

# Ispitivanje interakcija derivata cijanina i piperazina s dvolančanim DNA i RNA spektroskopskim metodama

---

**Pšeničnik, Silvia**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

*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:217:696021>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-03**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Silvia Pšeničnik

**ISPITIVANJE INTERAKCIJA DERIVATA  
CIJANINA I PIPERIZINA S DVOLANČANIM  
DNA I RNA SPEKTROSKOPSKIM  
METODAMA**

**Diplomski rad**

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

Zagreb, 2019.



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

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom „Molekularno prepoznavanje DNA:RNA hibridnih i višečlanih struktura u bioanalitičkim i in vitro sustavima“ (HRZZ-IP-2018-01-4694).



## Zahvale

Od srca se zahvaljujem mentorici dr. sc. Lidiji-Mariji Tumir na potpori, trudu, uloženom vremenu, pomoći oko izrade ovog diplomskog rada kao i na brojnim korisnim savjetima.

Zahvaljujem se i svima u laboratoriju LBIS na pomoći kada god mi je ona bila potrebna te na ugodnoj radnoj atmosferi.

Također se zahvaljujem i mentorici prof. dr. sc. Ivi Juranović Cindrić na podršci, toplim riječima i svim savjetima.

Hvala svim prijateljima i kolegama koji su sa mnom dijelili trenutke tijekom studiranja te ih učinili još ljepšima i posebnijima.

Hvala puno i ekipi sa „šanka“ na svim jutarnjim kavama i druženju bez kojih nisam mogla započeti dan. Nisam mogla poželjeti bolju ekipu od vas.

Ogromno hvala mojem Marku na strpljenju i podršci uz beskonačnu dozu ljubavi.

Na kraju posebno hvala mojoj obitelji, mami Anici, tati Davoru i bratu Borni na beskonačnoj podršci, neograničenoj vjeri u mene, ljubavi te pomoći oko faksa i života. Bez vas ne bi bila to što jesam.



# Sadržaj

<b>SAŽETAK.....</b>	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XIII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Cijaninske boje.....</b>	<b>2</b>
<b>2.2. Struktura i svojstva DNA i RNA .....</b>	<b>4</b>
<b>2.3. Istraživanje vezanja malih molekula s DNA/RNA.....</b>	<b>7</b>
2.3.1. <i>UV/Vis spektroskopija.....</i>	<i>10</i>
2.3.2. <i>Promjena temperature mekšanja nukleinskih kiselina.....</i>	<i>12</i>
2.3.3. <i>Fluorescencijska spektroskopija .....</i>	<i>14</i>
2.3.4. <i>Cirkularni dikroizam.....</i>	<i>15</i>
<b>2.4. Konfokalna mikroskopija.....</b>	<b>18</b>
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1. Materijali .....</b>	<b>20</b>
3.1.1. <i>Kemikalije .....</i>	<i>20</i>
3.1.2. <i>Uređaji .....</i>	<i>22</i>
<b>3.2. Spektroskopska karakterizacija otopina ispitivanih spojeva.....</b>	<b>22</b>
<b>3.3. Istraživanje interakcija spojeva s polinukleotidima .....</b>	<b>23</b>
3.3.1. <i>Fluorimetrijske titracije .....</i>	<i>23</i>
3.3.2. <i>Temperaturno mekšanje.....</i>	<i>23</i>
3.3.3. <i>Cirkularni dikroizam.....</i>	<i>24</i>
<b>3.4. Konfokalna mikroskopija.....</b>	<b>25</b>
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>26</b>
<b>4.1. Cilj istraživanja.....</b>	<b>26</b>
4.1.1. <i>pH ovisnost spojeva .....</i>	<i>26</i>
<b>4.2. Spektrofotometrijska karakterizacija spojeva .....</b>	<b>29</b>
4.2.1. <i>UV/Vis spektroskopija.....</i>	<i>29</i>
4.2.2. <i>Temperaturna stabilnost vodenih otopina spojeva .....</i>	<i>30</i>
4.2.3. <i>Fluorescencija.....</i>	<i>32</i>
<b>4.3. Interakcije spojeva s polinukleotidima .....</b>	<b>33</b>
4.3.1. <i>Fluorimetrijske titracije .....</i>	<i>33</i>
4.3.2. <i>Temperaturno mekšanje polinukleotida.....</i>	<i>41</i>



---

4.3.3. Cirkularni dikroizam.....	44
<b>4.4. Konfokalna mikroskopija.....</b>	<b>48</b>
<b>§ 5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>53</b>
<b>§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....</b>	<b>55</b>
<b>§ 7. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>56</b>
<b>§ 8. DODATAK.....</b>	<b>XV</b>
<b>§ 9. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>XXX</b>







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

Diplomski rad

## SAŽETAK

### ISPITIVANJE INTERAKCIJA DERIVATA CIJANINA I PIPERAZINA S DVLANČANIM DNA I RNA SPEKTROSKOPSKIM METODAMA

Silvia Pšeničnik

U okviru ovog diplomskog rada spektroskopski su okarakterizirane vodene otopine šest novosintetiziranih cijaninskih boja koje sadržavaju benzotiazolnu podjedinicu i metilpiperazinsku, odnosno fenilpiperazinsku podjedinicu. Ispitane su njihove interakcije s dvolančanim polinukleotidima. Interakcije cijaninskih boja s različitim polinukleotidima ispitane su koristeći standardne spektrofotometrijske metode UV/Vis-spektroskopije, termičke denaturacije, fluorimetrije i CD spektroskopije. Otopine spojeva imaju UV/Vis spektar u području od 220 nm do 600 nm i velike molarne ekstincijske koeficijente, a slabi intenzitet fluorescencije spojeva značajno se povećao dodatkom polinukleotida. Ispitani spojevi su akiralni te nemaju CD spektar. Novosintetizirani derivati različito se vežu za polinukleotide različite sekundarne strukture, uz odgovarajuće različite intenzitete fluorescencije. Općenito, fenilpiperazinski spojevi pokazuju slabije vezanje od metilpiperazinskih spojeva. Spektrofotometrijska ispitivanja upućuju većinom na vezanje cijaninske boje u utore DNA/RNA, no kod fenilpiperazinskih derivata može se pretpostaviti interkalativni način vezanja.

(58 stranica, 45 slika, 5 tablica, 37 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: apsorbanacija, cirkularni dikroizam, cijaninske boje, DNA, fluorescencija, RNA

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

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

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
  2. prof. dr. sc. Ines Primožić
  3. prof. dr. sc. Željka Soldin
- Zamjena: izv. prof. dr. sc. Snežana Miljanić

Datum diplomskog ispita: 24. rujna 2019.





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

Diploma Thesis

## ABSTRACT

Study of interactions of cyanine-piperazine derivatives with double-stranded DNA and RNA by spectroscopic methods

Silvia Pšeničnik

In the scope of thesis water solution of six newly synthesized cyanine dyes containing the benzothiazole subunit and the methylpiperazine or phenylpiperazine subunits were characterized spectroscopically. Their interactions with double-stranded polynucleotides were studied. The interactions of the conjugates with different polynucleotides were studied using standard spectroscopic methods of UV/Vis spectroscopy, thermal denaturation experiments, fluorescence and CD spectroscopy. Aqueous solutions of compounds absorbed in the UV/Vis region 220-600 nm and had a high molar extinction coefficients. Compounds had a large increase in fluorescence intensity upon addition of polynucleotides. Aqueous solutions of compounds had no intrinsic CD spectrum. Novel cyano dyes, although intrinsically non-fluorescent, give rise to strong fluorimetric response upon binding to double-stranded (ds)-DNAs or (ds)-RNA, whereby selectivity in emission response to various polynucleotide secondary structures is controlled by linker length. In general, phenylpiperazine compounds show weaker binding than methylpiperazine compounds. Mostly, new compounds bind to the polynucleotide minor groove, while in case of phenyl-piperazine derivatives intercalation into DNA/RNA was observed.

(58 pages, 45 figures, 5 tables, 37 references, original in croatian)

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

Keywords: absorbance, circular dichroism, cyanine dyes, DNA, fluorescence, RNA

Mentor: Dr. Lidija-Marija Tumir, research assistant IRB

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

Reviewers:

1. Dr. Iva Juranović Cindrić., Associate Professor
  2. Dr. Ines Primožić, Associate Professor
  3. Dr. Željka Soldin, Associate Professor
- Substitute: Dr. Snežana Miljanić, Associate Professor

Date of exam: 24<sup>th</sup> September 2019.



## § 1. UVOD

Mnoge male, organske molekule koje se nekovalentno vežu na polinukleotide (DNA i RNA) imaju vrlo važnu biološku ili biokemijsku primjenu.<sup>1</sup> Kako bi se ispitala svojstva novosintetiziranih spojeva, poželjno je ispitati njihove nekovalentne interakcije s polinukleotidima.<sup>1</sup> Neki od tipova nekovalentnih interakcija su interkaliranje, vezanje u mali ili veliki utor polinukleotida te elektrostatsko vezanje pozitivno nabijene molekule uz fosfatnu okosnicu.<sup>1</sup>

U posljednje vrijeme sve se više pozornosti pridaje kemiji cijaninskih boja.<sup>2</sup> Razlog tome je njihova široka primjena u nekoliko polja znanosti, tehnologije, inženjeringa, farmakologije i medicine.<sup>2</sup> Razvijene su razne sintetske metode koje omogućuju pripremu cijaninskih boja koje imaju vrlo širok spektar apsorpcije i fluorescencije od 400 do 1000 nm, mogućnost topljivosti u velikom broju organskih i vodenih otapala te reaktivne skupine koje omogućuju kovalentno vezanje s drugim molekulama.<sup>3</sup>

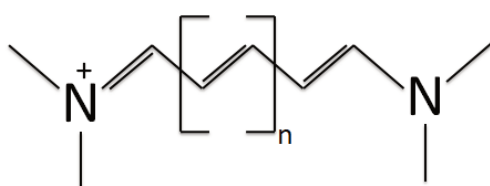
U okviru ovog diplomskog rada ispitana su i spektroskopski okarakterizirana šest novosintetizirana spoja koji sadržavaju cijaninsku jedinicu. Interakcije novosintetiziranih spojeva s polideoksiribonukleotidima i poliribonukleotidima ispitane su standardnim spektrofotometrijskim metodama UV/Vis i fluorescencijske spektroskopije. Način vezanja ispitivanih cijaninskih boja na polinukleotide određen je CD spektroskopijom. Vizualizacija fluorescentnih kompleksa cijaninskih boja i DNA/RNA unutar stanice provedena je konfokalnom mikroskopijom.



## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Cijaninske boje

Cijaninske boje su molekule koje sadrže polimetinski most između dva atoma dušika s delokaliziranim nabojem.



Slika 1. Općenita strukturna formula cijaninske boje ( $n = 0, 1, 2, 3$ )<sup>4</sup>

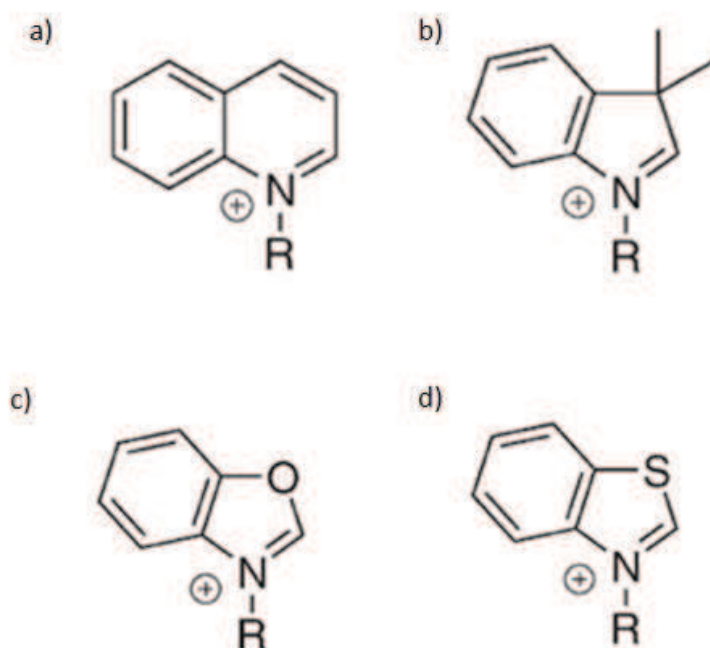
Zanimljivo svojstvo cijaninskih boja je da sama vodena otopina spoja ne pokazuje gotovo nikakvu fluorescenciju, ali fluorescencija se značajno povećava nakon vezanja DNA.<sup>5</sup> Razlog toj pojavi je fleksibilnost polimetinskog mosta koji spaja dva heterociklička prstena. Zbog brzog neradijativnog povratka iz pobuđenog u osnovno stanje, vodene otopine cijaninskih boja ne pokazuju emisiju fluorescencije.<sup>6</sup> Vezanje cijaninskih boja na DNA uzrokuje ograničenje i smanjenje fleksibilnosti polimetinskog mosta što kao posljedicu ima pojavu jake fluorescencijske relaksacije iz pobuđenog stanja.<sup>7</sup>

Ovisno o duljini polimetinskog mosta razlikuju se i svojstva spojeva. Polimetinski most ima neparni broj ugljikovih atoma pa se pozitivni naboj delokalizira preko dva dušikova atoma. Ovisno o broju ugljikovih atoma u polimetinskom lancu razlikujemo: cijanine (jedan ugljikov atom), karbocijanine (dva ugljikova atoma), dikarbocijanine (pet ugljikovih atoma) i trikarbocijanine (sedam ugljikovih atoma).<sup>3</sup>

Daljnja podjela cijaninskih boja odnosi se na simetriju kromofora. Ukoliko se cijaninske boje sastoje od identičnih heterocikla povezanih na istom položaju u sustavu, pripadaju u skupinu simetričnih cijaninskih boja. Za razliku od simetričnih, asimetrične

cijaninske boje sastoje se od dva različita heterocikla ili dva identična heterocikla, ali povezana na različitim položajima u sustavu.<sup>3</sup>

Najčešći heterocikli su indol, kinolin, benzoksazol i benzotiazol (slika 2). Supstituenti postavljeni na različite položaje oko ovih heterocikala koriste se za poboljšanje svojstava cijaninskih boja kao što su topljivost u vodi, mogućnost agregacije (koja može biti i pozitivno i negativno svojstvo), interakcije s DNA te se mogu mijenjati elektronska svojstva kromofora.<sup>3</sup>



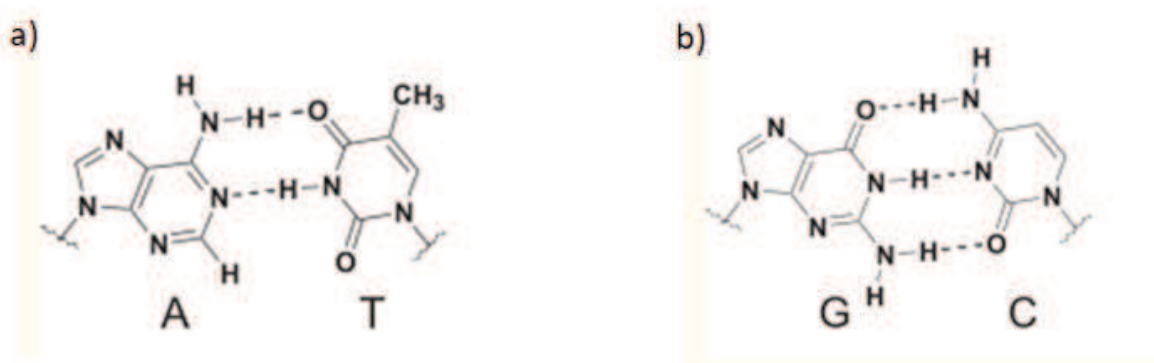
Slika 2. Strukture najčešćih heterocikla u cijaninskim bojama: a) kinolin, b) indol, c) benzoksazol i d) benzotiazol<sup>3</sup>

Male molekule mogu se vezati na polinukleotide. Tri su najčešća vezanja malih molekula na polinukleotide, a to su: nespecifično elektrostatsko vezanje uz fosfatnu okosnicu polinukleotida, interkalacija i vezanje u mali utor dvostruke zavojnice. Budući da interkaliranje zahtjeva da se dva susjedna para razmaknu jedan od drugog kako bi se stvorio vezni džep za ligand, vezanje u mali utor uzrokuje puno manju deformaciju dvostruke uzvojnice.<sup>3</sup>

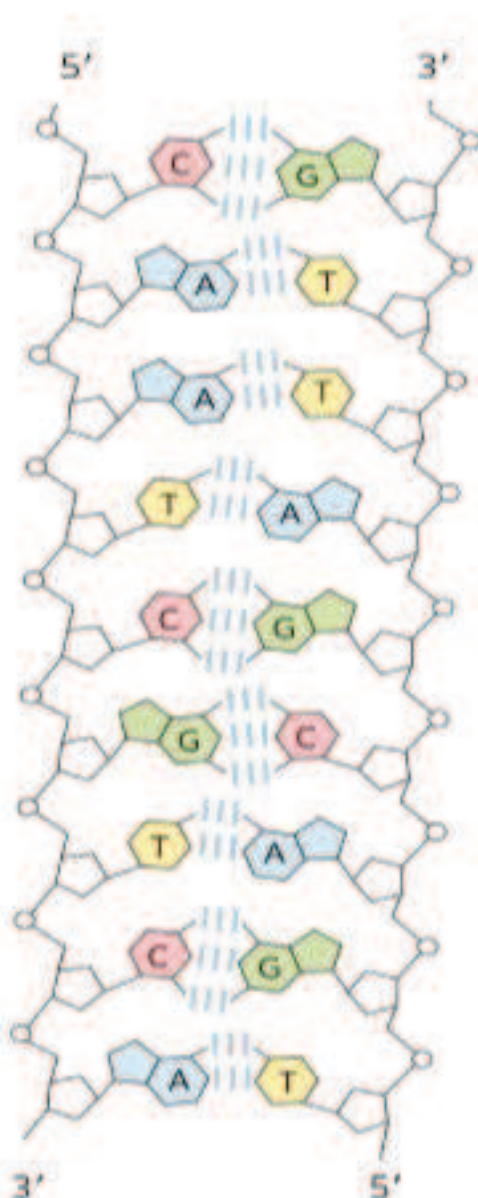
## 2.2. Struktura i svojstva DNA i RNA

DNA i RNA su linearni polimeri ograničenog broja monomera.<sup>8</sup> Osnovne jedinice DNA su nukleozidi, u kojima je šećer deoksiriboza, a baze su: adenin (A), timin (T), gvanin (G) i citozin (C). Kod RNA šećer je riboza, a timin je zamijenjen bazom uracil (U). Dušične baze mogu se podijeliti u dvije skupine: purinske i pirimidinske baze. U purinske spadaju adenin i gvanin, a u pirimidinske citozin, uracil i timin.

Sva stanična DNA sastoji se od dvaju dugih, spiralnih polinukleotidnih lanaca smotanih oko zajedničke osi. Lanci su antiparalelni, a prema dogovoru, redosljed baza u okosnici piše se u smjeru 5' prema 3'. Okosnica šećer – fosfat obaju lanaca nalazi se na vanjskoj strani dvostruke uzvojnice, a baze se nalaze u unutrašnjosti.<sup>8</sup> Kako bi se lanci održali skupa, parovi baza povezani su vodikovim vezama: adenin se uvijek sparuje s timinom pomoću dvije vodikove veze, a gvanin s citozinom preko tri vodikove veze. Takve parove nazivamo Watson-Crickovim parovima baza (Slika 3). Posljedica toga je da su lanci u dvostrukoj uzvojnici međusobno komplementarni.



Slika 3. Watson-Crickovi parovi baza u DNA; a) adenin i timin su povezani preko dvije vodikove veze, b) gvanin i citozin su povezani preko tri vodikove veze<sup>9</sup>



Slika 4. Komplementarnost lanaca u dvostrukoj uzvojnici DNA. Komplementarni, antiparalelni lanci DNA slijede Watson-Crick pravila sparivanja<sup>10</sup>

Oblik B-DNA je najstabilnija struktura molekule DNA. Najzastupljenija je u biološkim sustavima i pri fiziološkim uvjetima. Snimanjem kristalnih struktura utvrđeno je da postoje još dva tipa DNA konformacija: A- i Z-DNA. Ove tri konformacije DNA prikazane su na slici 5. Konformacija A šira je i kraća od konformacije B, a njezini parovi baza nisu okomiti na os zavojnice, već su vezani pod kutem od  $19^\circ$ . Budući da fosfati u A-uzvojnici vežu manje vode nego u B-DNA, dehidratacija potiče stvaranje A-DNA. Z-DNA karakterizira stabilnost pri

uvjetima visoke ionske jakosti. Ime je dobila jer su fosfati okosnice bili u cik-cak liniji. A- i B-DNA su desne dvostruke uzvojnice, dok je Z-DNA lijeva dvostruka uzvojnica.<sup>11</sup> Neke od osnovnih karakteristika A-, B- i Z-DNA dane su u tablici 1.



Slika 5. Struktura A-, B- i Z-DNA<sup>11</sup>

Tablica 1. Pregled glavnih strukturnih svojstava A-, B- i Z-DNA<sup>12</sup>

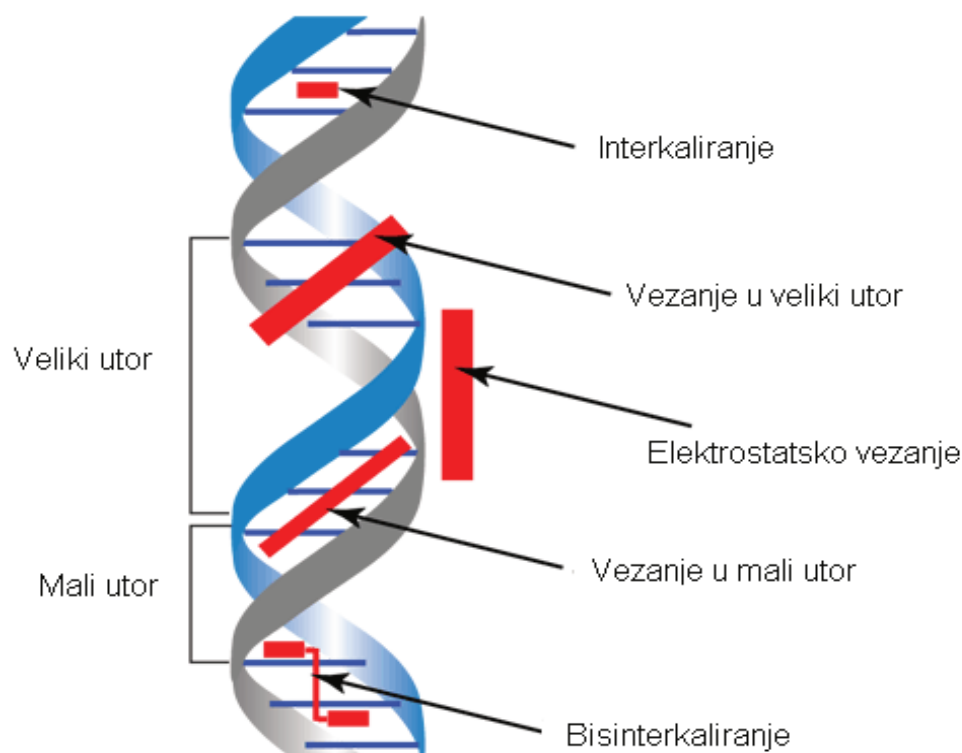
	<b>A-DNA</b>	<b>B-DNA</b>	<b>Z-DNA</b>
Oblik	najšira	srednja	najuža
Zavijenost	desna	desna	lijeva
Broj parova baza u jednom navoju	11	10,4	12
Promjer / Å	25,5	23,7	18,4
Visina navoja / Å	25,3	35,4	45,6
Glikozidna veza <sup>a</sup>	<i>anti</i>	<i>anti</i>	naizmjenično <i>sin</i> i <i>anti</i>
Nagib baznog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

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

### 2.3. Istraživanje vezanja malih molekula s DNA/RNA

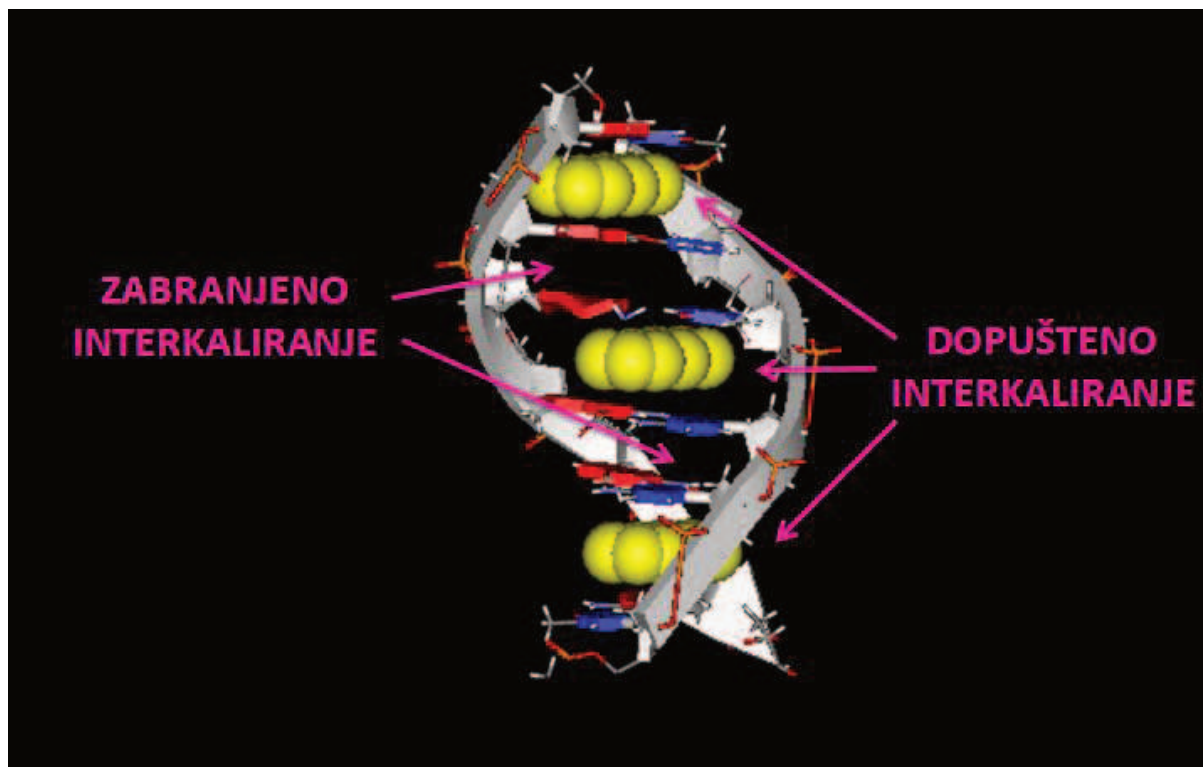
Male organske molekule se na polinukleotide mogu vezati na dva načina: nepovratno (nastaju kovalentni kompleksi malih molekula s polinukleotidima) i ravnotežno (nastaju nekovalentni kompleksi malih molekula s polinukleotidima). Kod ravnotežnih interakcija razlikujemo tri

osnovna načina vezanja: elektrostatske interakcije polikationskih spojeva s negativno nabijenim fosfatima polinukleotida, vezanje malih molekula u manji utor dvolančanih uzvojnica te interkaliranje.<sup>1</sup>



Slika 6. Schematski prikaz ravnotežnih interakcija malih molekula s polinukleotidima<sup>13</sup>

Interkaliranje, tj. umetanje planarnih aromatskih spojeva između parova baza polinukleotida, dovodi do stabilizacije i ukrućivanja polinukleotidnog lanca te do produljenja uzvojnice kao i njenog odvijanja i deformacije.<sup>14,15</sup> Male molekule se ne mogu interkalirati bilo gdje u polinukleotidnom lancu zbog principa „isključenja susjeda“ koji onemogućuje istovremeno vezanje između susjednih parova baza<sup>1</sup> (Slika 3).



Slika 7. Model principa “isključenja susjeda”<sup>16</sup>

Elektrostatske interakcije između pozitivno nabijenih spojeva s negativno nabijenim fosfatima polinukleotida pokazuju malu ili nikakvu selektivnost s obzirom na slijed nukleotida. Afinitet vezanja ovisi o broju pozitivnih naboja molekule spoja. Molekule koje se na polinukleotide vežu na ovaj način su npr. alifatski poliamini.<sup>17</sup>

Važno strukturno svojstvo polinukleotida jest postojanje velikih i malih utora. Ovisno o slijedu, utori imaju različite potencijale sudjelovanja u vodikovim vezama kao donori ili akceptori vodika.<sup>8</sup> Osim vodikovih veza, važne su i Van der Waalsove interakcije između malih molekula spoja i DNA/RNA.<sup>18</sup> Mnogi antibiotici i antitumorski lijekovi, predmet su mnogih istraživanja jer se njihovo terapijsko djelovanje temelji na ovom načinu vezanja. Male molekule koje se vežu u utore polinukleotida imaju konveksni oblik koji odgovara konkavnom obliku utora dvostrukih uzvojnica DNA i RNA.<sup>1</sup>

Spojevi koji se vežu na polinukleotide predmet su istraživanja zbog svojih terapijskih, antitumorskih i antibiotskih svojstva. Vezanjem spojeva na polinukleotide dolazi do promjene u njihovoj strukturi, a to onda dovodi i do promjene u biološkoj aktivnosti polinukleotida.



