Konjugati cijaninske boje i gvanidinijkarbonil-pirola kao nove fluorescentne i CD probe za razlikovanje različitih sekundarnih struktura dvolančane DNA ili dvolančane RNA

Košćak, Marta

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:421375

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Marta Košćak

KONJUGATI CIJANINSKE BOJE I GVANIDINIJKARBONIL-PIROLA KAO NOVE FLUORESCENTNE I CD PROBE ZA RAZLIKOVANJE RAZLIČITIH SEKUNDARNIH STRUKTURA DVOLANČANE DNA ILI DVOLANČANE RNA

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 biomolekulske interakcije i spektroskopiju Instituta Ruđer Bošković pod mentorstvom dr.sc. Ive Piantanide i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Tamare Šmidlehner. 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 „Višekromoforne probe za prepoznavanje pojedinih struktura DNA, RNA i proteina “ (HrZZ IP-2018-01-5475).

Zahvale

Zahvaljujem se Institutu Ruđer Bošković, u prvom redu, Laboratoriju za biomolekulske interakcije i spektroskopiju, koji mi je omogućio potrebnu opremu i materijale za izradu diplomskog rada te svim njegovim članovima na nesebičnoj pomoći u svakom trenutku.

Veliku zahvalnost prvenstveno dugujem svom mentoru dr. sc. Ivi Piantanida kao i neposrednoj voditeljici dr. sc. Tamari Šmidlehner za njihov doprinos pri nastanku važnih dijelova ovog rada. Hvala na strpljenju i izdvojenom vremenu, te na savjetima i uputama pri izradi diplomskog rada!

Također, zahvaljujem se svojoj mentorici s fakulteta, prof. dr. sc. Ivi Juranović Cindrić, što me uputila na Laboratorij za biomolekulske interakcije i spektroskopiju Instituta Ruđer Bošković, te je u svakom trenutku bila dostupna za konzultacije, pomoć i iskreni savjet.

Zahvaljujem se svojim prijateljima i prijateljicama s fakulteta što su obogatili ovaj dio moga života i učinili studiranje jednostavnijim i zabavnijim.

Najveću zahvalnost i zaslugu za postignuto upućujem svojoj obitelji, HVALA VAM što ste bili uz mene u lijepim ali i onim manje lijepim, teškim trenutcima, bez vas ništa ovo ne bi bilo moguće postići.
Veliko hvala i mom dečku na savjetima i potpori.

Sadržaj

SAŽETAK X
ABSTRACT XIII
§ 1. UVOD 1
§ 2. LITERATURNI PREGLED 4
2.1. Struktura DNA / RNA 4
2.2. Načini vezanja malih molekula na DNA/RNA 7
2.3. Fluorescencijska spektroskopija 8
2.4. Polarizacijska spektroskopija – Cirkularni dikroizam (CD) 10
2.5. Cijaninske boje 12
2.5.1. Porijeklo i primjena cijaninskih boja 12
2.5.2. Opća struktura cijaninskih boja 13
2.5.3. Povezivanje cijaninskih boja i nukleinskih kiselina 14
2.5.4. Spektroskopska svojstva boja 14
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO 16
3.1. Materijali i metode 16
3.1.1. Kemikalije 18
3.1.2. Uređaji 19
3.2. Praćenje fizikalno-kemijskih svojstava vodenih otopina 19
3.1.3. Određivanje molarnih ekstinkcijskih koeficijenata vodenih otopina spojeva 19
3.3. Proučavanje DNA / RNA interakcija 20
3.3.1. Fluorimetrijske titracije 20
3.3.2. Temperaturno mekšanje 21
3.3.3. CD titracije 22
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA 23
4.1. Struktura spojeva 23
4.2. Karakterizacija cijaninskih konjugata u vodenom mediju 23
4.3 Istraživanja interakcija spoja 1 i spoja 2 s dvolančanom DNA / RNA 25
4.3.1 Pokusi termičke denaturacije 25
4.3.2 Spektrofotometrijske titracije 26
4.3.3 Eksperimenti cirkularnog dikroizma (CD) 28
§ 5. ZAKLJUČAK 31
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA 32

§ 7. LITERATURNI IZVORI 33

§ 8. DODATAK XV

8.1. Praćenje fizikalno-kemijskih svojstava vodenih otopina xv

8.1.1 Topljivost xv

8.1.2 Ispitivanje stabilnosti pomoću UV/Vis i fluorescentnog spektra xv

8.1.3 Temperaturna ovisnost xvii

8.2. Proučavanje interakcija spojeva 1 i 2 s dvolančanom DNA / RNA u vodenom mediju xviii

8.2.1 Fluorimetrijske titracije sa spojem 1 xviii

8.2.2 Fluorimetrijske titracije sa spojem 2 xxiii

8.2.3 CD titracije sa spojem 1 xxviii

8.2.4 CD titracije sa spojem 2 xxx

8.2.5 Temperaturno mekšanje – mjerenje ΔT_m spoja 1 xxxii

8.2.6 Temperaturno mekšanje – mjerenje ΔT_m spoja 2 xxxv

§ 9. ŽIVOTOPIS XXXVI

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

KONJUGATI CIJANINSKE BOJE I GVANIDINIJKARBONIL-PIROLA KAO NOVE FLUORESCENTNE I CD PROBE ZA RAZLIKOVANJE RAZLIČITIH SEKUNDARNIH STRUKTURA DVOLANČANE DNA ILI DVOLANČANE RNA

Marta Košćak

U sklopu rada okarakterizirana su dva nova konstitucijska izomera gvanidinijkarbonil-pirola (GCP) i 6-bromo-tiazol oranž (cijanin), koji se razlikuju u svojoj povezanosti: kod jednog konjugata GCP je s cijaninom vezan preko atoma dušika u benzotiazolu, a drugi konjugat je povezan preko dušika u kinolinu. Spojevi pokazuju različita svojstva u vodenom mediju, kao i različitost u prepoznavanju raznih dvolančanih DNA i dvolančanih RNA. Specifična karakteristika cijanina je povećana sklonost agregiranja u vodenom mediju. Oba spoja se efikasno vežu na dvolančane DNA i RNA s mikromolarnim afinitetom, s tim da je benzotiazolni izomer pokazao izrazitu fluorescentnu selektivnost prema dvolančanoj RNA, u usporedbi s ostalim ispitivanim dvolančanim DNA uzvojnicama, dok je kinolinski analog pokazao slabu fluorescencijsku selektivnost prema dvolančanoj GC-DNA. Vezanjem na DNA ili RNA, samo je izomer povezan preko kinolina pokazao, po vezanju na DNA/RNA, pojavu induciranog cirkularnog dikroizma (ICD; λ=450-550 nm), s tim da je pomoću ICD vrpci moguće pouzdano razlikovati A-T(U) polinukleotide od G-C polinukleotida.

(33 stranice, 10 slika, 2 tablice, 31 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: cijanin, cirkularni dikroizam, fluorescencija, gvanidinijkarbonil-pirol, prepoznavanje dvolančane DNA ili RNA

Mentor: dr. sc. Ivo Piantanida
Neposredni voditelj: dr. sc. Tamara Šmidlehner
Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): prof dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
2. prof. dr. sc. Željka Soldin
3. prof. dr. sc. Ines Primožič

Datum diplomskog ispita:
6. rujna 2019.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

THE CONJUGATES OF CYANINE DYE AND GUANIDINIOCARBONYL-PYRROLE AS A FLUORESCENT AND CD PROBRS FOR DISTINGUISHING BETWEEN VARIOUS DOUBLE STRANDED DNA OR DOUBLE STRANDED RNA SECONDARY STRUCTURES

Marta Košćak

Two novel constitutional isomers of guanidiniocarbonyl-pyrrole (GCP) and 6-bromo-thiazole orange (cyanine) were characterized, differing only in linker connectivity between GCP and cyanine (benzothiazole nitrogen *vs* quinoline nitrogen). Conjugates revealed distinctively different properties in aqueous medium, as well as different recognition pattern of various ds-DNA or ds-RNA sequences. Namely, quinolone-linked was more prone to aggregation in aqueous medium. Both compounds effectively bind, with micromolar affinity, to double-stranded DNA and RNA, whereby benzothiazole-linked isomer showed distinct fluorimetric selectivity toward ds-RNA in comparison to any other tested ds-DNA, whereas the quinolone-linked analog showed similar fluorescence response to all studied DNA/RNA. By binding to DNA or RNA, only the quinoline analogue showed induced circular dichroism bands (ICD; λ = 450-550 nm), whereby it was possible to use an ICD bands to reliably differentiate AT (U) polynucleotides from GC polynucleotides.

(33 pages, 10 figures, 2 tables, 31 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: cyanine, circular dichroism, fluorescence, guanidiniocarbonyl-pyrrole, double stranded DNA/RNA sensing

Mentor: dr. sc. Ivo Piantanida
Assistant mentor: dr. sc. Tamara Šmidlehner
Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): prof dr. sc. Iva Juranović Cindrić
Reviewers:

1. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
2. prof. dr. sc. Željka Soldin
3. prof. dr. sc. Ines Primožič

§ 1. UVOD

Raznovrsna primjena malih fluorescentnih proba usmjerenih na proučavanje DNA i RNA u biokemijske i biomedicinske svrhe izazvala je ogroman interes, te je zbog svestranosti primjene postala nezaobilazan alat praćenja bioloških procesa. [1]

Prethodna istraživanja DNA i RNA boja uglavnom su bila usmjerena na proučavanje funkcija nukleinskih kiselina, odnosno selektivnog ili specifičnog obilježavanja DNA / RNA. [2,3,4] Međutim, ogromna složenost DNA procesa, koji ne ovise samo o sastavu parova baza kodirajuće DNA sekvence, nego uključuju i epigenetiku, tek su nedavno privukla pozornost. [5]

Zbog raznolikosti svoje primjene, cijaninske boje su jedne od najkorištenijih sintetskih boja. Intrinzički nefluorescentne u vodenom mediju, posjeduju sposobnost vezanja u dvostruku uzvojnicu DNA ili RNA, pri čemu počinju emitirati izrazito jaku fluorescenciju, što ih čini idealnim fluorescentnim markerima. Trenutni interes znanstvenika je proučavanje načina na koji određena cijaninska boja nekovalentnim vezanjem prepoznaje različite slijedove DNA ili RNA. Zapažena je velika poveznica između strukture boje i modela vezanja u DNA / RNA, o čemu će biti riječi u ostatku rada. [6]

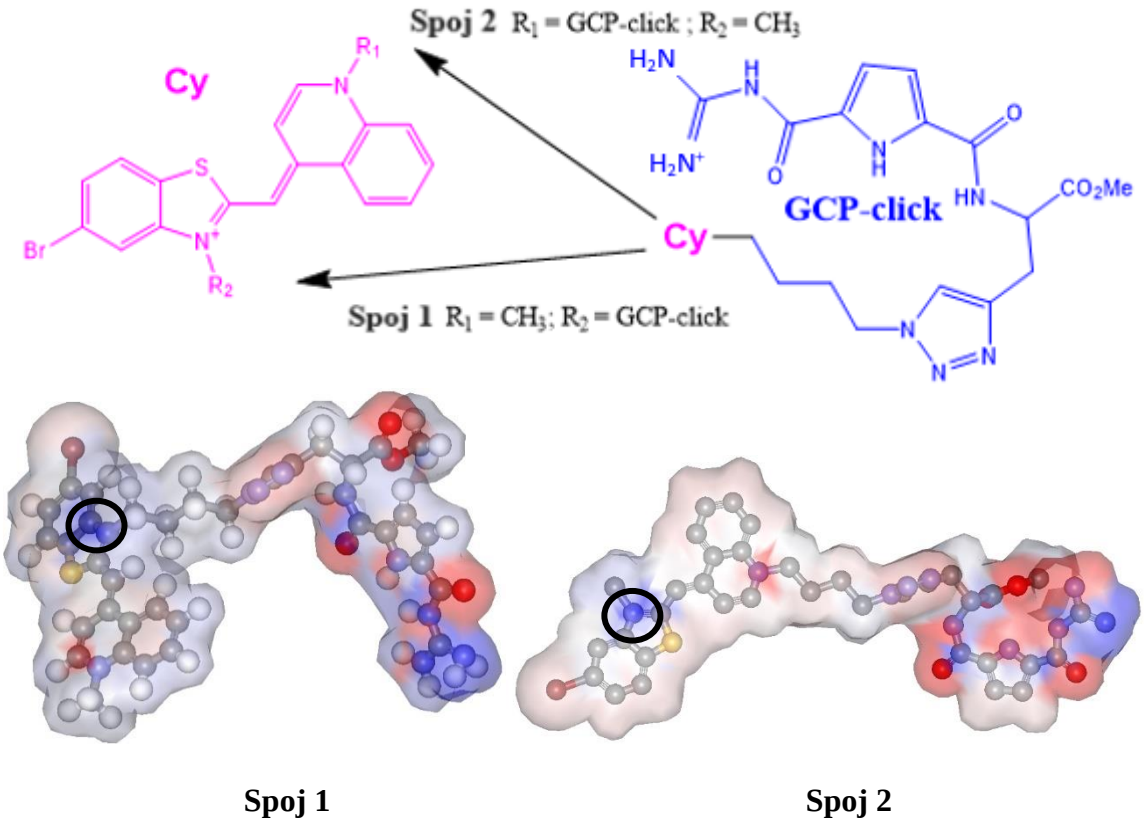
Gvanidinijkarbonil-pirolana jedinica (GCP) ima sposobnost protoniranja te učinkovito veže oksoanione, npr. karboksilate i fosfate, čak i u polarnom, vodenom mediju. [7] Piren-GCP analozi pokazali su se učinkovitim višenamjenskim probama s mogućnošću prepoznavanja različitih dvolančanih DNA i dvolančanih RNA, uz istovremeno praćenje fluorimetrijskih odgovora i odgovora cirkularnog dikroizma. [8] Piren, kao interkalator, omogućuje vezanje u helikalnu strukturu DNA, no kombinirajući ga s gvanidinijkarbonil-pirolanim kationom, postiže se uspješno, no različito vezanje piren-GCP analoga u dvostruku uzvojnicu DNA i RNA. [7] Također, moguće je reverzibilno kontrolirati fluorimetrijsko prepoznavanje analoga piren-GCP-a pomoću pH. [9]

Iz nedavno provedenih istraživanja ustanovljeno je da su konjugati izosteričnog cijanina s pirenom pokazali različitu interakciju s DNA, RNA i proteinima (BSA) uslijed različite povezanosti s cijaninskim kromoforom. [10] Pripremljen je prvi konjugat cijanina i GCP-a koji je pokazao obećavajuću fluorimetrijsku i CD selektivnost prema različitim dvolančanim DNA ili dvolančanim RNA. Selektivnost je, zbog prisutnosti GCP-a, dodatno kontrolirana

pomoću pH. [11] Preliminarni rezultati prvog dizajna konjugata cijanina i GCP-a nisu obuhvaćali rezultate istraživanja fine strukturne razlike, no pretpostavljajući obećavajuće rezultate, osmišljeni su i pripremljeni novi analozi, prikazani u ovom radu.

Strukture novih spojeva prikazane su na slici 1. Poveznica je produljena u odnosu na prethodno proučavani analog. [9] Napravljena je zamjena supstituenata Cl s Br, jer je povećani volumen Br povezan s mogućnošću blokiranja DNA / RNA interkaliranja, usmjeravajući male molekule na vezanje u DNA / RNA utore, što pridonosi osjetljivijem prepoznavanju okoliša veznog mjesta i time mogućim razlikovanjem različitih slijedova DNA / RNA.

Pripravljeni konjugati (Slika 1) su konstitucijski izomeri. Razlikuju se u povezanosti GCP dijela molekule na cijanin (preko benzotiazola, odnosno kinolina), što rezultira u više (Spoj 1) ili manje (Spoj 2) zaštićenom položaju pozitivnog naboja u molekuli, prikazanog na slici 1. U slabo kiselim uvjetima obje molekule imaju mogućnost protoniranja zbog GCP jedinice i time povećanja ukupnog pozitivnog naboja, što omogućuje kontrolu elektrostatske interakcije s DNA / RNA promjenom pH. Naime, DNA i RNA su, zbog negativno nabijene šećerno-fosfatne okosnice, polianioni te lako stvaraju elektrostatske interakcije s malim kationima, pri čemu dolazi do stvaranja kompleksa.



Slika 1. GORE: opća struktura ispitivanih spojeva; DOLJE: kuglično-štapni modeli s naznačenom površinom VdW radijusa koja označava raspodjelu atomskih naboja (crveno-negativan naboj; plavo pozitivan naboj). Razlika u izloženosti stalnog pozitivnoog naboja okolišu (crni krugovi).

Izbor dvolančanih DNA i RNA ovisio je o značajnim razlikama u njihovoj sekundarnoj strukturi. Odabrane su sljedeće alternirajuće, polinukleotidne sekvence: poli dAdT- poli dAdT lanci posjeduju karakterističnu B helikalnu strukturu, te se u njihov mali utor lako vežu male molekule; poli dGdC- poli dGdC imaju mali utor koji je sterički blokiran amino skupinama gvanina, s čime je ometeno umetanje malih molekula u mali utor; poli A-poli U sadrži tipičnu RNA A helikalnu strukturu s velikim utorom kao mogućim mjestom vezanja malih molekula. Za usporedbu je korištena prirodno izolirana *ct*DNA (eng. *calf timus* DNA), odnosno DNA iz telećeg timusa, koju karakterizira tipična B helikalna struktura s podjednakim udjelom A-T i C-G baznih parova. [12]

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Struktura DNA / RNA

Nukleinske kiseline, DNA i RNA, su nositelji genetičke informacije u stanici. Makromolekula DNA se sastoji od dva, komplementarna polinukleotidna lanca, međusobno zavijena tako da poprima oblik dvostruke uzvojnice. [13] Osnovna građevna jedinica nukleinske kiseline je nukleotid. Svaki se nukleotid sastoji od tri komponente: baze, šećera i fosfata. Okosnica DNA izgrađena je od šećera 2'-deoksiriboze, koji je fosfodiesterskom vezom, vezan s fosfatima. Genetička informacija sadržana je u varijabilnom redosljedu baza, koje su glikozidnom vezom vezane za šećer 2'-deoksiribozu. [14]

Deoksiribonukleinska kiselina, DNA, sadrži šećer 2'-deoksiribozu. Naziv 2'-deoksiriboza ukazuje da šećer na 2' ugljiku nema vezanu hidroksilnu skupinu, nego samo dva vodika. [13] Povezivanje baze s 2'-deoksiribozom praćeno je uklanjanjem molekule vode između 1' ugljika šećera i baze formirajući glikozidnu vezu. Šećer i baza, bez fosfata, čine nukleozid. Također, povezivanje fosfata s 2'-deoksiribozom odvija se uklanjanjem molekule vode između fosfata i hidroksilne skupine na 5' C atomu šećera, stvarajući fosfoestersku vezu i okosnicu DNA. [13] Monomerne jedinice nukleotida su povezane u polinukleotidni lanac fosfodiesterskom vezom, koja se stvara vezanjem 3' hidroksilne skupine 2'-deoksiriboze, jednog nukleotida, s 5' hidroksilnom skupinom 2'-deoksiriboze drugog nukleotida. „Diesterska“ u nazivu „fosfodiesterska“ označava da je šećer jednog nukleotida esterificiran, kroz svoju 3' OH skupinu, te da je drugi šećer također estericifiran, ali kroz svoju 5' OH skupinu. Polaritet DNA lanca potječe od negativno nabijene šećerno-fosfatne okosnice. Uobičajeno je da DNA lanac ima slobodan fosfat na 5' kraju i slobodnu 3' OH skupinu. [13]

U strukturi nukleinskih kiselina razlikujemo purinske i pirimidinske baze. One su, po svom sastavu, heterociklički prstenovi izgrađeni od ugljikovih i dušikovih atoma na koje su vezane specifične skupine. Purinima pripadaju adenin i gvanin, dok su pirimidinske baze citozin i timin. Stabilnost dvostruke uzvojnice omogućuje veliki broj vodikovih veza, koje povezuju komplementarne baze; adenin i timin te gvanin i citozin. [13] Stabilnosti helikalne strukture doprinosi i činjenica da se hidrofobne baze nalaze u unutrašnjosti strukture, a polarnije skupine, odnosno šećerno-fosfatna okosnica, su na vanjskog strani uzvojnice, izložene vodi. Taj hidrofobni učinak omogućuje slaganje baza jednih na druge. Tako složene baze privlače se van

der Walsovim interakcijama, koje su pojedinačno slabe, no ukupni utjecaj im je vrlo značajan. [14]

Dva polinukleotidna lanca su antiparalelno uvijena tvoreći spiralnu uzvojnicu. Komplementarni polinukleotidni lanci imaju istu spiralnu geometriju ali su suprotne, 5' → 3', orijentacije, te tako razlikujemo nizvodni lanac, u smjeru 5' → 3' i uzvodni lanac, u smjeru 3' → 5'. Antiparalelna orijentacija lanaca je stereokemijska posljedica povezivanja komplementarnih baza; adenina i timina te gvanina i citozina. [13] Struktura DNA se ponavlja svakih 34 Å što odgovara 10 parova baza, tj. nukleotida. Svaki par baza je rotiran u odnosu na drugi par za 36 °. [14]

