260 nm) u ovisnosti o temperaturi.





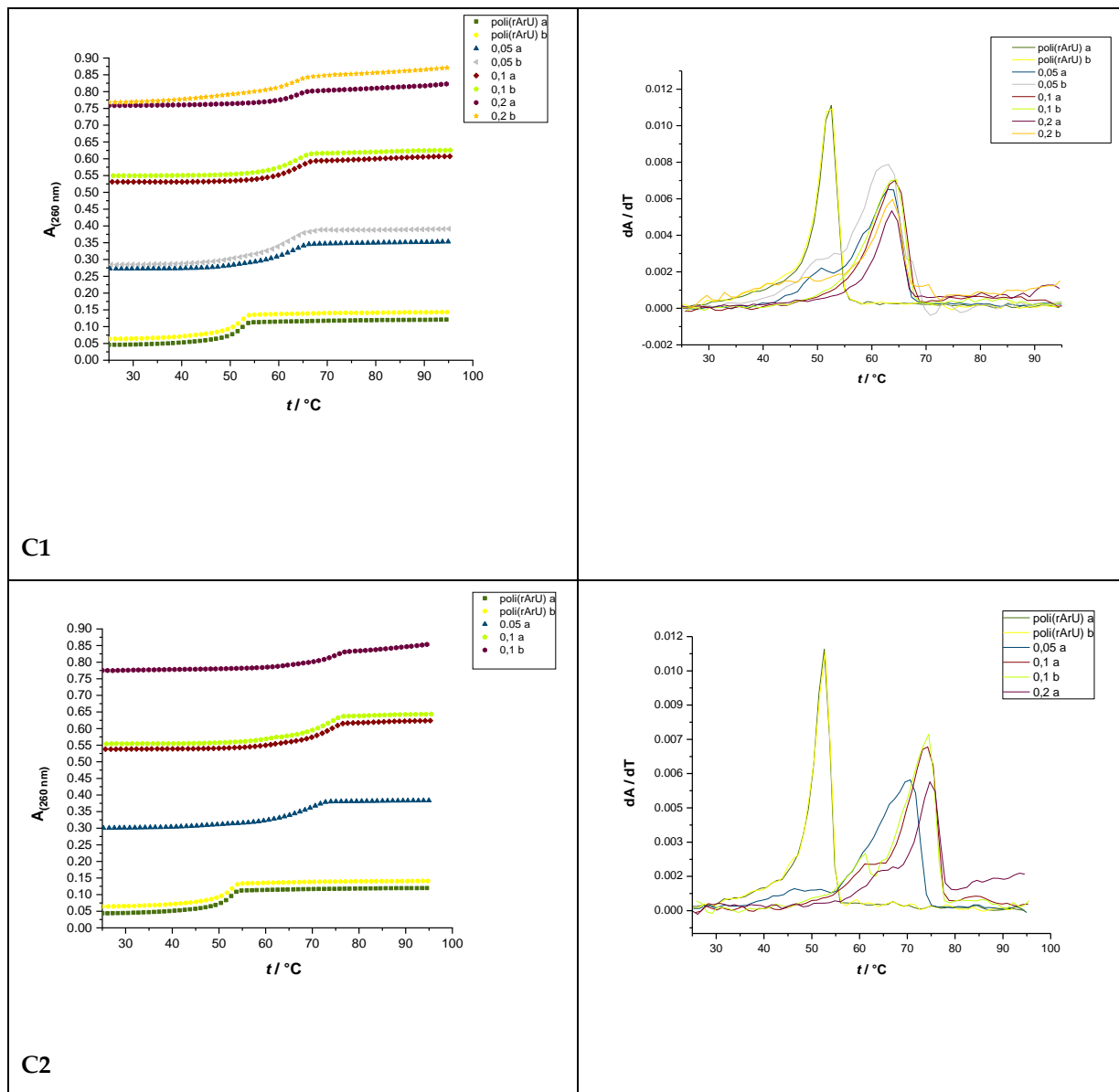
Slika D.8.21. Lijevo: krivulja temperaturnog mekšanja nealternirajuće strukture poli dA-poli dT nakon dodavanja liganada **C1** – **C3** u različitim omjerima ( $r$  ( $[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]$ )) pri  $\text{pH} = 7,0$  (pufer natrijevog kakodilata s dodatkom  $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  EDTA,  $I = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ); Desno: prva derivacija apsorbancije (260 nm) u ovisnosti o temperaturi.