U istraživanjima se mogu koristiti prirodni i sintetski polinukleotidi. Od prirodnih polinukleotida najčešće se koristi DNA iz timusa teleta (*engl. Calf Thymus DNA*, ct DNA), čiji redoslijed baza nije detaljno poznat. Za provedbu detaljnijih ispitivanja koriste se sintetski polinukleotidi čiji su slijedovi baza poznati. Koriste se homopolinukleotidi (osnovne strukture poli X – poli Y) i alternirajući polinukleotidi (osnovne strukture poli XY – poli XY). Spojevi koji se vežu u mali utor obično pokazuju veliku selektivnost prema manjem utoru DNA u odnosu na RNA, a to se povezuje sa samim oblikom manjeg utora kod DNA i RNA. Manji utor RNA je bitno širi i plići što otežava vezanje malim molekulama. Također, vezanje malih molekula u utor DNA ovisi i o slijedovima DNA. Kod poli dG – poli dC slijedova DNA u malom utoru nalaze se amino skupine gvanina koje imaju vrlo nepovoljan sterički utjecaj te zbog toga male molekule preferiraju vezanje na DNA koje su bogate poli dA – poli dT slijedovima.<sup>1</sup>

Za ispitivanje nekovalentnih kompleksa koriste se razne eksperimentalne metode kao što su: promjena viskoziteta otopine DNA/RNA, promjena sedimentacijskog koeficijenta ili elektroforetske pokretljivosti cirkularne DNA, promjena temperature „mekšanja“ dvostruke uzvojnice nakon vezanja ispitivanog spoja, UV/Vis, <sup>1</sup>H NMR i fluorescencijska spektroskopija te cirkularni i linerani dikroizam.<sup>1</sup>

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

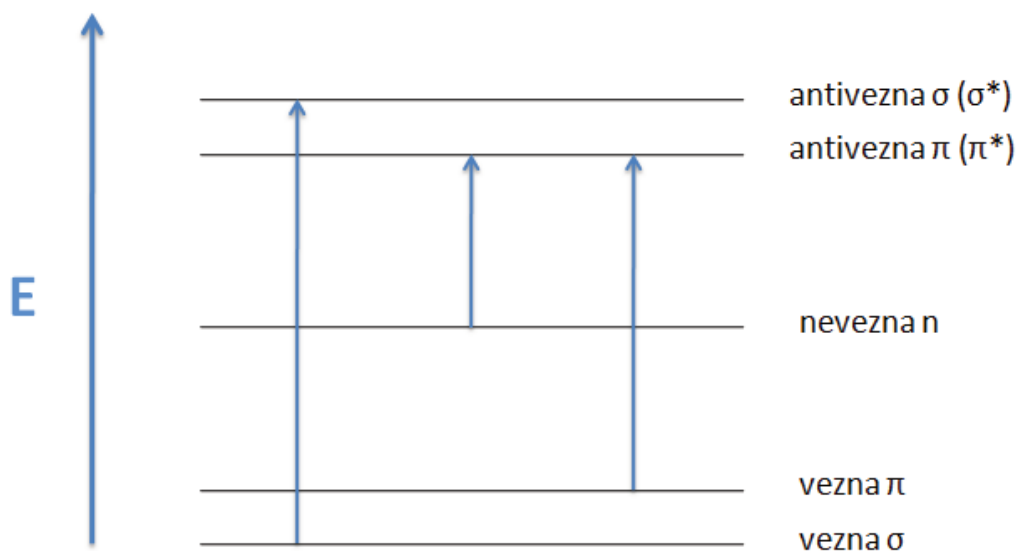
### 2.3.1. UV/Vis spektroskopija

Ultraljubičasta – vidljiva spektroskopija (*engl. ultraviolet – visible spectroscopy*, UV/Vis) jedna je od najčešće korištenih metoda za identifikaciju i određivanje brojnih organskih i anorganskih spojeva. Omogućuje određivanje molekulskih vrsta koje apsorbiraju ultraljubičasto ili vidljivo zračenje. UV/Vis spektroskopija je apsorpcijska spektroskopija kod koje uslijed pobude elektrona atoma ili molekula u području elektromagnetskog zračenja (100 – 400 nm za UV i 400 – 800 nm za Vis područje) dolazi do prijelaza elektrona iz osnovnog u pobuđeno elektronsko stanje. Prednosti ove metode su široka primjenjivost, velika osjetljivost, visoka selektivnost, točnost i jednostavnost.<sup>19</sup>

U apsorpcijskoj spektroskopiji mjeri se količina apsorbirane svjetlosti kao funkcija valne duljine. To može dati i kvalitativne i kvantitativne podatke o uzorku. Elektroni koji su

uključeni u dvostruke i trostruke veze organskih spojeva nisu tako snažno vezani te se zbog toga lakše pobuđuju. Nezasićene organske funkcionalne skupine koje apsorbiraju u UV/Vis dijelu elektromagnetskog spektra nazivaju se kromofori. Iako kromofori imaju karakteristične valne duljine na kojima apsorbiraju, konjugacija između dva ili više kromofora ima tendenciju pomicanja apsorpcijskih maksimuma koji se definiraju na sljedeći način: batokromni pomak je pojava pomicanja apsorpcijskih maksimuma prema većim valnim duljinama, a hipsokromni pomak je pomak prema manjim valnim duljinama. Ukoliko nekom promjenom uvjeta dolazi do povećanja intenziteta apsorpcije, riječ je o hiperkromnom efektu, dok je suprotni efekt hipokromni.<sup>19</sup>

Elektronski prijelazi mogu se klasificirati prema tipu orbitala čija se populacija mijenja prilikom apsorpcije zračenja. Što je lakše pobuditi elektrone (niži energetska razmak između molekularskih orbitala), to je veća valna duljina svjetlosti koju molekula apsorbira.



Slika 8. Tipovi orbitala kod molekula i elektronski prijelazi uzrokovani UV ili Vis zračenjem

Tijekom analize organskih molekula najviše se bavimo  $\pi$ - $\pi^*$  i  $n$ - $\pi^*$  prijelazima budući da upravo tim prijelazima odgovara energija UV/Vis zračenja. Prijelaz iz molekulske orbitale  $\sigma$  u  $\sigma^*$  je najteži te se odnosi na niže valno područje. Neće svi prijelazi između kvantnih razina biti mogući. Postoje selekcijska pravila koja govore o ograničenjima koja postoje tijekom interakcija elektromagnetskog zračenja i tvari.<sup>20</sup>

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

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

Što je veći broj molekula koje apsorbiraju zračenje, to je veća apsorpcija. Što molekula učinkovitije apsorbira zračenje pri određenoj valnoj duljini, to je apsorpcija veća. Iz ovoga proizlazi Beer-Lambertov zakon koji kaže da je apsorbancija proporcionalna koncentraciji apsorbirajuće tvari, dok je molarni apsorpcijski koeficijent  $\varepsilon$  fizikalna veličina koja opisuje iznos apsorpcije na određenoj valnoj duljini u određenom koncentracijskom rasponu. Beer-Lambertov zakon dan je jednadžbom:

$$A = \varepsilon cl$$

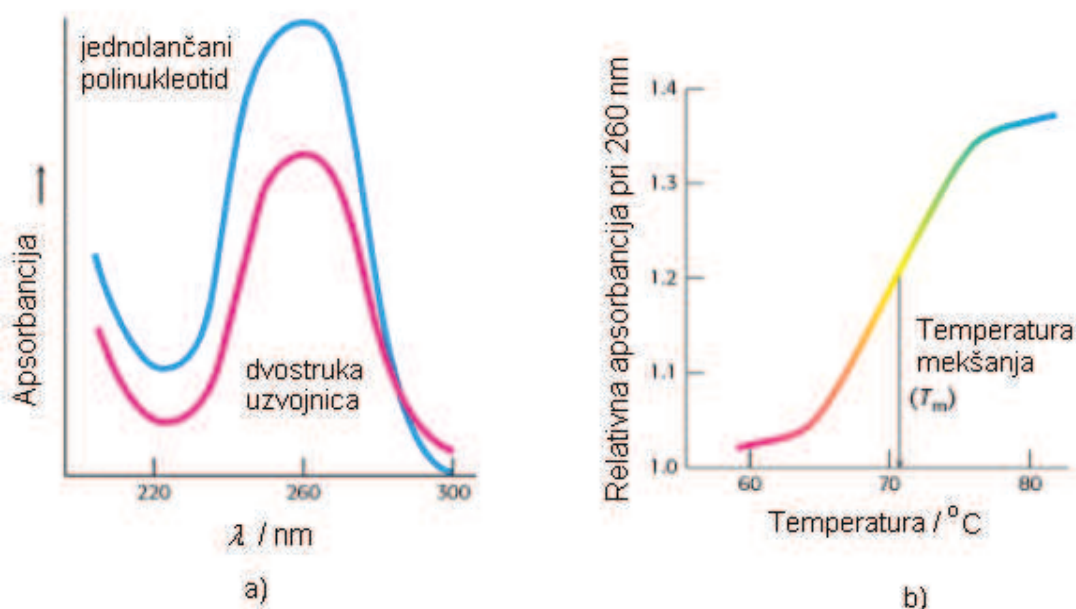
gdje je  $A$  apsorbancija pri određenoj valnoj duljini,  $c$  je molarna koncentracija otopine spoja ( $\text{mol dm}^{-3}$ ),  $l$  je duljina ćelije (cm), a  $\varepsilon$  je molarni apsorpcijski koeficijent ( $\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).<sup>19</sup>

### 2.3.2. Promjena temperature mekšanja nukleinskih kiselina

Dva se lanca u dvolančanoj uzvojnici DNA mogu razdvojiti ako se razore vodikove veze između parova baza. U laboratoriju se dvostruka uzvojnica DNA može razoriti grijanjem otopine DNA ili dodatkom kiseline ili lužine što dovodi do ionizacije baza. Razdvajanje dvostruke uzvojnice događa se pri određenoj temperaturi. Temperatura mekšanja ( $T_m$ ) definira se kao temperatura kod koje je pola strukture denaturirano i ona je karakteristična za svaki polinukleotid. Ova promjena je popraćena mjerljivim promjenama fizičkih svojstva otopine DNA. Primjerice, otopina native DNA je viskozna jer se ukočena zavojnica opire deformaciji, dok se nakon denaturacije viskoznost otopine bitno smanjuje, jer su odvojeni lanci puno savitljiviji.<sup>21</sup>

Denaturacijom molekule DNA mijenja se i njena apsorbancija. Dušikove baze apsorbiraju svjetlost u ultraljubičastom dijelu spektra. Nakon denaturacije one više nisu gusto složene strukture pa apsorbiraju oko 40% više svjetlosti na svim valnim duljinama u

ultraljubičastom dijelu spektra. Taj učinak denaturacije na apsorpcijski spektar naziva se hiperkromizam. Denaturacija zavojnice je kooperativan proces jer razdvajanje zavojnice na jednom mjestu jako destabilizira ostatak zavojnice i potiče daljnju denaturaciju.<sup>20</sup>



Slika 9. a) Hiperkromni efekt prilikom denaturacije DNA; b) Krivulja taljenja DNA<sup>22</sup>

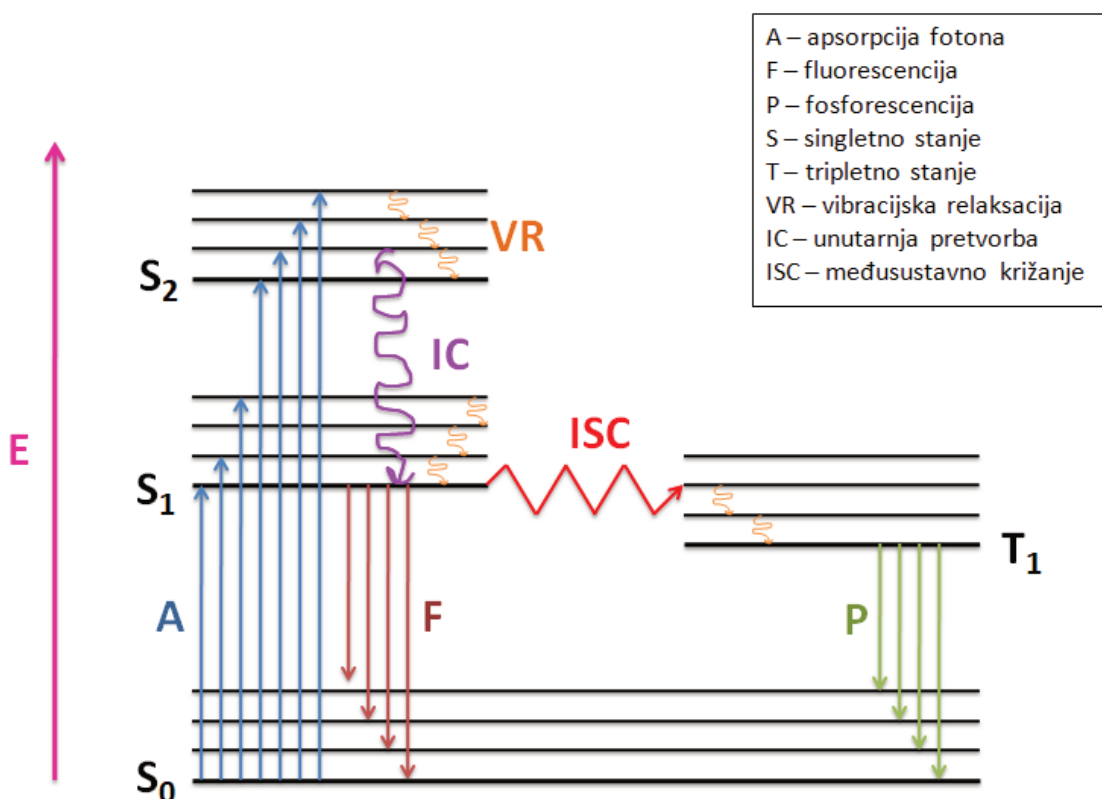
Čimbenici koji utječu na temperaturu mekšanja DNA su sastav baza, ionska jakost, vrijednost pH te molekule koje se vežu na DNA.<sup>23</sup> Budući da G - C parove baza povezuju tri vodikove veze, te su oni stabilniji od A - T parova baza, potrebna je viša temperatura kako bi se ti parovi baza denaturirali. Povećanjem ionske jakosti otopine, povećava se i dielektrična konstanta koja dovodi do smanjenja međusobnog odbijanja fosforilnih skupina što stabilizira zavojnicu. Bilo koja molekula koja može stvoriti vodikove veze s funkcionalnim skupinama baza u DNA može doprinijeti denaturaciji zavojnice. Da bi male molekule denaturirale zavojnicu DNA, moraju biti prisutne u velikim koncentracijama, jer je potrebno ostvariti prednost natječući se za vodikove veze s bazama drugog lanca DNA.

Nekovalentno vezanje malih molekula na dvolančane polinukleotide uzrokuje promjene u termičkoj stabilnosti polinukleotida, tj. u njihovim temperaturama mekšanja. Vezanje malih molekula na dvolančane polinukleotide može dovesti do stabilizacije (pozitivna vrijednost  $\Delta T_m$ ) ili do destabilizacije (negativna vrijednost  $\Delta T_m$ ) dvolančanog

polinukleotida. Interkalativni način vezanja stabilizira dvostruku uzvojnica, dok spojevi koje se vežu u utore mogu dati pozitivne ili negativne  $\Delta T_m$  vrijednosti.<sup>1</sup>

### 2.3.3. Fluorescencijska spektroskopija

Fluorescencijska spektroskopija ili fluorimetrija je tip elektromagnetske spektroskopije koja analizira fluorescenciju analita u uzorku. Elektroni u molekuli se ekscitiraju zrakom svjetlosti (najčešće UV) te se prati emisija svjetla nakon pobude (obično je emisija u vidljivom dijelu spektra). Fluorimetrija je komplementarna metoda UV/Vis spektroskopiji. U fluorescencijskoj spektroskopiji kemijska vrsta se pobuđuje apsorbirajući foton iz svojeg osnovnog elektronskog stanja u različita vibracijska stanja u ekscitiranom elektronskom stanju. Sudari s drugim molekulama mogu utjecati na to da molekula izgubi vibracijsku energiju dok ne dosegne najniže vibracijsko stanje unutar ekscitiranog elektronskog stanja. Ovi procesi vizualiziraju se prema dijagramu po Jablonskom (Slika 10.).<sup>24</sup>



Slika 10. Dijagram po Jablonskom

Struktura većine molekula omogućava vibracijsku relaksaciju i unutarnju pretvorbu tijekom kojih pobuđene molekule pri povratku u osnovno stanje gube energiju bez emisije zračenja. Deaktivacijski proces u kojem pri prijelazu između stanja istog multipliciteta molekula emitira zračenje naziva se fluorescencija, dok pri prijelazu iz tripletnog u osnovno stanje govorimo o fosforescenciji. Učestalost unutarnje pretvorbe razlog je što se fluorescencija javlja pri samo jednoj valnoj duljini, odnosno samo iz prvog pobuđenog elektronskog stanja, neovisno o valnoj duljini pobude. Zbog pojave zvane Stokesov pomak, sve linije emisijskog zračenja imaju nešto veću valnu duljinu i manju energiju od pobudnih linija.<sup>24</sup>

Fluorescencijska spektroskopija koristi se u biokemijskim, medicinskim i kemijskim istraživanjima. Problem s primjenjivosti ove metode je da molekula mora fluorescirati te je zato njezina upotreba jako ograničena. Međutim, kada je primjenjiva, ova metoda je veoma osjetljiva.

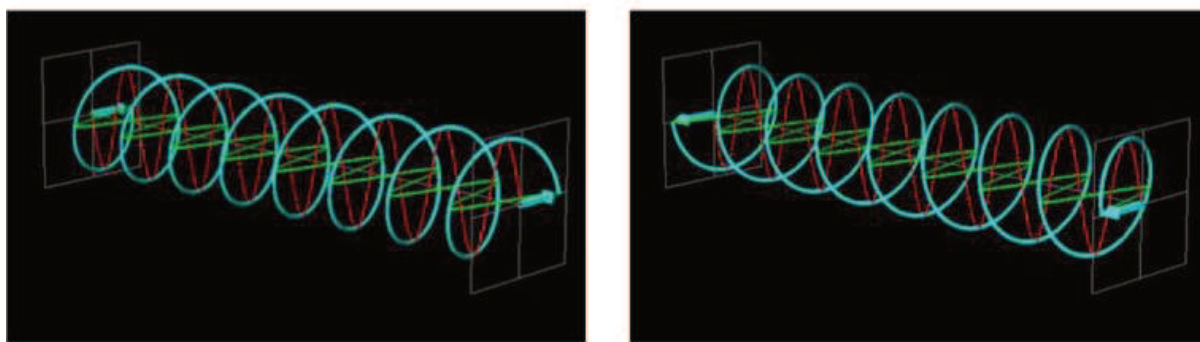
Jedna od eksperimentalnih metoda koja se koristi kako bi se provjerilo veže li se spoj na polinukleotid je fluorimetrijska titracija. Ovaj se eksperiment može provoditi samo ako barem jedan od reaktanta ima fluorescencijski spektar u eksperimentalnim uvjetima. Vezanje molekule na polinukleotid može dovesti do porasta kao i do gašenja fluorescencije. U slobodnoj maloj molekuli cijanina moguća je rotacija te se procesom vibracijske relaksacije gubi apsorbirana energija, a posljedica toga je mali ili nikakav intenzitet fluorescencije. Vezanjem na polinukleotid dolazi do strukturnih promjena koje zakoče rotaciju i ukrate strukturu što značajno povećava intenzitet fluorescencije.<sup>25</sup>

Podatci dobiveni iz fluorometrijskih titracija koriste se za izračunavanje konstanti stabilnosti spojeva te za određivanje gustoće vezanja spoja, odnosno omjera koncentracije vezanog spoja i koncentracije polinukleotida. Kako bi se mogla izračunati konstanta stabilnosti, vezanje spoja na polinukleotid mora biti ravnotežno te spektroskopske promjene moraju biti dovoljno velike.<sup>1</sup> Za računanje konstanti stabilnosti koristi se Scatchardova jednadžba.<sup>26,27</sup>

#### 2.3.4. Cirkularni dikroizam

Cirkularni dikroizam je spektroskopska metoda koja otkriva informacije o kiralnosti molekule. Daje podatke o kiralnim vrstama u otopini koje apsorbiraju svjetlost u UV/Vis području tijekom prijelaza iz osnovnog u jedno ili više pobuđenih stanja. CD se oslanja na razliku u apsorpciji između lijeve i desne kružno polarizirane svjetlosti.<sup>28</sup>

Polarizirana svjetlost je ona vrsta svjetlosti kod koje elektromagnetski valovi titraju u samo jednoj ravnini. Pojava nesimetričnog titranja električnog i magnetskog polja koje tijekom širenja čini svjetlost naziva se polarizacija svjetlosti. Svjetlost može biti linearno i cirkularno polarizirana. Ako električno polje konstantno titra u istoj ravnini radi se o linearno polariziranoj svjetlosti, dok se kod cirkularno polarizirane svjetlosti ravnina titranja električnog polja jednoliko vrti. Ovisno o tome okreće li se ravnina titranja električnog polja u smjeru kazaljke na satu ili u suprotnom smjeru, razlikujemo lijevu i desnu polariziranu svjetlost (slika 11). Takva svjetlost je kiralna pa će i kiralne molekule različito apsorbirati lijevo i desno cirkularno polariziranu svjetlost.



Slika 11. Lijevo, cirkularno polarizirana svjetlost (lijevo) i desno, cirkularno polarizirana svjetlost (desno) u CD spektroskopiji<sup>29</sup>

Nukleinske kiseline, kao i mnoge druge biološke molekule su kiralne i kromoforne. Jedna od najčešće korištenih metoda u karakterizaciji sekundarne strukture DNA i RNA je spektroskopija cirkularnog dikroizma. Budući da su polinukleotidi najčešće desne zavojnice, promjene njihove konformacije mogu se pratiti na ovaj način.<sup>28</sup>

Spektar cirkularnog dikroizma prikazuje se kao funkcija molarne eliptičnosti [mdeg] u ovisnosti o valnoj duljini. Na određenoj valnoj duljini postoji razlika između apsorpcije lijeve i desne cirkularno polarizirane svjetlosti:

$$\Delta A = A_L - A_D$$

Primjermom Beer-Lambertovog zakona dobije se sljedeći izraz:

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

gdje su  $\varepsilon_L$  i  $\varepsilon_D$  molarni apsorpcijski koeficijenti za lijevu, odnosno desnu cirkularno polariziranu svjetlost,  $c$  je molarna koncentracija, a  $l$  je dužina optičkog puta.

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

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

Simetrične molekule nemaju CD spektar jer jednako apsorbiraju i lijevo i desno polariziranu svjetlost. Kiralne molekule imaju CD signal u području u kojem se javlja njihova apsorpcijska vrpca. Iako akiralne molekule nemaju svoj CD signal, vezanjem na polinukleotid može doći do stvaranja induciranog signala cirkularnog dikroizma (skraćeno ICD). Uočeno je da se ICD signali pojavljuju pri valnim duljinama na kojima se nalaze apsorpcijski maksimumi kromofora male molekule.<sup>31</sup>

Prilikom CD titracija polinukleotida s malim molekulama prate se promjene CD spektra polinukleotida u rasponu valnih duljina od 200 do 300 nm gdje apsorbiraju DNA i RNA te promjene u spektrima na valnim duljinama iznad 300 nm gdje se pojavljuje CD spektar malih molekula ukoliko su molekule kiralne, te eventualni inducirani CD spektar (ICD) nekiralnih malih molekula. Promjene koje se događaju između 200 i 300 nm povezuju se sa specifičnim promjenama u sekundarnoj strukturi polinukleotida što je posljedica kiralnosti fosfatno-šećerne okosnice.<sup>30</sup> Kod promjena CD spektra iznad 300 nm interpretacija rezultata je jednostavnija jer tu ne apsorbiraju DNA i RNA, te se samo prate promjene spektra male molekule.<sup>28</sup>

Prema jačini ICD signala može se zaključiti o kojem tipu interakcije spoja i polinukleotida se radi. Slabi negativni ili pozitivni ICD signali upućuju na interkaliranje, dok jači ICD signali upućuju da se spoj vezao u mali utor polinukleotida.<sup>31</sup> Ovisno o predznaku ICD signala, može se zaključiti koja je orijentacija male molekule. Nadalje, tzv. bisignatni signali (pozitivni i negativni signal) obično upućuju na vezanje dimera spoja u utor polinukleotida.



## 2.4. Konfokalna mikroskopija

Konfokalna mikroskopija je tehnika optičkog snimanja koja se obično koristi za povećanje optičke razlučivosti i kontrasta slike. Rutinski problem koji se susreće kod snimanja trodimenzionalnih bioloških uzoraka sa složenim svjetlosnim ili fluorescentnim mikroskopima je taj što se svjetlost snima u više žarišta kako bi se stvorila jednodimenzionalna slika. To može rezultirati izobličenjem slike i gubitkom razlučivosti, ako je uzorak dovoljno gust. Za razliku od njih, konfokalna mikroskopija fokusira svjetlost na jednu točku unutar definirane žarišne ravnine, eliminirajući svjetlosni šum iz drugih ploha. Točno skeniranje omogućuje snimanje dvodimenzionalne slike. Ukoliko je svjetlost uzastopno uhvaćena i s drugih ploha, može se upotrijebiti za rekonstrukciju trodimenzionalne slike uzorka. Laserski skenirajuća mikroskopija jedna je od najčešće korištenih konfokalnih tehnika i može serijski prikazati uzorak pomoću različitih linija laserskih pobuda i filtera za emisije, olakšavajući detaljno, stanično, fluorescentno snimanje unutar pojedinih stanica. Puna slika u konfokalnom mikroskopu konstruirana je sukcesivnim skeniranjem malih dijelova uzorka. Akumulacija informacija dolazi uz pomoć posebnih fotodetektora, a kao izvori svjetlosti koji osvjetljavaju uzorak naširoko se koriste laseri s visokim intenzitetom i monokromatskim (jednom valnom duljinom) zračenjem. Stoga se takvi uređaji često nazivaju konfokalni mikroskopi za skeniranje laserom. Kao rezultat toga, kontrast dobivenih slika je puno veći nego u slučaju optičke mikroskopije. Računala se koriste za upravljanje cjelokupnim sustavom, oblikovanje i pohranjivanje slika i obradu rezultata.

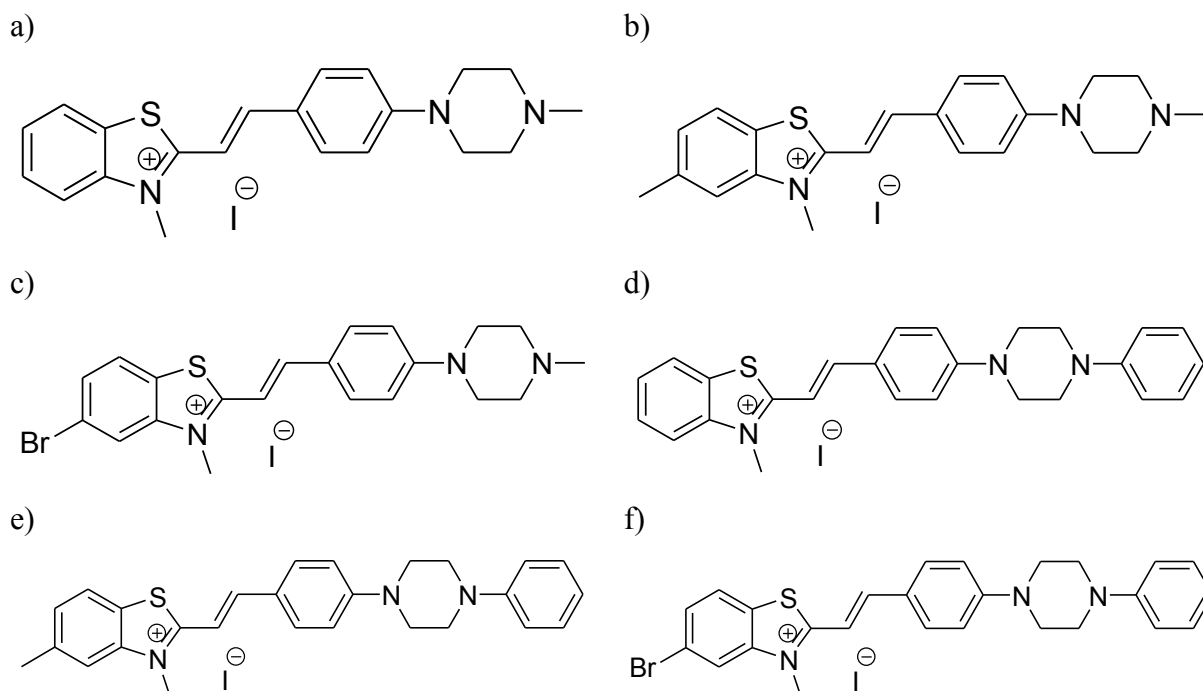


## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Kemikalije

Spojevi: 3-metil-2-[(*E*)-2-[4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil]etenil]-1,3-benzotiazol-3-ijev jodid (simbol: KI73A), 3,5-dimetil-2-[(*E*)-2-[4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil]etenil]-1,3-benzotiazol-3-ijev jodid (simbol: KI73B), 5-brom-3-metil-2-[(*E*)-2-[4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil]etenil]-1,3-benzotiazol-3-ijev jodid (simbol: KI73C), 3-metil-2-[(*E*)-2-[4-(4-fenilpiperazin-1-il)fenil]etenil]-1,3-benzotiazol-3-ijev jodid (simbol: BN73A), 3,5-dimetil-2-[(*E*)-2-[4-(4-fenilpiperazin-1-il)fenil]etenil]-1,3-benzotiazol-3-ijev jodid (simbol: BN73B) i 5-brom-3-metil-2-[(*E*)-2-[4-(4-fenilpiperazin-1-il)fenil]etenil]-1,3-benzotiazol-3-ijev jodid (simbol: BN73C) su praškaste krutine. Spojevi serije KI73 su narančasto-crvene boje, dok su spojevi BN73 serije ljubičaste boje. Spojevi su sintetizirani u grupi koju vodi dr. sc. A. Vasilev, Department of Pharmaceutical and Applied Organic Chemistry, Faculty of Chemistry and Pharmacy, Sofia University „St. Kliment Ohridski“. Strukturne formule spojeva prikazane su na slici 13.