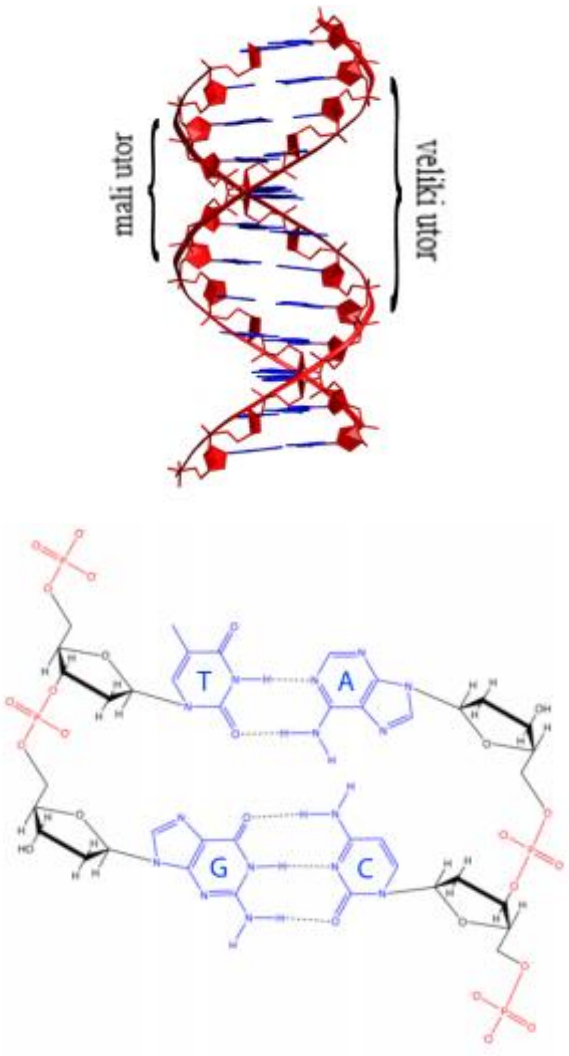
Struktura DNA obuhvaća dva utora različitih dubina i veličina, koji se nazivaju mali i veliki utor. [14] Postojanje velikog i malog utora posljedica je geometrije komplementarnih baznih parova. Krajnji dijelovi baznih parova, u velikom i malom utoru, tvore mrežu donora i akceptora vodikove veze koji, uz jak van der Waaslov efekt, omogućuju proteinima prepoznavanje specifičnog slijeda, te vezanje u veliki utor DNA, uz ostvarivanje određenog kontakta s manjeg utora. [13]

Geometrija strukture DNA uzrokuju nejednaku udaljenost između šećerno-fosfatne okosnice na jednoj strani u odnosu na drugu, što objašnjava postojanost dva utora različite veličine. Kut između glikozidnih veza, odnosno kut pri kojem dva šećera vire izvan baznog para, je oko 120 ° ili oko 240 °. Kao rezultat povećane količine baznih parova koji se slažu jedan na drugi, uži kut između šećera na jednom kraju baznog para tvori mali utor, te veći kut na drugom kraju stvara veliki utor. [13] Veliki utor obiluje kemijskim informacijama te ima sposobnost razlikovanja adenin-timin, odnosno timin-adenin, i gvanin-citozin, tj. citozin-gvanin, baznih parova. Manji utor nije koristan kod prepoznavanja baznih parova DNA, te ima manju sposobnost ugrađivanja bočnih lanaca aminokiselina. Stoga A-T i T-A bazni parovi te G-C i C-G, izgledaju slično u malom utoru. No, manji utor može smjestiti manje molekule koje utječu na replikaciju i transkripciju DNA. [13]

Dvostruka uzvojnica DNA može poprimiti A, B i Z konformaciju. U kompleksima s proteinima prisutna je A konformacija, Z prevladava pri visokim koncenetracijama soli, dok je B konformacija najčešće prisutna u stanici. S obzirom na konformaciju u kojoj se DNA nalazi, mijenja se dubina i širina utora. [13] Duljina punog spiralnog okreta B konformacije je 10 baznih parova, međusobno razmaknutih 3,4 Å, što je po punom okretu približno 34 Å. A konformacija je strukturno nabijenija, jer po jednom okretu ima 11 baznih parova koji su određenog nagiba

u odnosu na helikalnu os. Z konformacija je specifična za hibride RNA-DNA i RNA-RNA, a spiralna uzvojnica joj je lijevo zavijena. [13]

Ribonukleinska kiselina (RNA) je nerazgranati polimer čija je monomerna jedinica također nukleotid. RNA posjeduje 3 razlike u odnosu na DNA. Šećer u RNA je riboza koja, za razliku od deoksiriboze, sadrži 2' – OH skupinu. Također, umjesto baze timina sadrži uracil, te je najčešće prisutna u jednolančanom obliku. [13] RNA ne služi za prijenos genetičkog materijala kao DNA, no posjeduje glasnička, prijenosna, strukturalna i regulatorna svojstva. Neovisno o ulozi koju vrši u stanici, RNA je jednolančana molekula. Umnaža se kopiranjem samo jednog DNA lanca, te ne sadrži komplementarni lanac. [13]



b)

Slika 2. a) Strukturni prikaz dvostrukog heliksa DNA u B konformaciji s naznačenim položajima velikog i malog utora. b) Prikaz komplementarnih parova baza A=T i C ≡ G, povezanih vodikovim vezama. [15]

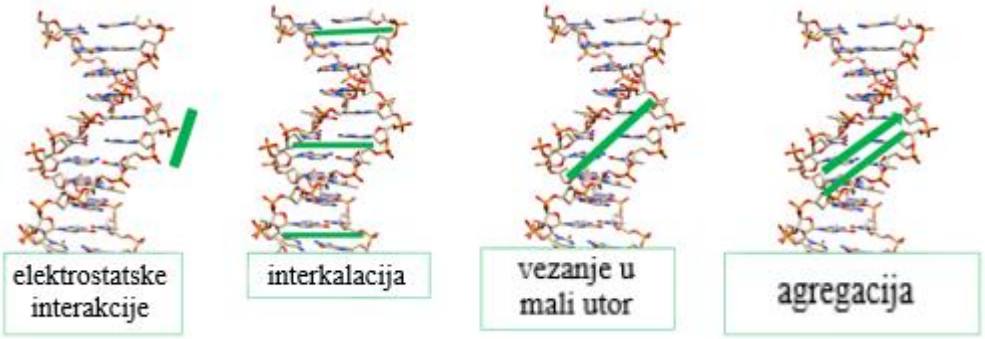
Karakterizacija interakcija malih molekula s polinukleotidima zahtjeva korištenje nekoliko dvolančanih DNA i RNA. Svaki polinukleotid ima jedinstvenu širinu, dubinu i afinitet malog utora prema različitim supstituentima. Najčešće korištena DNA je *Calf thymus* DNA (*ct*DNA) koja je sastoji od 58,1 mol % AT parova baza i 41.9 mol % GC parova baza, te poprima B konformaciju. Izmjenjujući polinukleotidni lanci, poli dAdT-poli dAdT, poprimaju B konformaciju koju karakterizira uzak mali utor srednje dubine. Naizmjenični gvanini u poli dGdC-poli dGdC lancu, odnosno amino skupine gvanina koje se protežu u mali utor, onemogućuju pristup malom utoru. [12]

2.2. Načini vezanja malih molekula na DNA/RNA

Postoji nekoliko mogućih načina vezanja malih molekula na dvolančanu DNA ili RNA. Vrlo lako dolazi do elektrostatskih interakcija pozitivno nabijenih molekula s negativno nabijenom DNA. Negativni naboj šećerno-fosfatne okosnice potječe od fosfata koji su odgovorni za ukupni naboj DNA molekule i njena kisela svojstva. [12]

Planarne molekule posjeduju sposobnost interkalacije između baznih parova. Rezultat interkalacije je smanjena gustoća nukleinskih kiselina te njihovo izduživanjem, što za posljedicu ima smanjenu helikalnost DNA. Nastali kompleks je stabiliziran π-π interakcijama između baza DNA i male, najčešće aromatske, molekule koja se interkalirala. Molekula koja se interkalira onemogućuje interkalaciju druge molekule u susjedni par baza, kroz „princip isključenja susjeda“. [12]

Molekule u obliku polumjeseca imaju tendenciju vezanja u mali utor DNA, pri čemu ne dolazi do konformacijskih promjena strukture DNA, no predstavlja vrlo specifičan način vezanja. U takvom načinu vezanja interkalirana molekula dolazi u kontakt s dijelovima baza prisutnim u malom utoru, što može dovesti do specifične interakcije s tim skupinama. U malom utoru prisutna je amino skupina baze gvanina, zbog čega molekule koje se vežu u mali utor pokazuju veći afinitet prema AT baznom paru. Osim toga, helikalna uzvojnica DNA podložna je ugradnji malih molekula koje agregiraju u utore dvolančane DNA. Najčešće dolazi do stvaranja agregata unutar utora, koji se lako primjete u apsorpcijskom spektru i CD spektru malih molekula. [12]



Slika 3. Prikaz mogućih načina vezanja malih molekula na dvolančanu DNA ili RNA. Zelenim pravokutnikom označeno je mjesto vezanja. Slika je preuzeta i prilagođena od Tamare Šmidlehner. [12]

Relativno je lako dizajnirati moleklu s visokim afinitetom prema DNA, no izazov predstavlja određivanje načina vezanja male molekule u utore DNA zbog različite prirode nastalog kompleksa: DNA / RNA-mala molekula. Nekoliko spektroskopskih metoda omogućilo je praćenje tog procesa, te će o njima biti riječi u sljedećim odlomcima.

2.3. Fluorescencijska spektroskopija

Fluorescencija je proces u kojem dolazi do pobuđivanja atoma ili molekula kao posljedica apsorpcije elektromagnetskog zračenja određene valne duljine, da bi nakon pobude došlo do relaksacije pobuđene vrste u osnovno stanje, praćeno emisijom fotona svjetlosti ($S_1 \rightarrow S_0$). Metoda je izuzetno korisna za praćenje svojstava i interakcija fluorescentne molekule, uz veći linearni koncentracijski raspon, u odnosu na apsorpcijsku spektroskopiju. Mjerenje se provodi pobudom uzorka pri valnoj duljini apsorpcije zračenja, te mjerenjem emisije pri emijsijskoj valnoj duljini, obavezno većoj valnoj duljini u odnosu na valnu duljinu pobude. [16]

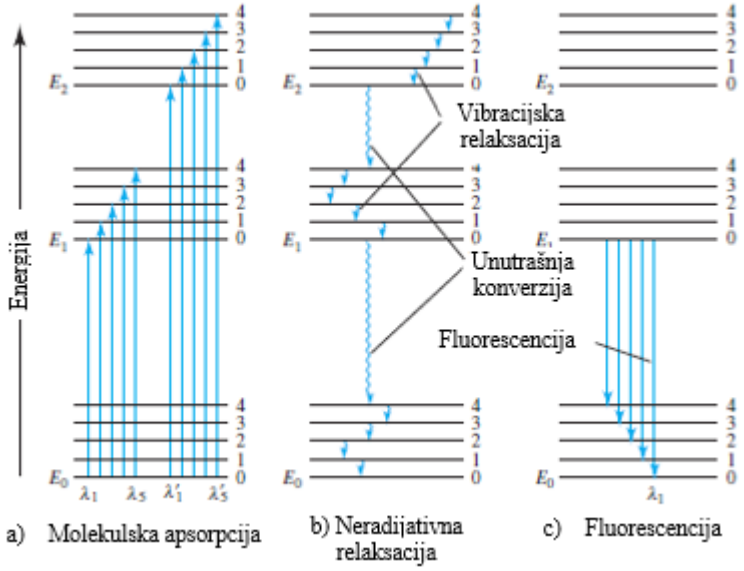
Fluorofor je molekula koja omogućuje apsorpciju energije pri određenoj valnoj duljini, te njenu emisiju pri većoj valnoj duljini. Intenzitet i valna duljina emisije ovise o samom fluoroforu ali i o uvjetima u kojima se taj fluorofor nalazi. Fluorofori su ujedno i kromofori, odnosno dio molekule koji je zaslužan za boju spoja. Povezanost kromofora i fluorofora interpretira se u smislu da kromofori apsorbiraju svjetlost (zračenje) a samo fluorofori dio absorbiranog zračenja emitiraju pri većim valnim duljinama. [17]

Pobuđena stanja molekula mogu biti singletna i tripletna. Singletna stanja, S, karakteriziraju spareni elektroni i antiparalelna orijentacija, dok su u metastabilnim tripletnim

stanjima prisutni nespareni elektroni paralelne orijentacije. Do fluorescencije može doći kroz nekoliko procesa, prikazanih pomoću dijagrama Jablonskog na slici 4.

Prikazana molekula posjeduje 3 različita elektronska stanja: osnovno stanje S_0 i dva pobuđena stanja S_1 i S_2. Unutar jednog elektronskog stanja prisutno je nekoliko vibracijskih stanja. Apsorpcijom zračenja dolazi do pobuđivanja elektrona iz osnovnog u neko od pobuđenih stanja, iza čega mogu slijediti nekoliko procesa kojima molekula otpušta apsorbiranu količinu energije. Molekula se relaksira između različitih vibracijskih stanja procesom vibracijske relaksacije, čiji je najčešći uzrok sudari pobuđenih molekula s molekulama otapala. Osim toga, moguća je i neradijativna relaksacija između nižih vibracijskih stanja u pobuđenom elektronskom stanju i viših vibracijskih razina drugog pobuđenog elektronskog stanja, poznata pod nazivom unutrašnja konverzija. [16]

Prelazak iz najnižeg singletnog vibracijskog stanja, S_1 u neko od osnovnih vibracijskih stanja S_0, uzrokuje emisiju fluorescentnog fotona. Međutim, ukoliko se vibracijske razine elektronske energije preklapaju, pobuđeni elektron može preći iz višeg elektronskog stanja u elektronski niže stanje procesom unutrašnje konverzije. Tim procesom ne dolazi do emisije fotona, odnosno fluorescencije. [16] Stokesov pomak predstavlja pojavu da se emitirano zračenje nalazi pri većoj valnoj duljini od apsorbiranog zračenja, jer su emitirani fotoni manje energije te su stoga pomaknuti prema višim valnim duljinama. [17]



Slika 4. Dijagram Jablonskog koji prikazuje procese tijekom (a) apsorpcije, (b) neradijativne relaksacije i (c) fluorescencijske emisije molekule. Prikazan je osnovni energetski nivo, E_0, te prvo i drugo pobuđeno stanje E_1 i E_2, između kojih su 1-4 vibracijski nivoi. [16]

S obzirom da polinukleotidi nisu fluorofori, primjenjivost fluorescentne spektroskopije u određivanju interakcija malih molekula s polinukleotidima, zahtjeva da proučavana molekula posjeduje fluorescenciju. [12]

Fluorimetrijske titracije pokazale su se prikladnim za ispitivanje proučavanih spojeva zbog svoje visoke osjetljivosti i postavka instrumenta, kao što su širina proreza. Iako iz fluorimetrijskih titracija ne možemo dobiti uvid u geometriju kompleksa pri vezanju liganda, one su vrlo korisne za praćenje promjene fluorescencije ispitivanog spoja u prisutnosti polinukleotida, te za dobivanje konstanti vezanja i kvantnih prinosa. [12]

2.4. Polarizacijska spektroskopija – Cirkularni dikroizam (CD)

Cirkularni dikroizam (CD) je spektroskopska metoda koja proučava razliku apsorpcija lijevo i desno kružno polariziranog zračenja, te omogućuje praćenje kiralnih spojeva u otopini. Kiralne molekule različito apsorbiraju lijevo i desno polarizirano svjetlo, te CD spektar može biti koristan pri identifikaciji i određivanju konfiguracije kiralnog spoja, sekundarne strukture proteina i praćenju procesa vezanja malih molekula (liganada). Prilično mali CD signal je prisutan u pojedinačnim nukleotidima, no njihovo spajanje u polinukleotide i dvostruku zavojnicu, dovodi do spiralne kiralnosti. [12, 18]

Praćenje se temelji na apsorpciji UV/Vis svjetlosti što za posljedicu ima prijelaz elektrona iz osnovnog u pobuđena stanja. Kiralnost potiče mehanizam ekscitacijskog povezivanja između različitih $\pi \rightarrow \pi^*$ prijelaza nukleobaza. [12] Stoga je CD jedna od najosjetljivijih spektroskopskih metoda za praćenje promjena konformacije DNA i RNA i njihovog vezanja s ligandima. S obzirom na prirodu CD-a, odnosno njegove ovisnosti o razlici apsorpcija lijevo i desno kružno polariziranog svjetla, dva reda veličine je manje osjetljiva metoda u odnosu na apsorpcijsku spektroskopiju. CD spektroskopija daje uvid u strukturalne informacije temeljene na električnom i magnetskom prijelaznom momentu susjednih kromofora i njihove međusobne orijentacije. Metoda je ovisna o sekundarnoj strukturi nukleinskih kiselina te daje karakteristične CD spektre kao rezultat slijeda baznih parova u dvostrukoj uzvojnici DNA/RNA kromofora i eksperimentalnih uvjeta. Također je vrlo korisna metoda za praćenje konformacijskih promjena koje se događaju pri vezanju liganda na nukleinske kiseline. Zanimljivo je da akiralni ligandi, vezanjem za DNA ili RNA, mogu izazvati pojavu induciranog CD spektra. To je učestala pojava kada su prijelazni momenti liganda jednoliko orijentirani s obzirom na kiralnu os DNA / RNA. Time se dobiju korisne informacije o geometriji vezanja i načinima interakcije. [18]

Proučavanje nastanka kompleksa male molekule (liganda) i DNA / RNA s CD spektroskopijom, općenito se može podijeliti u dva područja valnih duljina:

1. Područje valnih duljina 200-300 nm karakterizira intrinzični spektar DNA / RNA, te su vidljive promjene povezane sa specifičnom promjenom sekundarne strukture polinukleotida, koje se događaju prilikom vezanja liganda, uz uvjet da ligand ne apsorbira u tom području valnih duljina. Značajno smanjenje CD signala u ovom rasponu valnih duljina, može biti pokazatelj smanjenja helikalne kiralnosti DNA / RNA uzvojnice uzrokovano na primjer interkalacijom liganda ili iskrivljenja DNA / RNA zavojnice uslijed sterički zahtjevnog vezanja liganda. Slaba promjena CD spektra DNA / RNA, označava očuvanost uzvojnične strukture prilikom vezanja liganda. Postoji nekoliko mogućih razloga očuvanosti: ligand se vezao u neki od utora, vezao se za vanjsku površinu, slabo se vezao ili se uopće nije vezao. Ukoliko ligand apsorbira svjetlosti u rasponu od 200-300 nm, vidljive promjene se ne mogu pouzdano pripisati samo promjeni helikalnosti DNA/RNA. One mogu biti i rezultat teško predvidljivog induciranog CD signala liganda kombiniranog s intrinzičnim CD spektrom polinukleotida. [12]

2. Maksimum apsorpcije DNA i RNA je oko 260 nm, te se pojava CD signala iznad 300 nm pripisuje isključivo ligandu jer polinukleotidi u tom području ne apsorbiraju zračenje.