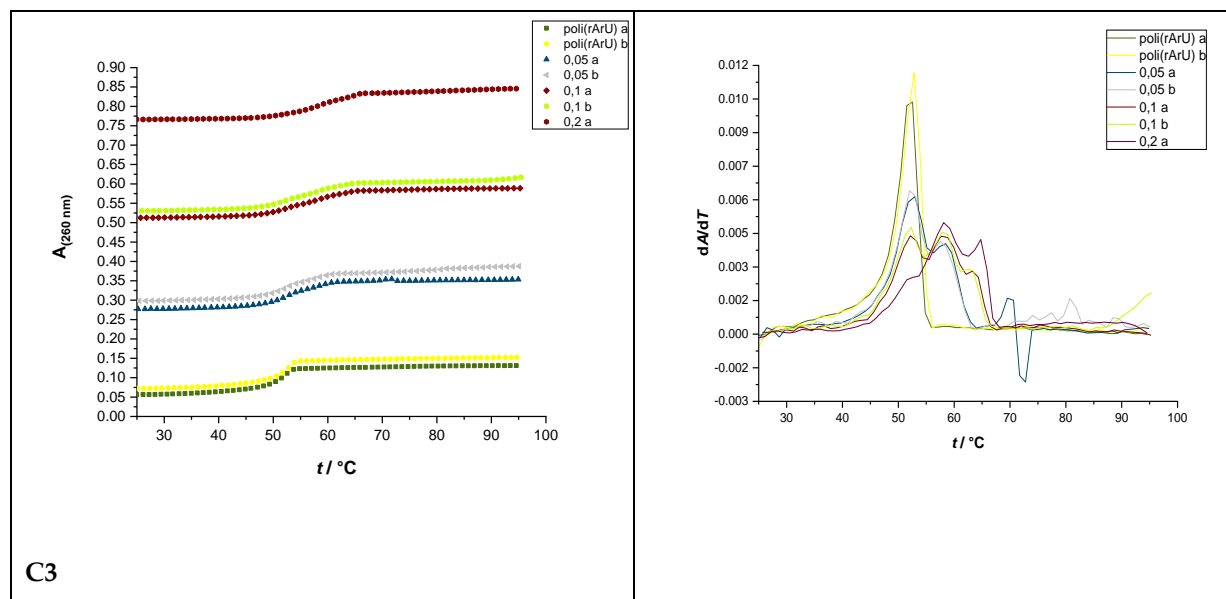




Slika D.8.22. Lijevo: krivulja temperaturnog mekšanja hibridne strukture poli rA-poli dT nakon dodavanja liganada C1 – C3 u različitim omjerima ( $r$  ([spoj]/[polinukleotid])) pri pH =

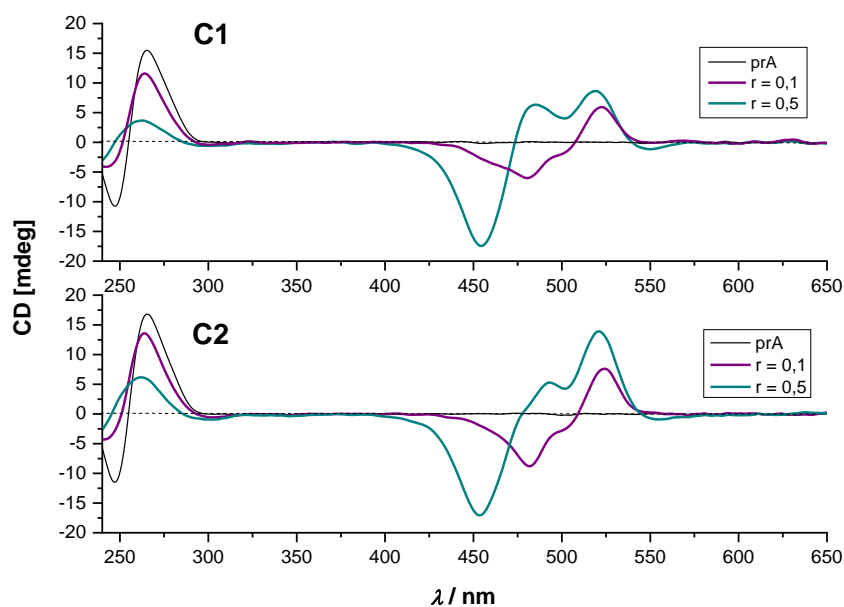
7,0 (pufer natrijevog kakodilata s dodatkom  $1 \times 10^{-3}$  mol dm<sup>-3</sup> EDTA,  $I = 0,1$  mol dm<sup>-3</sup>);  
 Desno: prva derivacija apsorbancije (260 nm) u ovisnosti o temperaturi.