Slika 13. Strukturne formule spojeva korištenih u radu; a) KI73A, b) KI73B, c) KI73C, d) BN73A, e) BN73B i f) BN73C

Spojevi KI73A i KI73B otopljeni su u redestiliranoj vodi uz primjenu ultrazvučne kupelji, dok su spojevi KI73C te spojevi BN73 serije slabo topivi u vodi te su otopljeni u dimetil-sulfoksidu uz primjenu ultrazvučne kupelji. Volumni udio DMSO-a prilikom mjerenja nije prelazio 1%. Pripremljene su otopine spojeva koncentracije  $1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ . Sve otopine čuvane su u hladnjaku na  $8^\circ\text{C}$  i stabilne su tijekom nekoliko tjedana.

Tijekom istraživanja korišten je kakodilatni pufer. Prilikom istraživanja spojeva KI73 serije korišten je kakodilatni pufer pH 5,00 ( $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ), dok je prilikom istraživanja spojeva BN73 serije korišten kakodilatni pufer pH 7,08 ( $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ). Kakodilatni pufer pripremljen je miješanjem vodene otopine natrijevog kakodilata i kloridne kiseline, a konačni pH podešen je pomoću pH-metra.

Polinukleotidi korišteni u radu (*calif thymus* DNA, poli A – poli U, poli dA – poli dT, poli dAdT – poli dAdT i poli dGdC – poli dGdC) kupljeni su (Sigma Aldrich, SAD) i otopljeni prema uputi proizvođača u kakodilatnom puferu (pH = 7,0,  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ). Konačna koncentracija polinukleotida određena je spektrofotometrijskim mjerenjem apsorbancije pri određenoj valnoj duljini, a izražena je kao koncentracija fosfata.<sup>34,35</sup> Otopine polinukleotida čuvane su u hladnjaku na  $-18^\circ\text{C}$ .

### 3.1.2. Uređaji

Za mjerenja UV-Vis zračenja korišten je spektrometar UV/Vis Varian Cary 100 Bio. Korištene su kvarcne kivete od 1 cm<sup>3</sup> s optičkim putem od 1 cm.

Fluorimetrijske titracije rađene su na instrumentu Agilent Cary Eclipse. Korištene su kvarcne kivete od 3 cm<sup>3</sup> s optičkim putem od 1 cm. Prilikom fluorimetrijskih titracija korišten je program Scan.

Mjerenja spektroskopije cirkularnog dikroizma provedena su na JASCO J-815 CD spektrometru. Ovisno o kombinaciji ispitivanog spoja i polinukleotida, korištena je visoka ili standardna osjetljivost detektora. Brzina skeniranja za sve spojeve iznosila je 200 nm min<sup>-1</sup>.

Za vizualizaciju fluorescentnih kompleksa cijaninskih boja i DNA/RNA unutar stanice korišten je konfokalni mikroskop Leica SP8 X FLIM.

## 3.2. Spektroskopska karakterizacija otopina ispitivanih spojeva

Za izradu baždarnog pravca za dobivanje molarnih ekstincijskih koeficijenata korišten je UV/Vis spektrometar. Korišten je program Scan. Ovisno o ispitivanom spoju korišten je odgovarajući kakodilatni pufer. U kvarcnu kivetu (optičkog puta 1 cm) stavljen je 1 mL odgovarajućeg pufera ( $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ), snimljena je apsorbancija pufera, tj. bazna linija te su zatim dodavani alikvoti otopine spoja. Mjerenja su provedena pri temperaturi od 25°C. Mjerenja su provedena u rasponu valnih duljina: 220 (tj. 240) – 650 (tj. 700) nm te koncentracijskom području spojeva od cca  $5 \times 10^{-6}$  do  $2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ . Svi dobiveni podaci obrađeni su u program OriginPro 7.5.

Za određivanje termičke stabilnosti snimljeni su UV/Vis spektri ispitivanih spojeva (koncentracija spojeva bila je između  $1 - 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri temperaturama 25, 30, 40, 50, 60, 70 i 80°C u kvarcnoj kiveti od 1 cm<sup>3</sup>, optičkog puta od 1 cm. Nakon hlađenja ponovno je snimljen UV/Vis spektar pri 25°C. Korišten je program Scan, a dobiveni podaci obrađeni su u programu OriginPro 7.5.

Za ispitivanje fluorescencije spojeva korišten je program Scan na instrumentu Agilent Cary Eclipse. U kvarcnu kivetu optičkog puta 1 cm, pipetirano je 2 mL odgovarajućeg pufera (za seriju spojeva KI73 kakodilatni pufer pH 5,00, a za BN73 seriju spojeva kakodilatni pufer pH 7,08) te je snimljen spektar pufera. Uzorak se prvo pobuđivao na valnoj duljini

maksimuma iz UV/Vis spektra. Nakon što je snimljen emisijski spektar, očitana je maksimum. Ekscitacijski spektar snimljen je pri valnoj duljini očitana maksimuma.

### 3.3. Istraživanje interakcija spojeva s polinukleotidima

#### 3.3.1. Fluorimetrijske titracije

Sve fluorimetrijske titracije rađene su na instrumentu Agilent Cary Eclipse. U kvarcnu kivetu duljine optičkog puta 1 cm stavljeno je 2 mL odgovarajućeg kakodilatnog pufera (za seriju spojeva KI73 kakodilatni pufer pH 5,00, a za BN73 seriju spojeva kakodilatni pufer pH 7,08) te se snimi spektar pufera. Uzorak se pobuđuje na valnoj duljini maksimuma iz UV/Vis spektra. Izračuna se potrebna količina otopine ispitivanog spoja kako bi početna koncentracija spoja u kiveti bila  $3/4/6 \times 10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup>. Također, izračuna se potreban alikvot kako bi početna koncentracija polinukleotida iznosila  $5 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>. Alikvoti polinukleotida (2 – 100 µL) dodavani su dok se ne postigne zasićenje. Vrijeme inkubacije između svakog mjerenja je iznosilo 2 - 4 minute. Za svako mjerenje rađena je i kontrola vremena inkubacije na način da se je nakon šestog dodatka alikvota snimio spektar nakon 2 minute te ponovno nakon 10 minuta. Spektri su snimani u rasponu valnih duljina od 470 (tj. 500) do 650 (tj. 700) nm. Spojevi su pobuđeni pri valnoj duljini maksimuma apsorpcije u vidljivom dijelu spektra (442 – 508 nm). Dobiveni podaci obrađeni su u programu OriginPro 7.5 i računati pomoću Scatchardove jednadžbe.<sup>26,27</sup>

Sa spojevima BN73B i BN73C nisu napravljene fluorimetrijske titracije sa polinukleotidima poli dA – poli dT i poli dGdC – poli dGdC jer su promjene fluorescencije prilikom titracija s ostalim polinukleotidima bile zanemarivo male. Prilikom računanja konstanti stabilnosti za spojeve BN73 serije, linije su korigirane na način da je od svih podataka oduzet pufer.

#### 3.3.2. Temperaturno mekšanje

Molekula DNA je biopolimer koji se sastoji od dva polinukleotidna lanca i pri fiziološkim uvjetima postoji kao dvostruka zavojnica. Lanci DNA međusobno su povezani vodikovim vezama koje nastaju između adenina i timina (dvije veze), između gvanina i citozina (tri veze) i Van der Waalsovih interakcijama između dušikovih baza usporedno s osi zavojnice.

Promjenom temperature dolazi do denaturacije DNA. Denaturacija se prati mjerenjem apsorbancije dušikovih baza u ultraljubičastom dijelu spektra u ovisnosti o temperaturi. Denaturacijom DNA baze postaju slobodnije i pokretnije, više apsorbiraju UV zračenje te dolazi do povećanja apsorbancije za otprilike 40% na svim valnim duljinama u UV području. Ta pojava naziva se hiperkromizam.

Temperature mekšanja određene su korištenjem programa Thermal na UV/Vis spektrofotometru Varian Cary 100 Bio. U svaku kvarcnu kivetu, optičkog puta od 1 cm, stavljen je 1 mL odgovarajućeg kakovitnog pufera. U programu Advanced Read očitana je apsorbancija pufera te zatim apsorbancija pufera s polinukleotidom. Dobivene vrijednosti unesene su u program OriginPro 7.5. i izračunati su potrebni alikvoti spojeva. U programu Thermal namjeste se postavke snimanja: mjeri se apsorbancija pri 260 nm, temperatura se povećava brzinom 1°C / minuti. Mjerenje se provodi u rasponu od 25 do 95°C. Kako polinukleotid poli dGdC – poli dGdC ima temperaturu mekšanja veću od 95°C, izostavljen je iz mjerenja. Podaci se spremaju u ASCII formatu. Sva se mjerenja rade u duplikatu. U dvije kivete ostaju samo pufer i polinukleotid, dok se u ostale kivete dodaju spojevi u omjeru  $r$  [ispitivani spoj]/[polinukleotid] = 0,3.

Rezultati se prikazuju grafički u programu OriginPro 7.5. Kao rezultat se dobiju krivulje sigmoidalnog oblika. Svaka krivulja je normalizirana, a temperature mekšanja određene su očitavanjem točki maksimuma prve derivacije sigmoidalnih krivulja. Sve temperature mekšanja su prosjek dvaju mjerenja.

### 3.3.3. Cirkularni dikroizam

Sve CD titracije provedene su na JASCO J-815 CD spektrometru. Paralelno sa CD spektrima, istovremeno su snimani i UV/Vis spektri. Brzina skeniranja spektra iznosila je 200 nm min<sup>-1</sup>. Mjerenja su provedena u kvarcnim fluorimetrijskim/CD kivetama duljine optičkog puta 1 cm. Titracije su provedene tako da su u otopinu polinukleotida dodavani alikvoti ispitivanog spoja. Od svakog spektra oduzet je spektar prethodno snimljenog pufera. Promjena cirkularnog dikroizma kod spojeva KI73A s polinukleotidom poli A – poli U i spoja BN73A s polinukleotidom poli dA – poli dT praćena je pri standardnoj osjetljivosti detektora, dok je kod svih ostalih spojeva i polinukleotida osjetljivost detektora bila visoka. Za svaki spektar rađene su dvije akumulacije, osim za spoj KI73B s polinukleotidom poli dAdT – poli dAdT gdje su snimane tri akumulacije. CD spektri su snimani pri sljedećim valnim duljinama: spoj

KI73A 600 – 220 nm (osim u slučaju sa polinukleotidom poli dA – poli dT 600 – 230 nm), spoj KI73B 600 – 230 nm, te svi ostali spojevi 650 – 240 nm. Prilikom mjerenja prati se CD spektar polinukleotida i eventualno pojavljivanje induciranih CD spektara spoja. Sami spojevi su akiralni te nemaju intrinzični CD spektar. Svi dobiveni podaci su obrađeni u programu OriginPro 7.5.

### 3.4. Konfokalna mikroskopija

Učinak monometinskih cijaninskih derivata ispitan je na humanim tumorskim stanicama karcinoma vrata grlića maternice HeLa. Na dan 0, HeLa stanice u koncentraciji  $1 \times 10^4$  stanica/mL nasadene su na petrijeve zdjelice sa staklenim dnom (MatTek corp., SAD). Stanice su inkubirane kroz 24 sata pri 100% vlažnosti, 5% CO<sub>2</sub> i 37°C. Spojevi koncentracije  $1 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup> sljedeći su dan dodani u tako uzgojene stanice, a zatim je uslijedila dodatna inkubacija od dva sata. Stanice su analizirane pomoću konfokalnog mikroskopa Leica SP8 X FLIM uz pobudu  $\lambda_{exc} = 496$  nm i emisijski filter  $\lambda_{em} = 520 - 600$  nm. Lucija Horvat i dr. sc. Ivo Crnolatac napravili su eksperimentalni dio i obradu slika dobivenih konfokalnom mikroskopijom.



## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

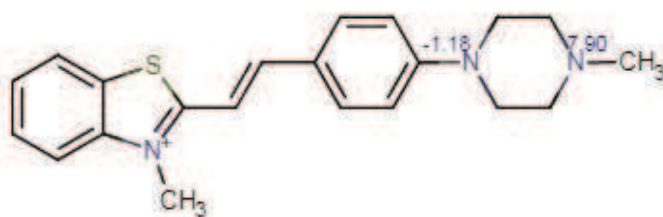
### 4.1. Cilj istraživanja

Cilj istraživanja i ovog rada bio je okarakterizirati šest novosintetiziranih spojeva: 3-metil-2-[(*E*)-2-[4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil]etenil]-1,3-benzotiazol-3-ijev jodid (simbol: KI73A), 3,5-dimetil-2-[(*E*)-2-[4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil]etenil]-1,3-benzotiazol-3-ijev jodid (simbol: KI73B), 5-brom-3-metil-2-[(*E*)-2-[4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil]etenil]-1,3-benzotiazol-3-ijev jodid (simbol: KI73C), 3-metil-2-[(*E*)-2-[4-(4-fenilpiperazin-1-il)fenil]etenil]-1,3-benzotiazol-3-ijev jodid (simbol: BN73A), 3,5-dimetil-2-[(*E*)-2-[4-(4-fenilpiperazin-1-il)fenil]etenil]-1,3-benzotiazol-3-ijev jodid (simbol: BN73B) i 5-brom-3-metil-2-[(*E*)-2-[4-(4-fenilpiperazin-1-il)fenil]etenil]-1,3-benzotiazol-3-ijev jodid (simbol: BN73C). Također, ispitivale su se i interakcije spojeva sa prirodnom DNA i sa sintetskim dvolančanim polinukleotidima spektroskopskim metodama u vodenim otopinama te biološki utjecaj ispitivanih spojeva na humane tumorske stanice karcinoma vrata grlića maternice.

#### 4.1.1. pH ovisnost spojeva

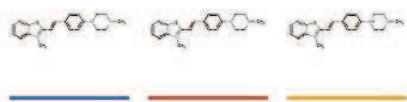
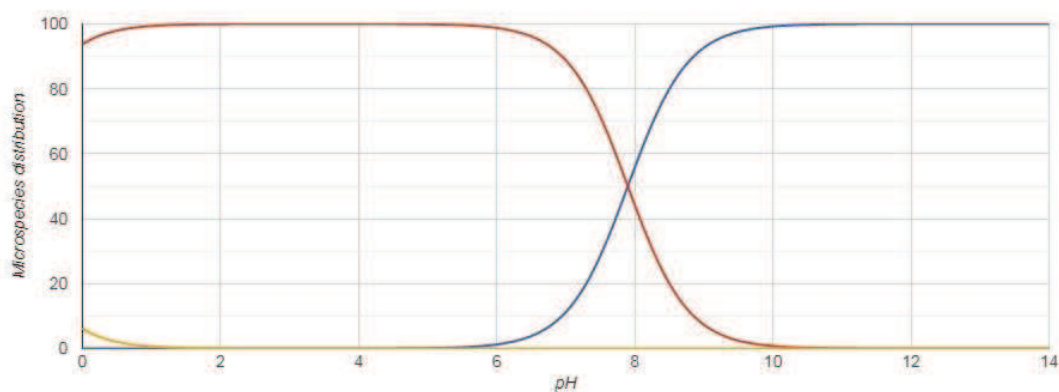
KI73 serija spojeva na pH 5,00 nalazi se u protoniranom obliku u veoma velikom postotku, a pKa metilpiperazinske skupine je 7,9. Zbog toga je KI73 serija spojeva mjerena pri pH 5,00 kako bi se osiguralo da molekule spoja budu u protoniranoj formi i da se izbjegne smjesa protoniranog / deprotoniranog oblika. Nadalje, protoniranje osigurava dodatni pozitivni naboj te povećava vjerojatnost vezanja spojeva na DNA/RNA. S druge strane, BN73 serija ima pKa vrijednost fenilpiperazinske skupine 3,6 te su zbog toga BN73 spojevi deprotonirani na pH 5,00, kao i na fiziološkom pH 7,00. Stoga je BN73 serija spojeva mjerena pri fiziološkoj vrijednosti pH 7,00, kako bi se kasnije moglo korelirati rezultate ispitivanja interakcija s DNA/RNA s budućim ispitivanjima biološke aktivnosti spojeva.

Izračuni pKa vrijednosti napravljeni su pomoću ChemAxon izračuna u on-line softverskom programu MarvinSketch. Na slikama 15 i 17 prikazane su distribucije protonirane i deprotonirane forme za KI73A i BN73A spojeve.

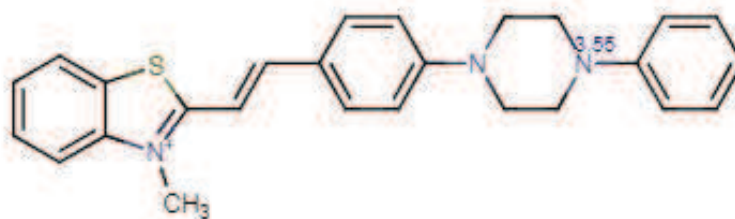


Strongest basic pKa 7.9

Slika 14. Izračun pKa vrijednosti spoja KI73A koristeći alat ChemAxon u program MarvinSketch<sup>36</sup>

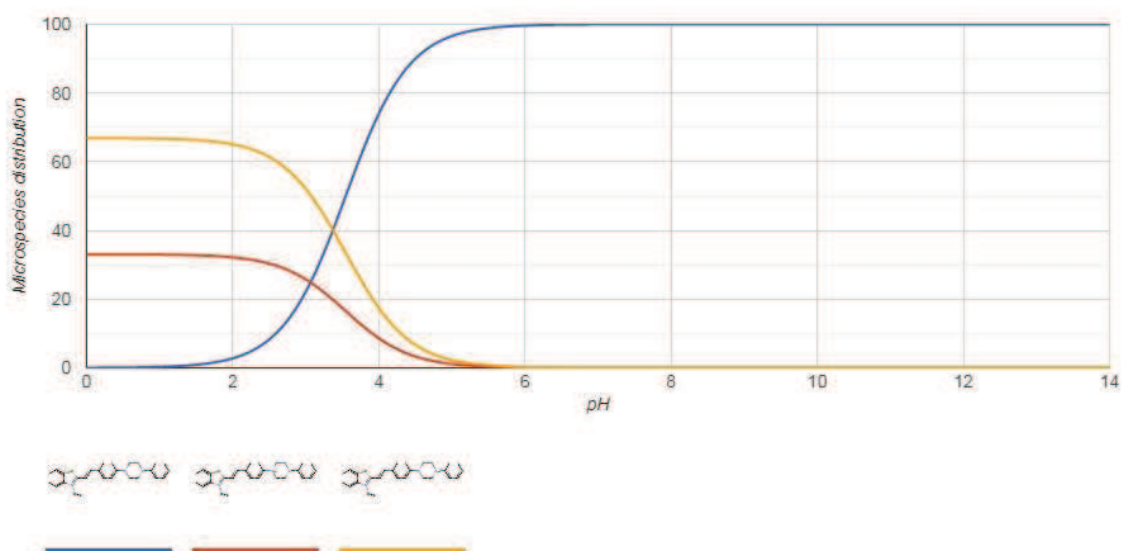


Slika 15. Distribucija protonirane i deprotonirane forme spoja KI73A napravljena koristeći alat ChemAxon u program MarvinSketch<sup>36</sup>



Strongest basic pKa 3.55

Slika 16. Izračun pKa vrijednosti spoja BN73A koristeći alat ChemAxon u program MarvinSketch<sup>36</sup>



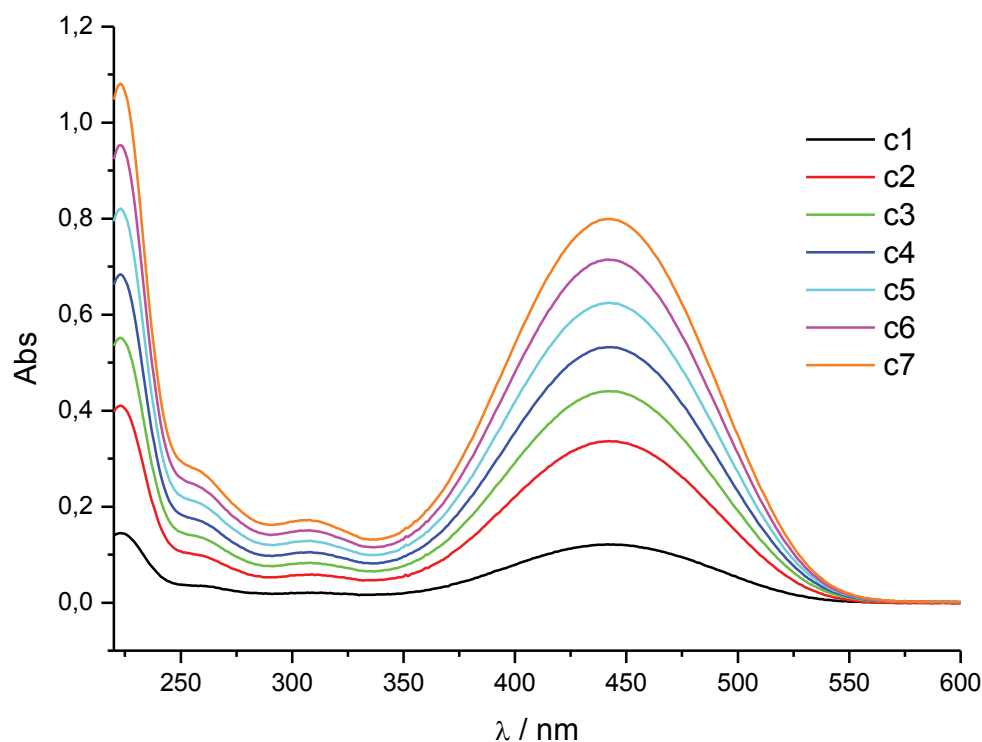
Slika 17. Distribucija protonirane i deprotonirane forme spoja BN73A napravljena koristeći alat ChemAxon u program MarvinSketch<sup>36</sup>

## 4.2. Spektrofotometrijska karakterizacija spojeva

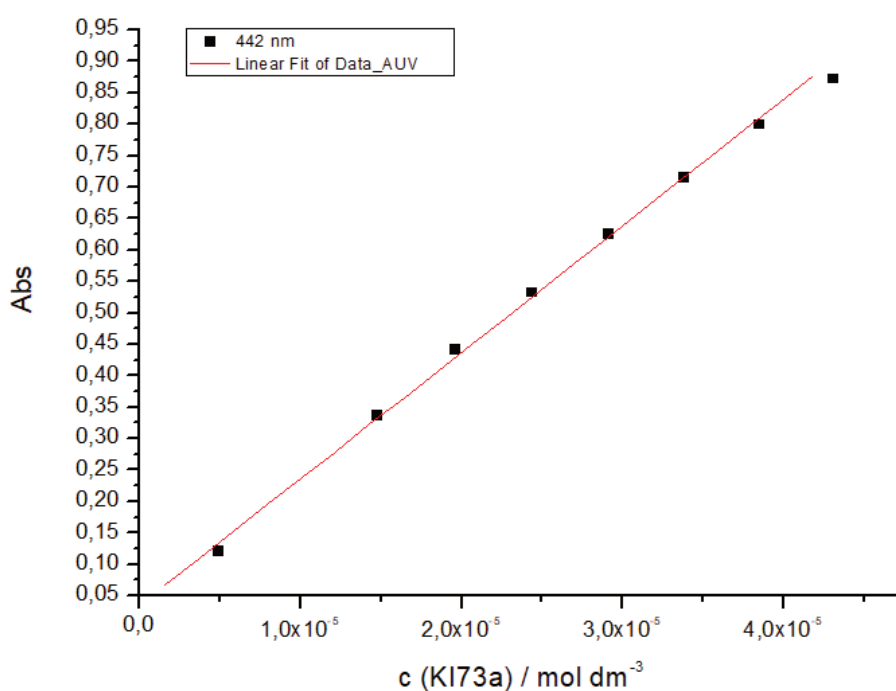
### 4.2.1. UV/Vis spektroskopija

U sklopu ovog rada pripravljene su puferirane otopine svih spojeva različitih koncentracija te su snimljeni UV/Vis spektri. Spektri su snimljeni prema opisu iz poglavlja 3.2. Kod svih spojeva došlo je do linearnog povećanja apsorbancije zračenja povećanjem koncentracije spoja do koncentracije spoja [ $1 - 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ] što odgovara Beer-Lambertovom zakonu.

Svi spektri imaju maksimum apsorbancije u vidljivom dijelu spektra za koje su određeni molarni ekstincijski koeficijenti koji su dani u Tablici 4. Svi UV/Vis spektri prikazani su kao ovisnost apsorbancije o valnoj duljini.



Slika 18. UV/Vis spektar spoja KI73A u rasponu koncentracija  $4,97 \times 10^{-6} - 4,31 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  pri pH 5,00, u kakodilatnom puferu  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



Slika 19. Ovisnost apsorbancije spoja KI73A o koncentraciji pri 442 nm

Tablica 2. Molarni ekstincijski koeficijenti ( $\epsilon$ ) ispitivanih spojeva

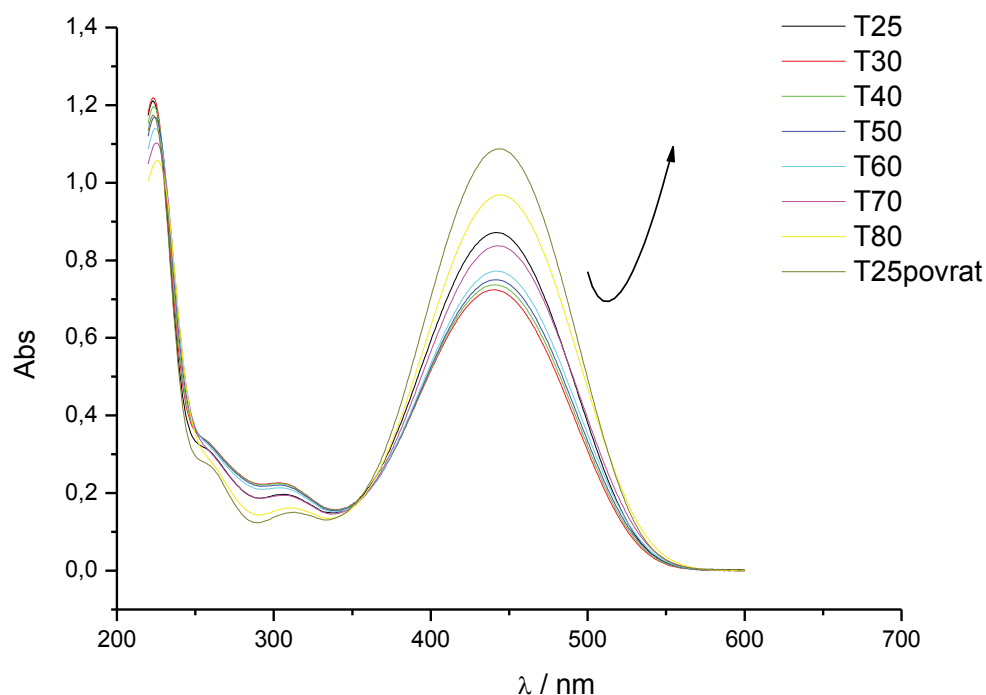
spoj	$\lambda_{\max}$ / nm	$\epsilon$ / mmol <sup>-1</sup> cm <sup>2</sup>
KI73A	442	20188
KI73B	442	23075
KI73C	458	34230
BN73A	456	23033
BN73B	480	18554
BN73C	508	22148

Molarni ekstincijski koeficijenti ispitivanih spojeva su slični i istog reda veličine.