Umetanjem akiralnih liganada u kiralno okruženje dvolančanih polinukleotida, te njihovim vezanjem za DNA/RNA, dobiva se inducirani CD spektar (ICD). [18] Najjednostavniji je slučaj u kojem geometrija vezanja određuje veličinu i predznak ICD spektra. Negativni ICD s omjerom zasićenja *r*=0,2-0,3 (*r*=[ligand] / [polinukleotid]) ukazuje najvjerojatnije na interkalaciju liganda, s vektorom prijelazog momenta uzduž dulje osi liganda paralelno orijentiranim u odnosu na dulju os susjednih parova baza. Jaki pozitivni ICD signal, također pri omjerom *r*=0,2-0,3, je pokazatelj vezanja liganda u utor, s tim da vektorom prijelazog momenta uzduž dulje osi liganda pod kutom od oko 45 stupnjeva u odnosu na DNA kiralnu os. No, interkalacijsko vezanje liganda vektorom prijelazog momenta uzduž dulje osi liganda, orijentiranim okomito na dulju os susjednih parova baza, može biti razlog pojave slabog pozitivnog ICD-a. U uvjetima suviška liganda u odnosu na polinukleotid, može doći do agregiranja molekula liganda (obično unutar utora DNA / RNA) što dovodi do pojave ekscitonsko-bisignantnih ICD signala. Elektrostatskim interakcijama fosfatne okosnice i liganda, dolazi do vezanja liganda na vanjsku površinu polinukleotida, no takvi načini vezanja obično nemaju ujednačenu orijentiranost molekula liganda s obzirom na DNA / RNA i stoga su ICD spektri zanemarivog inteziteta i nepouzdani. [12]

Ukoliko je ligand kiralan posjeduje intrinzični CD spektar te se multikomponentnom analizom titracije DNA / RNA s ligandom može dobiti CD spektar nastalog kompleksa. Promjenu CD spektra može uzrokovati: a) strukturna promjena nastala vezanjem liganda koja mijenja fundamentalnu kiralnost liganda; b) umetanje liganda u kiralno vezno mjesto uzrokuje ICD; c) ekscitacijsko povezivanje višestruko agregiranih liganda. [18]

2.5. Cijaninske boje

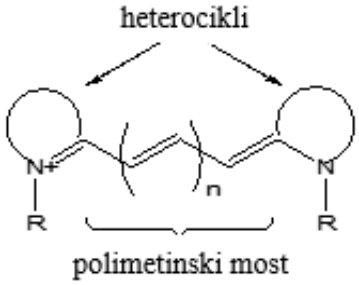
2.5.1. Porijeklo i primjena cijaninskih boja

Cijaninske boje su najstarije korištene sintetske boje, koje su i danas u širokoj primjeni. Iako je naziv „cijanin“ u današnje vrijeme rasprostranjen, sustavno ispravniji izraz za ovu skupinu spojeva je polimetinska boja, kako ju je Konig nazvao 1920. godine. U daljnjem tekstu je za imenovanje ove grupe spojeva korišten, danas usvojen naziv, cijaninske boje. Otkriće ovih sintetskih boja seže u 19. stoljeće, točnije 1856. godinu kada je Williams sintetizirao prvu sintetsku boju i nazvao ju „cijanin“ zbog njene plave boje. Zbog svoje raznolike mogućnosti primjene, znanstvenici koriste ovu skupinu boja skoro dva stoljeća, a prvotno su našle primjenu u tekstilnoj industriji, fotografskom filmu i u biotehnologiji. Osnova korištenja cijaninskih boja u biotehnologiji je njihova sposobnost učinkovite apsorpcije svjetlosti, pri određenim valnim

duljinama u vidljivom području spektra, te njihovim fluorescencijskim svojstvima, odnosno emisiji fotona. Danas se često koriste kao fluorescentni markeri i senzori za praćenje i detekciju bioloških procesa. Svoju primjenu su pronašle i kao fluorescentne probe u genetskoj analizi i DNA sekvenciranju. Brojne primjene oslanjaju se na interakciji cijaninskih boja s nukleinskim kiselinama, DNA i RNA, jer se struktura cijaninskih boja smatra molekularnim senzorom sekundarne strukture nukleinskih kiselina. [19]

2.5.2. Opća struktura cijaninskih boja

Cijaninske boje su najčešće pozitivno nabijene molekule, iako mogu biti neutralne ili anioni. Terminalni dušici heterocikličkog prstena vezani su pomoću polimetinskog mosta, što je prikazano na slici 5. Polimetinski most je izgrađen od neparnog broja ugljikovih atoma što omogućuje delokalizaciju pozitivnog naboja između dva dušika. [12]



Slika 5. Opća struktura cijaninske boje. Dva heterociklička prstena su povezana pomoću polimetinskog mosta. [12]

Duljina polimetinskog mosta, kao i vrsta heterocikla ili supstituenata koji se nalaze na heterociklu ili polimetinskom mostu, utječe na maksimum apsorpcije i emisije boje. Umetanjem samo jednog vinilnog ostatka u polimetinski most, apsorpcijski spektar cijanina može biti pomaknut do 100 nm. Osim toga, ova promjena kao i uvođenje supstituenata na polimetinski most, može utjecati na smanjenje emisije fluorescencije. Dolazi do povećanja rasipanja neradijativne energije prvog pobuđenog stanja. Uvođenjem istog supstituenta na heterociklički prsten dolazi do povećanja kvantnog prinosa fluorescencije, posebno u prisustvo auksokroma, kao što su halogeni atomi ili sulfonska kiselina. [12]

Sintezom pravilne strukture cijaninske boje, moguće je podesiti spektroskopska svojstva u rasponu od vidljivog do infracrvenog dijela spektra. Za proučavanje nukleinskih kiselina i proteina prikladni su se pokazali monometini i trimetini, zbog apsorpcije valne duljine vidljivog dijela spektra, te ne preklapanja apsorpcijskih spektara boja i makromolekula. [12, 19]

Cijaninske boje po svojoj strukturi mogu biti simetrične i asimetrične, s obzirom posjeduju li iste ili različite heterocikle spojene polimetinskim mostom. [19]

2.5.3. Povezivanje cijaninskih boja i nukleinskih kiselina

Cijaninske boje se nekovalentnim reakcijama vežu s dvolančanim DNA. Moguća su dva načina vezanja:

1. Interkaliranje koje se ogleda u umetanju boje između dva susjedna bazna para što za posljedicu ima stvaranje π-kompleksa;

2. Vezanjem u mali utor DNA, u koji se boja ugrađuje cijelom svojom dužinom. [19]

2.5.4. Spektroskopska svojstva boja

Elektronski prijelazi duž polimetinskog mosta cijaninskih boja omogućuju apsorpciju u vidljivom do infracrvenom području. Broj ugljikovih atoma u polimetinskog mostu, određuje područje apsorpcije svjetlosti. Polimetinski most pokazuje uske apsorpcijske linije i vrlo velike ekstincijske koeficjente (čak do ε=200000 mol^{-1} dm^3 cm^{-1}). U uvjetima niske temperature, visoke ionske jakosti te pri visokoj koncentraciji cijanina, cijaninske boje imaju sklonost samoagregiranju. [15] Dodatkom nukleinskih kiselina, cijanini također agregiraju. Agregati se najčešće uglave u mali utor DNA i u veliki utor dvolančane RNA. CD eksperimenti omogućuju praćenje agregacije. Naime, u prisutnosti agregata u CD spektru imamo pojavu intezivnog inducirane CD vrpce u apsorpcijskom području cijaninske boje. Do te pojave dovodi kiralno svojstvo agregata, uzrokovana umetanjem boje u kiralne utore nukleinskih kiselina. [19]

Cijanini ne pokazuju fluorescentna svojstva u vodenim otopiama, no njihovim kompleksiranjem s nukleinskim kiselinama dolazi do značajnog porasta fluorescencije. Porast u fluorescenciji nastaje kada je ograničena rotacija polimetinskog mosta između dva aromatska sustava. Cijanini ne moraju biti planarni kako bi pokazali značajno pojačanje fluorescencije. Sposobnost stvaranja fluorescentnih kompleksa s biomakromolekulama učinila ih je zanimljivim za biotehnološke eksperimente, jer ne dolazi do pozadinske fluorescencije nevezane boje. Stokesov pomak cijanina je obično oko 30 nm. [12]

Predmet interesa ovog rada bile su dvije monometinske cijaninske boje tiazol oranž (eng. *thiazole orange*, TO). TO je asimetrična monometinska cijaninska boja građena od kinolinskog i benzotiazolnog heterocikla. Boja je nefluorescentna u vodenom mediju, a do porasta fluorescencije dolazi njihovim vezanjem za nukleinsku kiselinu. Asimetrične cijaninske boje, poput tiazol oranž (TO) pokazuju najbolja fluorescencijska svojstva u prisutnosti polinukleotida. Karakteristično, TO ima vrlo niske kvantne prinose fluorescencije u vodenim

otopinama, no vezanjem za nukleinske kiseline dolazi do 100-1000 puta povećanja kvantnih prinosa. [12]

Valna duljina maksimalne apsorpcije monomera TO cijanina je pri 501 nm. [12] Ukoliko su prisutni agregati to je u spektru vidljivo u obliku dodatnih vrpci koje se pojavljuju s lijeve ili desne strane u odnosu na monomernu vrstu. Monomer TO ima prisutnu vrpcu agregata uglavnom pri 471 nm, ovisno o ionskoj jakosti. Ovaj tip agregata je H-agregat te je on najstabilniji oblik cijaninskih agregata. Zahvaljujući antiparalelnom rasporedu nukleinskih kiselina, odbojne sile između dva pozitivno nabijena TO su minimizirane. Često u spektru dolazi do pojave izosbestične točke, koja predstavlja maksimalnu valnu duljinu apsorpcije uzorka, odnosno ravnotežu monomera i agregata. [19] H-agregati pokazuju hipsokromatski pomak, sužavanje apsorpcijske trake, te vrlo nisku ili nepostojeću fluorescenciju. Drugi tip agregata je slabije zastupljen u cijaninskim bojama, no postoji mogućnost njegova nastanka. J-agregat je druga vrsta agregata koji posjeduje batokromatski pomaknutu apsorpcijsku traku u odnosu na monomer i emisiju fluorescencije s malim Stokesovim pomakom. [12] Stvaranje H i J agregata je moguće kontrolirati spustituiranjem cijaninske jezgra i pravilnim odabirom heterocikla pri sintezi boje. [12]

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali i metode

Sinezu **spoja 1 (benzotiazol analog)** i **spoja 2 (kinolin analog)** provela je dr. sc. Tamara Šmidlehner za vrijeme rada u Laboratoriju za biomolekularne interakcije i spektroskopiju Instituta Ruđer Bošković, u sklopu projekta HrZZ 1477 „Višenamjenska molekularna detekcija DNA / RNA sekundarne strukture kemijskim senzorima“ (voditelj Ivo Piantanida). U daljnjem tekstu priloženi su ^{1}H NMR, ^{13}C NMR i HRMS (MALDI-TOF/TOF) spektri svakog spoja pojedinačno. Na slici 6. prikazani su spojevi strukturnom formulom.

Spoj 1 (benzotiazol analog; (E)-5-bromo-3-(4-(4-(2-(5-(carbamimidoylcarbamoyl)-1H-pyrrole-2-carboxamido)-3-methoxy-3-oxopropyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)butyl)-2-((1-methylquinolin-4(1H)-ylidene)methyl)benzo[d]thiazol-3-ium)

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO) δ 12,47 (s, 1H, NH), 10,93 (s, 1H, NH), 8.84 (dd, J = 18,6, 7,6 Hz, 1H, Ar), 8,75 (d, J = 8,7 Hz, 1H, Ar), 8,71 (d, J = 7,2 Hz, 1H, Ar), 8,25 – 8,09 (m, 5H, Ar + NH), 8,07 – 8,01 (m, 2H, Ar), 7,95 (dd, J = 26,2, 17,8 Hz, 2H, Ar), 7,85 – 7,81 (m, 1H, Ar), 7,55 (dd, J = 8,3, 1,6 Hz, 1H, Ar), 7,43 (d, J = 7,0 Hz, 1H, Ar), 6,99 (dd, J = 4,0, 2,4 Hz, 1H, Ar), 6,87 (s, 1H, CH), 4,67 (dd, J = 15,1, 7,0 Hz, 1H, CH), 4,56 – 4,50 (m, 1H, CH), 4,43 (t, J = 6,7 Hz, 1H, CH), 4,23 (s, 3H, CH_3), 3,59 (s, 3H, CH_3), 3,18 – 3,01 (m, 2H, CH_2), 2,10 – 1,97 (m, 2H, CH_2), 1,87 – 1,63 (m, 4H, 2X CH_2) ppm.

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) δ 159,37, 155,94, 149,79, 145,88, 141,95, 138,51, 133,89, 132,17, 127,78, 127,32, 126,19, 124,88, 124,70, 123,59, 123,40, 121,74, 118,80, 115,68, 115,56, 109,25, 88,21, 67,21, 53,66, 52,90, 49,31, 46,43, 43,18, 27,69 ppm.

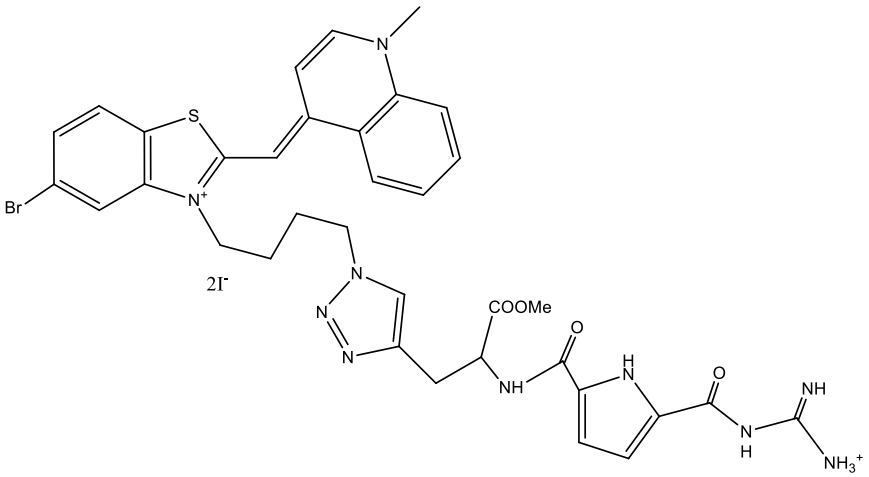
HRMS (MALDI-TOF/TOF) m/z calcd for $C_{35}H_{37}BrN_{10}O_4S^{2+}$ ($[M-H]^{+}$) 773,1806, found 773,1809.

Spoj 2 (kinolin analog; (E)-5-bromo-2-((1-(4-(4-(2-(5-(carbamimidoylcarbamoyl)-1H-pyrrole-2-carboxamido)-3-methoxy-3-oxopropyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)butyl)quinolin-4(1H)-ylidene)methyl)-3-methylbenzo[d]thiazol-3-ium)

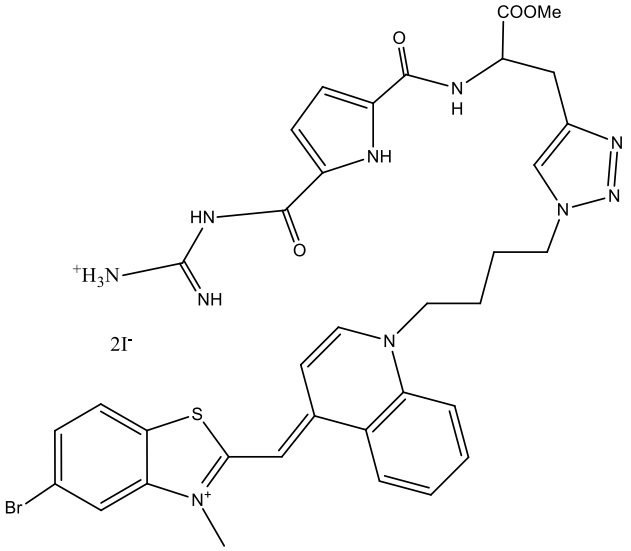
^{1}H NMR (600 MHz, DMSO) δ 12,69 (s, 1H, NH), 12,46 (s, 1H, NH), 10,95 (s, 1H, NH), 8,83 (dd, *J* = 24,5, 13,1 Hz, 1H, Ar), 8,65 (d, *J* = 38,3 Hz, 1H, Ar), 8,16 (d, *J* = 12,2 Hz, 2H, Ar), 8,06 – 8,00 (m, 3H, Ar + NH), 7,98 – 7,91 (m, 2H, Ar), 7,76 (d, *J* = 7,3 Hz, 2H, Ar), 7,67 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, Ar), 7,56 (d, *J* = 5,0 Hz, 1H, Ar), 7,38 (d, *J* = 15,1 Hz, 1H, Ar), 7,03 (t, *J* = 25,5 Hz, 1H, Ar), 6,93 – 6,82 (m, 2H, Ar), 6,70 (s, 1H, CH), 4,63 (dd, *J* = 57,4, 14,8 Hz, 2H, CH2), 4,43 – 4,30 (m, 1H, CH), 4,00 (s, 3H, CH3), 3,84 (d, *J* = 22,3 Hz, 2H, CH2), 3,60 (s, 3H, CH3), 2,97 – 2,86 (m, 2H, CH2), 1,97 – 1,69 (m, 4H, 2XCH2) ppm.

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO) δ 162,81, 160,09, 154,96, 149,00, 144,84, 142,34, 142,07, 137,15, 133,61, 127,54, 126,84, 125,85, 125,00, 124,30, 123,21, 121,52, 121,06, 116,70, 115,57, 108,36, 88,38, 83,51, 54,22, 52,43, 34,30, 33,95, 26,11 ppm.

HRMS (MALDI-TOF/TOF): m/z calcd for $C_{35}H_{37}BrN_{10}O_4S^{2+}$ ($[M-H]^+$) 773,1980, found 773,1982.



Chemical Formula: $C_{35}H_{37}BrI_2N_{10}O_4S$
Molecular Weight: 1027,51



Chemical Formula: $C_{35}H_{37}BrI_2N_{10}O_4S$
Molecular Weight: 1027,51

Slika 6. Strukturni prikaz spojeva: GORE– Spoj 1; DOLJE – Spoj 2.

3.1.1. Kemikalije

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

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

natrijev kakodilatni pufer, pH=7,0; I = 0,05 mol dm^{-3}; natrijev kakodilat, p.a., Sigma Aldrich, SAD

poli dGdC - poli dGdC (poli $(dGdC)_2$), Sigma Aldrich, SAD

poli dAdT - poli dAdT (poli $(dAdT)_2$), Sigma Aldrich, SAD

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

3.1.2. Uređaji

analitička vaga (Mettler Toledo, USA)

UV/Vis spektrofotometar Aligent Technologies Varian Cary 100 Bio (Agilent Technologies, SAD)

UV/Vis spektrofotometar NanoDrop Thermo Scientific Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA)

fluorimetar Agilent Technologies Varian Cary Eclipse (Agilent Technologies, SAD)

CD spektrofotometar Jasco J-815 (Jasco, Japan)

NMR spektrometri Bruker AV600 i Bruker AV300 (Bruker, SAD)

maseni spektrometar MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems, SAD)

3.2. Praćenje fizikalno-kemijskih svojstava vodenih otopina

Otopine spojeva 1 i 2 pripremljene su otapanjem spojeva u DMSO-u (dimetil sulfoksidu), množinske koncentracije c =1 x 10^{-3} mol dm^{-3}. Otopine su pohranjivane na temperaturi od -8 °C, dok su pri mjerenju držane pri sobnoj temperaturi od +25 °C. Tijekom nekoliko mjeseci korištenja nije došlo do vidljivog taloženja ili degradacije otopina.

NMR spektri su snimljeni na AV600 i AV300 MHz spektrometrima (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Njemačka), radeći na 600,13 ili 300,13 MHz za ^{1}H jezgre i na 150,92 MHz za ^{13}C, što je standardni postupak za održavanje kvalitete ^{13}C spektra, uz upotrebu DMSO-d6 kao unutrašnjeg standarda.

Masena spektrometrija provedena je na Agilent 6410 Triple Quad masenom spektrometru (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), a maseni spektri visoke rezolucije (HRMS) dobiveni su pomoću Q-Tof2 hibridnog kvadrupolnog masenog spektrometra s analizatorom vremena leta (Micromass) Cary, NC, SAD).

3.1.3. Određivanje molarnih ekstinkcijskih koeficijenata vodenih otopina spojeva

Sva spektrofotometrijska mjerenja izvedena su u vodenim otopinama natrijevog kakodilatnog pufera, pH = 7,00, I = 0,05 mol dm^{-3}. Mjerenja UV/Vis spektrofotometrije provedena su pomoću spektrometra Varian Cary 100 Bio, a fluorimetrijska mjerenja pomoću fluorimetra Agilent Cary Eclipse. Za sva mjerenja su se koristile kvarcne kivete (optičkog puta 1 cm).

Snimljeni su UV/Vis spektri spojeva za izradu baždarnog pravca kako bi izračunali molarni ekstinkcijski koeficijent svakog spoja pri određenom apsorpcijskom maksimumu. Snimljeno je po 5 spektara svakog spoja u području koncentracija $2 \times 10^{-6} – 1 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3}.

3.3. Proučavanje DNA / RNA interakcija

Spektroskopski je određena koncentracija polinukleotida mjerenjem apsorbancije na odgovarajućem UV/Vis maksimumu polinukleotida, definiranog od proizvođača, te korištenjem odgovarajućih molarnih ekstincijskih koeficijenata. Dobivena je koncentracija za nukleobazu, što u pravilu označava koncentraciju fosfata.

3.3.1. Fluorimetrijske titracije

Početna koncentracija cijaninske boje u kiveti je 5×10^{-7} mol dm^{-3}. Ishodne otopine polinukleotida bile su koncentracije 1×10^{-3} mol dm^{-3}. Alikvoti ishodnih otopina polinukleotida su dodavani u kivetu s otopinom cijaninske boje, počevši od ekvimolarnog omjera $r_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]} = 1$ te je za svaki dodatak snimljen fluorescencijski spektar cijaninske boje. Sakupljeno je dvadesetak točaka titracije, do omjera $r_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]}$ kod kojeg više ne dolazi do značajnijeg povećanja fluorescencije s novim dodatkom polinukleotida.

Pri računanju konstante stabilnosti, K_s, kompleksa ispitivanog spoja s DNA/RNA koristi se Scatchardova jednadžba, [20, 21] izvedena iz Langmuirove izoterme (jednadžbe 1 i 2), koja omogućuje istovremeno računanje konstante stabilnosti K_s i omjera $\boldsymbol{n}$ [vezani spoj]/[polinukleotid] nekom od metoda nelinearne regresije.