C3

Slika D.8.23. Lijevo: krivulja temperaturnog mekšanja strukture poli rA-poli rU nakon dodavanja liganada **C1** – **C3** u različitim omjerima ( $r$  ([spoj]/[polinukleotid])) pri  $\text{pH} = 7,0$  (pufer natrijevog kakodilata s dodatkom  $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  EDTA,  $I = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ); Desno: prva derivacija apsorbancije (260 nm) u ovisnosti o temperaturi.



Slika D.8.24. Kombinirani ICD signal cijaninskih boja **C1** (gore) i **C2** (dole) s jednolančanom strukturom rA u molarnom omjeru  $r$  ([spoj]/[polinukleotid]) = 0,1 i 0,5 pri  $\text{pH} = 7,0$ ; natrijev kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ .

## § 9. ŽIVOTOPIS

### Osobni podaci:

Ime i prezime: Iva Zonjić  
Datum rođenja: 1. 6. 1994.  
Mjesto rođenja: Metković

### Obrazovanje:

2019. – Poslijediplomski studij kemije-smjer organska kemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
2013. – 2019. Integrirani preddiplomski i diplomski sveučilišni studij biologija i kemija, smjer-nastavnički, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

### Zaposlenje:

2019. – Asistent, Laboratorij za biomolekularne interakcije i spektroskopiju, Zavod za organsku kemiju i biokemiju, Institut Ruđer Bošković

### Dodatna usavršavanja:

Listopad 2022. studijski boravak u “Institute of Molecular Systems Biology, Department of Biology”, ETH Zurich (stipendija Instituta Ruđer Bošković)

### Objavljeni znanstveni radovi:

**I. Zonjić**, A. Kurutos, P. Mihovilović, I. Crnolatac, L.-M. Tumir, A. Tomašić-Paić, J. Kralj, L. Horvat, A. Brozovic, R. Stojković, M. Radić Stojković, *Dyes and pigments*, **207** (2022) 110715.

N. Gazdek, **I. Zonjić**, I. Nikšić-Franjić, L. Frkanec, I. Piantanida, *Supramolecular chemistry*, **33** (2022) 569-577.

**I. Zonjić**, M. Radić Stojković, I. Crnolatac, A. Tomašić Paić, S. Pšeničnik, A. Vasilev, M. Kandinska, M. Mondeshki, S. Balushev, K. Landfester, Lj. Glavaš – Obrovac, M. Jukić, J. Kralj, A. Brozović, L. Horvat, L.-M. Tumir, *Bioorganic Chemistry*, **127** (2022) 105999.

I. Zonjić, L.-M. Tumir, I. Crnolatac, F. Šupljika, L. Racané, S. Tomić, M. Radić Stojković, *Biomolecules*, **12** (2022) 374.

L. Racané, V. Rep, S. Kraljević Pavelić, P. Grbčić, I. Zonjić, M. Radić Stojković, M. Taylor, J. Kelly, S. Raić-Malić, *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, **36** (2021) 1952 – 967.

A. Bistrović Popov, L. Krstulović, S. Koštrun, D. Jelić, A. Bokulić, M. Radić Stojković, I. Zonjić, M. Taylor, J. Kelly, M. Bajić, S. Raić-Malić, *European journal of medicinal chemistry*, **207** (2020) 112802.