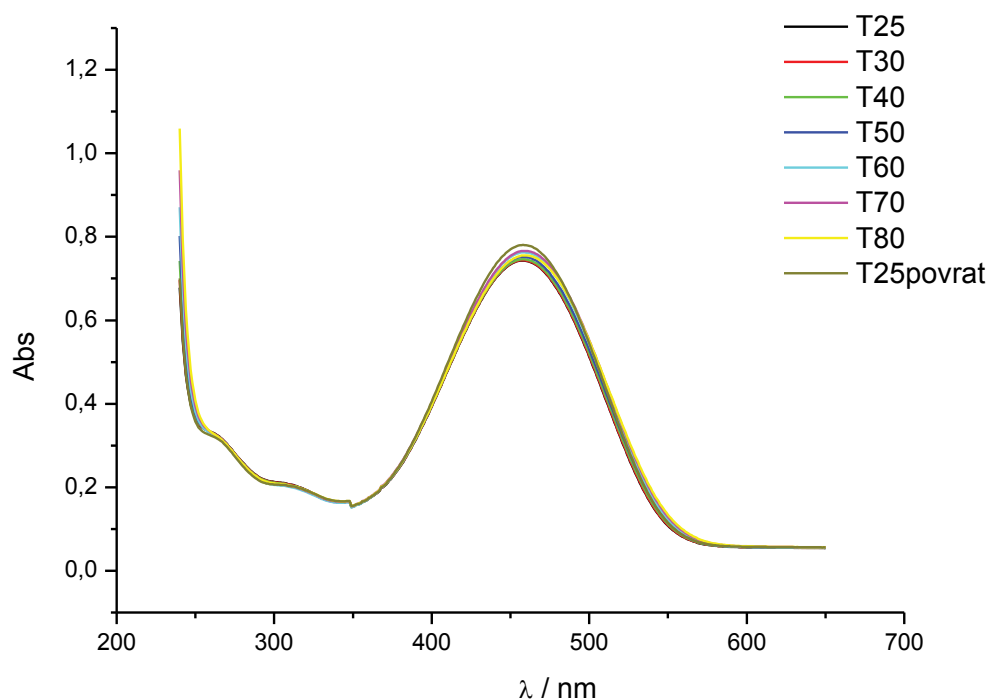
#### 4.2.2. Temperaturna stabilnost vodenih otopina spojeva

Nakon snimljenih UV/Vis spektara svih spojeva, provjerena je i termička stabilnost samih spojeva na način koji je opisan u poglavlju 3.2. Kod spojeva KI73A i KI73B dolazi do

povećanja apsorbancije zračenja povećanjem temperature. Hlađenjem na 25°C i ponovnim snimanjem UV/Vis spektra, ovi spojevi imaju veću apsorbanciju zračenja u odnosu na prvu apsorbanciju zračenja prije zagrijavanja uzorka. Na apsorbanciju spoja KI73C promjena temperature nema utjecaja. Povećanje temperature ne dovodi do povećanja apsorbancije zračenja kod spojeva BN73A i BN73B već samo do blagog batokromnog pomaka apsorpcijskog maksimuma. Kod spoja BN73C prati se apsorbancija na dva maksimuma: na 340 i 508 nm. Pri 340 nm, tijekom zagrijavanja od 25°C do 80°C i zatim hlađenja do 25°C dolazi do stalnog porasta apsorbancije zračenja. S druge strane, na maksimumu 508 nm, tijekom zagrijavanja od 25°C do 80°C i hlađenja do 25°C dolazi do stalnog pada apsorbancije i pomaka maksimuma apsorbancije batokromno.



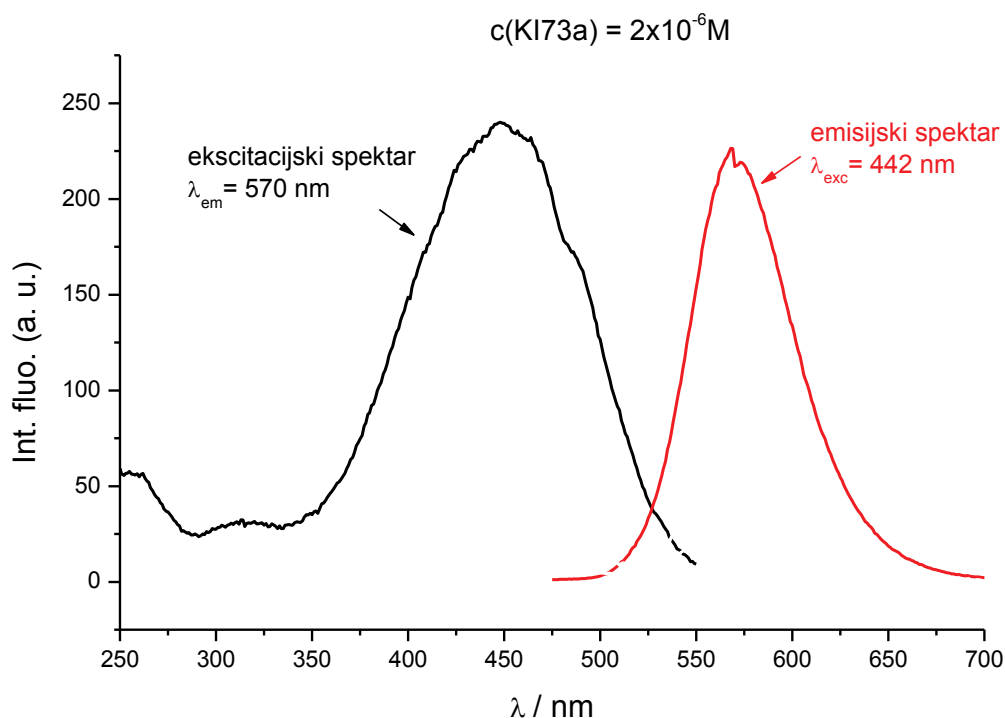
Slika 20. Prikaz ovisnosti UV/Vis spektra spoja KI73A ( $c = 4 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) o temperaturi pri pH 5,00, u kakodilatnom puferu,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



Slika 21. Prikaz ovisnosti UV/Vis spektra spoja KI73C ( $c = 1,96 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) o temperaturi pri pH 5,00, u kakodilatnom puferu,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$

#### 4.2.3. Fluorescencija

Provjerena je i fluorescencija samih spojeva. Iako sami spojevi ne fluoresciraju jako, spojevi KI73 serije ipak imaju mjerljivu fluorescenciju. Na slici 22 prikazani su emisijski i ekscitacijski spektri spoja KI73A. Ekscitacijski spektar podudara se s UV/Vis spektrom spoja.



Slika 22. Usporedba ekscitacijskog i emisijskog spektra spoja KI73A ( $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 5,00$ , Na kakodilatni pufer  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )

### 4.3. Interakcije spojeva s polinukleotidima

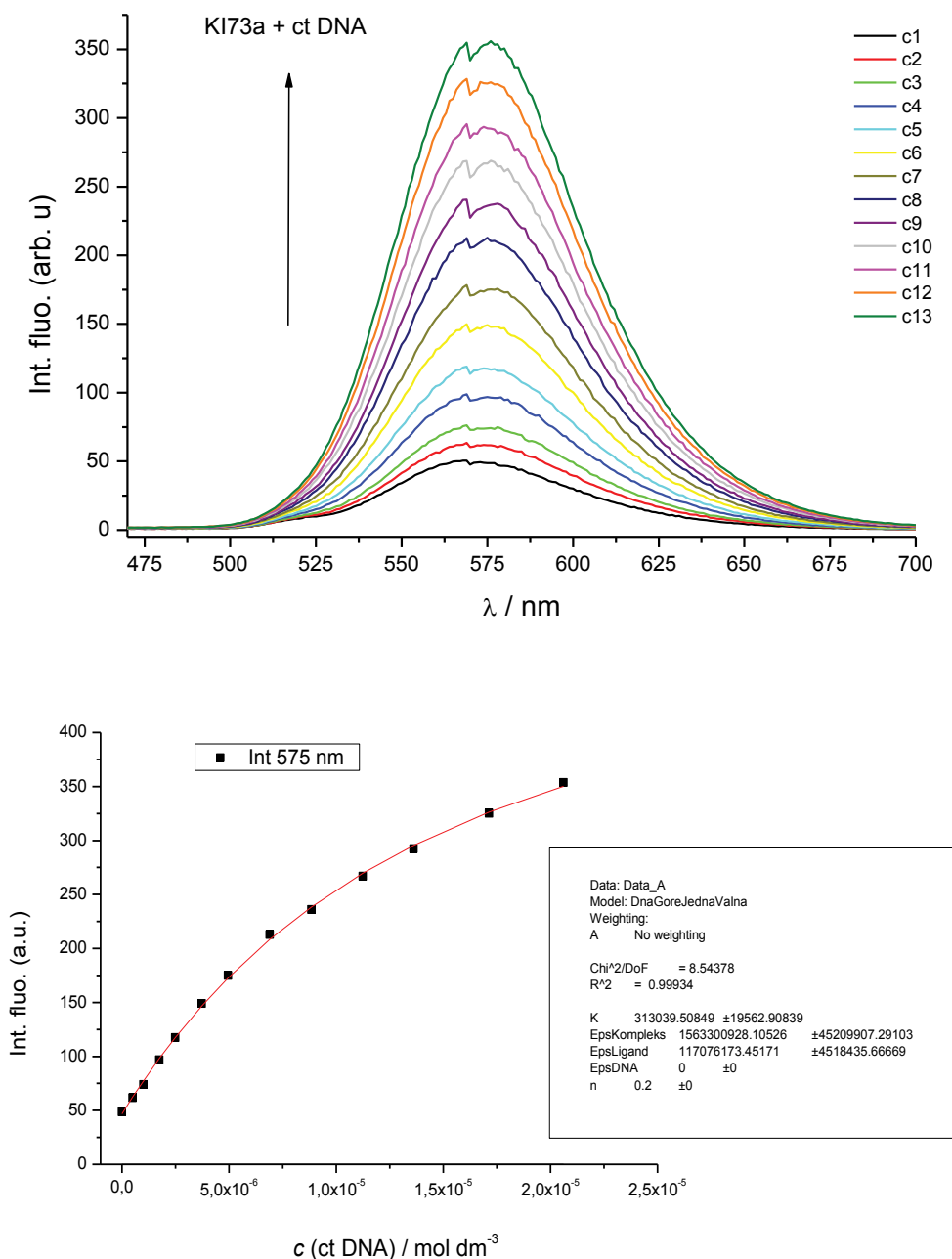
Osim same karakterizacije ispitivanih spojeva, potrebno je bilo napraviti i karakterizaciju ispitivanih spojeva u interakciji s dvolančanim polinukleotidima. Temperatura mekšanja ( $T_m$ ), fluorimetrijske titracije i CD spektroskopija korištene su kao metode za određivanje jačine i načina vezanja ispitivanih spojeva na DNA i RNA. Pomoću Scatchardove jednadžbe<sup>26,27</sup> metodom nelinearne regresije izračunate su konstante stabilnosti (Ks) ispitivanih spojeva.

#### 4.3.1. Fluorimetrijske titracije

Spojevi serije KI73 imaju vrlo mali intenzitet emisije, no on se značajno povećavao dodatkom polinukleotida što je karakteristično za cijanine, osim poli dGdC – poli dGdC koji gasi intenzitet emisije otopine spoja. Povećanje intenziteta fluorescencije prilikom dodatka polinukleotida može se pripisati ukrućivanju strukture spoja prilikom vezanja na



polinukleotid. Svaki dodatak alikvota polinukleotida poli A – poli U dovodi do blagog batokromnog pomaka maksimuma intenziteta fluorescencije.



Slika 23. gore: fluorimetrijska titracija spoja KI73A s polinukleotidom ct DNA,  $\lambda = 442$  nm,  $c$  (KI73A) =  $4 \times 10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup>; dolje: eksperimentalni (■) i izračunati (---) intenzitet fluorescencije spoja KI73A pri  $\lambda_{em} = 575$  nm nakon dodatka ct DNA (pH = 5,00, Na kakodilatni pufer  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>)

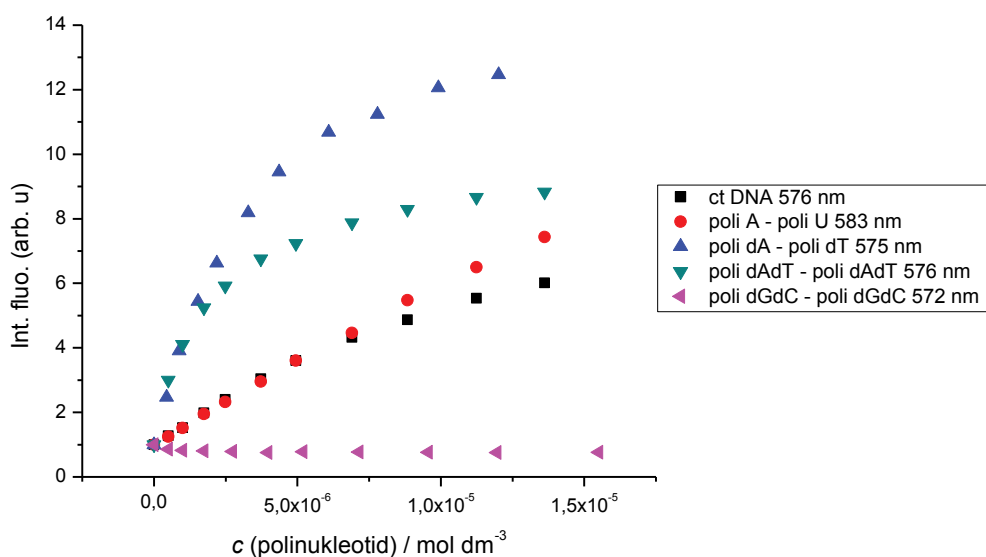
Podaci o titracijama obrađeni su Scatchard-ovom jednadžbom<sup>26,27</sup> za izračunavanje konstanti stabilnosti i omjera [vezani spoj] / [polinukleotid] u program OriginPro 7.5 (Tablica 3).

Tablica 3. Konstante vezanja ( $\log K_s$ )<sup>a</sup> spojeva s polinukleotidima, izračunate obradom spektara fluorimetrijskih titracija po Scatchardu, pri pH = 5,00 u Na – kakodilatnom puferu,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$

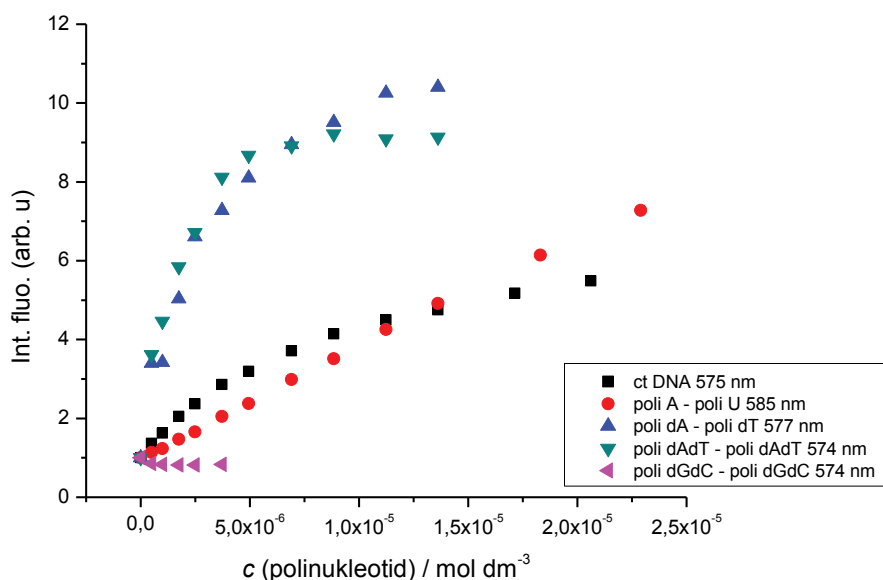
log $K_s^a$ / $n^b$					
	ct - DNA	poli rA – poli rU	poli dA – poli dT	poli dAdT – poli dAdT	poli dGdC – poli dGdC
KI73A	5,50 / fix 0,2	4,65 / fix 0,2	6,30 / fix 0,2 6,11 / 0,27	6,53 / fix 0,2	c
KI73B	5,73 / fix 0,2	c	7,27 / fix 0,2 6,16 / 0,65	6,67 / fix 0,2	c
KI73C	5,34 / fix 0,2 4,93 / 0,47	c	6,31 / fix 0,2 6,74 / 0,13	6,29 / fix 0,2 6,29 / 0,2	c

<sup>a,b</sup> Obrada podataka o titraciji pomoću Scatchard-ove jednadžbe i / ili Global Fit postupka dala je konstante stabilnosti i vrijednosti omjera  $n = [\text{vezani spojevi}] / [\text{polinukleotid}]$ ; koeficijenti korelacije bili su  $> 0,9$  za sve izračunane  $K_s$

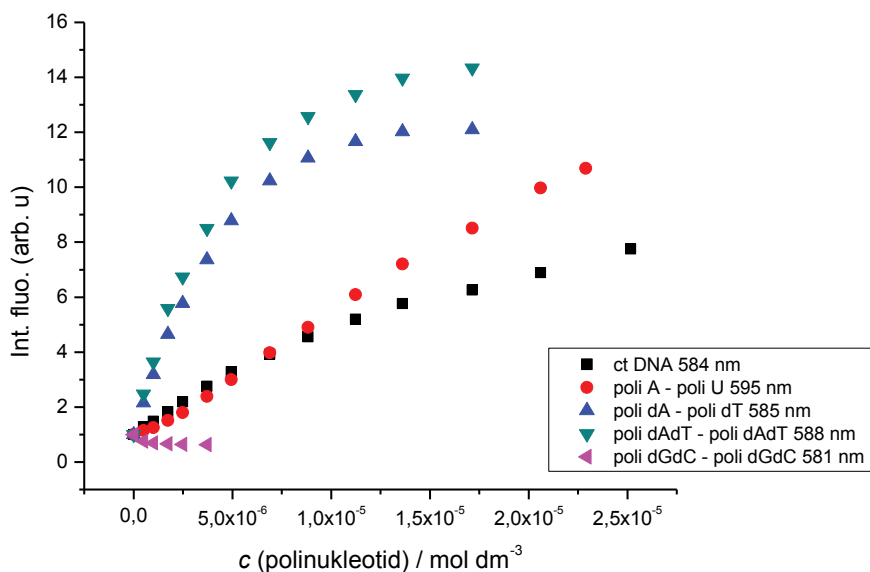
<sup>c</sup> mala / linearna promjena fluorescencije / bez promjene fluorescencije / velika odstupanja intenziteta fluorescencije → onemogućen je proračun konstante stabilnosti



Slika 24. Ovisnost fluorescencije o koncentraciji polinukleotida tijekom titracije spoja KI73A s polinukleotidom ( $\lambda_{exc} = 442 \text{ nm}$ ,  $c = 3 / 4 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ). Izmjereno pri pH 5,00 u kakovilatnom pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ . Vrijednosti su normalizirane s obzirom na prvu točku.

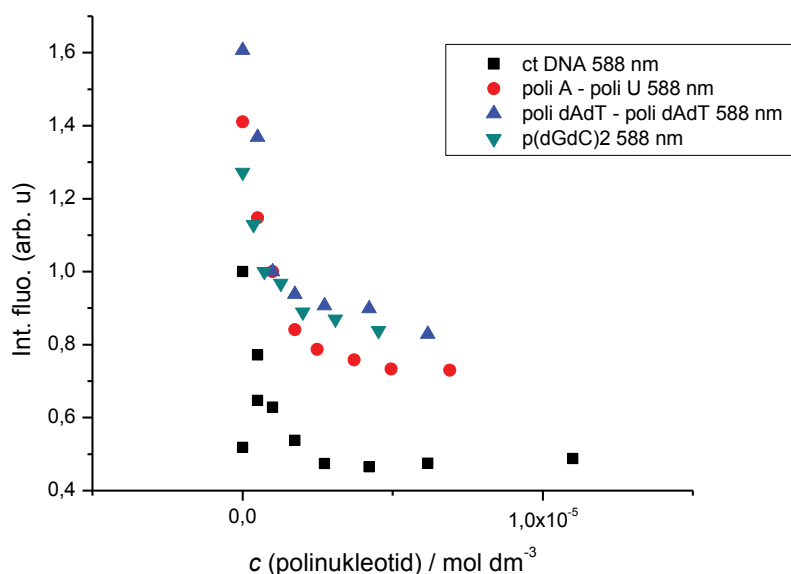


Slika 25. Ovisnost fluorescencije o koncentraciji polinukleotida tijekom titracije spoja KI73B s polinukleotidom ( $\lambda_{exc} = 442 \text{ nm}$ ,  $c = 3 / 6 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ). Izmjereno pri pH 5,00 u kakovilatnom puferu  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ . Vrijednosti su normalizirane s obzirom na prvu točku.

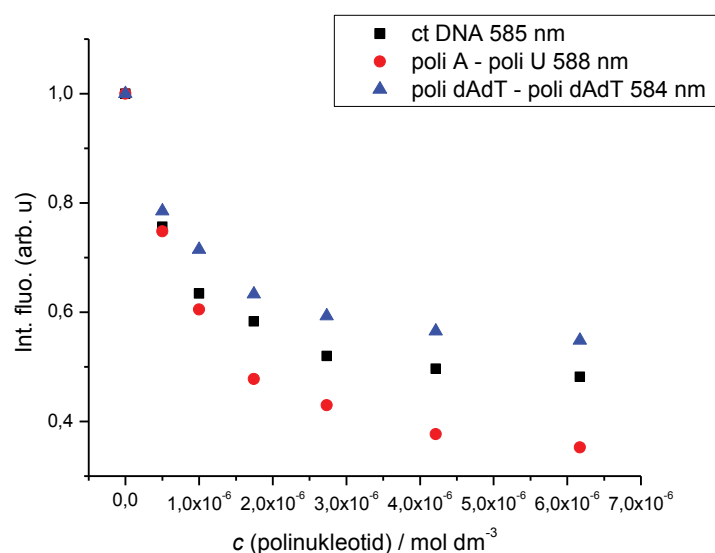


Slika 26. Ovisnost fluorescencije o koncentraciji polinukleotida tijekom titracije spoja KI73C s polinukleotidom ( $\lambda_{\text{exc}} = 458 \text{ nm}$ ,  $c = 6 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ). Izmjereno pri pH 5,00 u kakodilatnom puferu  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ . Vrijednosti su normalizirane s obzirom na prvu točku.

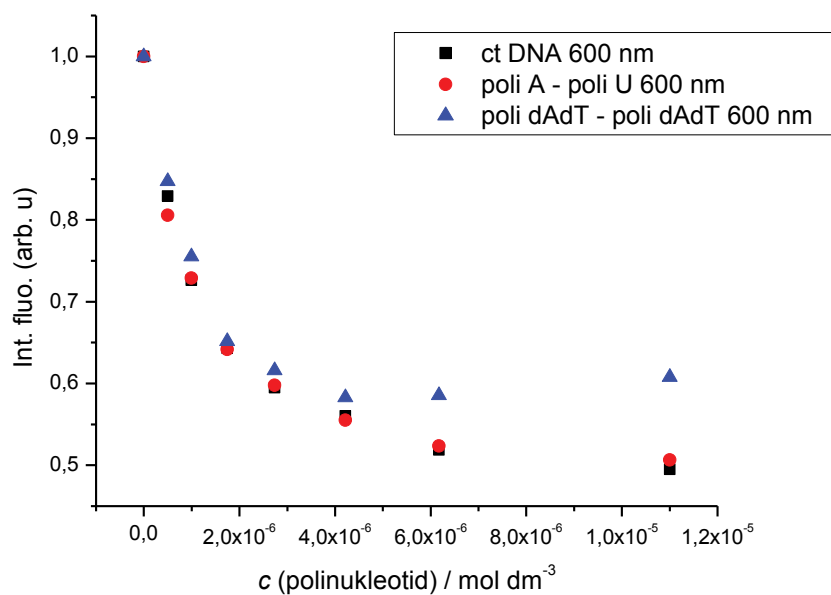
Iz slika 24, 25 i 26 vidljivo je sljedeće: kod spojeva KI73A-C ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji polinukleotida poli A – poli U je linearna pa se može zaključiti da u ispitivanom koncentracijskom području nije došlo do nastajanja kompleksa u značajnom postotku (20 – 80%) što bi omogućilo računanje konstante stabilnosti. Spojevi preferiraju vezanje u utor DNA, a ne u utor RNA koji je plići i širi od utora DNA. Polinukleotid poli dGdC – poli dGdC kod svih spojeva gasi fluorescenciju, a promjene su vrlo male. Gašenje fluorescencije može se pripisati samoj strukturi malog utora koji je bogat amino skupinama gvanina koji imaju vrlo nepovoljan sterički utjecaj što otežava vezanje spoja u utor, te je vjerojatnije da ispitivani spojevi s malim afinitetom interkaliraju u poli dGdC – poli dGdC. Spojevi pokazuju najveći afinitet vezanja prema polinukleotidima poli dA – poli dT i poli dAdT – poli dAdT te se spojevi mogu koristiti kao potencijalno dobri fluorescentni senzori za te polinukleotide. Spojevi KI73 serije vežu se na polinukleotid ct DNA, ali im je afinitet vezanja manji nego prema polinukleotidima poli dA – poli dT i poli dAdT – poli dAdT.



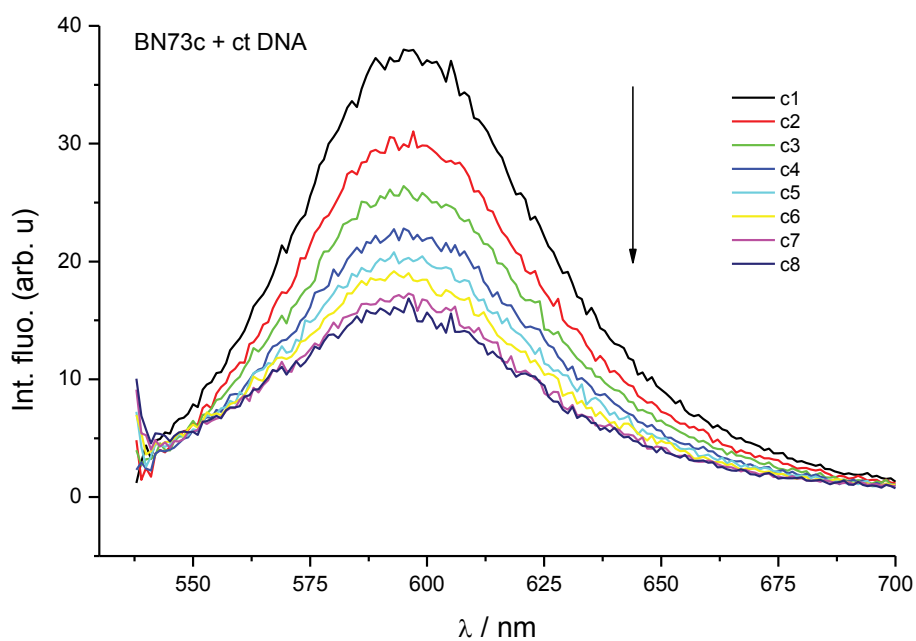
Slika 27. Ovisnost fluorescencije o koncentraciji polinukleotida tijekom titracije spoja BN73A s polinukleotidom ( $\lambda_{\text{exc}} = 456 \text{ nm}$ ,  $c = 6 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ). Izmjereno pri pH 7,08 u kakodilatnom puferu  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ . Vrijednosti su normalizirane s obzirom na prvu točku.

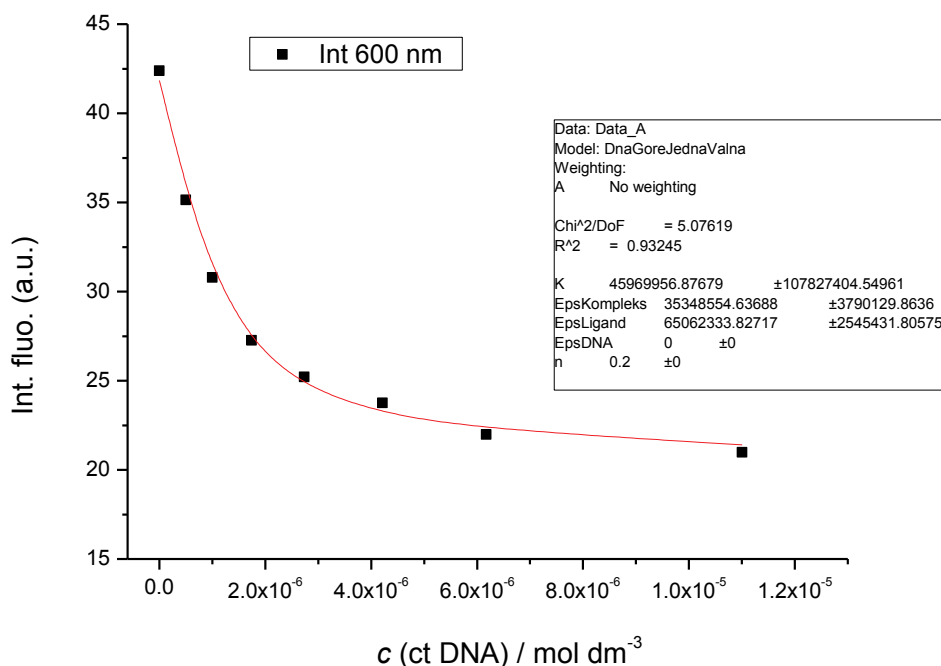


Slika 28. Ovisnost fluorescencije o koncentraciji polinukleotida tijekom titracije spoja BN73B s polinukleotidom ( $\lambda_{\text{exc}} = 480 \text{ nm}$ ,  $c = 6 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ). Izmjereno pri pH 7,08 u kakodilatnom puferu  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ . Vrijednosti su normalizirane s obzirom na prvu točku.



Slika 29. Ovisnost fluorescencije o koncentraciji polinukleotida tijekom titracije spoja BN73C s polinukleotidom ( $\lambda_{\text{exc}} = 508 \text{ nm}$ ,  $c = 6 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ). Izmjereno pri pH 7,08 u kakodilatnom puferu  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ . Vrijednosti su normalizirane s obzirom na prvu točku.