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

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

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

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

gdje je c koncentracija ispitivanog spoja u otopini, c_s koncentracija polinukleotida, $\boldsymbol{n}$ omjer koncentracije vezanog spoja i polinukleotida ($\boldsymbol{n}_{[\text{vezani spoj}]/[\text{poli XY}]}$), I_0 spektrofotometrijski

odgovor čistog spoja, I spektrofotometrijski odgovor nakon dodatka određene količine supstrata, I_{lim} spektrofotometrijski odgovor kompleksa kada više nema slobodnog spoja u otopini i K_s konstanta stabilnosti kompleksa.

3.3.2. Temperaturno mekšanje

Za eksperimente temperaturnog mekšanja polinukleotida stabiliziranih konjugatima cijaninskih boja korišten je spektrometar UV/Vis Varian Cary 100 Bio i program *Thermal*. Mjeren je utjecaj ispitivanih spojeva na temperaturno mekšanje dvolančanih uzvojnica *ct*DNA, $p(dAdT)_2$ te pApU, dok je polinukleotid $p(dGdC)_2$ izostavljen jer je njegova točka mekšanja previsoka (> 95 °C). Zagrijavanjem polinukleotida dolazi do denaturacije, tj. razdvajanja dvostruke uzvojnice na dva jednolančana polinukleotida. Temperatura mekšanja (T_m) je temperatura pri kojoj je približno pola dvolančane uzvojnice denaturirano, a karakteristična je za svaki dvolančani polinukleotid ovisno o sekundarnoj strukturi i sastavu nukleobaza. Za određivanje temperature mekšanja koristi se UV/Vis spektroskopija, gdje se razdvajanje polinukleotida prati mjerenjem rezultirajućeg hiperkromnog efekta (pri 260 nm) u ovisnosti o temperaturi otopine. [22, 23]

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

kiseline od vrijednosti T_m kompleksa. [24] Svaka ovdje određena vrijednost ΔT_m bila je prosjek najmanje dva mjerenja. Pogreška ΔT_m je ± 0,5 °C.

3.3.3. CD titracije

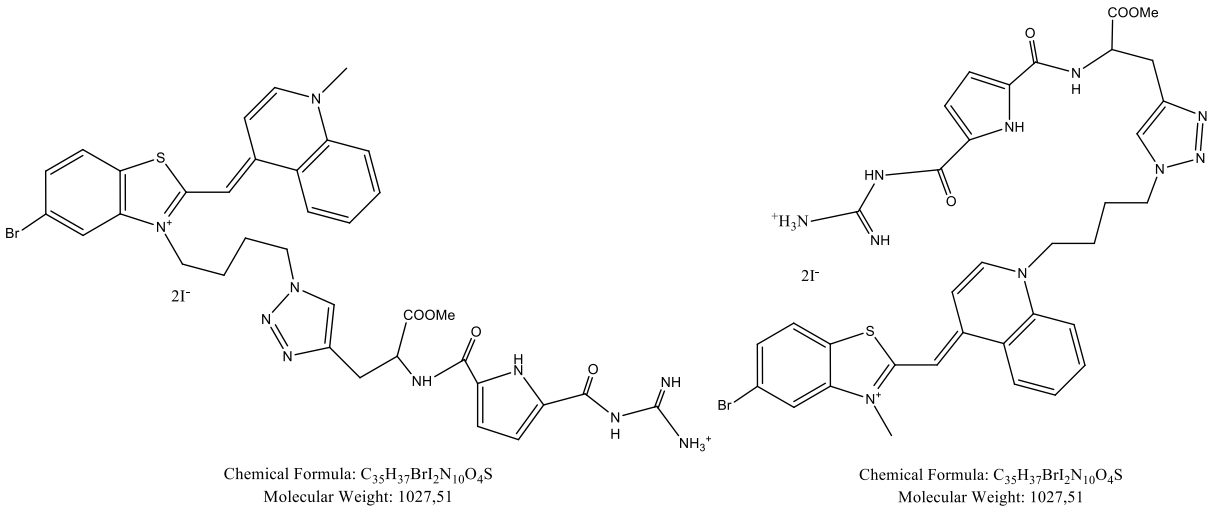
Eksperimenti cirkularnog dikroizma (CD) provedeni su dodavanjem određenog alikvota otopine spoja otopini polinukleotida. U kvarcnu kivetu stavi se 2 cm^3 pufera (natrijev kakodilatni pufer, I = 0,05 mol dm^{-3}, pH = 7,0 ili pH = 5) te se puferu doda polinukleotid tako da koncentracija polinukleotida u kiveti iznosi 2 x 10^{-5} mol dm^{-3}. Pripremljena otopina polinukleotida titrira se s alikvotom spoja 1 ili 2 tako da je raspon molarnih omjera r = [spoj] / [polinukleotid] od 0,10 do 0,50. Korišteni program je *Spectra Measurement* uz podešene parametre: osjetljivost: high (5 mdeg); λ = 650 – 210 nm; visina podataka: 0,2; način skeniranja: kontinuiran; brzina skeniranja: 200 nm/min; odziv: 1 s; širina vrpce: 2 nm; akumulacija: 3.

Titracijom otopine polinukleotida s određenim alikvotom racemične smjese spojeva dolazi do promjene u CD spektru na području λ < 300 nm, kao i pojave induciranog (I) CD spektra pri λ= 450-500 nm. [25]

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Struktura spojeva

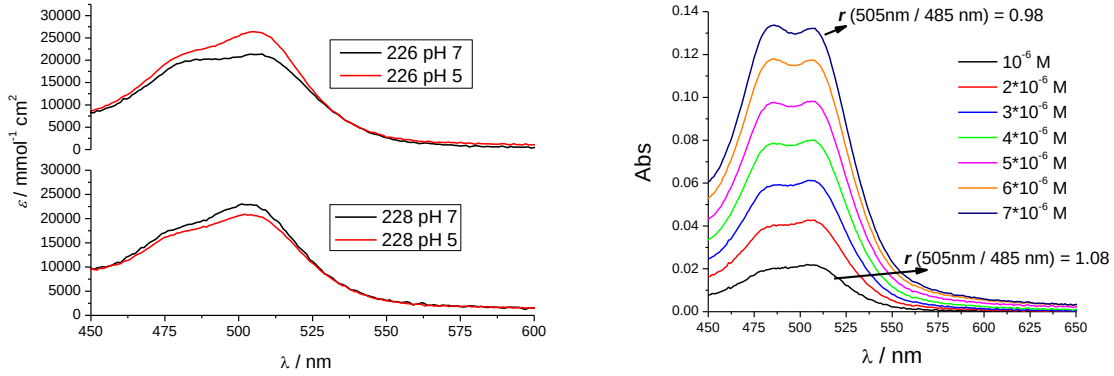
Strukture spojeva 1 i 2 prikazane su na slici 7.



Slika 7. Strukturni prikaz spojeva: LIJEVO – spoj 1; DESNO – spoj 2.

4.2. Karakterizacija cijaninskih konjugata u vodenom mediju

Oba spoja su otopljena u DMSO-u, što omogućuje pripravu otopina u mM koncentracijama koje su, ukoliko su pohranjene u hladnjaku, stabilne tijekom duljeg vremena. Protonirani i neprotonirani oblici GCP-a praćeni su UV/Vis spektrima spojeva 1 i 2, prikupljenih pri pH 7,0 i pH 5,0. Pri oba pH (Slika 8) vidljiva su dva izražena apsorpcijska područja kod oba spoja. Jedno područje potječe od preklopljenih apsorbancija gvanidinijkarbonil-pirola, GCP-a, i triazola (λ_{max} oko 300 nm). Druga apsorpcijska vrpca prisutna je u vidljivom dijelu spektra, te potječe od cijaninske boje (λ_{max} = 480-510 nm). Apsorbancije oba spoja, pri mikromolarnim koncentracijama, proporcionalne su koncentraciji (Dodatak D1-D4), što omogućuje određivanje molarnog ekstincijskog koeficjenta (Dodatak, tablica D1).



Slika 8. LIJEVO: UV/Vis spektri spoja 1 i spoja 2 (c = 2 × 10^{-6} M) pri pH 7,0 i pH 5,0 (natrijev kakodilatni pufer, *I* = 0,05 mol dm^{-3}). Primjećena je razlika u omjeru, *r* (505nm / 485nm) za spoj 2 pri različitim pH, ali ne i za spoj 1. DESNO: ovisnost apsorbancije o koncentraciji spoja 2; opažena promjena omjera *r* (505nm / 485nm) ovisna o koncentraciji.

Detaljnija analiza dobivenih UV/Vis podataka pokazuje značajne razlike između spoja 1 i 2, koje se mogu pripisati s poveznicom prema GCP dijelu preko benzotiazola, odnosno kinolina. Naime, spoj 1 (GCP- benzotiazol analog) pokazuje dominantan maksimum pri λ=505 nm na UV/Vis spektru. Konstantan omjer *r* (505 nm/485 nm) zadržan je tijekom čitavog raspona mikromolarnih koncentracija (Dodatak D1 a) i D2 a)), te je neovisan o promjeni pH (Dodatak, slika D5, lijevo). Prikazana svojstva su karakteristična za neagregirajuće cijanine.

Za razliku od spoj 1, UV/Vis spektar kinolin-analoga spoja 2, mijenja se unutar mikromolarnih koncentracija (slika 8., DESNO). U slučaju spoja 2 smanjenje omjera *r* (505 nm/485 nm) može se pripisati povećanoj H-tip agregaciji cijanina, što podupire promjena ekvivalenta uzrokovana smanjenjem temperature (Dodatak, slika D5, desno). [6, 26] Osim toga, pH ovisna razlika u omjeru *r* (505nm / 485nm) (slika 8., LIJEVO) jasno ukazuje na učinkovitiju agregaciju u neutralnim uvjetima u usporedbi s pH 5. U kiselim uvjetima postoji mogućnost ometanja učinkovitog aromatskog slaganja, potrebnog za agregaciju, koje je uzrokovano odbojnim interakcijama između protoniranih gvanidinijkarbonil-pirolnih jedinica.

Prethodno istraživana agregacijska svojstva cijanina-GCP u UV/Vis spektru uspoređivana s najbližim analogom spojem 2, pokazuju da su analozi cijanina konjugirani s GCP-om preko kinolina, skloniji agregiranju od benzotiazolnih analoga (npr. spoj 1). [6] UV/Vis spektri proučavanih boja prikazani su u Dodatku, tablica D1.

Vodene otopine oba spoja ne emitiraju fluorescenciju zbog jako poznate neemisijske relaksacije cijanina u slobodnom stanju, te bez obzira što su oba spoja kiralna, njihov CD spektar je zanemarivog intenziteta u ispitivanim uvjetima zbog prisutnosti spojeva u obliku racemične smjese (podaci nisu prikazani).

4.3 Istraživanja interakcija spoja 1 i spoja 2 s dvolančanom DNA / RNA

4.3.1 Pokusi termičke denaturacije

Pokusi temičke denaturacije osiguravaju informacije termičke stabilnosti dvostruke uzvojnice, kao funkcije interakcije s dodanom malom molekulom. [26] Razlika temperature mekšanja, T_m, slobodnih dvolančanih polinukleotida, te polinukleotida u kompleksu s malom molekulom je važan čimbenik karakterizacije interakcije polinukleotida i male molekule. Primjerice, umjerena do jaka stabilizacija (ΔT_m > 5 °C) potvrđuje interakciju u obliku interkalacije ili vezanja u mali utor. Suprotno tome, slaba stabilizacija (ΔT_m = 0 - 5 °C) je pokazatelj vezanja hidrofobnim učinkom potpomognutim slabim vodikovim vezama i / ili elektrostatskim interakcijama. [27]

Pokusi temičke denaturacije provedeni su koristeći UV-Vis spektrofotometar, te su bilježene apsorbancije, kao funkcija temperature, pri otprilike 260 nm. Denaturacija dvostruke zavojnice vodi do porasta apsorbancije i promjene sigmoindalne denaturacijske krivulje. Maksimum prve derivacije apsorbancije polinukleotida odgovara vrijednosti temperature mekšanja. [27]

Utjecaj konjugata 1 i 2 bio je prilično slab i sličan za sve proučavane DNA i RNA, s obzirom na stabilizaciju dvolančanih polinukleotida u neutralnim uvjetima, što je prikazano u tablici 1, isključujući klasičnu interkalaciju kao dominantni način vezanja. Međutim, stabilizacija spoja 2 / ctDNA i spoja 2 / AU-RNA kompleksa, znatno se povećala pri pH 5, što se može pripisati protonaciji GCP-a i njegovim dodatnim elektrostatskim interakcijama s negativno nabijenom okosnicom DNA ili RNA. Zanimljivo je da pH nije imao učinka na stabilizaciju spoja 2 / AT-DNA. Za spoj 1 kiseli pH imao je snažan utjecaj isključivo na stabilizaciju AU-RNA, pokazujući važnost dodatnih elektrostatskih interakcija prisutnih isključivo u RNA kompleksu.

Tablica 1. *ΔTm vrijednosti*[a] (°C) za različite omjere [b]*r* spojeva 1 i 2 dodanih polinukleotidima.

	[b]***r***	***ctDNA***	***p(dAdT)₂***	***pApU***
spoj 1, pH 7,0	0,1	2,0	0,6	1,0
	0,2	2,0	0,3	1,0
spoj 1, pH 5,0	0,1	2,0	1,3	[c]7,0; 2,0
	0,2	2,0	2,6	[c]6,0; 1,0
spoj 2, pH 7,0	0,1	1,1	1,0	2,0
	0,2	1,7	1,1	3,0
spoj 2, pH 5,0	0,1	6,0	1,0	[c]5,0; 2,0
	0,2	2,0	1,1	[c]8,0; 1,0

[a]ΔT_m-vrijednosti; [b]*r*=[spoj]/[polinukleotid]; [c]bifazni prijelazi; prvi prijelaz pri T_m 28,5 °C pripisuje se denaturaciji poli A – poli U, a drugi prijelaz pri T_m 80,1 ° C pripisuje se denaturaciji poliAH$^+$ - poliAH$^+$ jer je poli A pri pH 5 većinom protoniran, tvoreći dvolančani polinukleotid [28, 29].

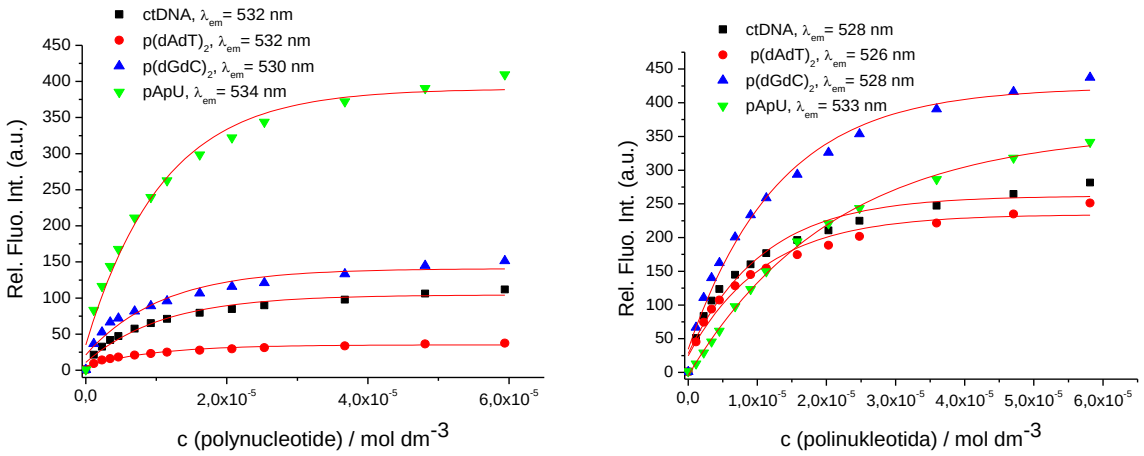
4.3.2 Spektrofotometrijske titracije

Sklonost boja da agregiraju pri $c > 1$ μmol dm^{-3} ometa preciznu titraciju u UV / Vis mediju. Međutim, dobro poznato svojstvo cijaninskih boja je pojava jake fluorescencije uslijed njihovog vezanja na DNA ili RNA, [10] što je omogućilo fluorimetrijsku titraciju u neagregirajućim uvjetima.

Puferirane otopine spojeva 1 i 2, intrinzično nefluorescentne, su doista pokazale jaku fluorescenciju nakon dodavanja bilo koje dvolančane DNA ili dvolančane RNA. Intenzitet emisije je bio jako ovisan o strukturi spoja te o sekundarnoj strukturi određenog dvolančanog polinukleotida, što je vidljivo na slici 9.

Konjugat 1 pokazao je jaku emisijsku selektivnost prema dvolančanoj RNA, u suprotnosti sa svojim izomerom, spojem 2, koji najjače emitira po vezanju na GC-DNA. Obje boje imaju najslabiju emisiju za AT-DNA. Toliko različiti odzivi upućuju na to da se obje boje vežu na sličan način s AT-DNA, dok se njihovo vezanje na GC-DNA odnosno AU-RNA značajno razlikuje. Razlike su posljedica finog međudjelovanja strukture boje i specifičnih svojstava veznih mjesta DNA i RNA. Naime, AT-DNA ima mali utor prikladan za vezanje malih molekula, u koji se spojevi 1 i 2 slično vežu. Mali utor AU-RNA je suviše plitak i širok te se male molekule najvjerojatnije vežu u veliki utor, dok mali utor GC-DNA karakterizira

ometanje vezanja zbog brojnih amino skupina gvanina, koje sterički ometaju vezanje i ograničavaju smještaj malih molekula. Stoga se u slučaju GC-DNA, male molekule preusmjeravaju na interkalaciju ili eventualno aglomeraciju u veliki utor.



Slika 9. Promjene u flourescenciji: LIJEVO: spoj 1 (λ_{eksc} = 505 nm, c = 5 × 10^{-7} mol dm^{-3}); DESNO: spoj 2 (λ_{eksc} = 505 nm, c = 5 × 10^{-7} mol dm^{-3}); nakon dodavanja polinukleotida. Provedeno pri pH 7,0 koristeći natrijev kakodilatni pufer, I = 0,05 mol dm^{-3}.

Fluorimetrijske titracije provedene su i pri pH 5, pri kojem je GCP jedinica protonirana, te je, s dodatnim pozitivnim nabojem, podložna interakciji s negativno nabijenom okosnicom DNA ili RNA, povećavajući ukupni afinitet (Dodatak, slike D20 i D30). Zanimljivo, fluorimetrijski odziv spoja 1 bio je identičan eksperimentima provedenim pri pH 7, dok su rezultati prepoznavanja fluorescencije spoja 2 spoja bili različiti. Pri pH 5, spoj 2 je pokazivao najjaču emisiju za ctDNA, a zatim za GC-DNA te AU-RNA. Svi titracijski podaci obrađeni su nelinearnom prilagodbom na Scatchardovu jednadžbu (McGhee, vonHippelov formalizam) [20, 29] dajući konstante vezanja, prikazane u Tablici 2.

Afiniteti boja prema svim dvolančanim polinukleotidima bili su slični, što ukazuje da opažena razlika u odzivu emisije nije posljedica jačine interakcija, nego je vjerojatnije posljedica sitnih razlika u pozicioniranju cijanina unutar mjesta vezanja i slobodne rotacije oko metinske veze. Nadalje, jače vezanje pri pH 5 u usporedbi s pH 7, slaže se s gore spomenutim jačim stabilizacijskim efektima (Tablica 1) te se može pripisati protonaciji GCP skupine u slabo kiselim uvjetima, dajući dodatne interakcije vezanja.

Tablica 2. Konstante vezanja i spektroskopska svojstva kompleksa ($^a\log K_s$) konjugata 1 i 2 s dvolančanim polinukleotidima, izračunatih obradom fluorimetrijskih titracija

($c = 5 \times 10^{-7}$ mol dm^{-3}), pri pH = 7,0 i pH = 5,0, natrijev kakodilatni pufer, $I = 0{,}05$ mol dm^{-3}.

	ctDNA	***p(dAdT)$_2$***	***p(dGdC)$_2$***	***pApU***
spoj 1, pH 7,0	6,1 / 14,3	6,2 / 8,8	6,4 / 7,8	6,2 / 15,8
spoj 1, pH 5,0	6,2 / 13,8	6,3 / 9,3	6,4 / 10,1	6,5 / 24,3
spoj 2, pH 7,0	6,2 / 13,0	6,1 / 14,4	6,2 / 16,8	5,6 / 373,9
spoj 2, pH 5,0	6,5 / 220,8	6,5 / 13,9	6,5 / 13,0	6,0 / 190,3

[a] Obradom podataka titracije pomoću Scatchard jednadžbe [20, 29] dobivene su vrijednosti omjera *n* [vezana boja] / [polinukleotid] = 0,1 i 0,2, za lakšu usporedbu sve log Ks vrijednosti su ponovno izračunate za fiksni n = 0,1. Koeficijenti korelacije bili su > 0,99 za sve izračunate Ks.