L.-M. Tumir, I. Zonjić, K. Žuna, S. Radić Brkanac, M. Jukić, A. Huđek, K. Durgo, I. Crnolatac, Lj. Glavaš-Obrovac, N. Cardullo, L. Pulvirenti, V. Muccilli, C. Tringali, M. Radić Stojković, *Bioorganic chemistry*, **104** (2020) 104190.

#### Sudjelovanja na znanstvenim skupovima:

I. Zonjić, A. Kurutos, P. Mihovilović, I. Crnolatac, L.-M. Tumir, A. Tomašić-Paić, J. Kralj, L. Horvat, A. Brozović, R. Stojković, M. Radić Stojković, *What does a Chlorine do?*, 6th Mini Symposium of Section of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry, 22. 11. 2022., Zagreb, Hrvatska (usmeno izlaganje)

I. Zonjić, A. Kurutos, P. Mihovilović, I. Crnolatac, L.-M. Tumir, A. Tomašić-Paić, J. Kralj, L. Horvat, A. Brozović, R. Stojković, M. Radić Stojković, *Halogenated thiazole orange dyes: synthesis, DNA/RNA binding and antiproliferative evaluations*, XXVII EFMC – International Symposium on Medicinal Chemistry, 4. – 8. 2022., Nica, Francuska (postersko priopćenje)

I. Zonjić, P. Mihovilović, L. Racané, S. Raić-Malić, M. Radić Stojković, *Interactions of benzothiazole amidine derivatives with DNA*, 5. Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a/5th PhD Student Symposium, 24. i 25. 4. 2021., Zagreb, Hrvatska (postersko priopćenje i flash usmeno izlaganje)

I. Zonjić, L.-M. Tumir, F. Šupljika, I. Crnolatac, L. Racané, S. Tomić, M. Radić Stojković, *Recognition of DNA:RNA hybrid and triplex structures by a series of benzothiazole ligands*, 5th Mini Symposium of Section of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry, 30. 11. 2021., Zagreb, Hrvatska (usmeno izlaganje)

I. Zonjić, L.-M. Tumir, F. Šupljika, I. Crnolatac, L. Racané, S. Tomić, M. Radić Stojković, *Recognition of DNA:RNA hybrid and triplex structure by a series of benzothiazole ligands*, 27th Croatian Meeting of Chemists and Chemical Engineers, 5. – 8. 10. 2021., Mali Lošinj, Hrvatska (usmeno izlaganje)

I. Zonjić, L.-M. Tumir, F. Šupljika, I. Crnolatac, L. Racane, S. Tomić, M. Radić Stojković, *Interactions of benzothiazole ligands with DNA:RNA hybrids and triplex structures*, IV. SIMPOZIJ SUPRAMOLEKULSKE KEMIJE Supramolecular Chemistry 10. 12. 2021., Zagreb, Hrvatska (usmeno izlaganje)

I. Zonjić, M. Radić Stojković, A. Bistровić Popov, S. Raić-Malić, *DNA and RNA interactions of benzimidazole amidines*, Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a, 28. 2. 2020., Zagreb, Hrvatska (postersko priopćenje)

I. Zonjić, M. Radić Stojković, A. Bistровić Popov, S. Raić-Malić, *DNA and RNA interactions of benzimidazole amidines*, XIII. susret mladih kemijskih inženjera, 20. i 21. 2. 2020., Zagreb, Hrvatska (postersko priopćenje)

I. Zonjić, M. Radić Stojković, A. Bistровić Popov, S. Raić-Malić, *DNA and RNA interactions of benzimidazole amidines*, III. simpozij supramolekulske kemije (Supramolecular Chemistry 2019), 3. 12. 2019., Zagreb, Hrvatska (postersko priopćenje)

**Ostalo:**

voditelj sekcije i hrvatski delegat u European Young Chemists' Network-EYCN (2021. – danas)

sudjelovanje na Otvorenom danu Instituta Ruđer Bošković – ODI 2022; Frizbijada 2023.

član Hrvatskog kemijskog društva (2019. – danas)

Predstavnik u vijeću asistenata (Zavod za organsku kemiju i biokemiju) Instituta Ruđer Bošković (2022. – danas)