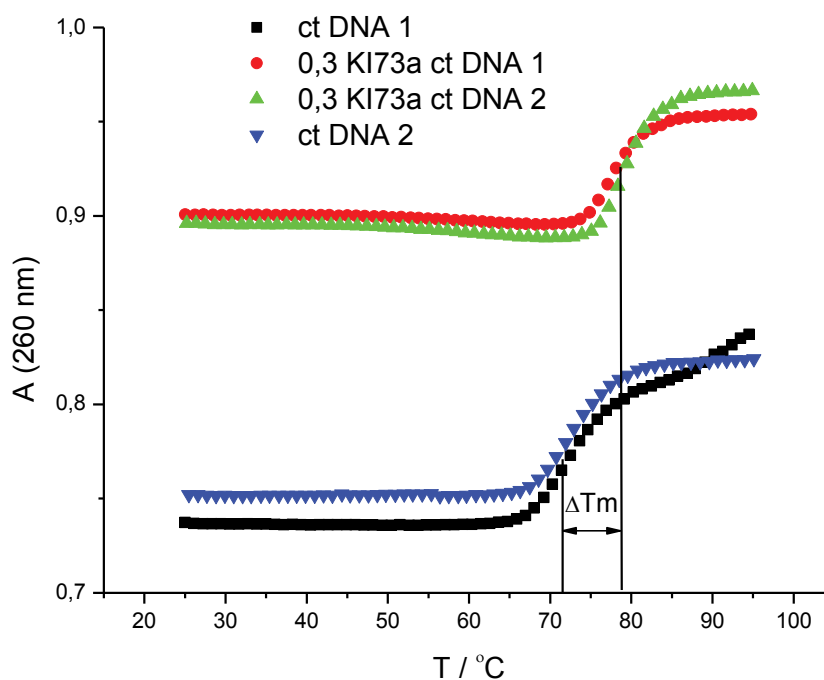
Slika 30. gore: fluorimetrijska titracija spoja BN73C s polinukleotidom ct DNA,  $\lambda = 456$  nm,  $c$  (BN73C) =  $6 \times 10^{-7}$  mol dm $^{-3}$ ; dolje: eksperimentalni (■) i izračunati (---) intenzitet fluorescencije spoja BN73C pri  $\lambda_{em} = 600$  nm nakon dodatka CT DNA (pH = 7,08, Na kakodilatni pufer  $I = 0,05$  mol dm $^{-3}$ )

Titriranje spojeva BN73 serije sa svim polinukleotidima dovodi do gašenja fluorescencije. Kod svih titracija intenziteti emisije i promjene su premale da bi se konstante stabilnosti mogle izračunati sa sigurnošću (slike 27, 28, 29 i 30). Može se zaključiti da se spojevi vežu na DNA/RNA, ali se ne mogu s potrebnom točnošću izračunati konstante stabilnosti kompleksa. Samo jedna promjena u strukturi između KI73 i BN73 serije (fenilna skupina na piperzinu umjesto metilne, što dovodi do različitog protoniranja molekule) dovodi do velikih promjena u intenzitetu fluorescencije. Fenilpiperazinska skupina je veća od metilpiperazinske skupine te dovodi do steričkih smetnji i otežava interakcija spojeva BN73 serije s polinukleotidima.

## 4.3.2. Temperaturno mekšanje polinukleotida

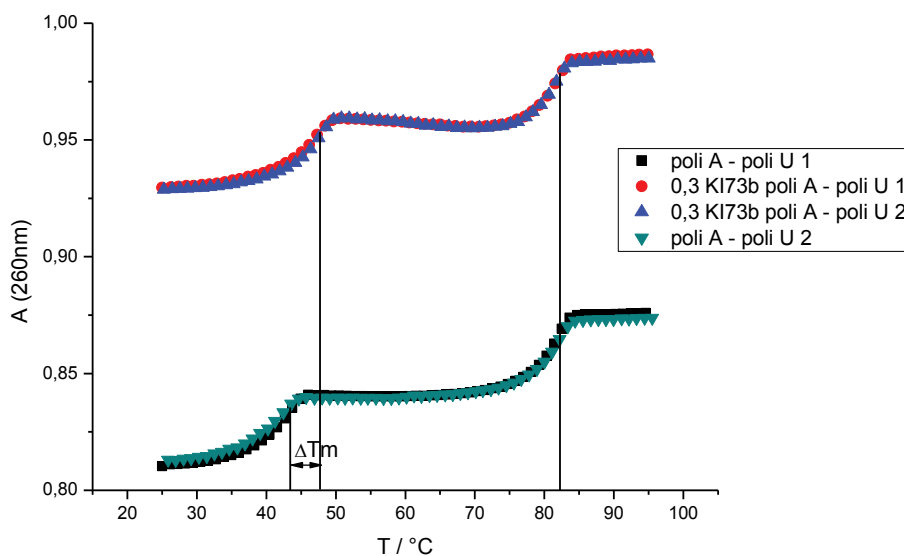
Iz ovisnosti apsorbancije o temperaturi može se očitati temperatura mekšanja,  $T_m$ .  $T_m$  je karakteristična temperatura pri kojoj je 50% DNA denaturirano, odnosno  $T_m$  je mjera stabilnosti DNA; otpornija DNA ima višu  $T_m$ . Temperature mekšanja određene su očitavanjem točki maksimuma prve derivacije sigmoidalnih krivulja. Promjene temperature mekšanja prosjek su dvaju mjerenja i dane su u Tablici 4.

Svi spojevi KI73 serije pokazali su značajan utjecaj na termalnu denaturaciju DNA i mali / zanemariv učinak na toplinsku denaturaciju RNA. Za razliku od spojeva KI73 serije, spojevi BN73 serije pokazali su mali / zanemariv učinak na toplinsku denaturaciju DNA i RNA.

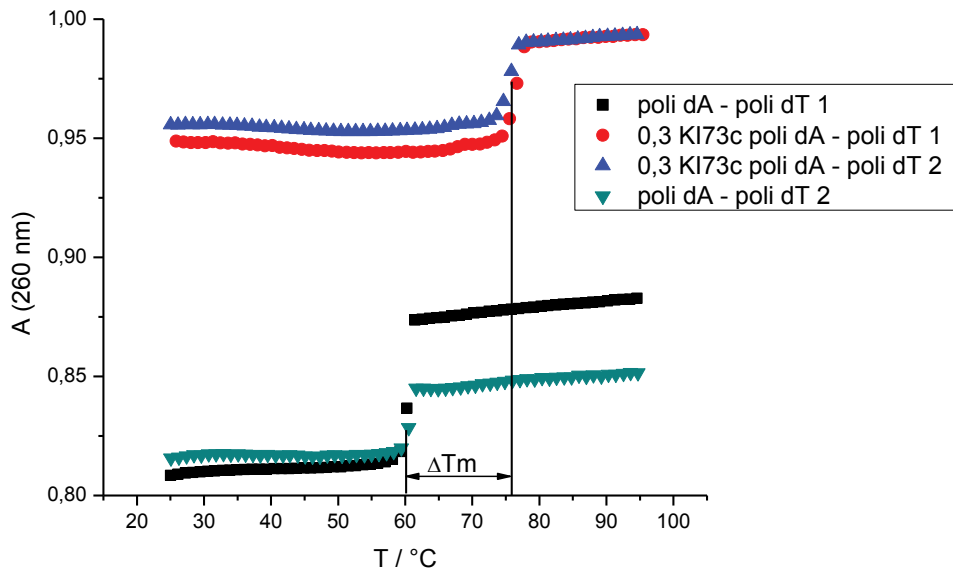


Slika 31. Krivulje taljenja ct DNA dodavanjem KI73A,  $c(\text{DNA}) = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ , omjeri  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  označeni su u grafičkoj legendi,  $\text{pH} = 5,00$ , Na – kakovilnatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$

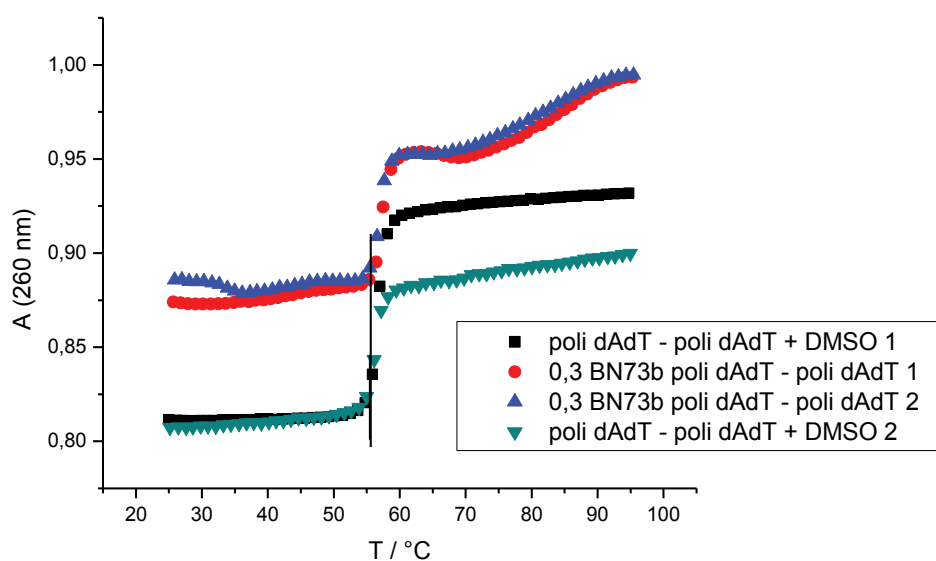




Slika 32. Krivulje taljenja poli A – poli U dodavanjem KI73B,  $c(\text{RNA}) = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ , omjeri  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  označeni su u grafičkoj legend,  $\text{pH} = 5,00$ , Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



Slika 33. Krivulje taljenja poli dA – poli dT dodavanjem KI73C,  $c(\text{DNA}) = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ , omjeri  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  označeni su u grafičkoj legend,  $\text{pH} = 5,00$ , Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



Slika 34. Krivulje taljenja poli dAdT – poli dAdT dodavanjem BN73B,  $c(\text{DNA}) = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ , omjeri  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  označeni su u grafičkoj legend,  $\text{pH} = 7,08$ , Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$

Tablica 4.  $\Delta T_m$  vrijednosti ( $^{\circ}\text{C}$ ) proučavanih polinukleotida nakon dodatka spojeva (omjer  $r^b = 0,3$ ) pri  $\text{pH} = 5,00$  za spojeve KI73 serije, tj. pri  $\text{pH} = 7,08$  za spojeve BN73 serije (Na kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ),  $c(\text{DNA} / \text{RNA}) = 1-2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$

$\Delta T_m^a / ^{\circ}\text{C}$				
spoj	ct DNA	poli dAdT – poli dAdT	poli dA – poli dT	poli rA – poli rU <sup>c</sup>
KI73A	+6,1	+12,9	+13,5	+4,1 / -1,6
KI73B	+8,9	+13,2	+14,8	+4,6 / 0
KI73C	+9,8	+16,2	+15,8	+7,3 / 0
BN73A	+0,7	0	+2,2	0
BN73B	0	0	0	0
BN73C	0	0	+0,8	0

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

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

°dvofazni prijelaz: prvi prijelaz pri  $T_m = 47^\circ\text{C}$  pripisuje se denaturaciji poli rA – poli rU, a drugi prijelaz pri  $T_m = 69^\circ\text{C}$  pripisuje se denaturaciji poli rAH<sup>+</sup> - poli rAH<sup>+</sup> jer je poli rA pri pH = 5,00 uglavnom protonirani i tvori ds – polinukleotid

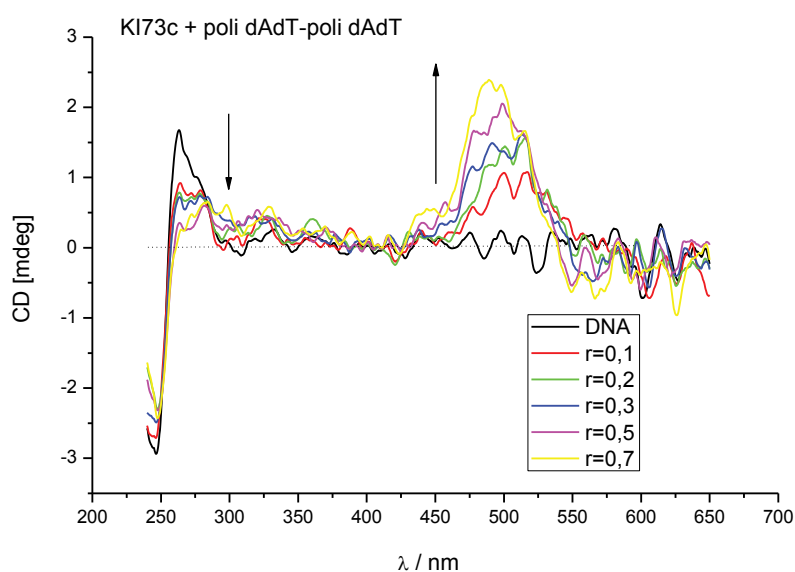
Iz tablice 4 može se uočiti da spojevi KI73 serije jako pridonose stabilizaciji dvostruke uzvojnice svih DNA polinukleotida i u puno manjoj mjeri pridonose stabilizaciji RNA. Za razliku od njih, spojevi BN73 serije ne pridonose stabilizaciji dvolančanih polinukleotida. Blagu stabilizaciju pokazuju u interakciji s polinukleotidom poli dA – poli dT.

#### 4.3.3. Cirkularni dikroizam

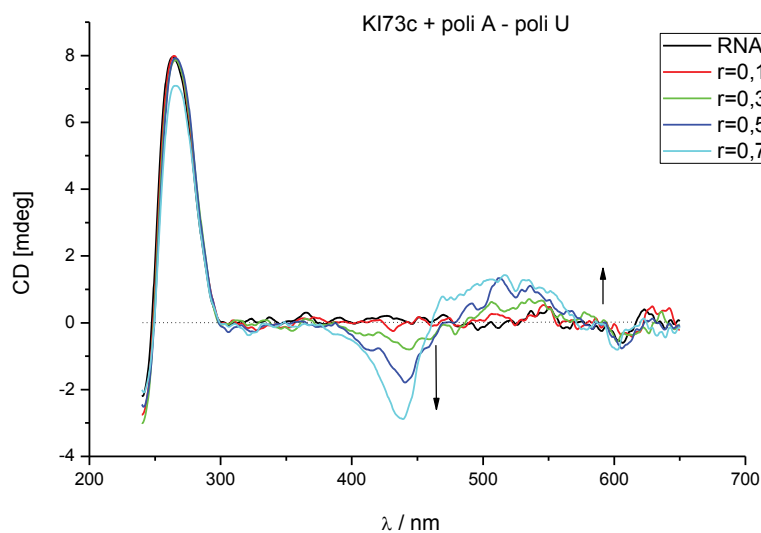
CD spektroskopija odabrana je za praćenje konformacijskih promjena polinukleotidne sekundarne strukture inducirane vezanjem malih molekula.<sup>37</sup> U rasponu od 200 – 300 nm, DNA i RNA apsorbiraju svjetlost pa se promjene spektra mogu povezati s promjenom sekundarne strukture zbog vezanja spoja.<sup>28</sup> U rasponu >300 nm DNA i RNA ne apsorbiraju svjetlost, stoga se svi inducirani CD (ICD) spektri mogu pripisati isključivo spojevima. U Tablici 5 dani su rezultati, odnosno prikazano je koji spojevi i polinukleotidi pokazuju ICD, a koji ne.

Tablica 5. Pojava ICD signala na valnim duljinama većim od 300 nm; “+” označava pozitivni ICD signal, a “-“ negativni ICD signal

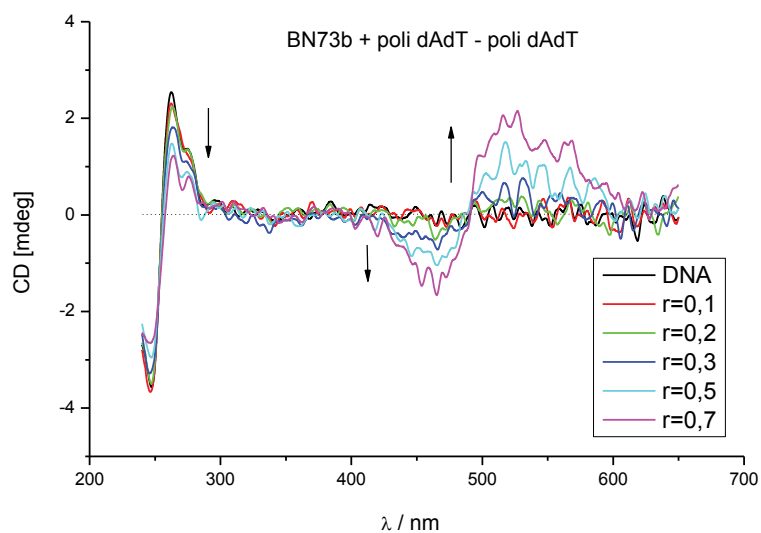
spoj	ct DNA	poli A – poli U	poli dA – poli dT	poli dAdT – poli dAdT	poli dGdC – poli dGdC
KI73A	nema ICD	nema ICD	jaki + / slabi -	jaki +	nema ICD
KI73B	nema ICD	nema ICD	jaki + / slabi -	jaki +	nema ICD
KI73C	jaki - / jaki +	slabi + / jaki -	jaki + / slabi -	jaki +	nema ICD
BN73A	jaki + / jaki -	slabi -	jaki + / slabi -	jaki + / slabi -	nema ICD
BN73B	slabi + / slabi -	jaki + / jaki -	slabi -	jaki + / jaki -	nema ICD
BN73C	nema ICD	slabi -	nema ICD	nema ICD	nema ICD



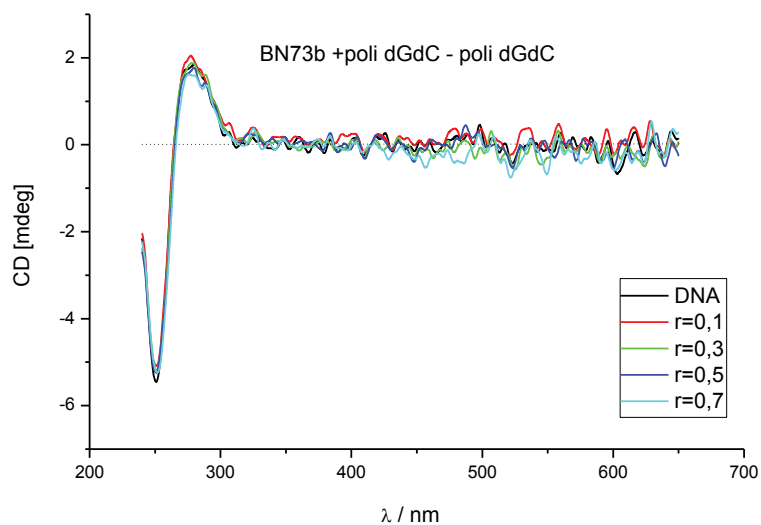
Slika 35. CD titracija poli dAdT – poli dAdT ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) sa spojem KI73C, različitim molarnim omjerima  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  ( $\text{pH} = 5,00$ , Na – kakoviladni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )



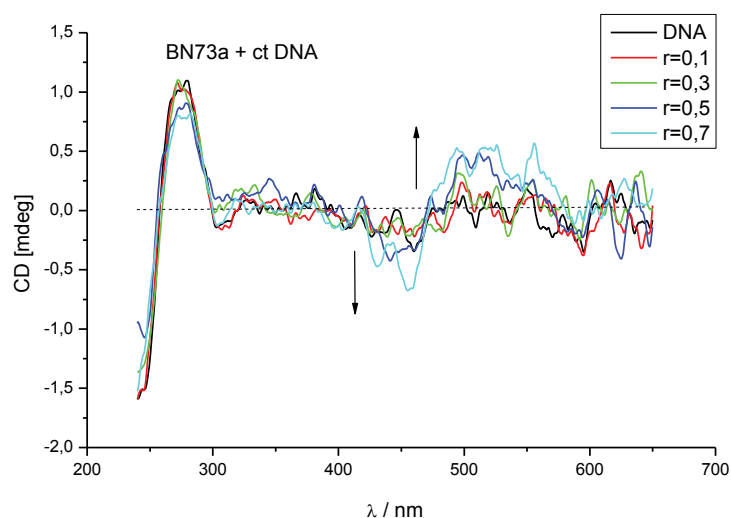
Slika 36. CD titracija poli A – poli U ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) sa spojem KI73C, različitim molarnim omjerima  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  ( $\text{pH} = 5,00$ , Na – kakoviladni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )



Slika 37. CD titracija poli dAdT – poli dAdT ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) sa spojem BN73B, različitim molarnim omjerima  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  (pH = 7,08, Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )



Slika 38. CD titracija poli dGdC – poli dGdC ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) sa spojem BN73B, različitim molarnim omjerima  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  (pH = 7,08, Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )



Slika 39. CD titracija ct DNA ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) sa spojem BN73A, različitim molarnim omjerima  $r = [\text{spojev}] / [\text{polinukleotid}]$  (pH = 7,08, Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )

Pojava snažnog ICD signala s pozitivnim predznakom na valnim duljinama oko 500 nm ukazuje na snažno vezanje u manji utor polinukleotida. Sami spojevi ne pokazuju CD spektre.

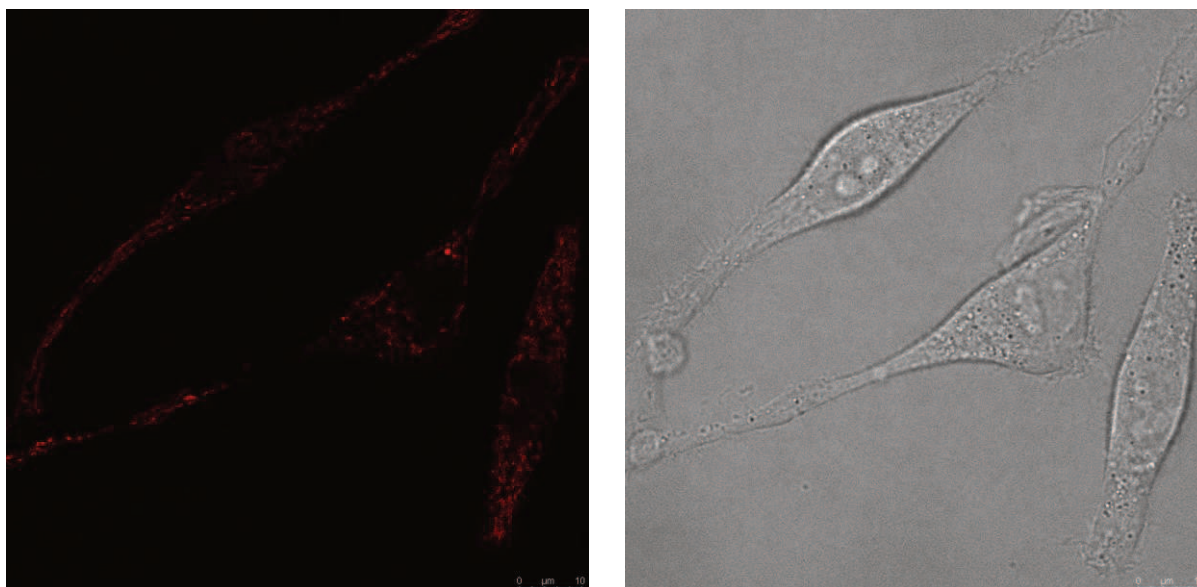
Svi spojevi, osim spoja BN73C, imaju velike ICD signale na oko 500 nm s polinukleotidima poli dA – poli dT i poli dAdT – poli dAdT.

Kod interakcija spojeva s polinukleotidom poli dGdC – poli dGdC ne dolazi do pojave ICD signala što se pripisuje nepovoljnom steričkom utjecaju amino skupina gvanina u malom utoru polinukleotida te neujednačenom vezanju ispitivanih spojeva u odnosu na kiralnu fosfatnu okosnicu polinukleotida.

Mali utor kod poli A – poli U je bitno širi i plići nego kod drugih polinukleotida te se zbog toga spojevi KI73 serije ne vežu u njega, ali postoji mogućenost vezanja dimera spoja u veliki utor polinukleotida. Spoj KI73C u interakciji s polinukleotidom pola A – poli U ima dva ICD signala: jako negativni na oko 440 nm i slabo pozitivni signal na oko 550 nm te se takav signal naziva bisignatnim signalom i ukazuje na to da se spoj veže kao dimer u veliki utor polinukleotida. Spojevi BN73 serije ne vežu se u utor polinukleotida poli A – poli U, već interkaliraju.

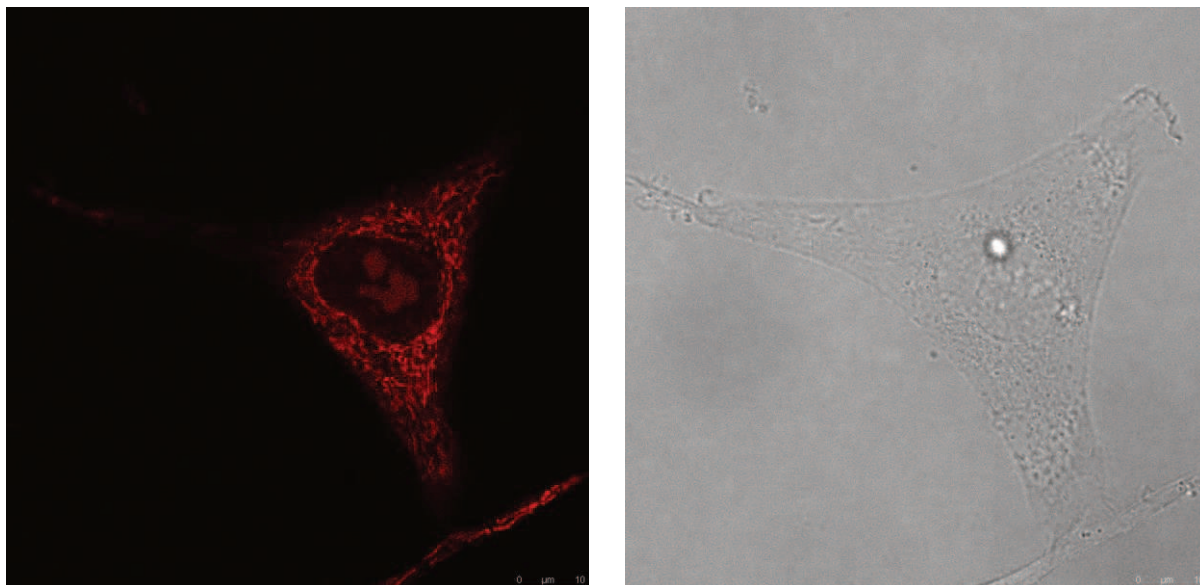
#### 4.4. Konfokalna mikroskopija

Leica SP8 X FLIM konfokalni mikroskop korišten je za snimanje živih stanica (HeLa stanica). Stanice su nasađene na petrijeve zdjelice sa staklenim dnom i inkubirane preko noći što im omogućuje da se pričvrste na stakleno dno petrijeve zdjelice. Stanice se inkubiraju sa spojevima dva sata prije konfokalne mikroskopije, što im omogućuje dovoljno vremena za ulazak u stanicu te dolazak do željenog subcelularnog mjesta. Slike su obrađene u softverskim paketima LAS X Leica Microsystems.

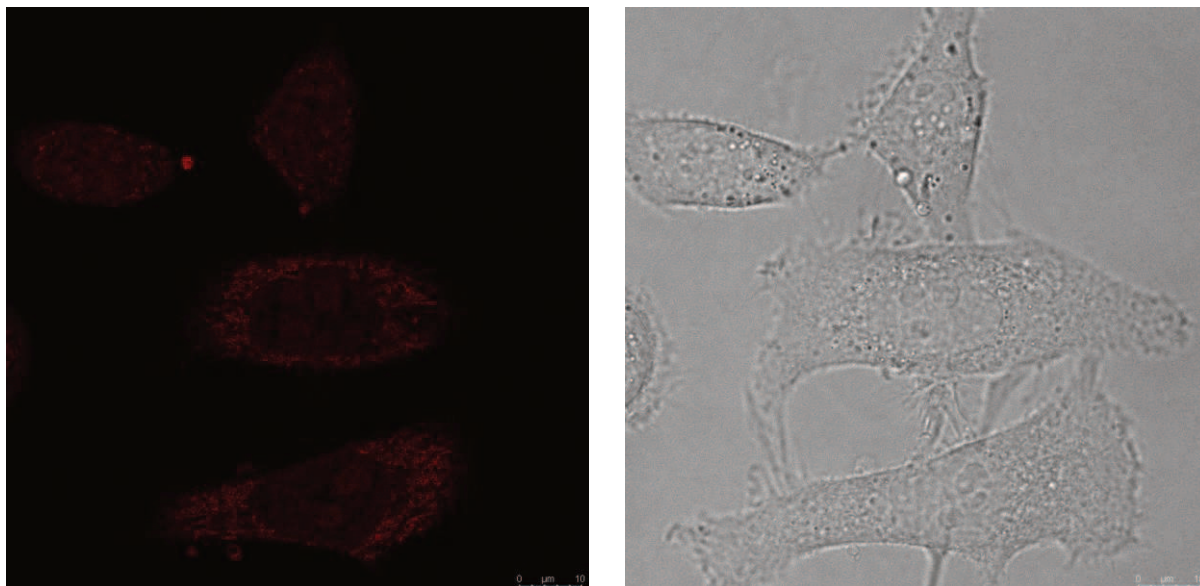


Slika 40. Konfokalna fotomikrografija živih stanica HeLa nakon inkubacije s KI73A ( $c = 1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ); lijevo: fluorescencija, desno: fazni kontrast, snimili: L. Horvat i dr. sc. I.