4.3.3 Eksperimenti cirkularnog dikroizma (CD)

Detaljniju analizu strukturnih svojstava nastalih kompleksa omogućila je CD spektrofotometrija. [30] Vezanjem na polinukleotide, mala molekula može izazvati inducirani (I) CD signal, postavljen na apsorpcijskim vrpcama male molekule, u ovom slučaju u rasponu 450- 500 nm, koji se ne podudara s CD signalima DNA / RNA. Izgled i veličina ICD signala predstavljaju vrijedne informacije za određivanje načina vezivanja malih molekula (interkalacija, aglomeracija, vezanje u utore, itd.). [31] Vezanjem u mali utor dvolančane DNA, uzrokuje orijentaciju liganda približno 45 ° u odnosu na kiralnu os DNA, dajući jaku pozitivnu ICD vrpcu. Interkalacija postavlja aromatsku skupinu liganda u koplanarni raspored s parovima baza, dajući slabu ICD vrpcu. Taj signal je, u većini slučajeva, negativnog predznaka zbog paralelne orijentacije tranzicijskog vektora liganda i dulje osi okolnih baznih parova. [11, 30]

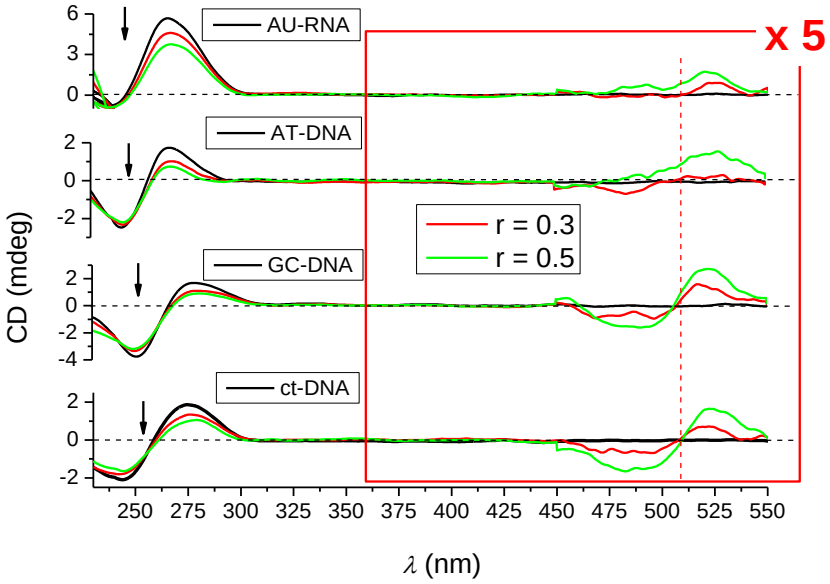
Zbog prisutnosti racemičnih smjesa spojeva, intenziteti CD spektara u rasponu 230 – 500 nm su zanemarivi s obzirom na CD spektre polinukleotida, što omogućuje točnu korekciju CD titracija.

Dodavanje boja rezultiralo je općim smanjenjem CD vrpca DNA/ RNA (240-290 nm, Dodatak D41 i D42), što je izraženije vidljivo za spoj 2 u usporedbi s spojem 1. Smatra se da

je takvo smanjenje kiralnosti DNA / RNA povezano s induciranim odmotavanjem dvostruke zavojnice polinukleotida, uzrokovano vezanjem malih molekula [30, 31].

Zanimljivo, spoj 1 izaziva najveće smanjenje AU-RNA CD spektra, što bi moglo biti povezano s najjačim povećanjem emisije fluorescencije spoja 1 nakon dodavanja AU-RNA, vidljivo na slici 10. S druge strane, spoj 2 je izazvao slične promjene u CD spektru svih DNA / RNA, u skladu sa sličnim povećanjem emisije. Odstupanje od svih, prethodno proučavanih, aril-GCP konjugata [7] te cijanin-GCP [11] konjugata (vrlo bliski analoga spoja 2), nisu uočene ICD vrpce GCP kromofora (na λ = 300 nm), ističući da za oba spoja, 1 i 2, GCP jedinica nije bila ravnomjerno orijentirana u odnosu na polinukleotidnu kiralnu os. [31] Detaljna analiza raspona λ = 450 - 600 nm (Dodatak, D41 i D42) pokazala je vrlo slabe ili zanemarive ICD vrpce za spoj 1 pri oba pH, i mnogo izraženije ICD vrpce za spoj 2, prikazano na slici 10., što je u korelaciji s jakim ICD vrpcama njegova bliskog analoga Cy-GCP. [11]

Budući da svi spojevi (1, 2 i Cy-GCP [11]) vežu DNA / RNA sa sličnim afinitetom (Tablica 2), čini se da analozi u kojima je GCP vezan za kinolin (spoj 2 i Cy-GCP [11]) postižu jednoličniju orijentaciju u odnosu na kiralnu os polinukleotida, što rezultira dobro definiranim ICD vrpcama [31] u usporedbi sa slabo orijentiranim cijaninom iz analoga 1 (GCP vezan na benzotiazol). ICD vrpce spoja 2 bile su smještene u rasponu apsorpcije cijanina, (Slika 10., 450 - 600 nm), nalik onima prethodno ispitivanog analoga Cy-GCP [11]. ICD vrpce spoj 2 bile su isključivo pozitivne za AT-DNA i AU-RNA, što je tipično za vezanje jedne molekule u mali ili veliki utor. [30, 31] To je u suprotnosti s ICD vrpcama GC-DNA, koje su jedine karakteristične po pojavi spregnutog pozitivnog i negativnog ICD spektra u području apsorpcije cijanina, uslijed agregacije / dimerizacije cijaninskih boja, [30, 31] vjerojatno u velikom utoru GC-DNA jer je manji utor sterički blokiran amino skupinama gvanina. [27]



Slika 10. CD titracija dvolančane DNA i dvolančane RNA (▬; c = 2 x 10^{-5} mol dm^{-3}) s spojem 2 u molarnim omjerima $r_{\text{[spoj 2] / [polinukleotid]}}$ = 0,3 (▬) i 0,5 (▬). Potrebno je zamjetiti kako je okvirom označeni raspon 450-550 nm pomnožen s 5 za bolju vidljivost. Provedeno pri pH 7 uz natrijev kakodilatni pufer, I = 0,05 mol dm^{-3}.

§ 5. ZAKLJUČAK

Iz provedenih istraživanja može se zaključiti da mjesto vezanja gvanidinijkarbonil-pirola (GCP) na cijanin preko benzotiazola ili kinolina, utječe na intrinzična svojstva cijanin-GCP konjugata u vodenom mediju. Povećana izloženost stalnog pozitivnog naboja otapalu, derivata 2, uzrokuje veću sklonost agregiranju u vodenim otopinama u odnosu na analog s centriranim pozitivnim nabojem, spojem 1. Također, spojevi 1 i 2 pokazali su različite fluorimetrijske rezultate i rezultate cirkularnog dikroizma pri mjerenjima s različitim dvolančanim DNA i dvolančanim RNA. Spoj 1 je pokazao izraženiju fluorimetrijsku i CD selektivnost prema AU-RNA, dok spoj 2 pokazuje vrlo malu fluorimetrijsku selektivnost između raznih DNA i RNA. Međutim, samo je izomer 2 pokazao mjerljive inducirane (I) CD vrpce, dajući različite spektre za AT (U)-polinukleotide i GC-polinukleotide.

Interakcije ispitivanih spojeva s DNA i RNA su do određene mjere kontrolirane promjenom pH uslijed GCP protonacije, dajući jači afinitet i termalnu stabilizaciju pri pH 5. Međutim pH kontrola nije pridonijela značajnijim razlikama u fluorimetrijskom prepoznavanju, za razliku od ranije primjećene selektivnosti u analoga pirena PE1.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

CD – cirkularni dikroizam

(I) CD – inducirani cirkularni dikroizam

*ct*DNA - DNA iz telećeg timusa (*calf thymus* DNA)

DMSO – dimetil sulfoksid

GCP - gvanidinijkarbonil-pirol

NMR – nuklearna magnetska rezonancija

$p(dAdT)_2$ – polinukleotid s alternirajućim AT parovima baza

$p(dGdC)_2$ – polinukleotid s alternirajućim GC parovima baza

pApU – dvolančani polinukleotid načinjen od lanca baze A i njemu komplementarnog lanca načinjenog od baze U

TO – tiazol oranž (eng. *thiazole orange*)

UV/Vis – ultraljubičasto/vidljivo zračenje

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. G. P. C. Drummen, *Fluorescent Probes and Fluorescence (Microscopy) Techniques - Illuminating Biological and Biomedical Research*, Molecules **17** (2012) 14067-14090.
2. E. Trinquet, G. Mathis, *Fluorescence technologies fot the investigation of chemical libraries*, Mol BioSyst **2** (2006) 381.
3. S. Bhaduri, N. Ranjan, D. P. Arya, *An overview of recent advances in duplex DNA recognition by small molecules*, Beilstein J Org Chem **14** (2018) 1051-1086.
4. M. Demeunynck, C. Bailly, W. D. Wilson, *DNA and RNA Binders*, Wiley-VCH: Weinheim, 2002.
5. a) S. B. Baylin, K. E. Schuebel, *Genomic biology: the epigenomic era opens*, Nature (2007), 448, 548.
   b) K. K. Li, C. Luo, D. X. Wang, H. L. Jiang, Y. G. Zheng, *Chemical and biochemical approaches in the study of histone methylation and demethylation*, Med Res Rev **32(4)** (2012) 815-867.
6. B. A. Armitage, *Cyanine Dye-DNA Interactions: Intercalation, Groove Binding and Aggregation*. u *DNA Binders and Related Subjects*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2005) 253: 55–76.
7. C. Schmuck, *A Journey through 12 Years of Interacting Molecules: From Artificial Amino Acid Receptors to the Recognition of Biomolecules and Switchable Nanomaterials*, Synlett **13** (2011) 1798-1815.
8. a) L. Hernandez-Folgado, D. Baretic, I. Piantanida, M. Marjanovic, M. Kralj, T. Rehm and C. Schmuck, *Chemistry-a European Journal* **16** (2010) 3036-3056; b) L. Hernandez-Folgado, C. Schmuck, S. Tomic and I. Piantanida, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **18 (**2008) 2977-2981.
9. M. Radić-Stojković, P. Piotrowski, C. Schmuck and I. Piantanida, *Org. Biomol. Chem.* **13** (2015) 1629-1633.
10. T. Šmidlehner, M. Badovinac, I. Piantanida, *Pyrene-cyanine conjugates as multipurpose fluorescent probes for non-covalent recognition of ds-DNA, RNA and proteins*, New Journal of Chemistry **42** (2018) 6655-6663.
11. T. Šmidlehner, Z. Karačić, S. Tomić, C. Schmuck, I. Piantanida, *Fluorescent cyanine-guanidiniocarbonyl-pyrrole conjugate with pH-dependent DNA/RNA recognition and DPP III fluorescent labelling and inhibition properties*, Monatsh Chem **149** (2018) 1307-1313.
12. T. Šmidlehner, *Multifunctional molecular recognition of DNA/RNA secondary structure by molecular senzors*. Doktorska disertacija, Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci (2018) 37-39; 46-53; 63-66.
13. J. D. Watson, T. A. Baker, S. P. Bell, A. Gann, M. Levine and R. Losick, *Molecular Biology of the Gene*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2014, str. 77-87; 107-108.
14. Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer, *Biokemija 6. izdanje (englesko), 1. izdanje (hrvatsko)*, Preveli: I. Weygand Đurašević, B. Jernej, Ž. Kućan, Školska knjiga, *Zagreb*, 2013, str. 107-113.
15. *Case Study: DNA, Theoretical and Computational Biophysics Group, NIH Center for macromolecular modeling & bioinformatics, University of Illinois at Urbana-*

Campaign, https://www.ks.uiuc.edu/Training/CaseStudies/pdfs/dna.pdf (datum pristupa 12. kolovoz 2019.).
16. Donald M. West, F. James Holler, Stanely R. Crouch and Douglas A. Skoog, *Fundamentals of Analytical Chemistry 9e*, Brooks/Cole, Cengage Learning, 2014.
17. M. Sauer, J. Hofkens, and J. Enderlein, *Handbook of fluorescence spectroscopy and imaging: from ensemble to single molecules*, John Wiley & Sons, 2010.
18. T. Šmidlehner, I. Piantanida, G. Pescitelli, *Polarization spectroscopy methods in the determination of interactions of small molecules with nucleic acids–tutorial*, Beilstein journal of organic chemistry **14** (2018) 84-105.
19. L. Strekowski, *Heterocyclic polymethine dyes: synthesis, properties and applications*. Springer **14** (2008).
20. G. Scatchard, Ann. N.Y. Acad. Sci. **51** (1949) 660–672.
21. J. D. McGhee, P. H. V. Hippel, J. Mol. Biol. **86** (1974) 469–489.
22. R. Varghese, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Commun.* (2009) 2615–2624.
23. M. Sauer, J. Hofkens, J. Enderlein, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (2011) 1–30.
24. J. B Chaires, N. Dattagupta, D. M. Crothers, *Biochemistry* **21** (1982) 3933–3940.
25. T. Šmidlehner, A. Kurutos, J. Slade, R. Beluzic, D. L. Ang, A. Rodger and I. Piantanida, *European Journal of Organic Chemistry* (2018) 1682-1692.
26. J.-L. Mergny, L. Lacroix, *Analysis of Thermal Melting Curves. Oligonucleotides* (2003) **13**: 515–537.
27. W. D. Wilson, L. Ratmeyer, M. Zhao, L. Strekowski, D. Boykin, *Biochemistry*, 32 (15) (1993) 4098-4104.
28. L.-M. Tumir, I. Piantanida, I. Cindrić Juranović, *New permanently charged phenanthridinium-nucleobase conjugates. Interactions with nucleotides and polynucleotides and recognition of ds-polyAH*$^+$, J Phys Org Chem **16** (2003) 891–899.
29. a) C. R. Cantor, P. R. Schimmel, (1980) *Biophysical Chemistry*, Vol. 3., WH Freeman and Co., San Francisco.; b) M. Egli, W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer-Verlag, New York 1983.
30. A. Rodger, B. Norden, *In Circular Dichroism and Linear Dichroism;* Oxford University Press: New York, 1997, 2. poglavlje.
31. M. Eriksson, B. Nordén, *In Methods in Enzymology*, J. B. Chaires, M. J. Waring, Academic Press, San Diego **340** (2001) 68–98.

§ 8. DODATAK

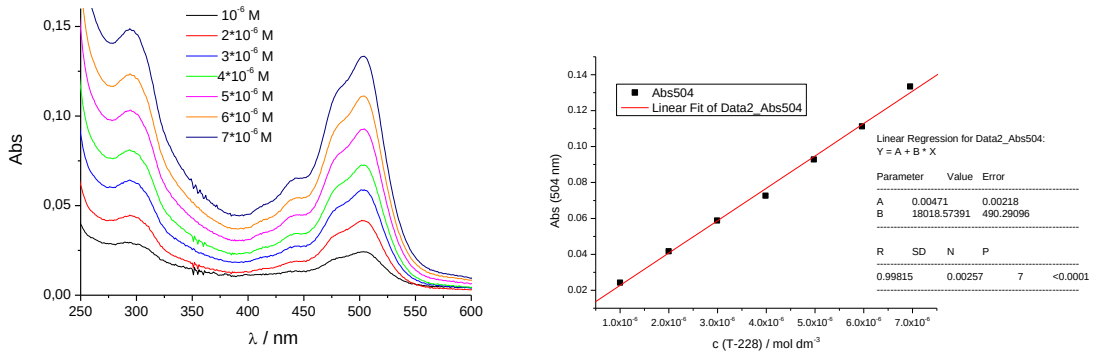
8.1. Praćenje fizikalno-kemijskih svojstava vodenih otopina

8.1.1 Topljivost

Otopina spojeva 1 i 2 pripremljena je otapanjem spojeva u DMSO-u, množinske koncentracije $c = 10^{-3}$ mol dm^{-3}. Otopine su pohranjivane na temperaturi od -8 °C, dok su pri mjerenju držane na sobnoj temperaturi od +25 °C. Tijekom nekoliko mjeseci korištenja otopina nije došlo do vidljivog taloženja ili degradacije.

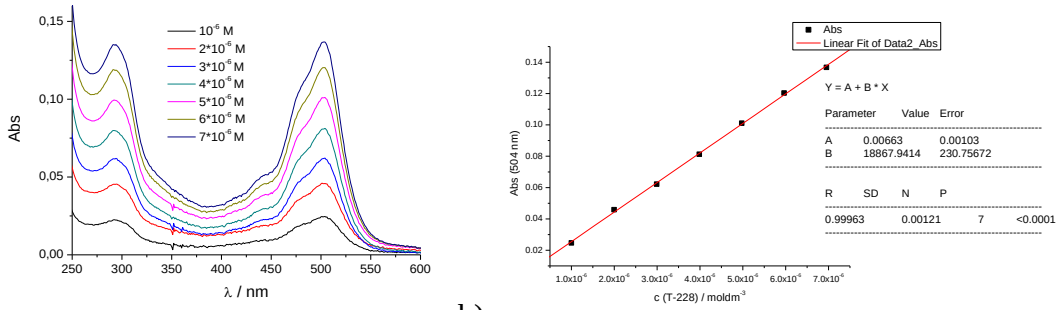
8.1.2 Ispitivanje stabilnosti pomoću UV/Vis i fluorescentnog spektra

Mjerenja su provođena u puferskoj otopina natrijeva kakodilatnog pufera, pri pH = 7,0, I = 0,05 mol dm^{-3}. Izmjerene apsorbancije spojeva 1 i 2, bile su proporcionalne korištenom rasponu koncentracija.



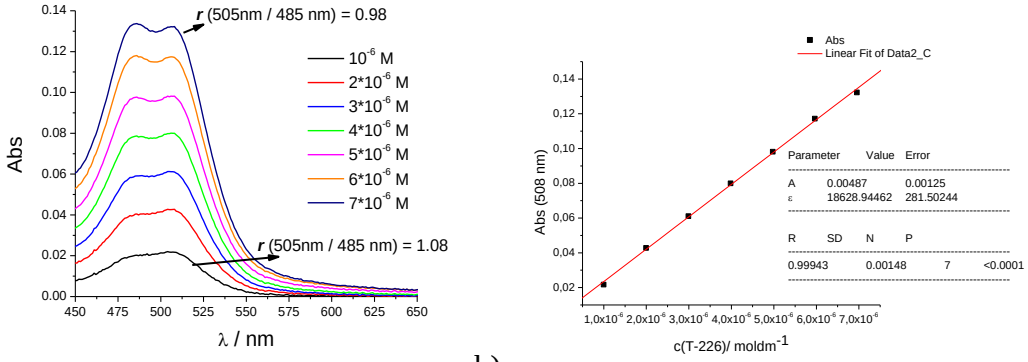
a) b)

Slika D1. a) Ovisnost UV/Vis spektra o koncentraciji spoja 1; b) Ovisnost apsorbancije pri 504 nm o množinskoj koncentraciji spoja 1, pri pH = 7,0 uz natrijev kakodilatni puffer, I = 0,05.



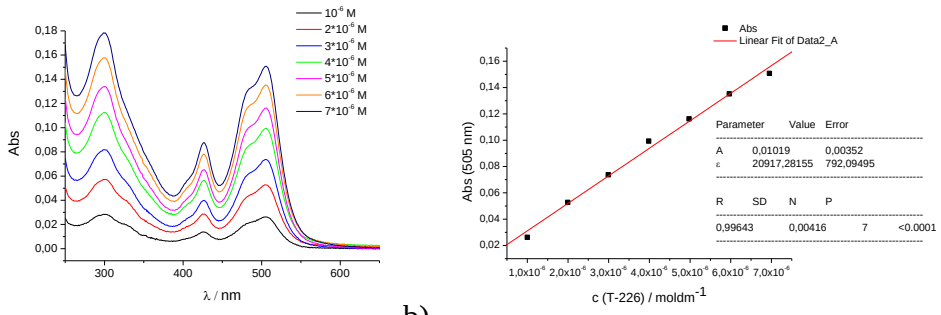
a) b)

Slika D2. a) Ovisnost UV/Vis spektra o koncentraciji spoja 1; b) Ovisnost apsorbancije pri 504 nm o množinskoj koncentraciji spoja 1, pri pH = 5,0 uz natrijev kakodilatni puffer, I = 0,05.



a) b)

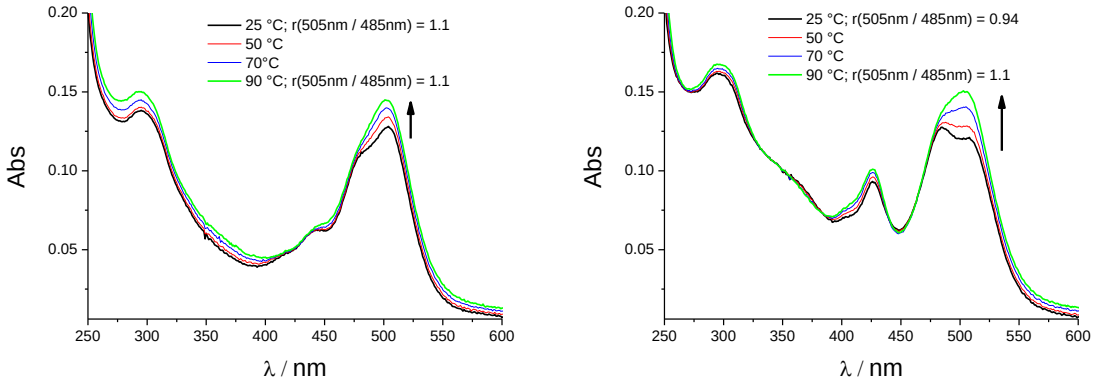
Slika D3. a) Ovisnost UV/Vis spektra o koncentraciji spoja 2; b) Ovisnost apsorbancije pri 504 nm o množinskoj koncentraciji spoja 2, pri pH = 7,0 uz natrijev kakodilatni pufer, I = 0,05.



a) b)

Slika D4. a) Ovisnost UV/Vis spektra o koncentraciji spoja 2; b) Ovisnost apsorbancije pri 504 nm o množinskoj koncentraciji spoja 2, pri pH = 5,0 uz natrijev kakodilatni pufer, I = 0,05.

8.1.3 Temperaturna ovisnost



Slika D5. UV/Vis spektar temperaturne ovisnosti spojeva (c = 1.0 × 10^{-5} mol dm^{-3}) pri pH 7,0, uz natrijev kakodilatni pufer, I = 0,05. Na slici lijevo je prikazan spoj 1, a desno spoj 2.

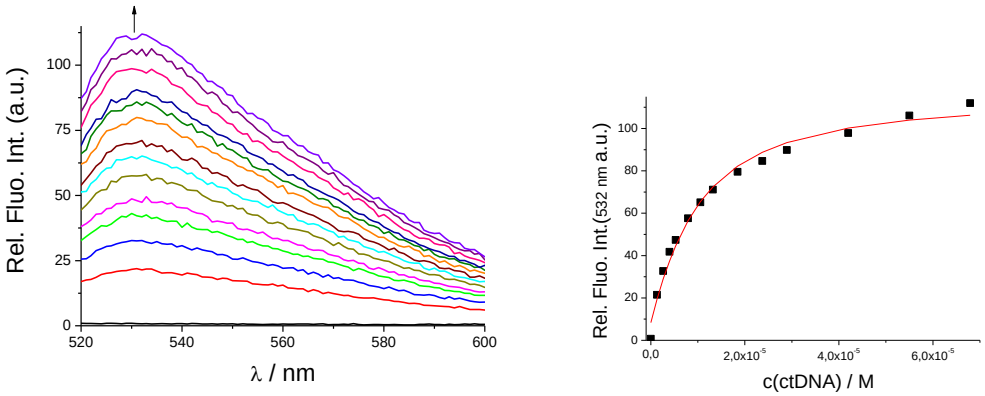
Tablica D1. Prikaz apsorpcijskih podataka spojeva 1 i 2 određenih iz slika 1-4.

	λ/nm	**ε / mmol^{-1} cm^2**
spoj 1, pH 7,0	504	18018
spoj 1, pH 5,0	504	18868
spoj 2, pH 7,0	508	18629
spoj 2, pH 5,0	505	20917

8.2. Proučavanje interakcija spojeva 1 i 2 s dvolančanom DNA / RNA u vodenom mediju

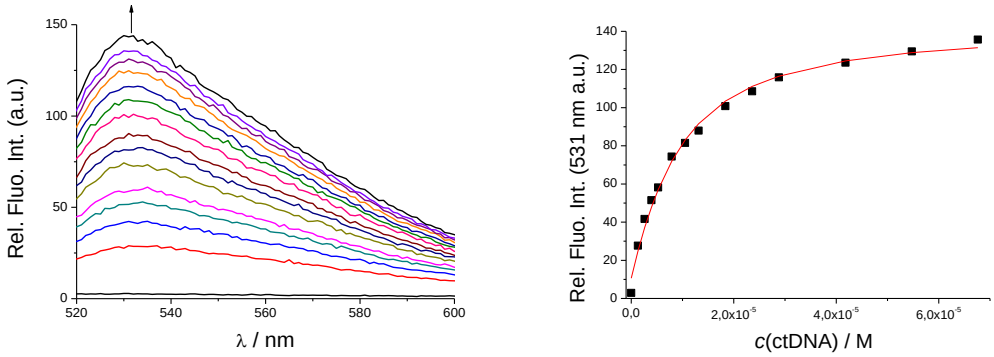
8.2.1 Fluorimetrijske titracije sa spojem 1

Opći uvjeti fluorimetra: prorezi: 5-10; emisija: 530 nm; pobuđivanje: 505 nm



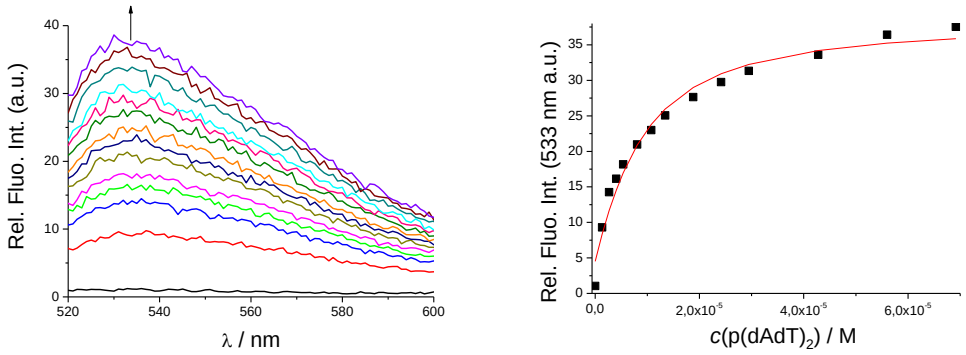
a) b)

Slika D11. a) Promjene fluorescencijskog spektra prilikom titracije spoja 1 (c = 5.0 × 10^{-7} mol dm^{-3}, λ_{eksc} = 505 nm) s ctDNA; b) Ovisnost inteziteta spoja 1 pri λ_{max} = 532 nm o množinskoj koncentraciji ctDNA pri pH 7,0, uz natrijev kakodilatni pufer, I = 0,05.



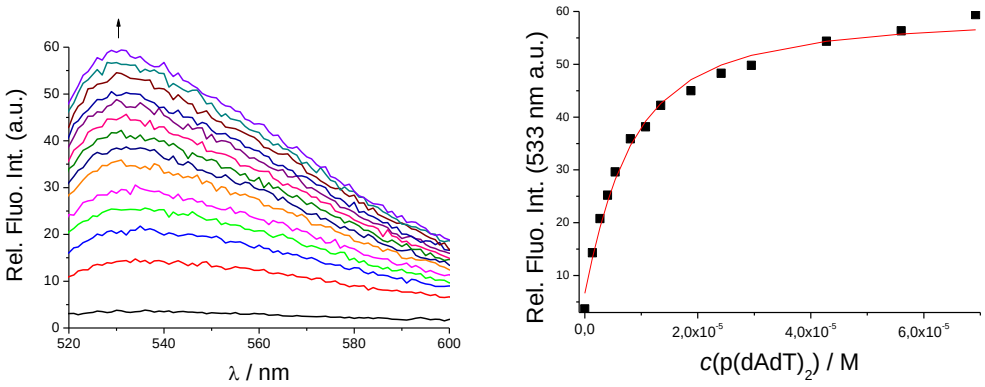
a) b)

Slika D12. a) Promjene fluorescencijskog spektra prilikom titracije spoja 1 (c = 5.0 × 10^{-7} mol dm^{-3}, λ_{eksc} = 505 nm) s ctDNA; b) Ovisnost inteziteta spoja 1 pri λ_{max} = 531 nm o množinskoj koncentraciji ctDNA pri pH 5,0, uz natrijev kakodilatni pufer, I = 0,05.



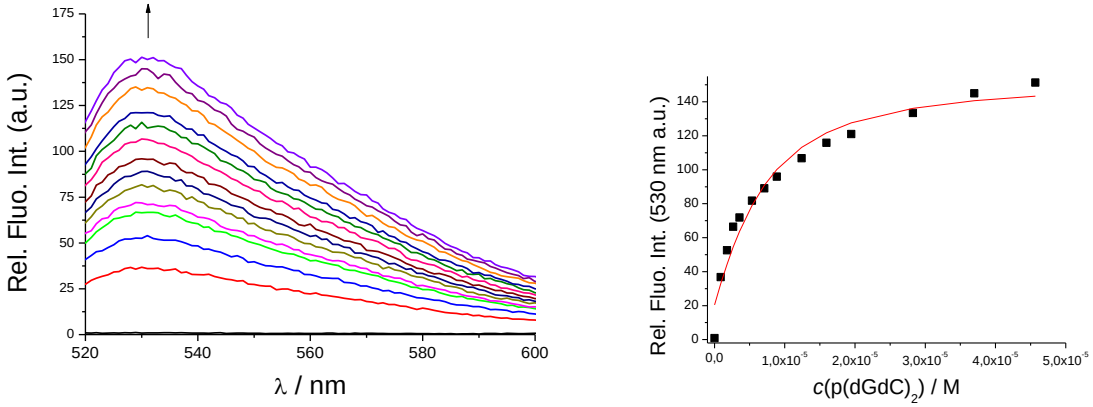
a) b)

Slika D13. a) Promjene fluorescencijskog spektra prilikom titracije spoja 1 (c = 5.0 × 10^{-7} mol dm^{-3}, λ_{eksc} = 505 nm) s $p(dAdT)_2$; b) Ovisnost inteziteta spoja 1 pri λ_{max} = 533 nm o množinskoj koncentraciji $p(dAdT)_2$ pri pH 7,0, uz natrijev kakodilatni pufer, I = 0,05.



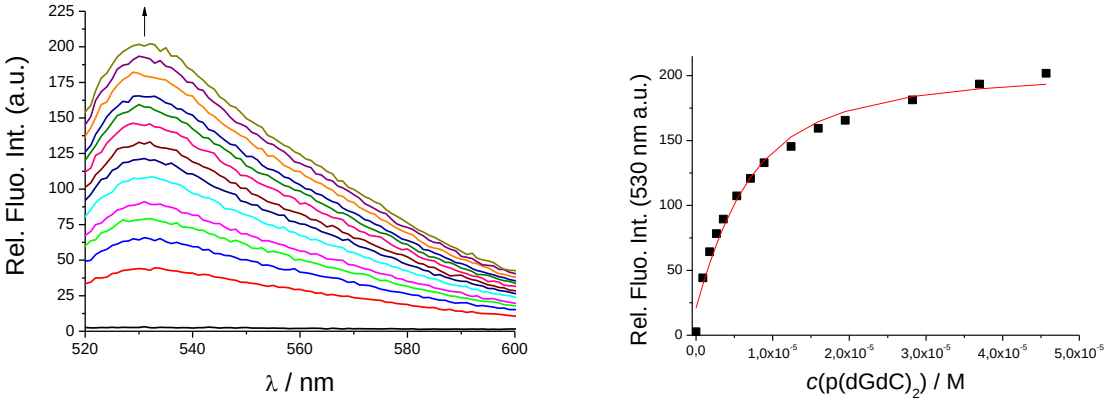
a) b)

Slika D14. a) Promjene fluorescencijskog spektra prilikom titracije spoja 1 (c = 5.0 × 10^{-7} mol dm^{-3}, λ_{eksc} = 505 nm) s $p(dAdT)_2$; b) Ovisnost inteziteta spoja 1 pri λ_{max} = 533 nm o množinskoj koncentraciji $p(dAdT)_2$ pri pH 5,0, uz natrijev kakodilatni pufer, I = 0,05.



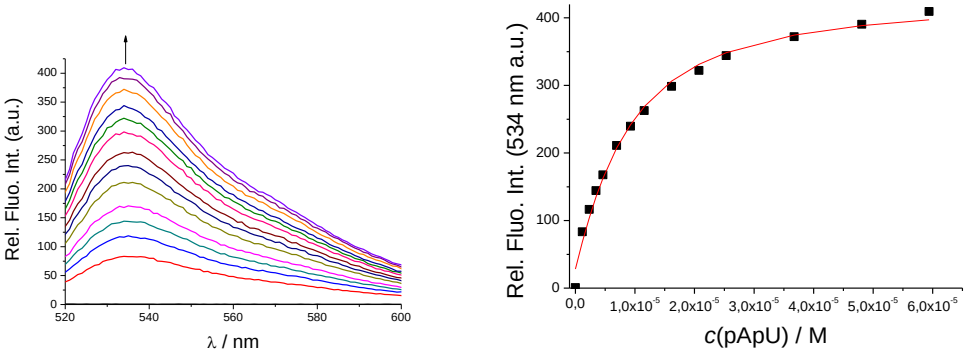
a) b)

Slika D15. a) Promjene fluorescencijskog spektra prilikom titracije SPOJ 1 (c = 5.0 × 10^{-7} mol dm^{-3}, λ_{eksc} = 505 nm) s p(dGdC)2; b) Ovisnost inteziteta SPOJ 1 pri λ_{max} = 530 nm o množinskoj koncentraciji $p(dGdC)_2$ pri pH 7,0, uz natrijev kakodilatni pufer, I = 0,05.



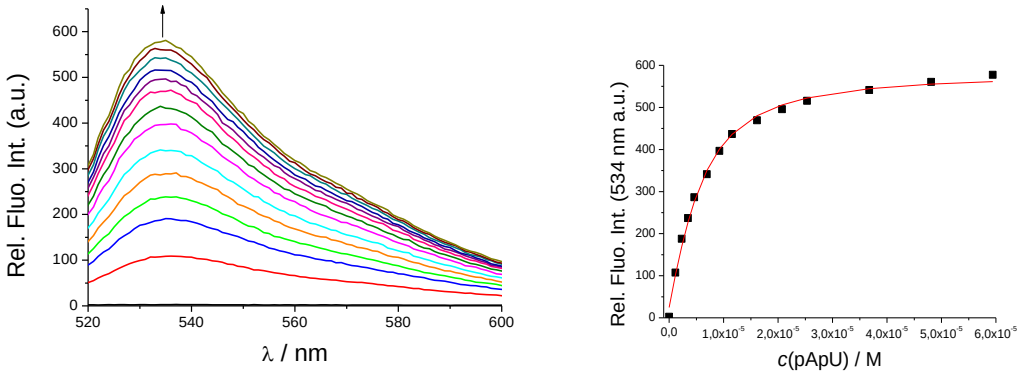
a) b)

Slika D16. a) Promjene fluorescencijskog spektra prilikom titracije spoja 1 (c = 5.0 × 10^{-7} mol dm^{-3}, λ_{eksc} = 505 nm) s p(dGdC)2; b) Ovisnost inteziteta spoja 1 pri λ_{max} = 530 nm o množinskoj koncentraciji $p(dGdC)_2$ pri pH 5,0, uz natrijev kakodilatni pufer, I = 0,05.



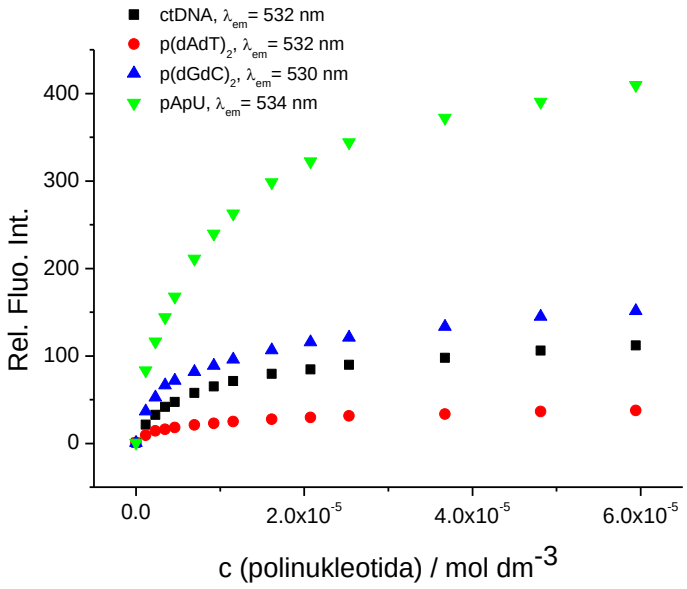
a) b)

Slika D17. a) Promjene fluorescencijskog spektra prilikom titracije spoja 1 (c = 5.0 × 10^{-7} mol dm^{-3}, λ_{exc} = 505 nm) s pApU; b) Ovisnost inteziteta spoja 1 pri λ_{max} = 534 nm o množinskoj koncentraciji pApU pri pH 7,0, uz natrijev kakodilatni pufer, I = 0,05.

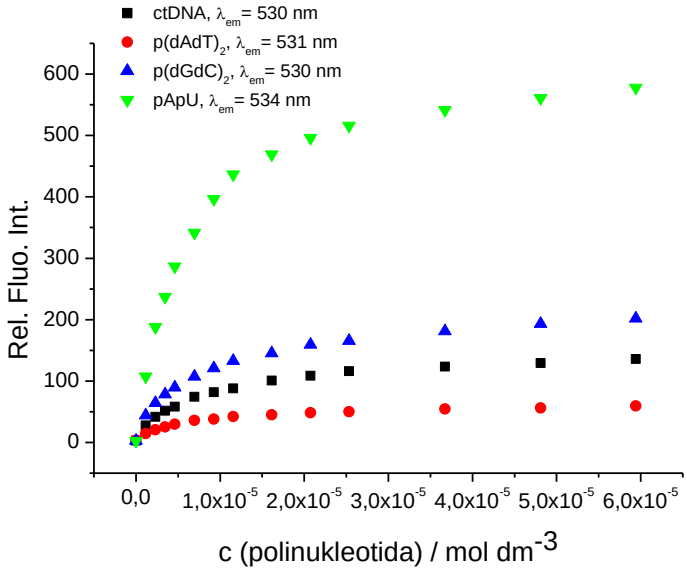


a) b)

Slika D18. a) Promjene fluorescencijskog spektra prilikom titracije spoja 1 (c = 5.0 × 10^{-7} mol dm^{-3}, λ_{eksc} = 505 nm) s pApU; b) Ovisnost inteziteta spoja 1 pri λ_{max} = 534 nm o množinskoj koncentraciji pApU pri pH 5,0, uz natrijev kakodilatni pufer, I = 0,05.



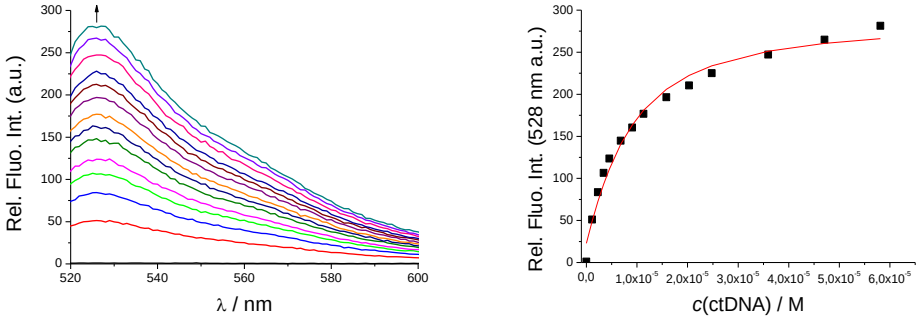
Slika D19. Usporedba promjena u fluorescenciji spoja 1 (c = 5 × 10^{-7} mol dm^{-3}, λ_{eksc} = 505 nm) titracijom s različitim polinukleotidima pri pH 7,0.



Slika D20. Usporedba promjena u fluorescenciji spoja 1 (c = 5 × 10^{-7} mol dm^{-3}, λ_{eksc} = 505 nm) titracijom s različitim polinukleotidima pri pH 5,0.

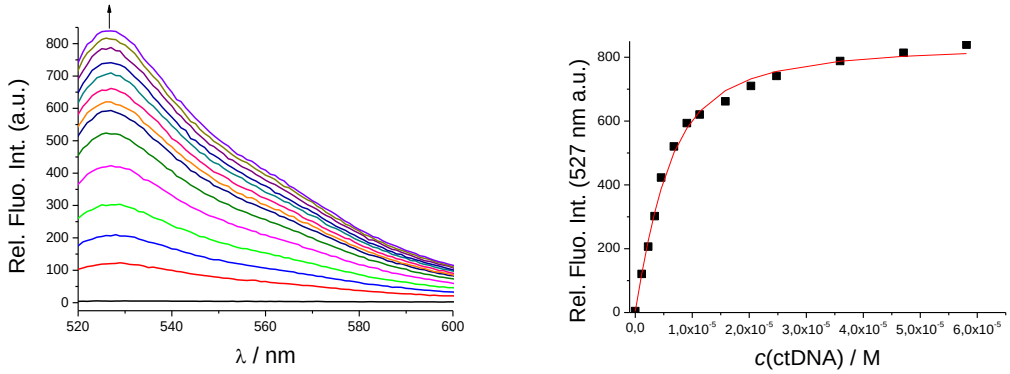
8.2.2 Fluorimetrijske titracije sa spojem 2

Opći uvjeti fluorimetra: prorezi: 5-10; emisija: 530 nm; pobuđivanje: 505 nm



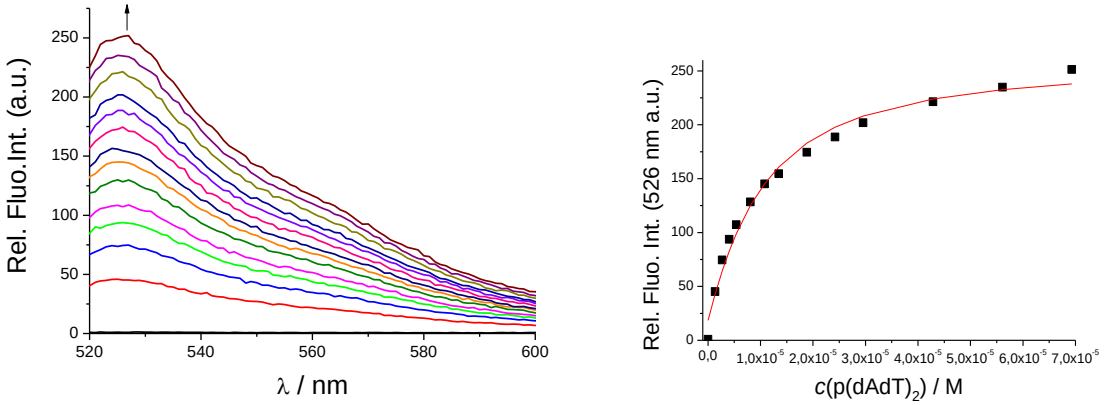
a) b)

Slika D21. a) Promjene fluorescencijskog spektra prilikom titracije spoja 2 (c = 5.0 × 10^{-7} mol dm^{-3}, λ_{eksc} = 505 nm) s ctDNA; b) Ovisnost inteziteta spoja 2 pri λ_{max} = 528 nm o množinskoj koncentraciji ctDNA pri pH 7,0, uz natrijev kakodilatni pufer, I = 0,05.