Crnolatac



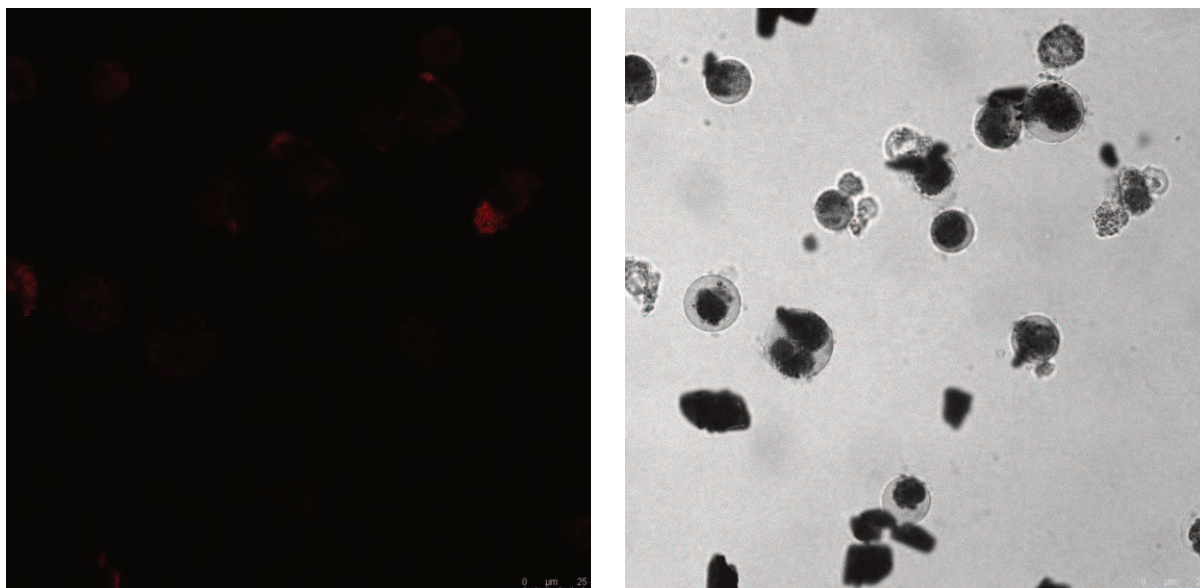
Slika 41. Konfokalna fotomikrografija živih stanica HeLa nakon inkubacije s KI73B ( $c = 1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ); lijevo: fluorescencija, desno: fazni kontrast, snimili: L. Horvat i dr. sc. I. Crnolatac



Slika 42. Konfokalna fotomikrografija živih stanica HeLa nakon inkubacije s KI73C ( $c = 1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ); lijevo: fluorescencija, desno: fazni kontrast, snimili: L. Horvat i dr. sc. I. Crnolatac

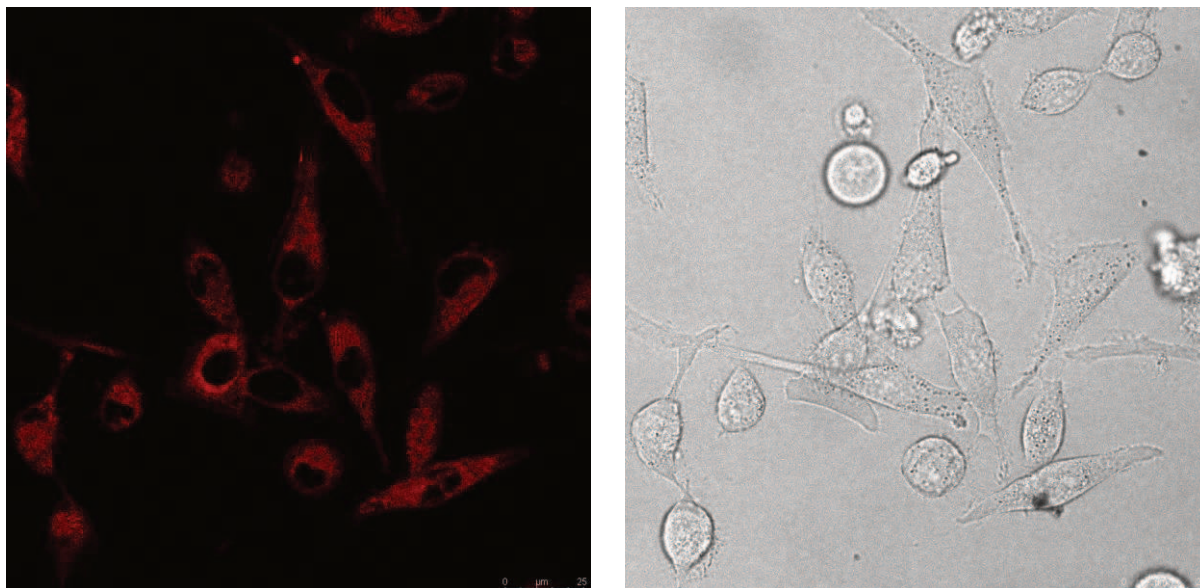


Stanice tretirane spojevima KI73A i KI73B izgledaju bez vidljivih znakova stresa. Za razliku od njih, stanice tretirane spojem KI73C nalaze se u apoptozi. Kod stanica tretiranih spojem KI73C fluorescencija je uočena i u citoplazmi u i jezgri. Fluorescencija spojeva KI73A i KI73B ukazuje na prisutnost spojeva u citoplazmi s vrlo velikom vjerojatnošću nakupljanja spojeva na mitohondrijima. Spoj KI73B prisutan je i u jezgri, a uglavnom se nakuplja u jezgri.

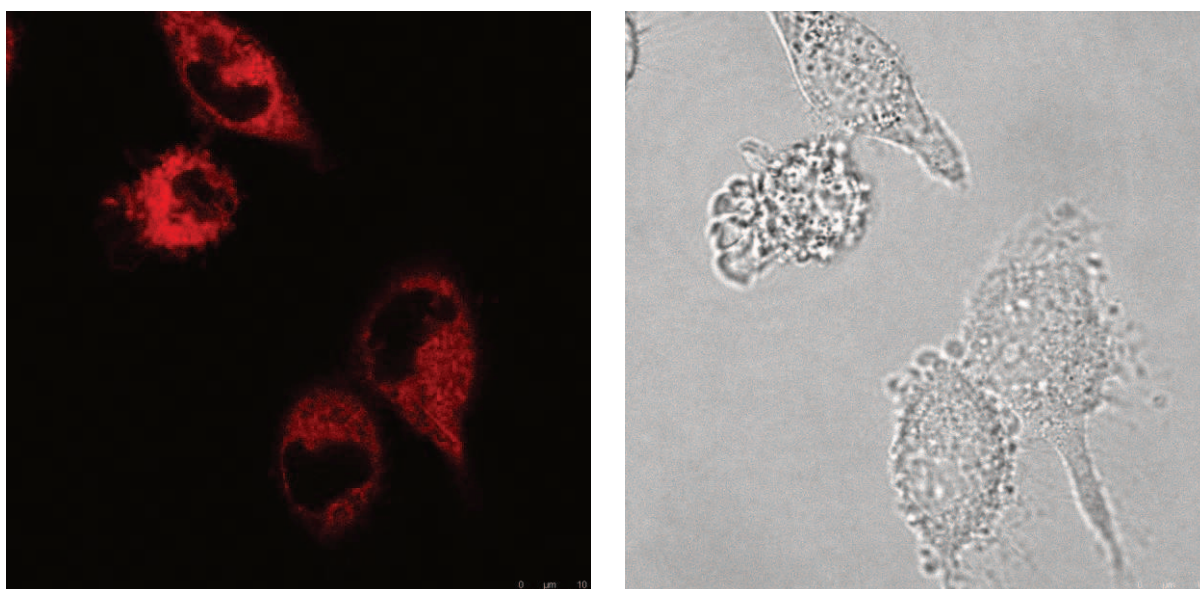


Slika 43. Konfokalna fotomikrografija živih stanica HeLa nakon inkubacije s BN73A ( $c = 1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ); lijevo: fluorescencija, desno: fazni kontrast, snimili: L. Horvat i dr. sc. I.

Crnolatac



Slika 44. Konfokalna fotomikrografija živih stanica HeLa nakon inkubacije s BN73B ( $c = 1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ); lijevo: fluorescencija, desno: fazni kontrast, snimili: L. Horvat i dr. sc. I. Crnolatac



Slika 45. Konfokalna fotomikrografija živih stanica HeLa nakon inkubacije s BN73C ( $c = 1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ); lijevo: fluorescencija, desno: fazni kontrast, snimili: L. Horvat i dr. sc. I. Crnolatac

Stanice tretirane spojevima BN73 serije uglavnom su u apoptozi (stanice tretirane spojem BN73A su mrtve ili u krajnjem stadiju apoptoze, dok su stanice tretirane spojevima BN73B i

BN73C u nižim stadijima apoptoze). Kod spoja BN73A slaba fluorescencija ukazuje na prisutnost spoja u citoplazmi i u jezrgi, dok je kod spoja BN73B i BN73C fluorescencija prisutna u citoplazmi, ali bez specifičnog nakupljanja u nekom od organela. Nedostatak fluorescencije ukazuje da spojevi ne ulaze u jezgru.

Ono što je bitno napomenuti je da su ovo preliminarni rezultati. Ono što zbunjuje je činjenica da na antiproliferacijskom testu nije dobivena jaka aktivnost, dok je na konfokalnom mikroskopu uočena jaka fluorescencija stanica koje su tretirane ispitivanim spojevima.

## § 5. ZAKLJUČAK

U okviru ovog diplomskog rada spektroskopski su okarakterizirana šest novosintetizirana spoja: KI73A, KI73B, KI73C, BN73A, BN73B i BN73C. UV/Vis spektroskopijom su određeni molarni ekstincijski koeficijenti te valne duljine maksimuma apsorpcije. Svi spojevi imaju maksimum apsorpcije u vidljivom dijelu spektra. Otopine ispitivanih spojeva ponašaju se prema Beer-Lambertovom zakonu u koncentracijskom području od  $1 \times 10^{-5}$  do  $2 \times 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  i ne dolazi do intermolekulskog slaganja molekula spojeva.

Kod spojeva KI73A i KI73B zagrijavanjem otopina spojeva dolazi do povećanja apsorpcije zračenja. Hlađenjem na početnih  $25^\circ\text{C}$ , spojevi pokazuju veću apsorpciju zračenja u odnosu na početnu apsorpciju zračenja. Otopina spoja KI73C je termički stabilna te zagrijavanje otopine spoja ne utječe na apsorpciju zračenja. Povećanje temperature ne dovodi do povećanja apsorpcije zračenja kod spojeva BN73A i BN73B već samo do oblagog batokromnog pomaka apsorpcijskog maksimuma. Kod spoja BN73C prati se apsorpcija na dva maksimuma: na 340 i 508 nm. Pri 340 nm dolazi do stalnog porasta apsorpcije zračenja, dok na maksimumu pri 508 nm dolazi do stalnog pada apsorpcije i batokromnog pomaka maksimuma apsorpcije.

Spojevi KI73 serije imaju vrlo mali intenzitet fluorescentne emisije, no on se značajno povećavao dodatkom polinukleotida što je karakteristično za cijanine, osim kod dodatka poli dGdC – poli dGdC koji gasi intenzitet emisije otopine spoja. Povećanje intenziteta fluorescencije prilikom dodatka polinukleotida može se pripisati ukrućivanju strukture spoja prilikom vezanja na polinukleotid. Spojevi pokazuju najveći afinitet vezanja prema polinukleotidima poli dA – poli dT i poli dAdT – poli dAdT te se spojevi mogu koristiti kao potencijalno dobri senzori za te polinukleotide. Nešto manji afinitet vezanja pokazuju prema ct DNA. Afinitet vezanja na polinukleotid poli A – poli U nije visok te se može pretpostaviti kako spojevi preferiraju vezanje u mali utor DNA, a ne u utor RNA koji je širi i plići. Polinukleotid poli dGdC – poli dGdC kod svih spojeva KI73 serije gasi fluorescenciju, a promjene su vrlo male.

Spojevi BN73 serije imaju jednu razliku u strukturi u odnosu na KI73 seriju spojeva. Metilpiperazin kod KI73 serije spojeva zamijenjen je s fenilpiperazinom. Iako je promjena

relativno mala, dovodi do gašenja fluorescencije kod svih ispitivanih polinukleotida. Promjene su bile premale da bi se konstante stabilnosti mogle izračunati sa sigurnošću.

Svi spojevi KI73 serije vežu se na dvolančane polinukleotide pri čemu ih stabiliziraju, tj. dobivaju se pozitivne vrijednosti  $\Delta T_m$ . Spojevi najviše stabiliziraju poli dA – poli dT i poli dAdT – poli dAdT polinukleotide, a zatim ct DNA. Spojevi u puno manjoj mjeri pridonose stabilizaciji RNA. Za razliku od njih, spojevi BN73 serije ne pridonose stabilizaciji dvolančanih polinukleotida. Blagu stabilizaciju pokazuju u interakciji s polinukleotidom poli dA – poli dT.

Nakon dodatka spojeva KI73A, KI73B, KI73C, BN73A, BN73B i BN73C dolazi do smanjenja ili povećanja CD signala dvolančanih polinukleotida u ultraljubičastom području ( $\lambda = 240\text{-}300\text{ nm}$ ). Sami spojevi su akiralni i nisu CD aktivni, ali prilikom interakcije s dvolančanim polinukleotidima javlja se inducirani CD signal (ICD) u vidljivom području ( $\lambda = 450\text{-}650\text{ nm}$ ) koje odgovara apsorpcijskim vrpčama ispitivanih spojeva. Na polinukleotide poli dA – poli dT i poli dAdT – poli dAdT spojevi se vjerojatno vežu u male utore. Niti jedan spoj se ne veže u utor polinuleotida poli dGdC – poli dGdC, ali možda se s malim afinitetom vežu elektorstatski ili djelomično interkaliraju. Spojevi KI73A i KI73B vežu se slabo na RNA. Spoj KI73C veže se na RNA kao dimer u veliki utor polinukleotida. Spojevi BN73 serije ne vežu se u utor RNA, već interkaliraju.

Vizualizacija spojeva unutar živih humanih tumorskih stanica karcinoma vrata grlića maternice provedena je konfokalnom mikroskopijom. Vidljivo je da spojevi ulaze u stanicu i prilikom toga imaju jaki fluorescencijski signal te zbog toga mogu biti senzori za stanice. Ukoliko se u budućnosti pokaže da su spojevi i citotoksični, o njima se može razmišljati i kao o lijekovima.

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

A - apsorpcija

BN73A – (E)-3-metil-2-(4-(4-fenilpiperazin-1-il)stiril)benzo[d]tiazol-3-il jodid

BN73B – (E)-3,5-dimetil-2-(4-(4-fenilpiperazin-1-il)stiril)benzo[d]tiazol-3-il jodid

BN73C – (E)-5-bromo-3-metil-2-(4-(4-fenilpiperazin-1-il)stiril)benzo[d]tiazol-3-il jodid

*c* – molarna koncentracija

CD – cirkularni dikroizam

CO<sub>2</sub> – ugljikov (IV) oksid

ct DNA – deoksiribonukleinska kiselina iz timusa teleta

DMSO – dimetil-sulfoksid

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

HeLA – humane tumorske stanice karcinoma vrata grlića maternice

ICD – inducirani cirkularni dikroizam

Int. fluo. – intrinzička fluorescencija

KI73A – (E)-3-metil-2-(4-(4-metilpiperazin-1-il)stiril)benzo[d]tiazol-3-il jodid

KI73B – (E)-3,5-dimetil-2-(4-(4-metilpiperazin-1-il)stiril)benzo[d]tiazol-3-il jodid

KI73C – (E)-5-bromo-3-metil-2-(4-(4-metilpiperazin-1-il)stiril)benzo[d]tiazol-3-il jodid

K<sub>s</sub> – konstanta stabilnosti

*n* – omjer koncentracije vezanog spoja i koncentracije polinukleotida

Na-kakodilat – C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>AsNaO<sub>2</sub> · 3H<sub>2</sub>O

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

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

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

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

RNA – ribonukleinska kiselina

T<sub>m</sub> – temperatura mekšanja

UV/Vis spektroskopija – ultraljubičasta i vidljiva spektroskopija

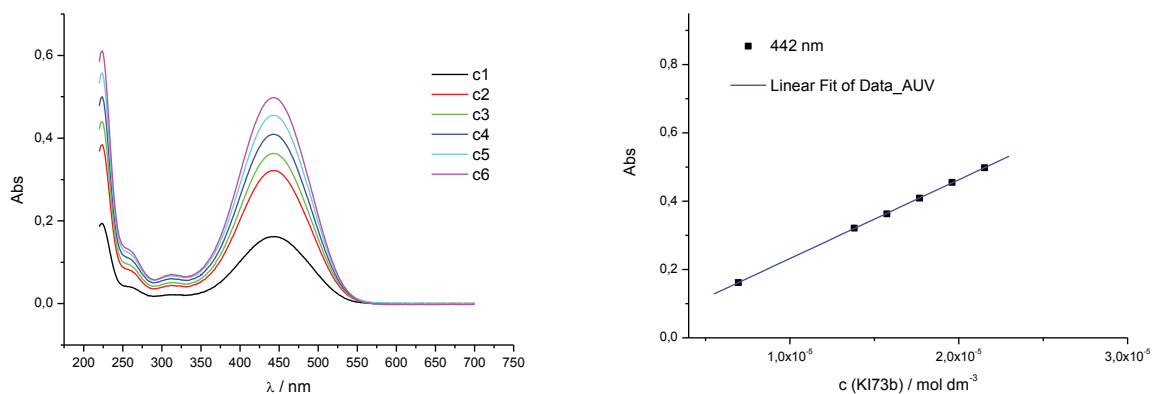
## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. P. Piantanida, *Kem. Ind.* **52** (2003) 545 – 552.
2. H. A. Shindy, *Dyes Pigments* **145** (2017) 505 – 513.
3. B. A. Armitage, *Top. Curr. Chem.* **253** (2005) 55 – 76.
4. <https://www.lumiprobe.com/tech/cyanine-dyes>, (preuzeto i prilagođeno 14.08.2019.)
5. I. Crnolatac, L. M. Tumir, N. Y. Lesev, A. A. Vasilev, T. G. Deligeorgiev, K. Mišković, L.J. Glavaš-Obrovac, O. Vugrek, I. Piantanida, *Chem.Med.Chem.* **0000**, (2013) 1 – 12.
6. A. Larsson, C. Carlsson, M. Jonsson, B. Albinsson, *J. Am. Chem. Soc.* **116** (1994) 8459 – 8465.
7. H. S. Rye, S. Yue, D. E. Wemmer, *Nucleic Acids Res.* **20** (1992) 2803 – 2812.
8. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjigâ, Zagreb, 2013., 108 – 116.
9. R. Yamashige, M. Kimoto, Y. Takezawa, A. Sato, T. Mitsui, S. Yokoyama, I. Hirao, *Nucleic Acids Res.* **40** (2012) 2793 – 2806.
10. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, Seventh edition, W. H. Freeman & Company, 2017, 805.
11. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, Seventh edition, W. H. Freeman & Company, 2017, 808 – 810.
12. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013., 784 – 788.
13. <https://www.indiamart.com/proddetail/nucleic-acid-stain-dna-isolation-kit-8711909330.html> (preuzeto i prilagođeno 16.08.2019.)
14. H. Ihmels, D. Otto, *Top. Curr. Chem.* **258** (2005) 161 – 204.
15. P. Herzyk, S. Neidle & J. M. Goodfellow, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **10** (1992) 97 – 139.
16. I. Piantanida, Supramolekularna kemija u interakcijama malih molekula s nukleinskim kiselinama, Microsoft Office PowerPoint 97-2003 Presentation, 2011
17. A. A. Ouameur, H. A. Tajmir-Riahi, *J. Biol. Chem.* **279** (2004) 42041 – 42054.

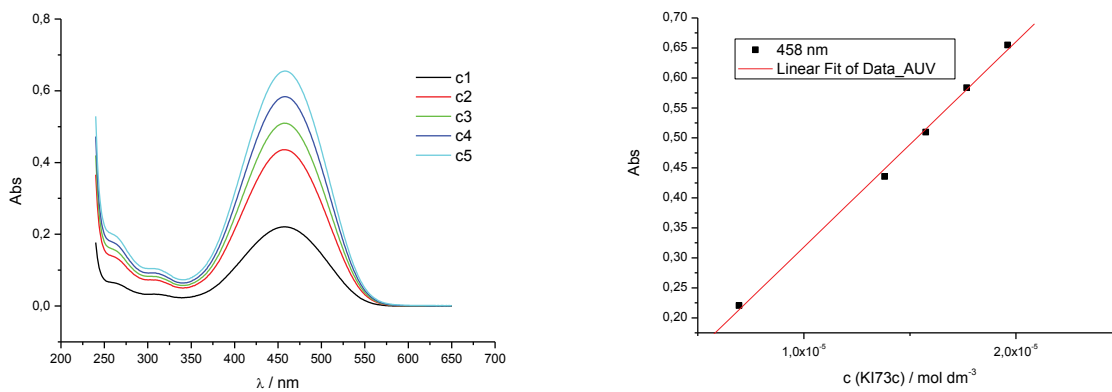
18. S. U. Rehman, T. Sarwar, M. A. Husain, H. M. Ishqi, M. Tabish, *Arch. Biochem. Biophys.* **576** (2015) 49 – 60.
19. D. Harvey, *Modern Analytical Chemistry*, McGraw-Hill, 2000., 368 – 412.
20. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Brooks/Cole – Thomson Learning, Canada, 2004, 784 – 824.
21. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, Seventh edition, W. H. Freeman & Company, 2017, 824 – 829.
22. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013., 115
23. H. F. Gilbert, *Basic Concepts in Biochemistry A Student's Survival Guide*, 2. izdanje, McGraw-Hill Companies, SAD, 2000.
24. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Brooks/Cole – Thomson Learning, Canada, 2004, 825 – 836.
25. V. González-Ruiz, A. I. Olives, M. A. Martín, P. Ribelles, M. T. Ramos, J. C. Menéndez, *Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies*, 2011, 65 – 90.
26. G. Scatchard, *Ann. NY Acad. Sci.* **51** (1949) 660.
27. A. Bose, *J. Lumin* **169** (2016) 220 – 226.
28. T. Šmidlehner, I. Piantanida, G. Pescitelli, *Beilstein J. Org. Chem.* **14** (2018) 84 – 105.
29. M. Čehić, Cirkularni dikroizam, Microsoft Office PowerPoint Presentation, 2016.
30. N. C. Garbett, P. A. Ragazzon, J. B. Chaires, *Nature protocols* **2** (2007) 3166 – 3172.
31. N. Berova, K. Nakanishi, R. W. Woody, *Circular Dichroism Principles and Applications*; Wiley-VCH: New York, 2000.
32. <https://imb.uq.edu.au/facilities/microscopy/hardware-software/confocal-microscopes> (preuzeto i prilagođeno 16.08.2019.)
33. M. S. Ignatius, D. M. Langenau, *Methods in Cell Biology* **105** (2011) 437 – 459.
34. Jeffrey L. Bresloff and Donald M. Crothers, *Biochemistry*, 1981, 3547 – 3553.
35. Chalikian TV, Völker J, Plum GE, Breslauer KJ. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1999** 7853 – 7858.
36. <http://www.chemaxon.com>, pristupljeno 1.3.2019.
37. A. Rodger, B. Norden, *Circular Dichroism and Linear Dichroism*, Oxford University Press, New York 1997.



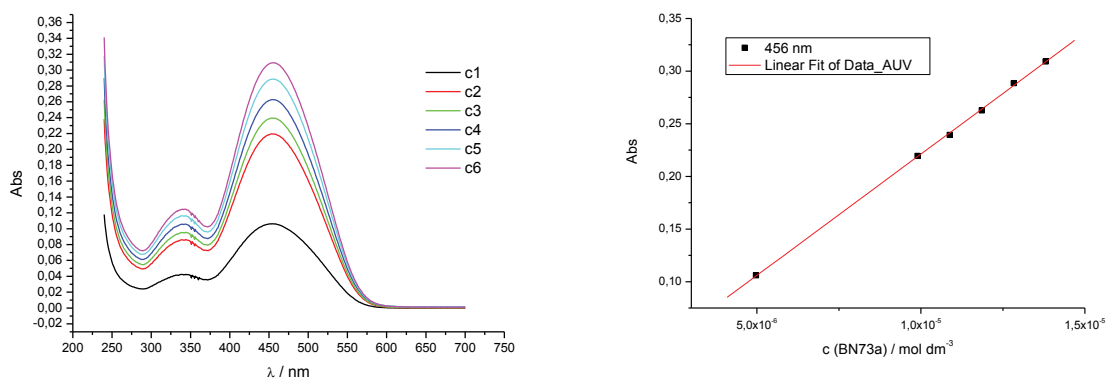
## § 8. DODATAK



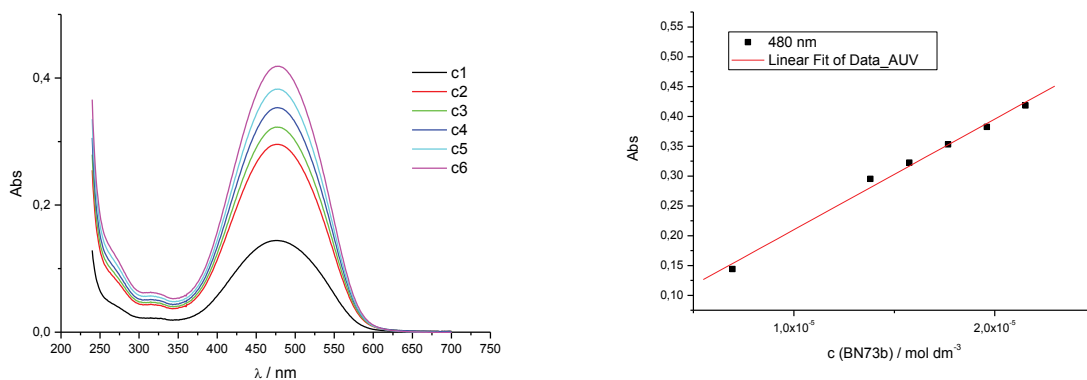
Slika D 1. lijevo: UV/Vis spektar spoja KI73B u koncentracijskom rasponu  $6,95 \times 10^{-6} - 2,15 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  pri pH 5,00 , u kakodilatnom puferu  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ; desno: ovisnost apsorbancije spoja KI73B o koncentraciji pri 442 nm



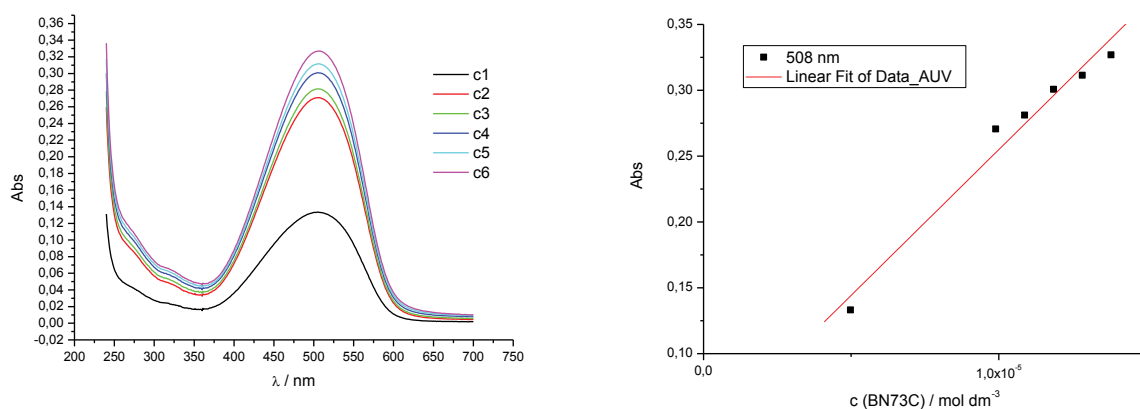
Slika D 2. lijevo: UV/Vis spektar spoja KI73C u koncentracijskom rasponu  $6,95 \times 10^{-6} - 1,96 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  pri pH 5,00 , u kakodilatnom puferu  $c = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ; desno: ovisnost apsorbancije spoja KI73C o koncentraciji pri 458 nm



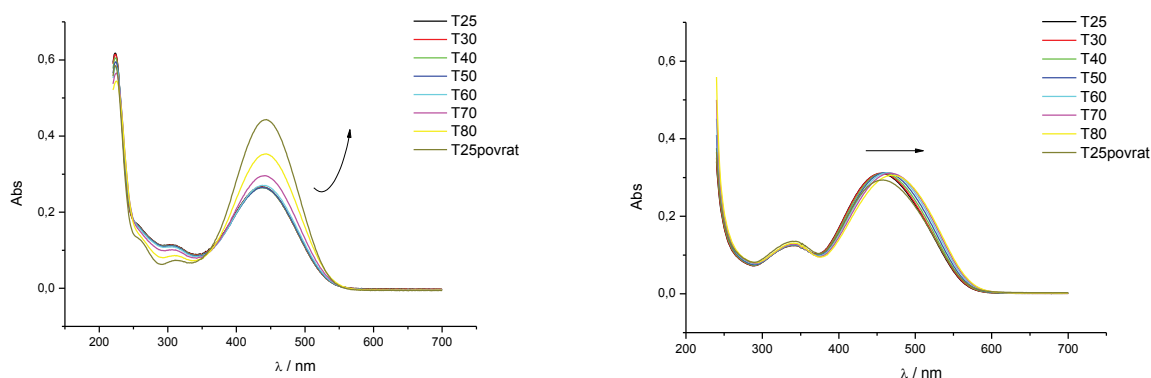
Slika D 3. lijevo: UV/Vis spektar spoja BN73A u koncentracijskom rasponu  $4,98 \times 10^{-6}$  –  $1,38 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> pri pH 7,08 , u kakodilatnom puferu  $c= 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>; desno: ovisnost apsorbancije spoja BN73A o koncentraciji pri 456 nm



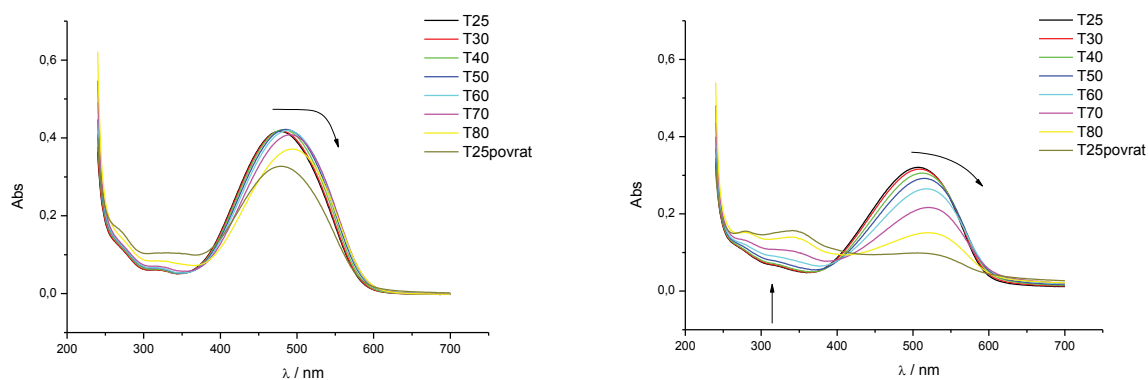
Slika D 4. lijevo: UV/Vis spektar spoja BN73B u koncentracijskom rasponu  $4,98 \times 10^{-6}$  –  $1,38 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> pri pH 7,08 , u kakodilatnom puferu  $c= 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>; desno: ovisnost apsorbancije spoja BN73B o koncentraciji pri 480 nm



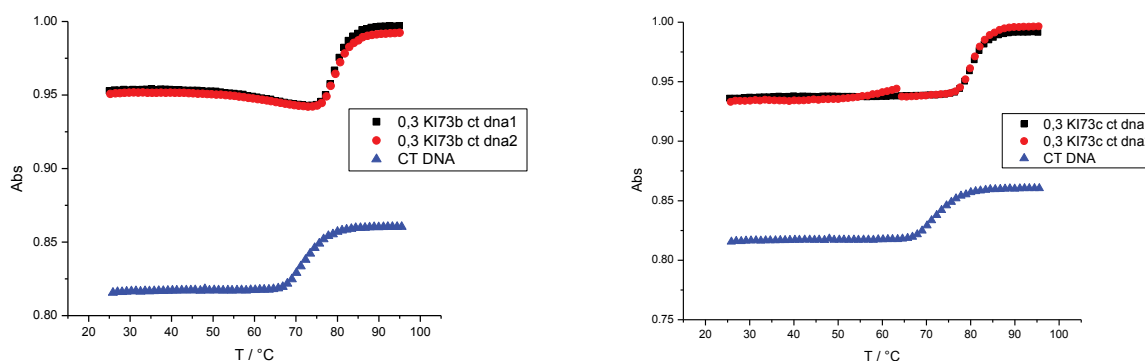
Slika D 5. lijevo: UV/Vis spektar spoja BN73C u koncentracijskom rasponu  $4,98 \times 10^{-6}$  –  $1,38 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> pri pH 7,08 , u kakodilatnom puferu  $c= 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>; desno: ovisnost apsorbancije spoja BN73C o koncentraciji pri 508 nm



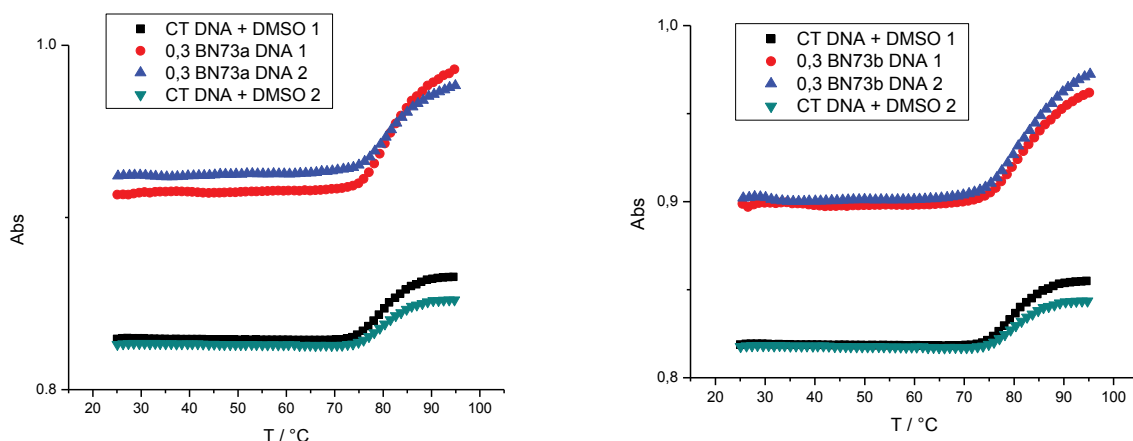
Slika D 6. Prikaz UV/Vis spektra spoja KI73B (lijevo) koncentracije  $1,96 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  i spoja BN73A (desno) koncentracije  $1,4 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  o temperature pri pH 5,00, tj. pH 7,08, u kakodilatnom puferu,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



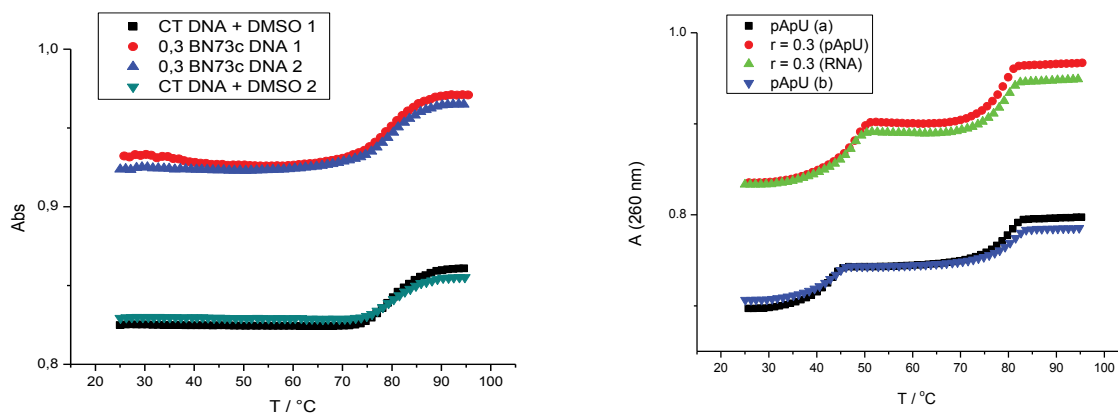
Slika D 7. Prikaz UV/Vis spektra spoja BN73B (lijevo) koncentracije  $1,4 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  i spoja BN73C (desno) koncentracije  $1,4 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  o temperature pri pH 7,08, u kakodilatnom puferu,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



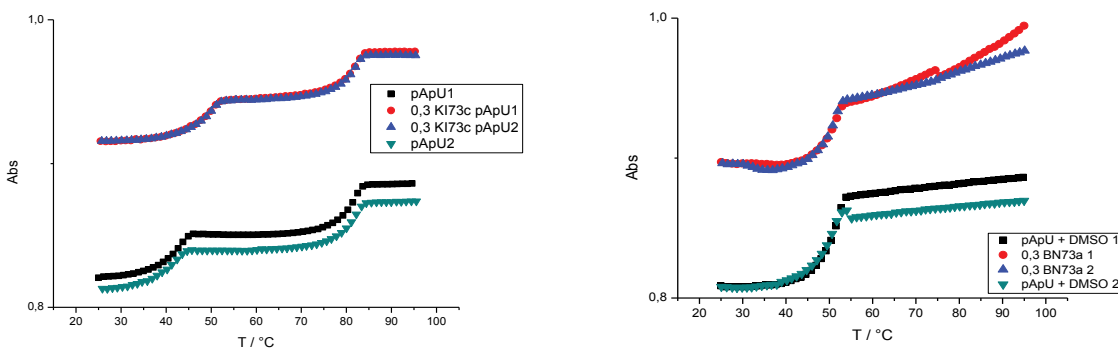
Slika D 8. Krivulje taljenja CT DNA dodavanjem KI73B (lijevo) i KI73C (desno),  $c(\text{DNA}) = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ , omjeri  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  označeni su u grafičkoj legend, pH = 5,00, Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



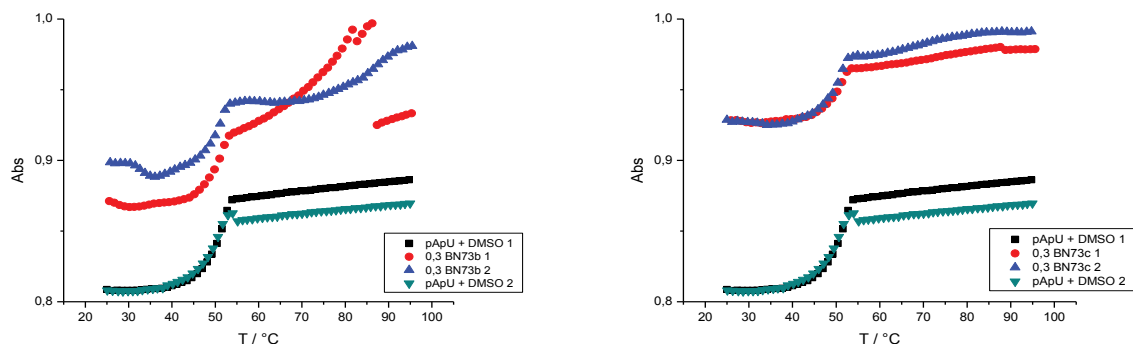
Slika D 9. Krivulje taljenja CT DNA dodavanjem BN73A (lijevo) i BN73B (desno),  $c$  (DNA) =  $2 \times 10^{-5}$  mol dm $^{-3}$ , omjeri  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  označeni su u grafičkoj legend, pH = 7,08, Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05$  mol dm $^{-3}$



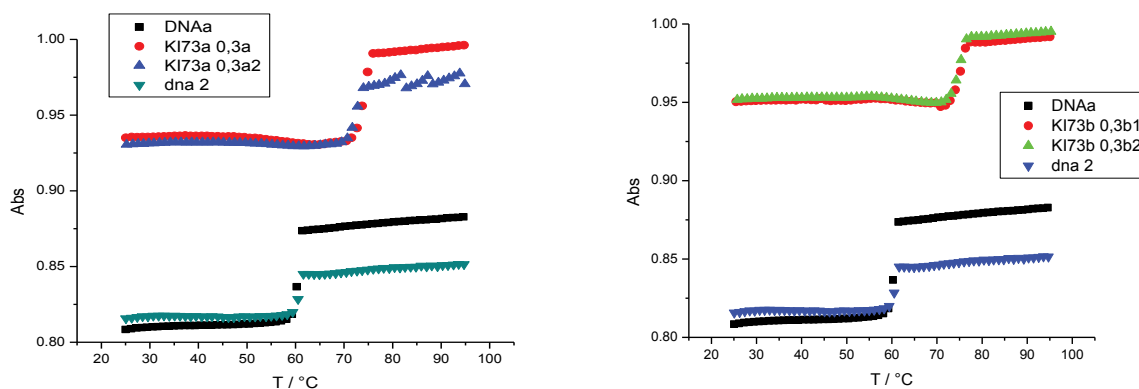
Slika D 10. lijevo: krivulje taljenja CT DNA dodavanjem BN73C (lijevo),  $c$  (DNA) =  $2 \times 10^{-5}$  mol dm $^{-3}$ , omjeri  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  označeni su u grafičkoj legend, pH = 7,08, Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05$  mol dm $^{-3}$ ; desno: krivulje taljenja poli A – poli U dodavanjem KI73A,  $c$  (RNA) =  $2 \times 10^{-5}$  mol dm $^{-3}$ , omjeri  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  označeni su u grafičkoj legend, pH = 5,00, Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05$  mol dm $^{-3}$



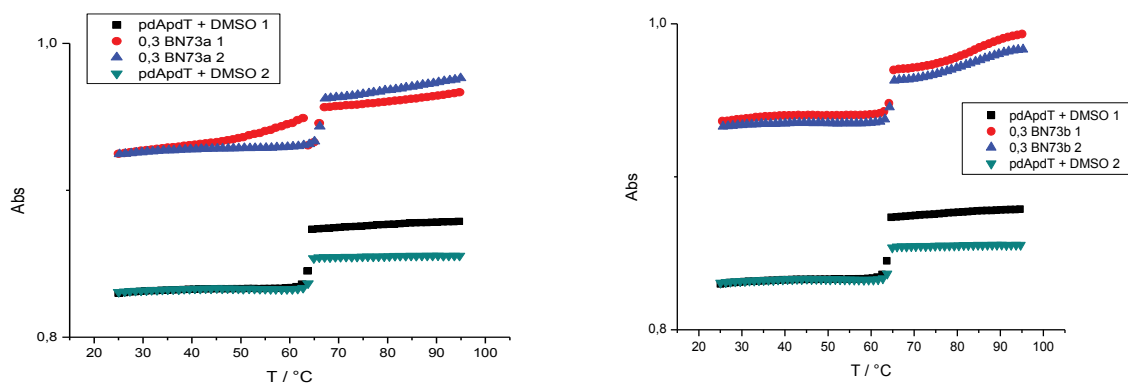
Slika D 11. Krivulje taljenja poli A – poli U dodavanjem KI73C (lijevo) i BN73A (desno),  $c(\text{RNA}) = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ , omjeri  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  označeni su u grafičkoj legendi,  $\text{pH} = 5,00$ , tj.  $\text{pH} = 7,08$ , Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



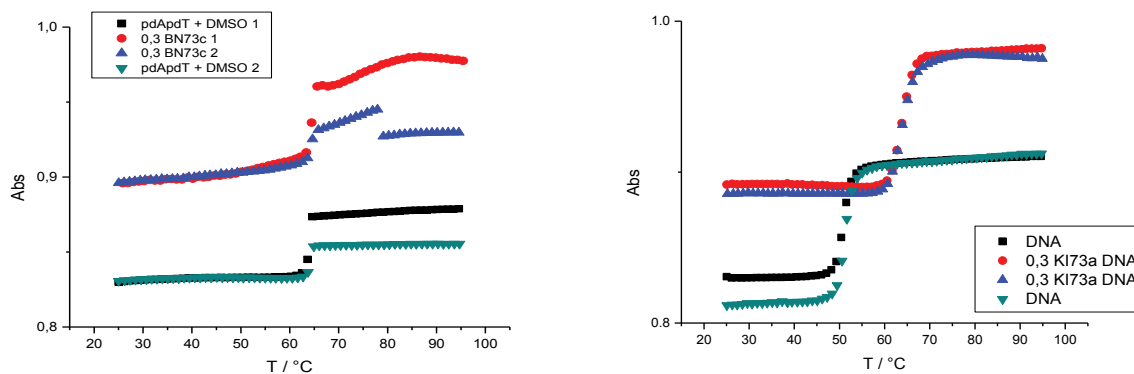
Slika D 12. Krivulje taljenja poli A – poli U dodavanjem BN73B (lijevo) i BN73C (desno),  $c(\text{RNA}) = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ , omjeri  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  označeni su u grafičkoj legendi,  $\text{pH} = 7,08$ , Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



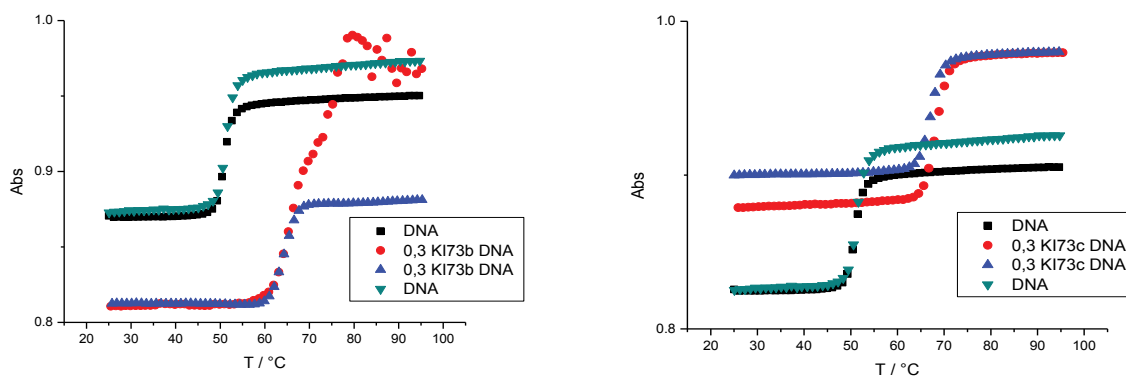
Slika D 13. Krivulje taljenja poli dA – poli dT dodavanjem KI73A (lijevo) i KI73B (desno),  $c(\text{DNA}) = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ , omjeri  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  označeni su u grafičkoj legendi,  $\text{pH} = 5,00$ , Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



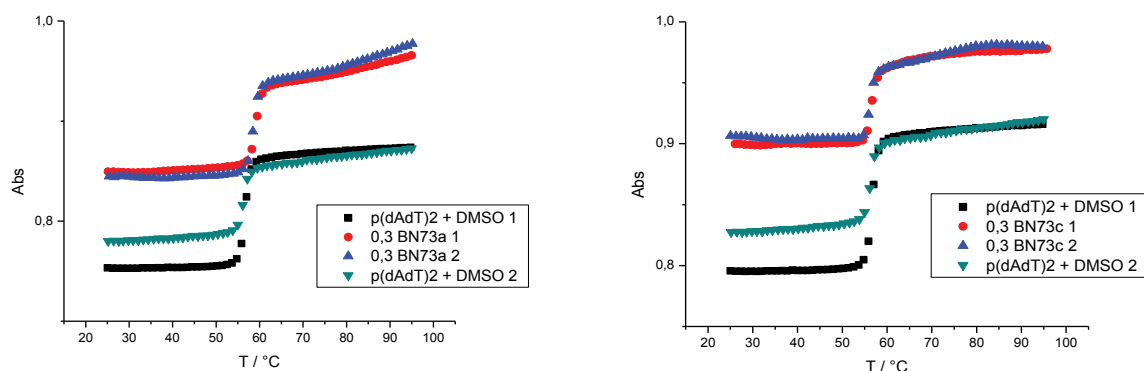
Slika D 14. Krivulje taljenja poli dA – poli dT dodavanjem BN73A (lijevo) i BN73B (desno),  $c(\text{DNA}) = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ , omjeri  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  označeni su u grafičkoj legend,  $\text{pH} = 7,08$ , Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



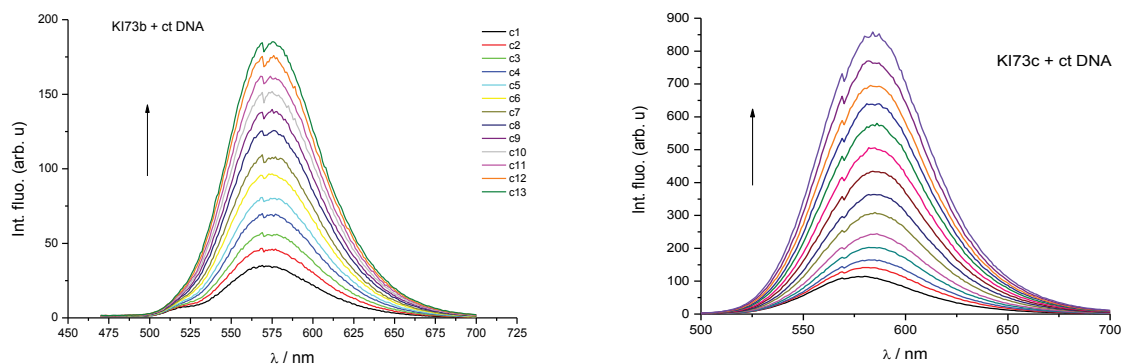
Slika D 15. lijevo: krivulje taljenja poli dA – poli dT dodavanjem BN73C (lijevo),  $c(\text{DNA}) = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ , omjeri  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  označeni su u grafičkoj legend,  $\text{pH} = 7,08$ , Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ; desno: krivulje taljenja poli dAdT – poli dAdT dodavanjem KI73A,  $c(\text{DNA}) = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ , omjeri  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  označeni su u grafičkoj legend,  $\text{pH} = 5,00$ , Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



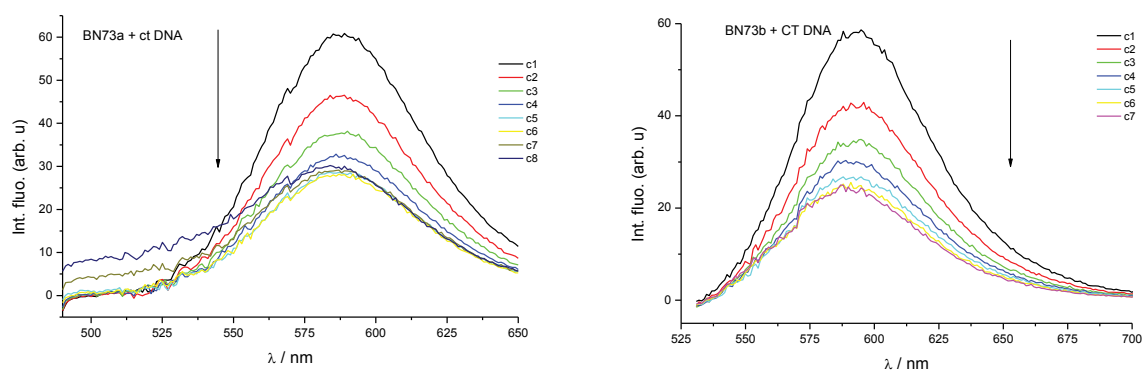
Slika D 16. Krivulje taljenja poli dAdT – poli dAdT dodavanjem KI73C (lijevo) i KI73C (desno),  $c(\text{DNA}) = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ , omjeri  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  označeni su u grafičkoj legend,  $\text{pH} = 5,00$ , Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



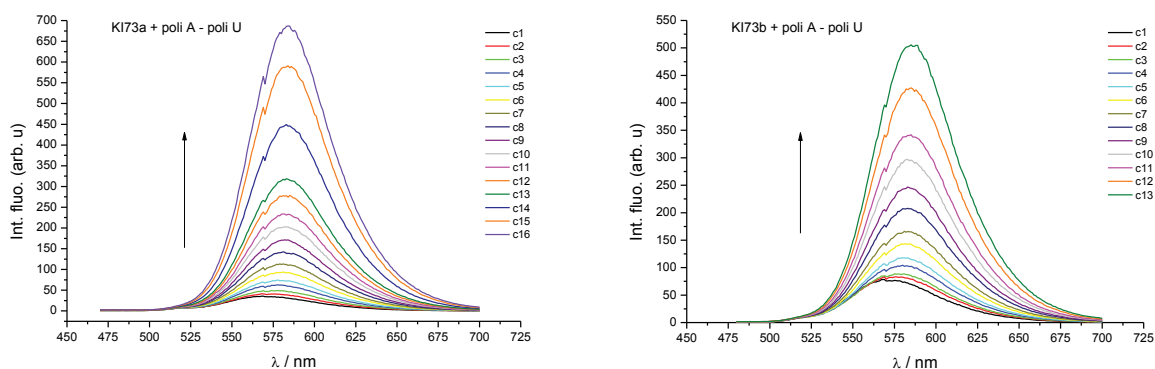
Slika D 17. Krivulje taljenja poli dAdT – poli dAdT dodavanjem BN73A (lijevo) i BN73C (desno),  $c(\text{DNA}) = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ , omjeri  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  označeni su u grafičkoj legend,  $\text{pH} = 7,08$ , Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



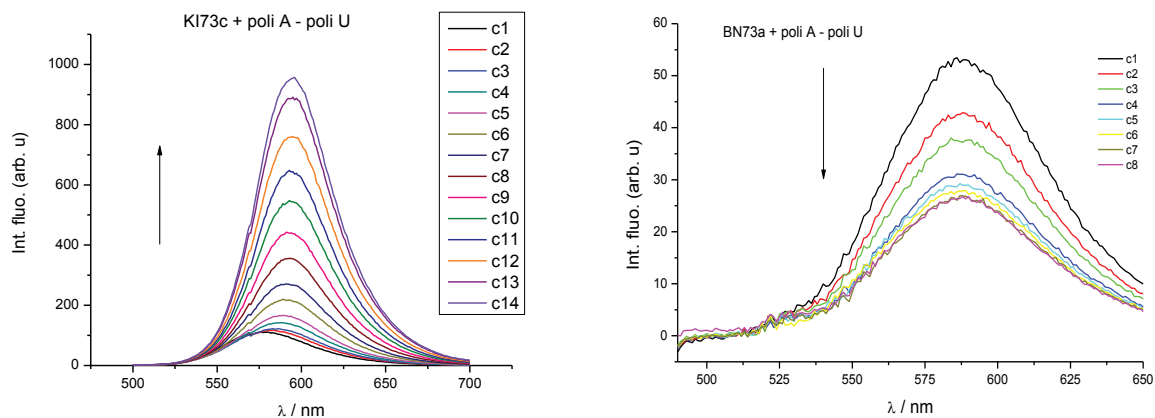
Slika D 18. Fluorimetrijske titracije spojeva KI73B (lijevo) i KI73C (desno) s polinukleotidnom CT DNA,  $\text{pH} = 5,00$ , Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



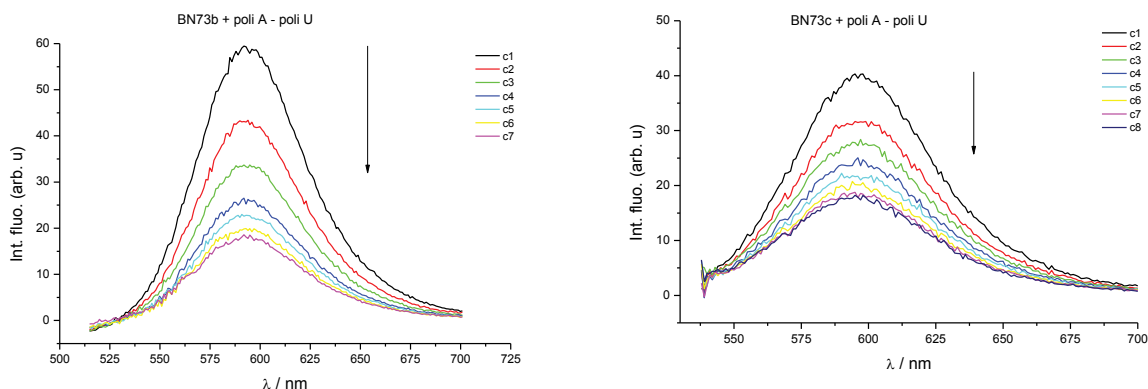
Slika D 19. Fluorimetrijske titracije spojeva BN73A (lijevo) i BN73B (desno) s polinukleotidnom CT DNA,  $\text{pH} = 7,08$ , Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



Slika D 20. Fluorimetrijske titracije spojeva KI73A (lijevo) i KI73B (desno) s polinukleotidnom poli A – poli U, pH = 5,00, Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$

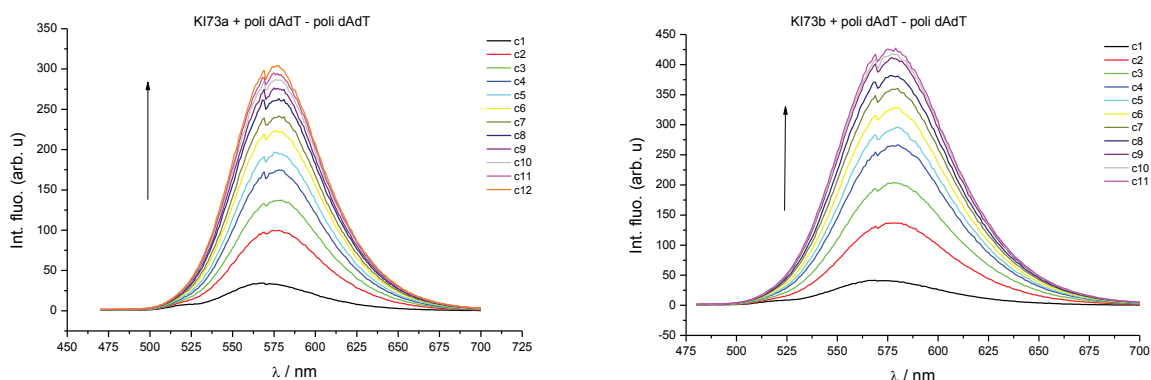


Slika D 21. Fluorimetrijske titracije spojeva KI73C (lijevo) i BN73A (desno) s polinukleotidnom poli A – poli U, pH = 5,00, tj. pH = 7,08, Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$

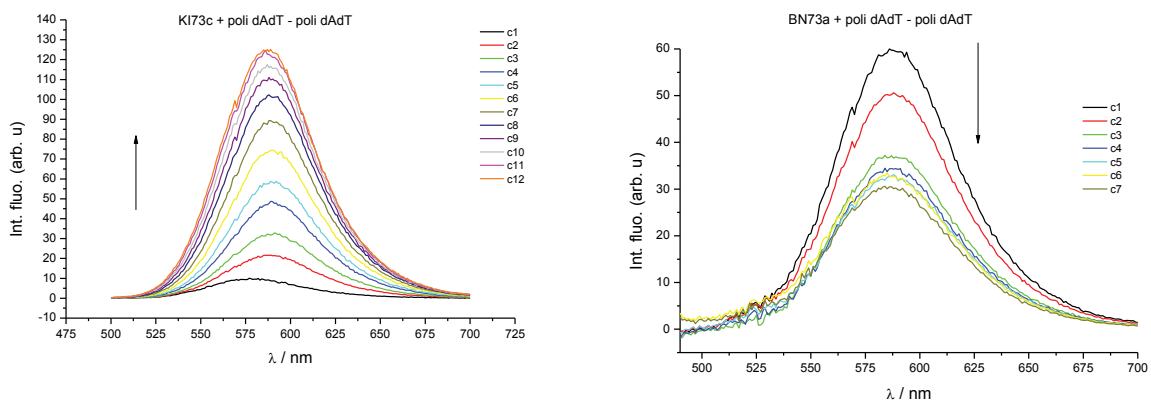


Slika D 22. Fluorimetrijske titracije spojeva BN73B (lijevo) i BN73C (desno) s polinukleotidnom poli A – poli U, pH = 7,08, Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$

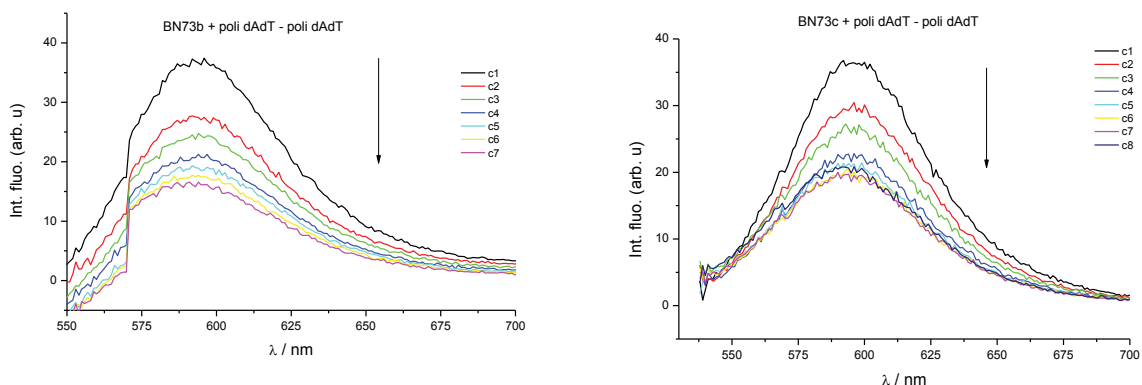




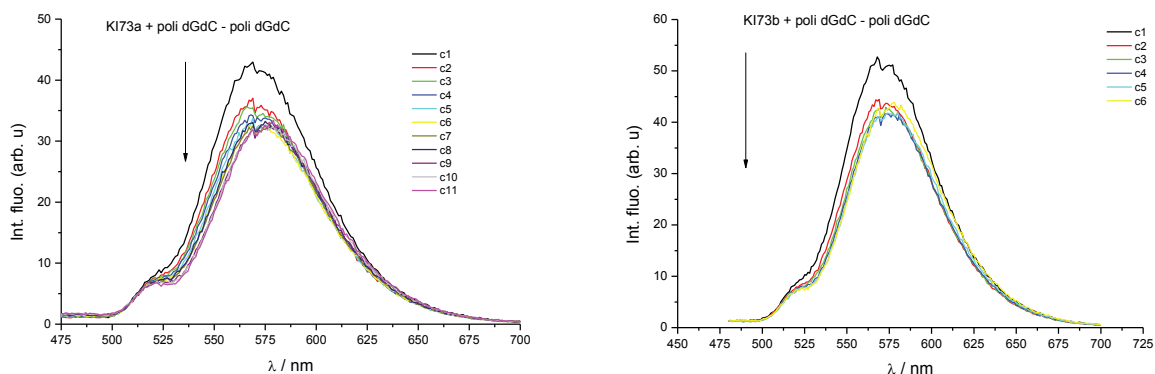
Slika D 23. Fluorimetrijske titracije spojeva KI73A (lijevo) i KI73B (desno) s polinukleotidnom poli dAdT – poli dAdT, pH = 5,00, Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



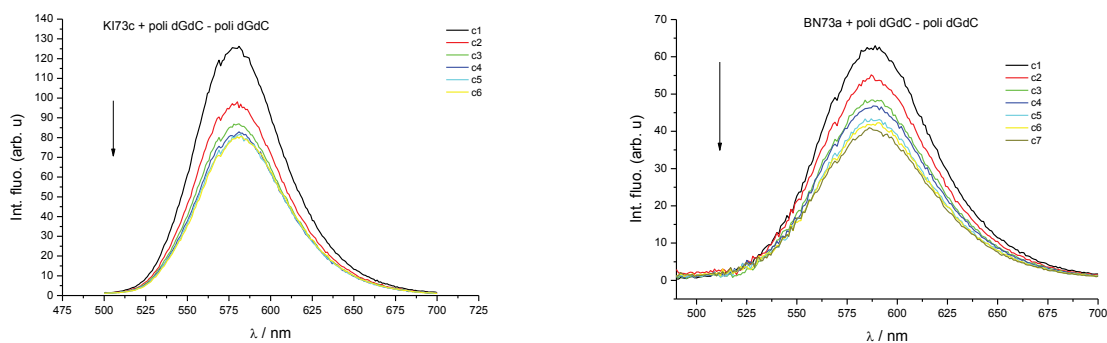
Slika D 24. Fluorimetrijske titracije spojeva KI73C (lijevo) i BN73A (desno) s polinukleotidnom poli dAdT – poli dAdT, pH = 5,00, tj. pH = 7,08, Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



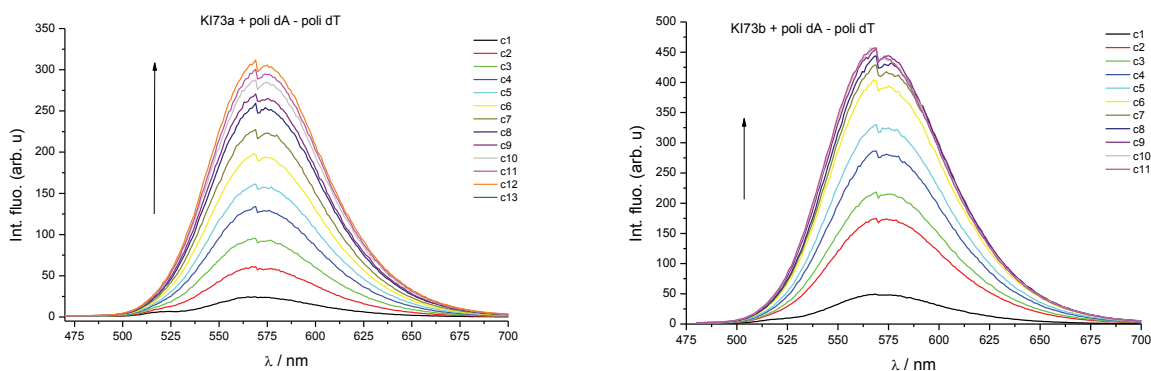
Slika D 25. Fluorimetrijske titracije spojeva BN73B (lijevo) i BN73C (desno) s polinukleotidnom poli dAdT – poli dAdT, pH = 7,08, Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



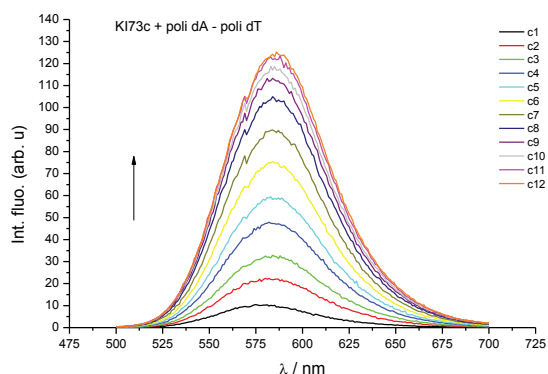
Slika D 26. Fluorimetrijske titracije spojeva KI73A (lijevo) i KI73B (desno) s polinukleotidnom poli dGdC – poli dGdC, pH = 5,00, Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



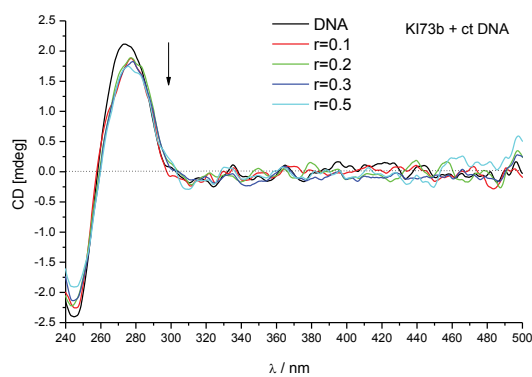
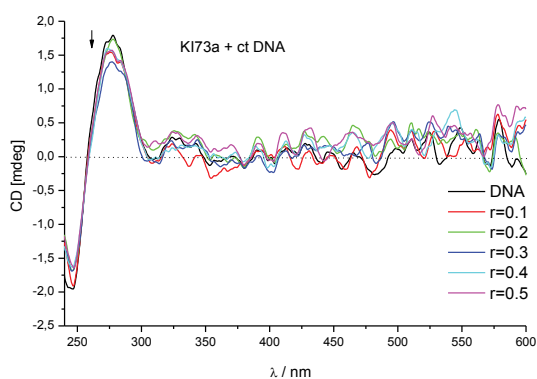
Slika D 27. Fluorimetrijske titracije spojeva KI73C (lijevo) i BN73A (desno) s polinukleotidnom poli dGdC – poli dGdC, pH = 5,00, tj. pH = 7,08, Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



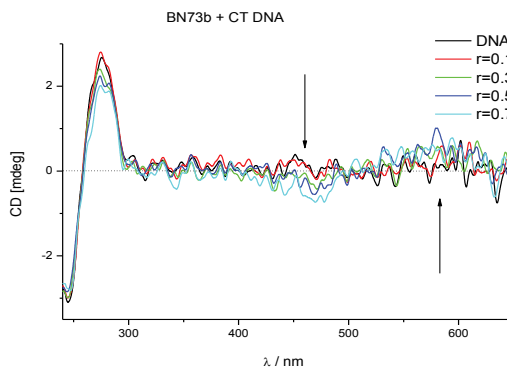
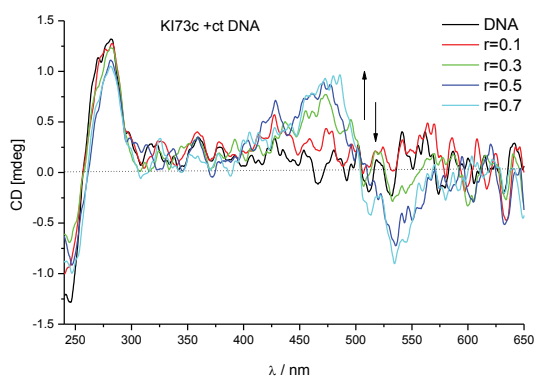
Slika D 28. Fluorimetrijske titracije spojeva KI73A (lijevo) i KI73B (desno) s polinukleotidnom poli dA – poli dT, pH = 5,00, Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



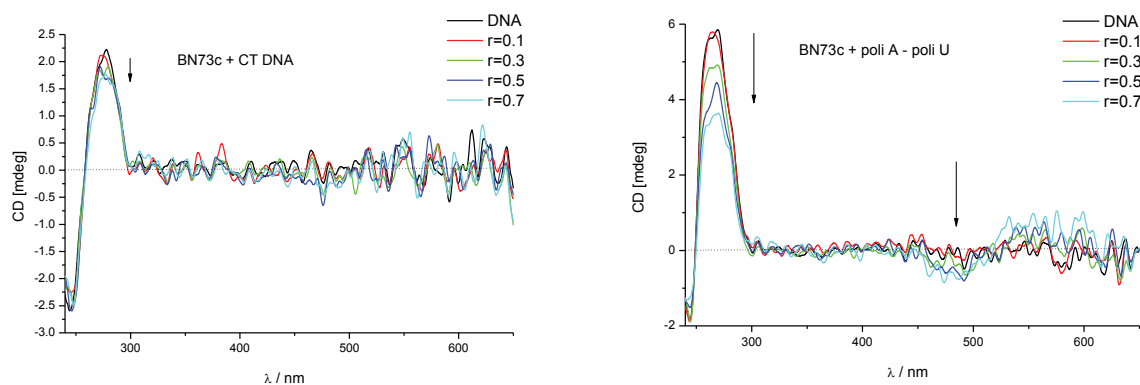
Slika D 29. Fluorimetrijske titracije spojeva KI73C s polinukleotidom poli dA – poli dT, pH = 5,00, Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



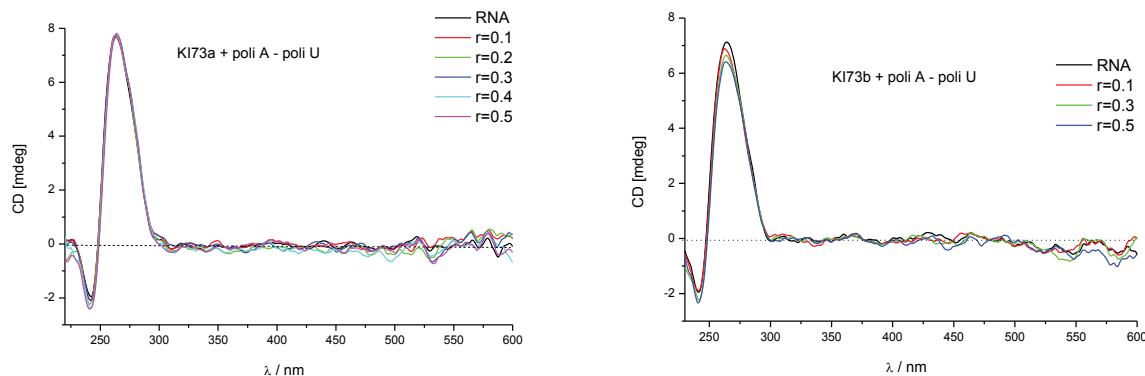
Slika D 30. CD titracija CT DNA ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) sa spojevima KI73A (lijevo) i KI73B (desno), različitim molarnim omjerima  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  (pH = 5,00, Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )



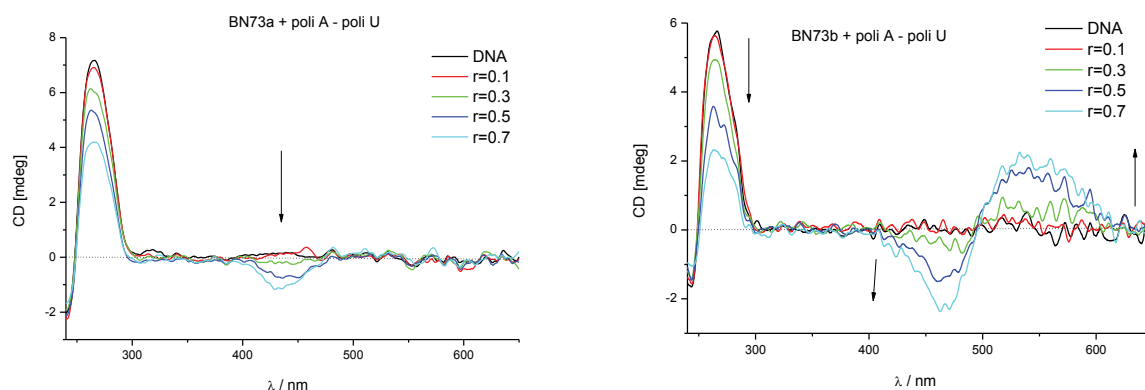
Slika D 31. CD titracija CT DNA ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) sa spojevima KI73C (lijevo) i BN73A (desno), različitim molarnim omjerima  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  (pH = 5,00, tj. pH = 7,08, Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )



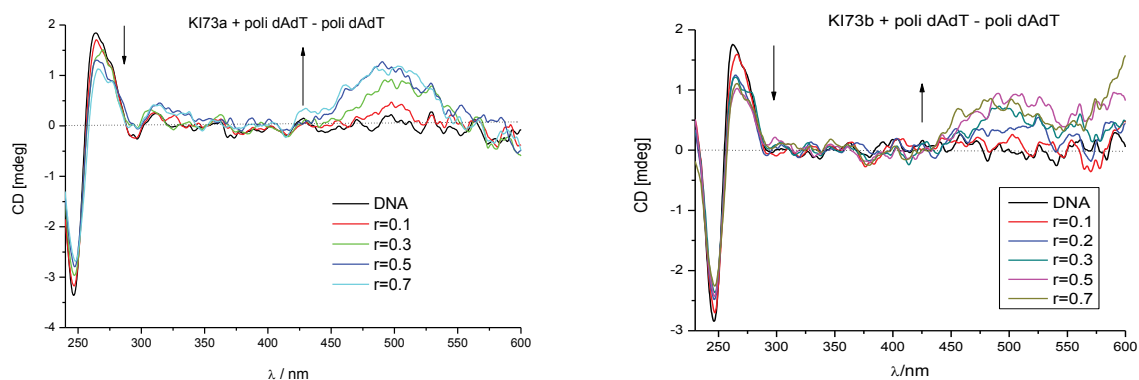
Slika D 32. CD titracija CT DNA ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) sa spojem BN73C (lijevo) i CD titracija poli A – poli U sa spojem BN73C (desno), različitim molarnim omjerima  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  (pH = 7,08, Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )



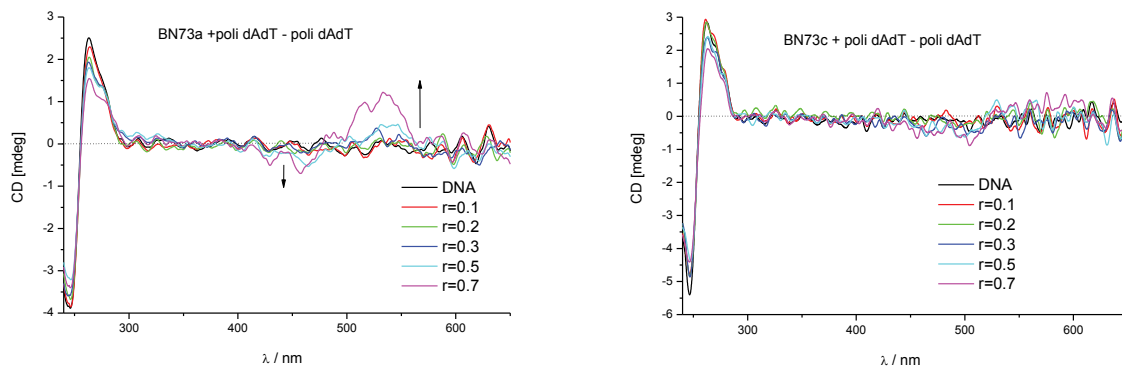
Slika D 33. CD titracija poli A – poli U ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) sa spojevima KI73A (lijevo) i KI73B (desno), različitim molarnim omjerima  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  (pH = 5,00, Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )



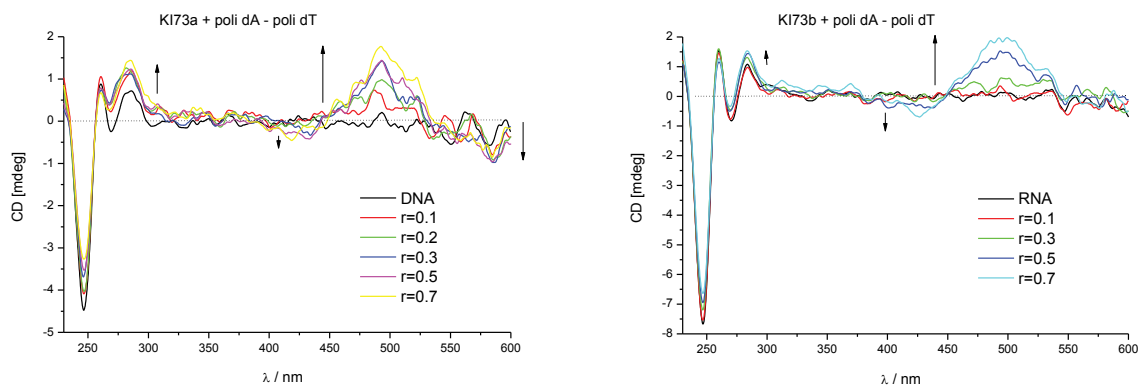
Slika D 34. CD titracija poli A – poli U ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) sa spojevima BN73A (lijevo) i BN73B (desno), različitim molarnim omjerima  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  (pH = 7,08, Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )



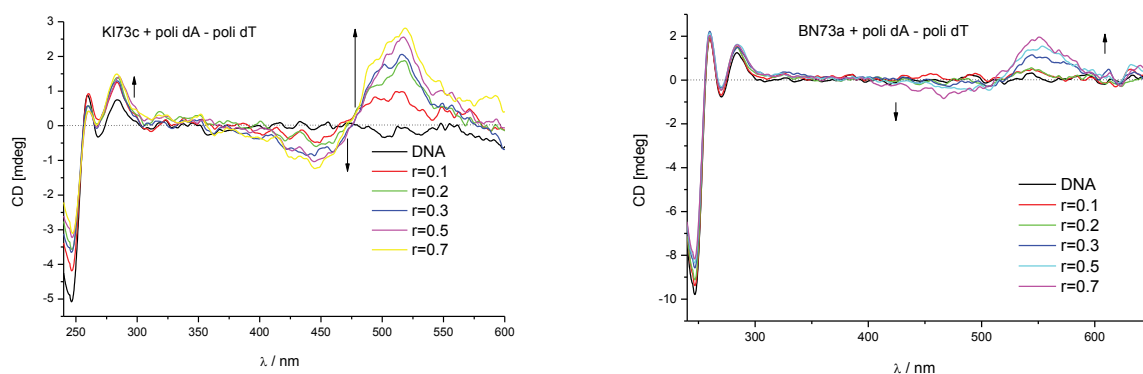
Slika D 35. CD titracija poli dAdT – poli dAdT ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) sa spojevima KI73A (lijevo) i KI73B (desno), različitim molarnim omjerima  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  ( $\text{pH} = 5,00$ , Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )



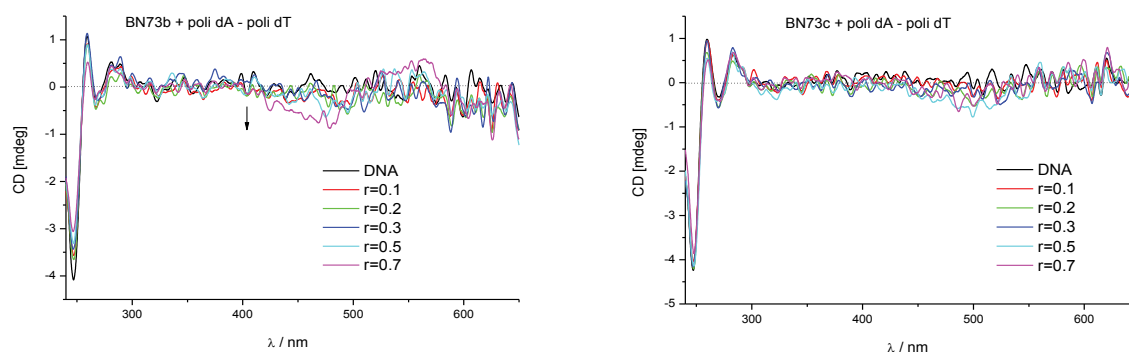
Slika D 36. CD titracija poli dAdT – poli dAdT ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) sa spojevima BN73A (lijevo) i BN73C (desno), različitim molarnim omjerima  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  ( $\text{pH} = 7,08$ , Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )



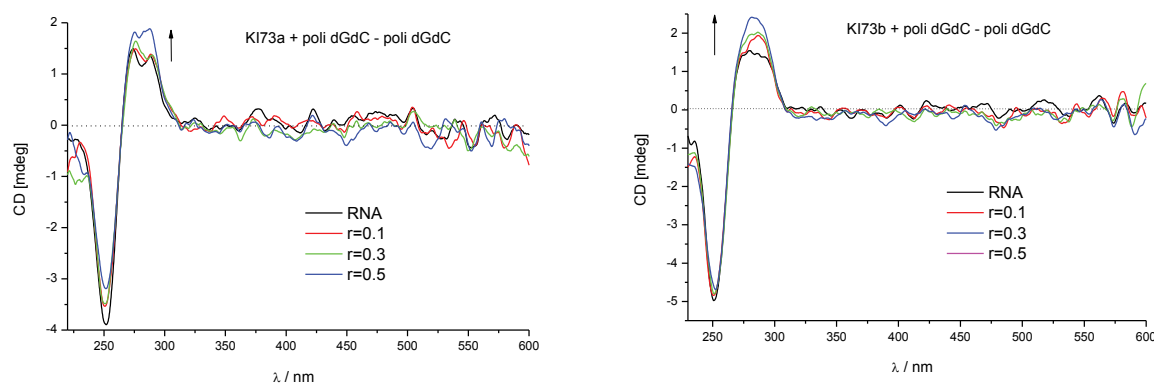
Slika D 37. CD titracija poli dA – poli dT ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) sa spojevima KI73A (lijevo) i KI73B (desno), različitim molarnim omjerima  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  ( $\text{pH} = 5,00$ , Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )



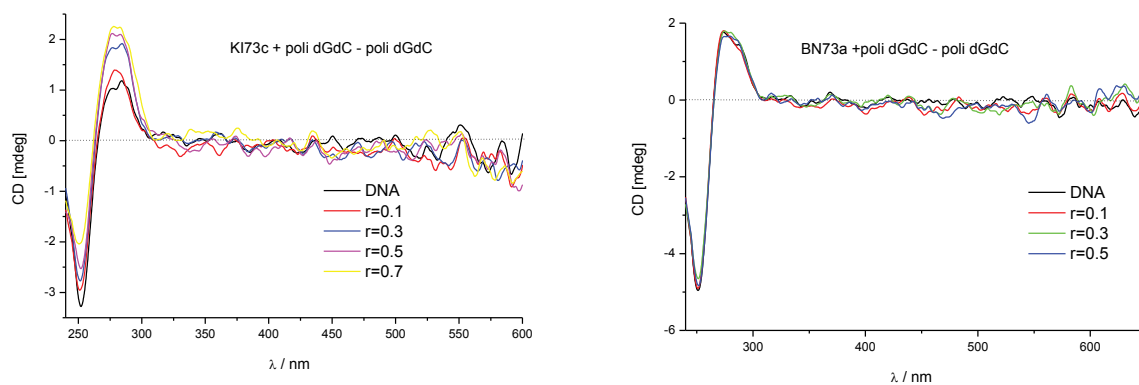
Slika D 38. CD titracija poli dA – poli dT ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) sa spojevima KI73C (lijevo) i BN73A (desno), različitim molarnim omjerima  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  ( $\text{pH} = 5,00$ , tj.  $\text{pH} = 7,08$ , Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )



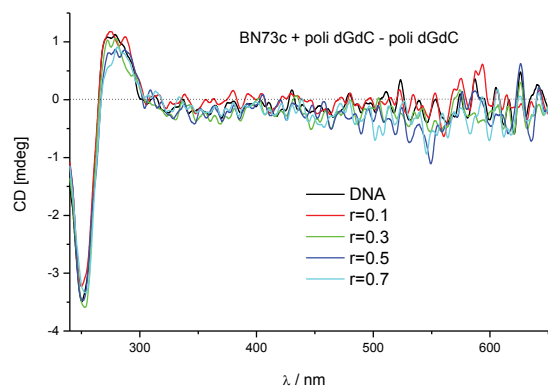
Slika D 39. CD titracija poli dA – poli dT ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) sa spojevima BN73B (lijevo) i BN73C (desno), različitim molarnim omjerima  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  ( $\text{pH} = 7,08$ , Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )



Slika D 40. CD titracija poli dGdC – poli dGdC ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) sa spojevima KI73A (lijevo) i KI73B (desno), različitim molarnim omjerima  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  ( $\text{pH} = 5,00$ , Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )



Slika D 41. CD titracija poli dGdC – poli dGdC ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) sa spojevima KI73C (lijevo) i BN73A (desno), različitim molarnim omjerima  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  (pH = 5,00, tj. pH = 7,08, Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )



Slika D 42. CD titracija poli dGdC – poli dGdC ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) sa spojem BN73C, različitim molarnim omjerima  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  (pH = 7,08, Na – kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )

## § 9. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Silvia Pšeničnik

Datum rođenja: 31. svibnja 1992.

Mjesto rođenja: Zagreb

### Obrazovanje

1999–2007 Osnovna škola Pantovčak, Zagreb

2007–2011 Gimnazija Tituša Brezovačkog, Zagreb

2011–2017 Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet,  
Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

### Nagrade i priznanja

2013 Posebna rektorova nagrada

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2012 Otvoreni dan kemije

2013 Otvoreni dan kemije

2014 Otvoreni dan kemije

2015 Otvoreni dan kemije

2016 Otvoreni dan kemije

2017 Otvoreni dan kemije

2018 Otvoreni dan kemije

2019 Otvoreni dan kemije