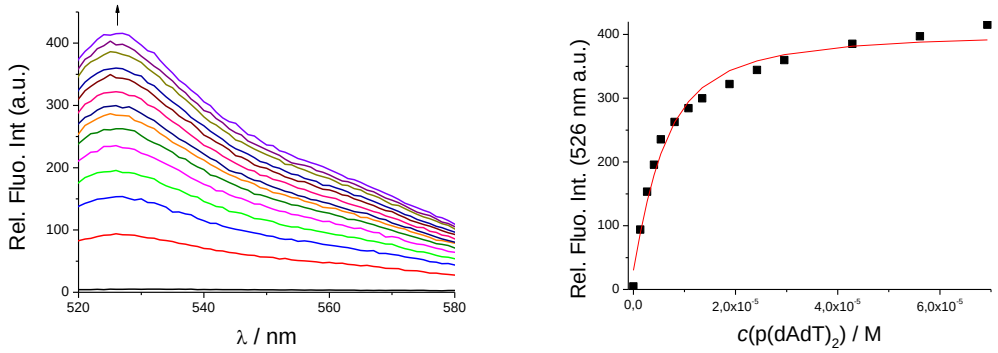
a) b)

Slika D22. a) Promjene fluorescencijskog spektra prilikom titracije spoja 2 (c = 5.0 × 10^{-7} mol dm^{-3}, λ_{exc} = 505 nm) s ctDNA; b) Ovisnost inteziteta spoja 2 pri λ_{max} = 527 nm o množinskoj koncentraciji ctDNA pri pH 5,0, uz natrijev kakodilatni pufer, I = 0,05.



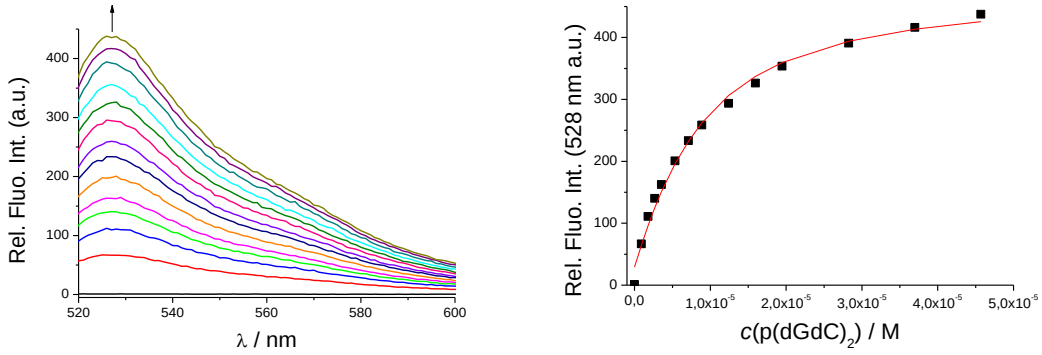
a) b)

Slika D23. a) Promjene fluorescencijskog spektra prilikom titracije spoja 2 (c = 5.0 × 10^{-7} mol dm^{-3}, λ_{exc} = 505 nm) s $p(dAdT)_2$; b) Ovisnost inteziteta spoja 2 pri λ_{max} = 526 nm o množinskoj koncentraciji $p(dAdT)_2$ pri pH 7,0, uz natrijev kakodilatni pufer, I = 0,05.



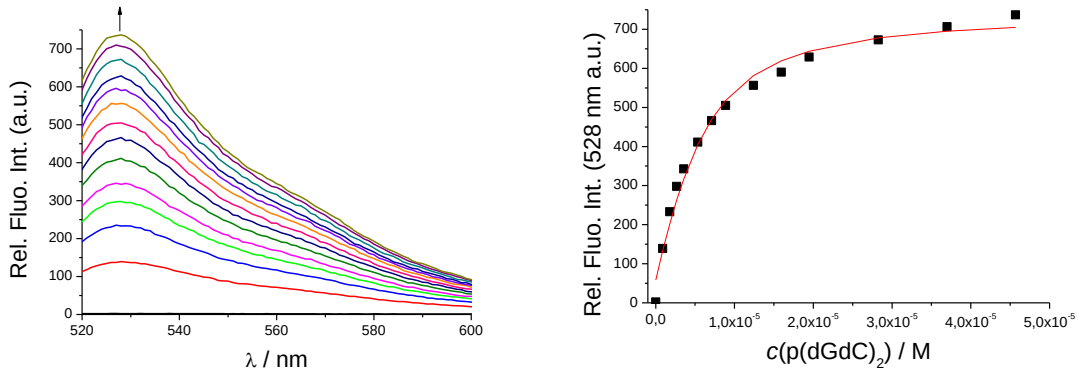
a) b)

Slika D24. a) Promjene fluorescencijskog spektra prilikom titracije spoja 2 (c = 5.0 × 10^{-7} mol dm^{-3}, λ_{eksc} = 505 nm) s $p(dAdT)_2$; b) Ovisnost inteziteta spoja 2 pri λ_{max} = 526 nm o množinskoj koncentraciji $p(dAdT)_2$ pri pH 5,0, uz natrijev kakodilatni pufer, I = 0,05.



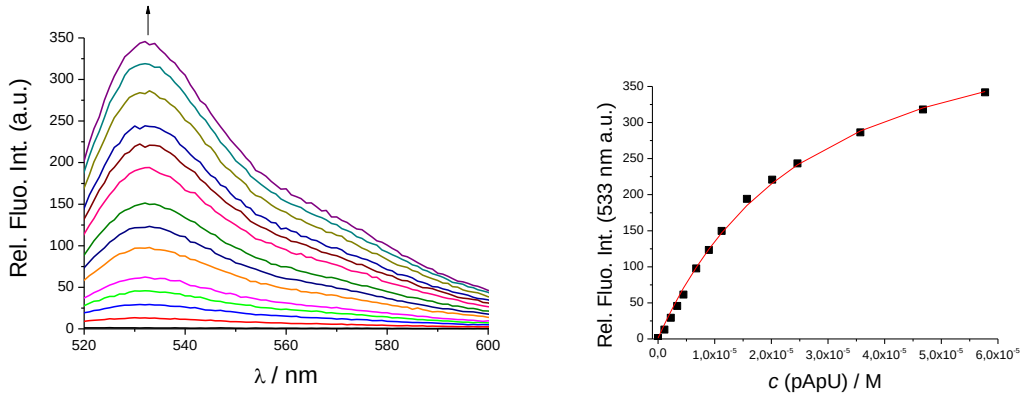
a) b)

Slika D25. a) Promjene fluorescencijskog spektra prilikom titracije spoja 2 (c = 5.0 × 10^{-7} mol dm^{-3}, λ_{eksc} = 505 nm) s p(dGdC)2; b) Ovisnost inteziteta spoja 2 pri λ_{max} = 528 nm o množinskoj koncentraciji $p(dGdC)_2$ pri pH 7,0, uz natrijev kakodilatni pufer, I = 0,05.



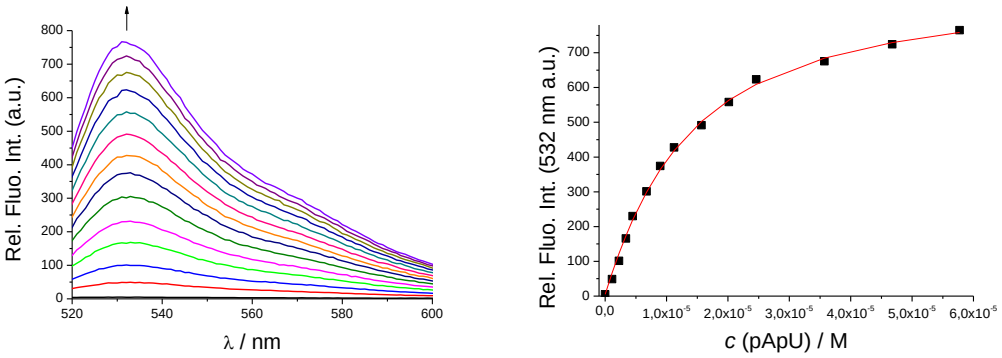
a) b)

Slika D26. a) Promjene fluorescencijskog spektra prilikom titracije spoja 2 (c = 5.0 × 10^{-7} mol dm^{-3}, λ_{eksc} = 505 nm) s p(dGdC)2; b) Ovisnost inteziteta spoja 2 pri λ_{max} = 528 nm o množinskoj koncentraciji $p(dGdC)_2$ pri pH 5,0, uz natrijev kakodilatni pufer, I = 0,05.



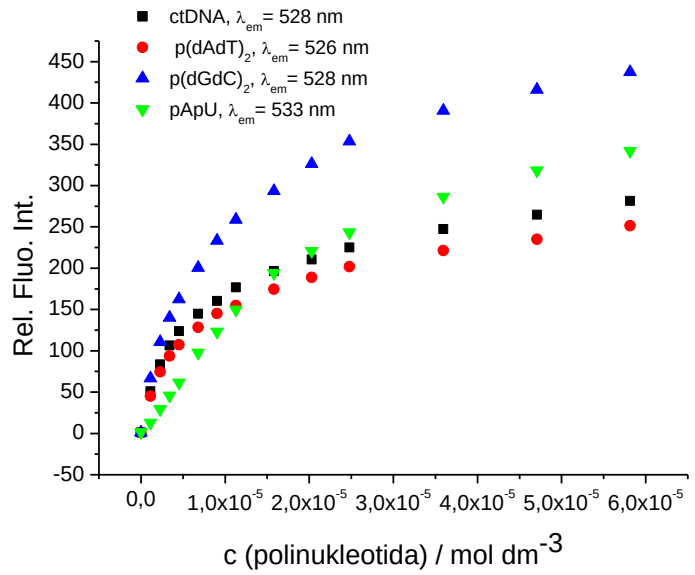
a) b)

Slika D27. a) Promjene fluorescencijskog spektra prilikom titracije spoja 2 (c = 5.0 × 10^{-7} mol dm^{-3}, λ_{eksc} = 505 nm) s pApU; b) Ovisnost inteziteta spoja 2 pri λ_{max} = 533 nm o množinskoj koncentraciji pApU pri pH 7,0, uz natrijev kakodilatni pufer, I = 0,05.

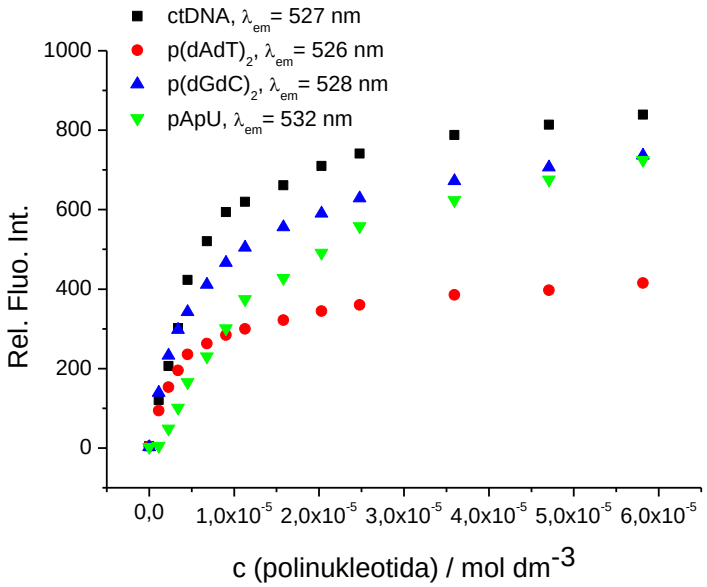


a) b)

Slika D28. a) Promjene fluorescencijskog spektra prilikom titracije spoja 2 (c = 5.0 × 10^{-7} mol dm^{-3}, λ_{eksc} = 505 nm) s pApU; b) Ovisnost inteziteta spoja 2 pri λ_{max} = 532 nm o množinskoj koncentraciji pApU pri pH 5,0, uz natrijev kakodilatni pufer, I = 0,05.

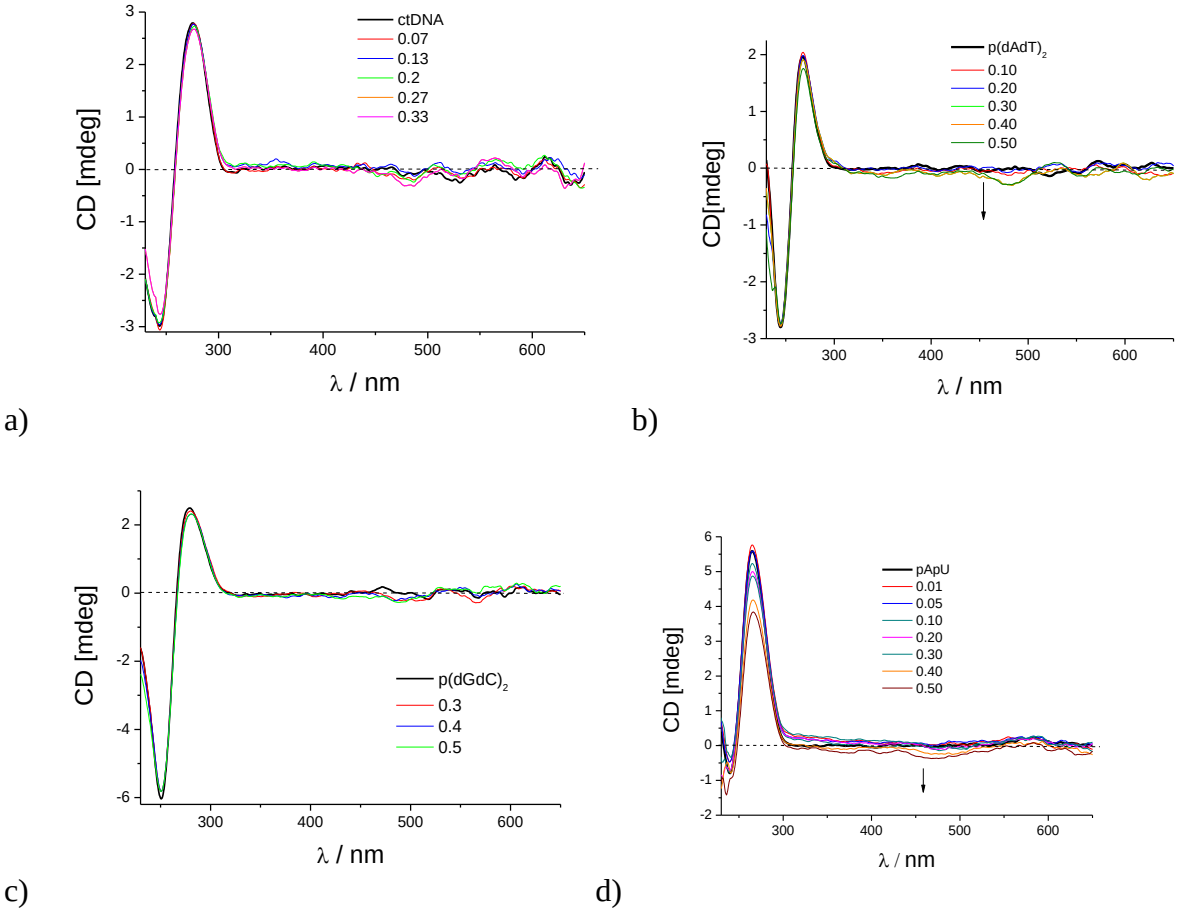


Slika D29. Usporedba promjena u fluorescenciji spoja 2 (c = 5 × 10^{-7} mol dm^{-3}, λ_{eksc} = 505 nm) titracijom s različitim polinukleotidima pri pH 7,0.

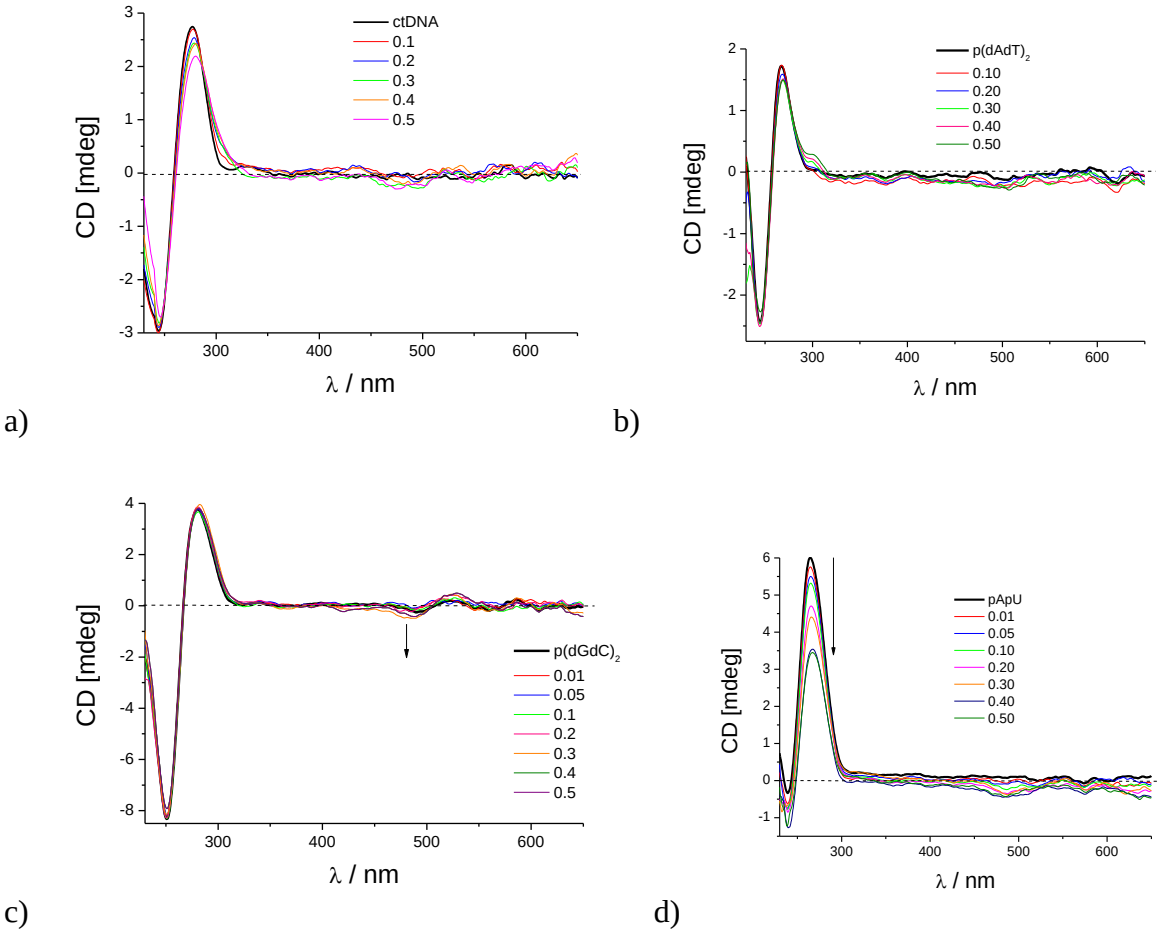


Slika D30. Usporedba promjena u fluorescenciji spoja 2 (c = 5 × 10^{-7} mol dm^{-3}, λ_{eksc} = 505 nm) titracijom s različitim polinukleotidima pri pH 5,0.

8.2.3 CD titracije sa spojem 1

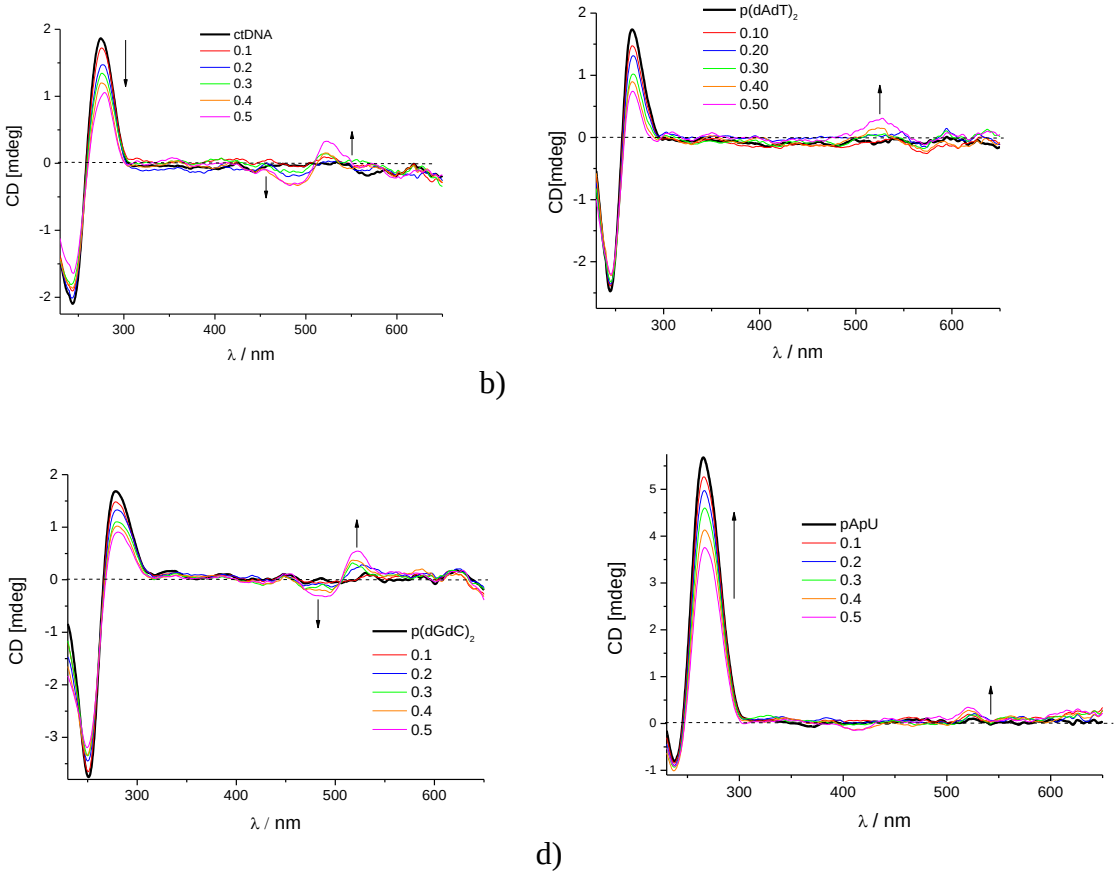


Slika D31. CD titracije a) ctDNA, b) $p(dAdT)_2$, c) $p(dGdC)_2$, d) pApU ($c = 2 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3}) sa spojem 1 pri molarnim omjerima r = [spoj] / [polinukleotid] pri pH 7,0 uz natrijev kakodilatni pufer, I = 0,05.

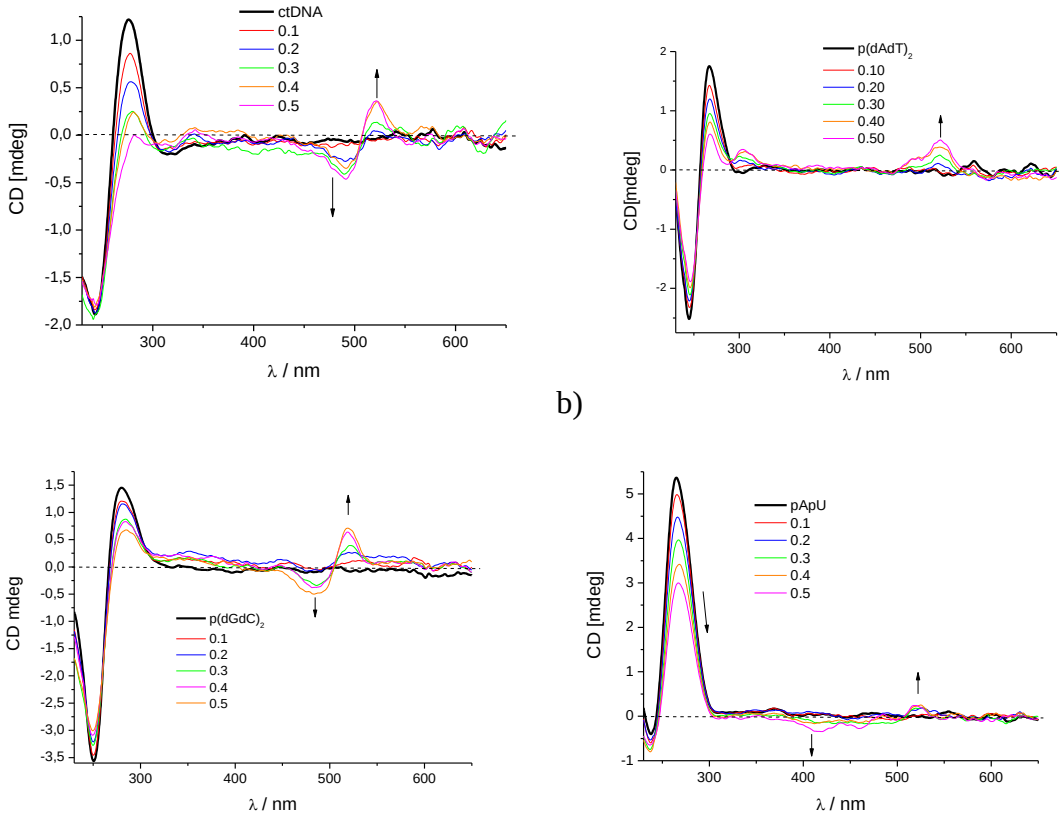


Slika D32. CD titracije a) ctDNA, b) $p(dAdT)_2$, c) $p(dGdC)_2$, d) pApU ($c = 2 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3}) sa spojem 1 pri molarnim omjerima r = [spoj] / [polinukleotid] pri pH 5,0 uz natrijev kakodilatni pufer, I = 0,05.

8.2.4 CD titracije sa spojem 2



Slika D41. CD titracije a) ctDNA, b) $p(dAdT)_2$, c) $p(dGdC)_2$, d) pApU ($c = 2 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3}) sa spojem 2 pri molarnim omjerima r = [spoj] / [polinukleotid] pri pH 7,0 uz natrijev kakodilatni pufer, I = 0,05.

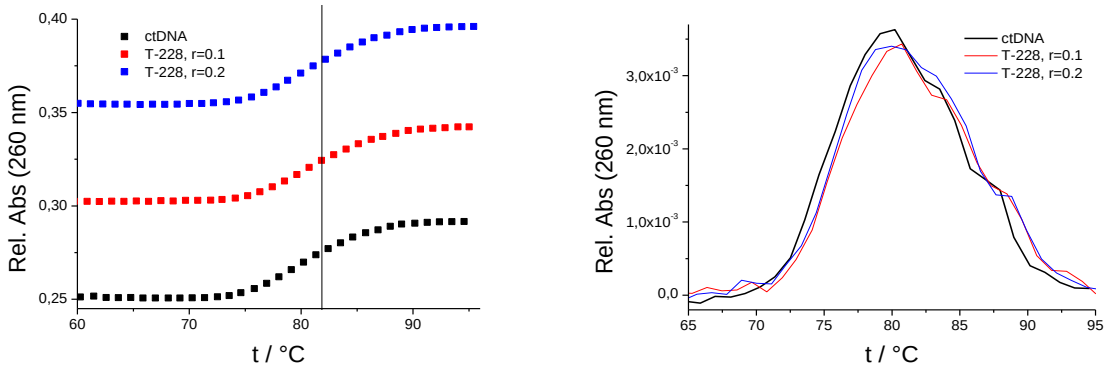


a) b)

c) d)

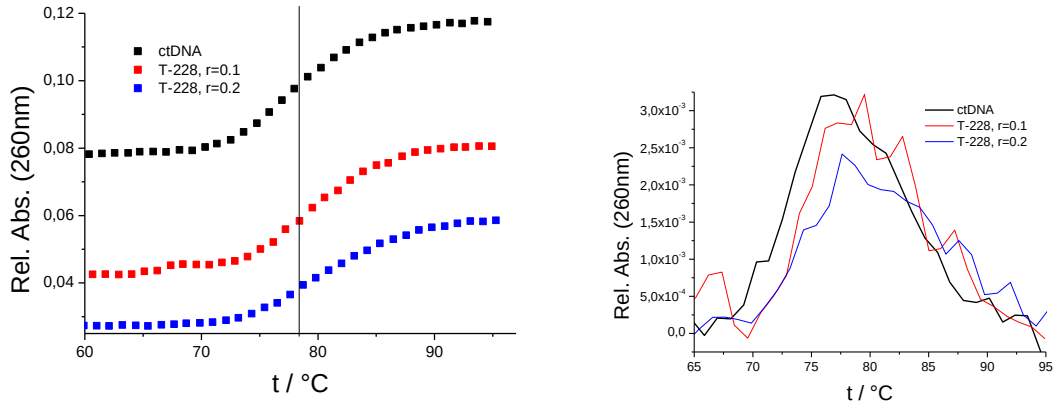
Slika D42. CD titracije a) ctDNA, b) $p(dAdT)_2$, c) $p(dGdC)_2$, d) pApU ($c = 2 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3}) sa spojem 2 pri molarnim omjerima r = [spoj] / [polinukleotid] pri pH 5,0 uz natrijev kakodilatni pufer, I = 0,05.

8.2.5 Temperaturno mekšanje – mjerenje ΔT_m spoja 1



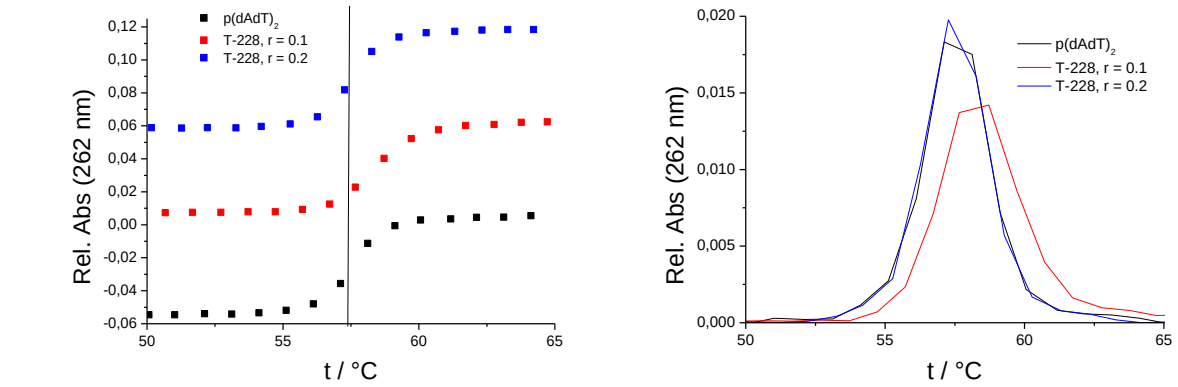
a) b)

Slika D51. Krivulja mekšanja *ct*DNA nakon dodatka r = 0,1 i r = 0,2 (r = [spoj] / [polinukleotid]) spoja 1 pri pH 7,0 uz natrijev kakodilatni pufer, I = 0,05; b) graf ovisnosti prve derivacije apsorbancije o temperaturi.

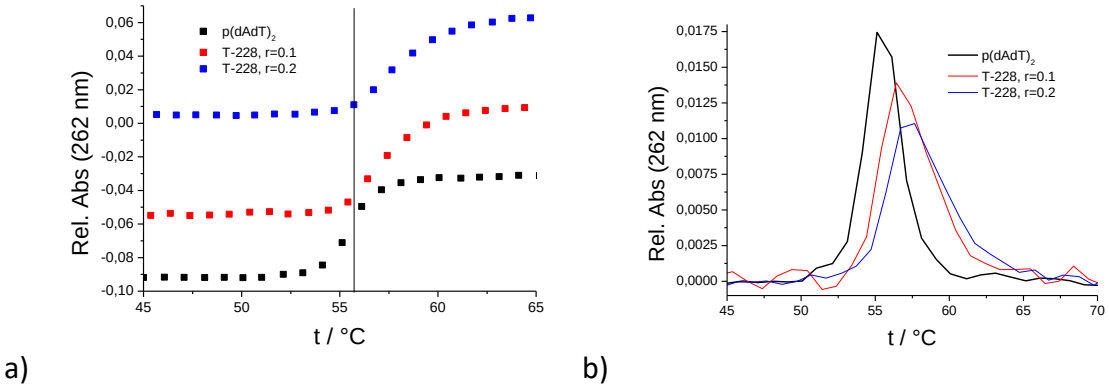


a) b)

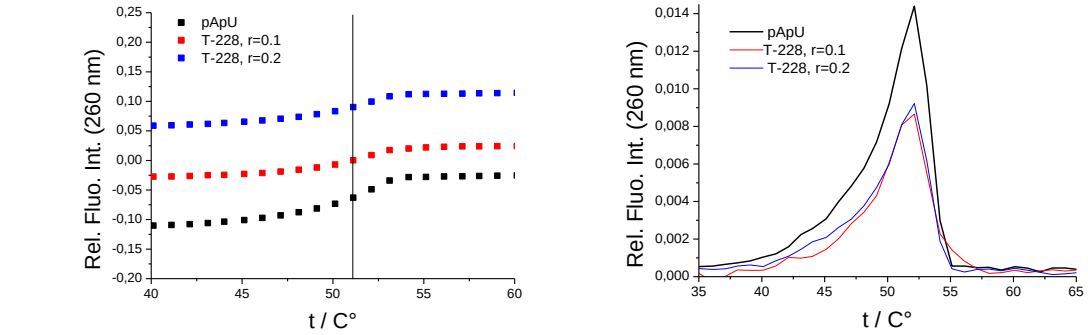
Slika D52. Krivulja mekšanja ctDNA nakon dodatka r = 0,1 i r = 0,2 (r = [spoj] / [polinukleotid]) spoja 1 pri pH 5,0 uz natrijev kakodilatni pufer, I = 0,05; b) graf ovisnosti prve derivacije apsorbancije o temperaturi.



Slika D53. Krivulja mekšanja p(dAdT)$_2$ nakon dodatka r = 0,1 i r = 0,2 (r = [spoj] / [polinukleotid]) spoja 1 pri pH 7,0 uz natrijev kakodilatni pufer, I = 0,05; b) graf ovisnosti prve derivacije apsorbancije o temperaturi.

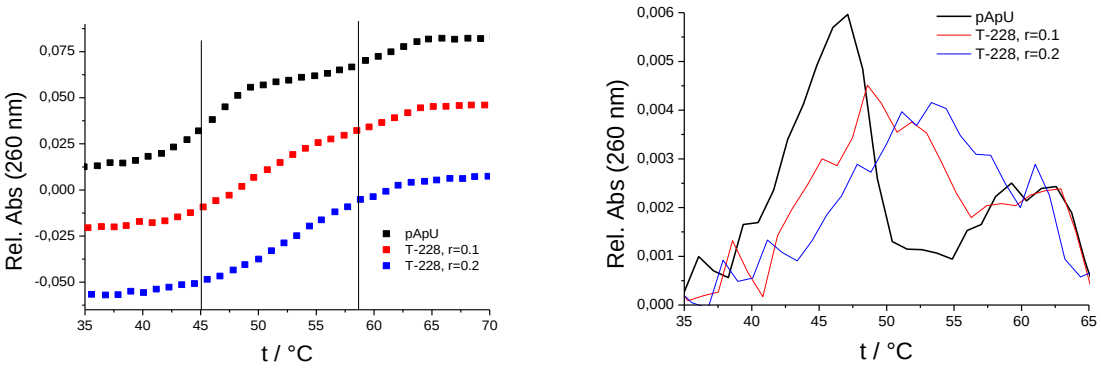


Slika D54. Krivulja mekšanja p(dAdT)$_2$ nakon dodatka r = 0,1 i r = 0,2 (r = [spoj] / [polinukleotid]) spoja 1 pri pH 5,0 uz natrijev kakodilatni pufer, I = 0,05; b) graf ovisnosti prve derivacije apsorbancije o temperaturi.



a) b)

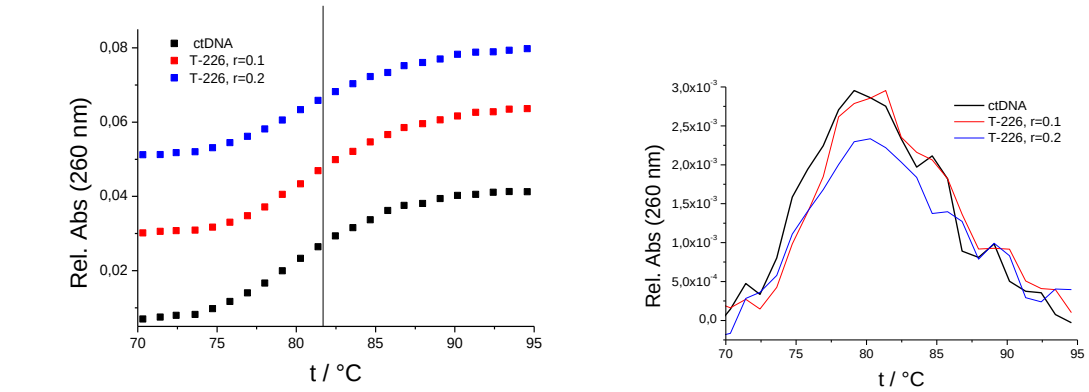
Slika D55. Krivulja mekšanja pApU nakon dodatka r = 0,1 i r = 0,2 (r = [spoj] / [polinukleotid]) spoja 1 pri pH 7,0 uz natrijev kakodilatni pufer, I = 0,05; b) graf ovisnosti prve derivacije apsorbancije o temperaturi.



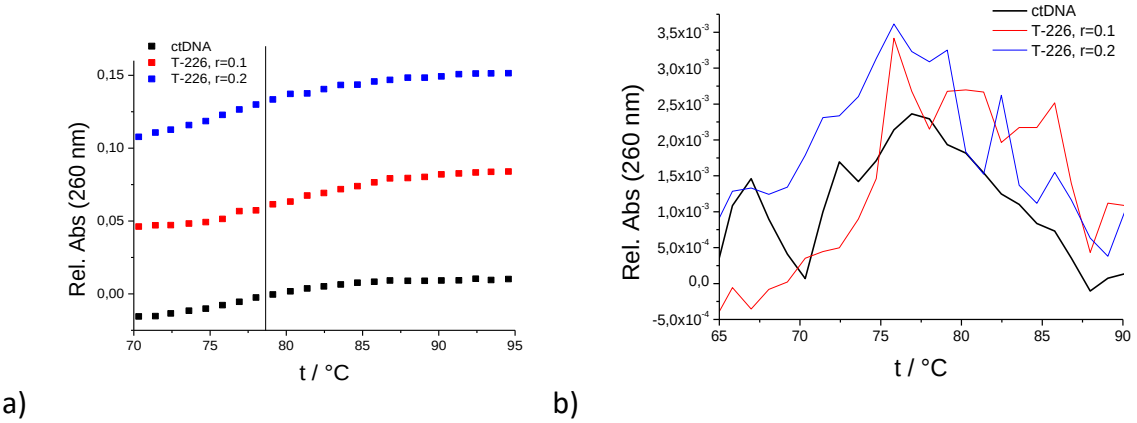
a) b)

Slika D56. Krivulja mekšanja pApU nakon dodatka r = 0,1 i r = 0,2 (r = [spoj] / [polinukleotid]) spoja 1 pri pH 5,0 uz natrijev kakodilatni pufer, I = 0,05; b) graf ovisnosti prve derivacije apsorbancije o temperaturi.

8.2.6 Temperaturno mekšanje – mjerenje ΔT_m spoja 2



Slika D61. Krivulja mekšanja ctDNA nakon dodatka r = 0,1 i r = 0,2 (r = [spoj] / [polinukleotid]) spoja 2 pri pH 7,0 uz natrijev kakodilatni pufer, I = 0,05; b) graf ovisnosti prve derivacije apsorbancije o temperaturi.



Slika D62. Krivulja mekšanja ctDNA nakon dodatka r = 0,1 i r = 0,2 (r = [spoj] / [polinukleotid]) spoja 2 pri pH 5,0 uz natrijev kakodilatni pufer, I = 0,05; b) graf ovisnosti prve derivacije apsorbancije o temperaturi.

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Marta Košćak

Datum rođenja: 02. kolovoz 1995.

Mjesto rođenja: Osijek

Obrazovanje

2002.–2010. Osnovna škola August Harambašić, Donji Miholjac

2010.–2014. Opća gimnazija, Srednja škola Donji Miholjac, Donji Miholjac

2014.–2017. Preddiplomski studij kemije, Odjel za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

2017.–2019. Diplomski studij analitičke kemije i biokemije, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2017. Dani otvoreni vrata Odjela za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku