

Ispitivanje interakcija halogeniranih i nehalogeniranih derivata cijanina s dvolančanim DNA i RNA spektroskopskim metodama

Mihovilović, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:889313>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Petra Mihovilović

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

Diplomski rad

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

Zagreb, 2021. godina

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

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

Zahvale

Prvenstveno se zahvaljujem dragoj mentorici Marijani Radić Stojković na uloženom vremenu, iskazanom povjerenju i pruženoj prilici da sudjelujem u ovom projektu. Hvala na svom prenesenom znanju kao i na prijateljskom odnosu tokom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se i svima u Laboratoriju za biomolekulske interakcije i spektroskopiju ugodnoj radnoj atmosferi. Posebno hvala Ivi na beskonačnom strpljenju i pomoći u svakom trenutku.

Također se zahvaljujem i profesorici Ivi Juranović Cindrić na ljubaznosti i svim korisnim savjetima.

Želim se zahvaliti svojoj obitelji koja mi je omogućila bezbrižno djetinjstvo i obrazovanje. Najveću zahvalu dugujem svojoj majci, HVALA TI što si uvijek bezuvjetno podržavala sve moje snove.

Na kraju, hvala Goranu na beskrajnoj ljubavi i razumijevanju.

Veliko hvala svim mojim ljudima koji su tu bili za mene tijekom cijelokupnog obrazovanja.



Sadržaj

SAŽETAK	VI
ABSTRACT	VII
§ 1. UVOD	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Struktura molekula DNA i RNA	2
2.2. Interakcija malih organskih molekula s polinukleotidima	7
2.3. Metode ispitivanja nekovalentnih interakcija malih molekula s DNA i RNA	10
2.3.1. <i>UV/Vis spektroskopija</i>	11
2.3.1.1. <i>Temperaturno mekšanje</i>	13
2.3.2. <i>Fluorescencijska spektroskopija</i>	15
2.3.3. <i>Spektroskopija cirkularnog dikrozima (CD)</i>	18
2.4. Cijaninske boje	21
2.4.1. <i>Interakcija cijaninskih boja s DNA i RNA molekulama</i>	22
2.4.2. <i>Spektroskopska svojstva cijaninskih boja</i>	23
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	24
3.1. Materijali	24
3.1.1. <i>Kemikalije</i>	24
3.1.2. <i>Uređaji</i>	26
3.2. Spektroskopska karakterizacija spojeva	26
3.3. Istraživanje interakcija spojeva s polinukleotidima	27
3.3.1. <i>Fluorimetrijske titracije</i>	27
3.3.2. <i>Temperaturno mekšanje</i>	28
3.3.3. <i>CD titracije</i>	29
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	30
4.1. Spektroskopska karakterizacija spojeva serije AK	30
4.1.1. <i>UV/Vis spektroskopija</i>	30
4.1.2. <i>Temperaturna stabilnost vodenih otopina spojeva</i>	31
4.2. Proučavanje interakcije spojeva AK serije s polinukleotidima	32
4.2.1. <i>Fluorimetrijske titracije</i>	32
4.2.2. <i>Temperaturno mekšanje</i>	36
4.2.3. <i>CD titracije</i>	37

§ 5. ZAKLJUČAK	41
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA	43
§ 7. LITERATURNI IZVORI	45
§ 8. DODATAK	XV
8.1. Podaci i spektri vezani uz spektroskopsku karakterizaciju spojeva	xv
8.2. Podaci i spektri vezani uz metodu fluorimetrijske titracije	xvii
8.3. Podaci i spektri vezani uz metodu temperaturnog mešanja	xxii
§ 9. ŽIVOTOPIS	XXVI



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

ISPITIVANJE INTERAKCIJA HALOGENIRANIH I NEHALOGENIRANIH DERIVATA CIJANINA S DVOLANČANIM DNA I RNA SPEKTROSKOPSKIM METODAMA

Petra Mihovilović

Cijaninske boje, kao poznate fluorescentne probe, pronalaze primjenu u specifičnoj detekciji nukleinskih kiselina. U okviru ovog diplomskog rada spektroskopski su okarakterizirane tri novosintetizirane cijaninske boje. Otopine spojeva posjeduju karakteristični UV/Vis spektar u valnom području od 220 nm do 600 nm. Intrinzično nefluorescentni cijanini, odlikuju se izrazitim fluorimetrijskim odgovorom uslijed vezanja na polinukleotide. Interakcije cijaninskih boja s dvolančanim polinukleotidima ispitane su standardnim spektrofotometrijskim metodama. Eksperimentima temperaturnog mekšanja i titracijama metodom cirkularnog dikroizma utvrđen je način vezanja spojeva na polinukleotide. Obradom fluorimetrijskih titracija pomoću Scatchardove jednadžbe metodom nelinearne regresije dobivene su konstante stabilnosti kompleksa cijaninskih boja s polinukleotidima. Cijanini su pokazali selektivnost u odnosu na na sekvencu i sekundarnu strukturu nukleinskih kiselina. Dobiveni rezultati ukazuju na mješovit način vezanja cijaninskih boja, u kojemu uz interkalaciju dolazi do vezanja dimera ili većih agregata u utore polinukleotida.

(48 stranica, 52 slika, 7 tablica, 62 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: apsorbanacija, cirkularni dikroizam, cijaninske boje, DNA, fluorescentne probe, RNA

Mentor: dr. sc. Marijana Radić Stojković, vzn. sur.

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

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
2. prof. dr. sc. Ines Primožič
3. doc. dr. sc. Marko Močibob

Zamjena: doc. dr. sc. Tomislav Jednačak

Datum diplomskog ispita: 22. listopada 2021.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

STUDY OF INTERACTIONS OF HALOGENATED AND NON-HALOGENATED CYANINE DERIVATIVES WITH DOUBLE-STRANDED DNA AND RNA BY SPECTROSCOPIC METHODS

Petra Mihovilović

Cyanine dyes, as known fluorescent probes, find application in the specific detection of nucleic acids. Three newly synthesized cyanine dyes were characterized spectroscopically as part of this thesis. Aqueous solutions of compounds absorbed in the UV/Vis region 220-600 nm. Intrinsically non-fluorescent cyanines are characterized by a pronounced fluorimetric response upon binding to polynucleotides. Interactions of cyanine dyes with double-stranded polynucleotides were examined by standard spectrophotometric methods. The mode of binding of compounds to polynucleotides was determined by temperature melting experiments and CD titrations. Stability constants of the complexes with polynucleotides were obtained by processing fluorimetric titrations using the Scatchard equation. Cyanines have shown selectivity with respect to the sequence and secondary structure of nucleic acids. The obtained results also indicate a coexistence of several binding modes, in which intercalation is accompanied by binding of dimer or higher-order aggregates inside the polynucleotide grooves.

(48 pages, 52 figures, 7 tables, 62 references, original in croatian)

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

Keywords: absorbance, circular dichroism, cyanine dyes, DNA, fluorescent probes, RNA

Mentor: Dr. Marijana Radić Stojković, Research Associate

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

Reviewers:

1. Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor
 2. Dr. Ines Primožič, Professor
 3. Dr. Marko Močibob, Assistant Professor
- Substitute: Dr. Tomislav Jednačak, Assistant Professor

Date of exam: 22nd October 2021

§ 1. UVOD

Specifična detekcija dvolančanih polinukleotida molekulskim prepoznavanjem posljednjih dvadesetak godina postala je vrijedan alat u molekularnoj biologiji i medicini.¹ Prepoznavanjem specifičnog slijeda male organske molekule stupaju u interakciju s biomakromolekulama (nukleinske kiseline, proteini). Upravo zbog uloge nukleinskih kiselina u živim stanicama, poznavanje njihovih interakcija s malim organskim molekulama jest ključno u razjašnjenju mehanizma nastanka mnogih bolesti. Također, biološka aktivnost brojnih lijekova zasniva se na interakcijama organskih molekula s nukleinskim kiselinama.^{2,3} Stoga su osmišljavanje, sinteza i ispitivanje biološke aktivnosti novih spojeva s ciljanom aktivnošću prema DNA, RNA ili proteinima izuzetno značajni.

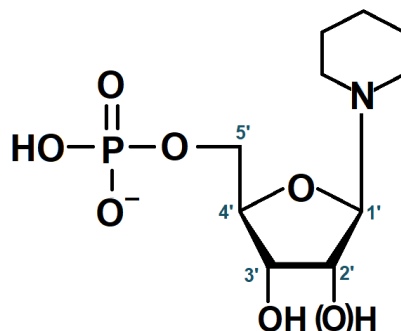
Cijaninske boje jedne su od najstarijih vrsta sintetičkih tvari, koje i dalje pronalaze primjenu u različitim područjima. U svrhu uporabe kao boje za tekstil prva cijaninska boja sintetizirana je prije više od 150 godina.⁴ Posljednjih dvadesetak godina intenzivno se koriste kao biljezi nukleinskih kiselina. Glavne osobine cijaninskih boja koje ih čine dobrim fluorescentnim biljezima su: visoki molarni ekstinkcijski koeficijenti u vidljivom dijelu spektra, niska intrinzična fluorescencija te veliko povećanje intenziteta fluorescencije uslijed vezanja na DNA ili RNA molekule. Kao takve su pronašle primjenu u elektroforezi^{5,6}, metodi lančana reakcije polimeraze PCR, fluorescencijskoj mikroskopiji stanica⁷, ispitivanju dinamike samih polinukleotida te vezanja malih molekula na polinukleotide pomoću metode fluorescentnog rezonancijskog prijenosa energije (FRET)⁸.

U okviru ovog diplomskog rada spektroskopski su okarakterizirana tri novosintetizirana spoja, koja sadrže cijaninsku jedinicu. Nadalje, ispitan je afinitet i način vezanja na prirodnu DNA te sintetske DNA i RNA molekule, a ujedno je ispitan utjecaj supstituenta na afinitet i način vezanja. U tu svrhu korištene su metode UV/Vis spektrofotometrije, fluorimetrije i spektroskopije cirkularnog dikroizma (CD). Titracijama metodom CD i eksperimentima temperaturnog mekšanja ispitan je način vezanja cijaninskih boja na dvolančane polinukleotide. Konstante stabilnosti K_s kompleksa ispitivanih spojeva s različitim polideoksiribonukleotidima i poliribonukleotidima određene su metodom fluorescencijske spektroskopije, a izračunate su temeljem Scatchardove jednadžbe metodom nelinearne regresije za spektroskopski aktivni kompleks.⁹

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Struktura molekula DNA i RNA

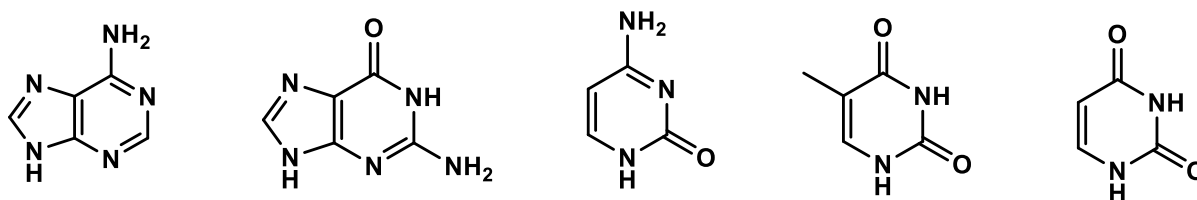
Nukleinske kiseline su linearni polimeri sastavljeni od strukturno sličnih monomernih jedinica, nukleotida. Nukleotidi su građeni od dušične baze, šećera pentoze i fosfatnog ostatka (slika 1).



Slika 1. Shematski prikaz (deoksi)ribonukleotida

Dok je fosfatno-šećerna okosnica nepromijenjena duž molekule nukleinske kiseline i igra strukturnu ulogu, redosljed baza u polimeru jedinstveno karakterizira nukleinsku kiselinu i predstavlja oblik genetičke informacije.¹⁰

DNA i RNA molekule strukturno se razlikuju na dvije razine. Prva obuhvaća vrstu dušične baze koja izgrađuje molekule DNA i RNA. Dušične baze su planarne aromatske molekule koje se dijele na monocikličke pirimidine (citozin, timin i uracil) i bicikličke purine (adenin i gvanin) čije su strukturne formule prikazane na slici 2.



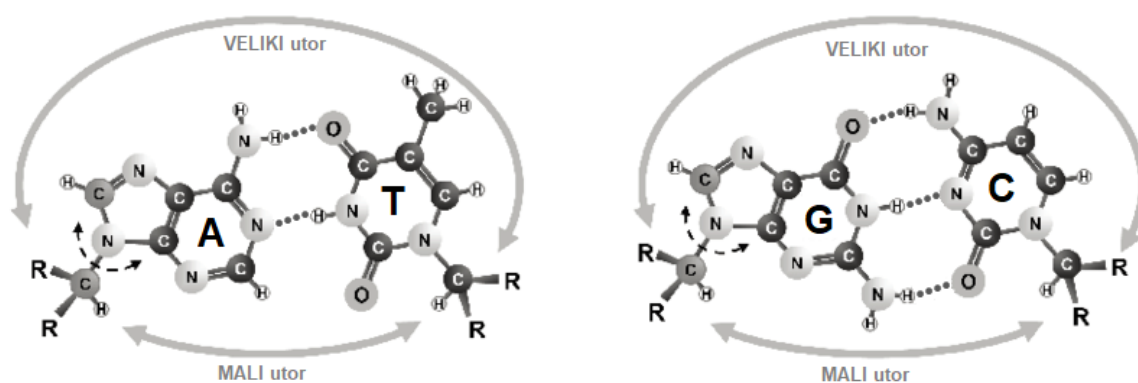
Slika 2. Strukturne formule purinskih (adenin i gvanin) i pirimidinskih baza (citozin, timin, uracil)

DNA molekulu izgrađuju citozin i timin, dok je RNA molekula građena od uracila i citozina. Uracil se od timina razlikuje po tome što atom C5 umjesto metilne skupine ima vezan atom vodika. Osim ovih vrsta dušičnih baza u nukleinskim kiselinama mogu se pronaći kemijski modificirani derivati poput metiliranog citozina i gvanozina.¹¹ Dušične baze vezane su na šećernu jedinicu preko N-9 atoma purina ili N-1 atoma pirimidina *N*-β-glikozidnom vezom tako tvoreći jednu nukleozidnu jedinicu.¹¹

Nadalje, razlikuju se obzirom na vrstu šećerne jedinice koja izgrađuje molekulu nukleinske kiseline. Ribonukleinsku kiselinu izgrađuje D-riboza, koja za razliku od deoksi-D-riboze koja izgrađuje DNA molekulu, sadržava 2'-hidroksilnu skupinu. Odsutnost 2'-OH skupine u DNA zaslužna je za otpornost molekule na hidrolizu čineći je idealnom za pohranu genetičke informacije.^{10,11} Furanozni prsten pentoze nije planaran, već poprima jednu od četiri konformacija. U svakom slučaju četiri atoma se nalaze u jednoj ravnini, dok se jedan C-atom (C-2' ili C-3') nalazi s iste (*endo*) ili suprotne (*exo*) strane ravnine u odnosu na C-5' atom.¹¹

Esterifikacijom C-5' atoma ribofuranoznog prstena omogućeno je povezivanje nukleotidnih jedinica u linearni polimer. Sukcesivni šećeri povezuju se fosfodiesterskim mostovima pri čemu je 3'-OH skupina jednog nukleotida povezana s 5'-fosfatnom skupinom drugog nukleotida.¹⁰

Purinske i pirimidinske baze međusobno su komplementarne na način da tvore baze parove povezane vodikovim vezama. Najpoznatiji parovi baza su Watson-Crick-ovi parovi baza gdje su adenin-timin, odnosno adenin-uracil povezani dvjema vodikovim vezama, a gvanin-citozin trima vodikovim vezama (slika 3).¹³

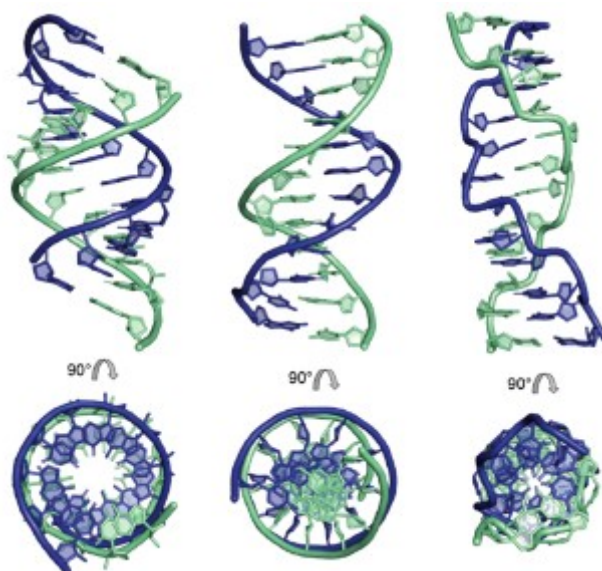


Slika 3. Watson-Crickovi parovi baza¹²

Prostorna komplementarnost dušičnih baza uz mogućnost međusobnog stvaranja vodikovih veza omogućava stvaranje dvostruke uzvojnice. Dvostruka uzvojnica DNA se sastoji od dva antiparalelna polinukleotidna lanca koji se uvijaju jedan oko drugog i zajedničke osi. Unutrašnjost dvostruke uzvojnice ispunjavaju dušične baze čineći je hidrofobnom, dok je okolnom vodenom mediju izložena negativno nabijena fosfatno-šećerna okosnica. Negativni naboj okosnice stabilizira se elektrostatskim interakcijama s proteinima, metalnim ionima i poliaminima. Kako bi dodatno smanjile svoj doticaj s vodom, međusobno paralelne dušične baze ostvaruju interakcije slaganja (engl. *stacking interaction*) u kojima uz π - π interakcije aromatskih sustava značajan doprinos imaju i van der Waalsove-interakcije te dipol-dipol interakcije.^{14,15}

Svaku dvostruku uzvojnici DNA karakterizira postojanje velikog i malog utora koji su posljedica uvijanja antiparalelnih polinukleotidnih lanaca. Budući da dvije glikozidne veze nisu dijametralno suprotna jedna drugoj, svaki par baza posjeduje veću i manju stranu tako određujući veliki i mali utor. Svaki utor sadržava potencijalne donore ili akceptore vodikovih veza odgovorne za specifične interakcije s malim organskim molekulama ili proteinima, dok same dimenzije utora određuju dostupnost istog za interakcije. U strukturi B-DNA veliki utor je širi i dublji u odnosu na mali utor zbog čega postoji više mogućnosti za razlikovanje baznog para.¹³

Molekula DNA pokazuje visoki stupanj fleksibilnosti uslijed moguće rotacije veza okosnice DNA, slobodne rotacije C1'-N-glikozidne veze kao i različitih konformacija koje zauzima furanozni prsten deoksiriboze. Posljedično, DNA molekula može poprimiti veliki broj različitih struktura čije je postojanje potvrđeno rendgenskom strukturnom analizom. Najpoznatiji strukturni oblici DNA molekule prikazani na slici 4.¹¹



Slika 4. Strukture A-DNA, B-DNA i Z-DNA¹⁵

U biološkim uvjetima najzastupljeniji i najstabilniji je B-oblik DNA koja je klasična Watson-Crick-ova uzvojnica s 10,5 baza po okretu pri čemu se bazni parovi nalaze pod kutom od 6° u odnosu na os dvostruke uzvojnice. Veliki utor je u B-DNA širok i dubok, a mali utor je uzak i dubok.

U uvjetima dehidratacije DNA poprima A-oblik u čijoj strukturi fosfati vežu manje vode nego u B-DNA. Radi se o desnoj zavojnici s 11 parova baza po okretu pri čemu su parovi baza nagnuti za 20° u odnosu na os uzvojnice. Uslijed ovih strukturnih promjena veliki utor A-DNA postaje dublji, a mali utor plići. Neki hibridi RNA-DNA i dijelovi RNA s strukturom dvostruke uzvojnice poprimaju oblik A-DNA.

Z-DNA drastično se razlikuje od A- i B-DNA. Formira lijevu zavojnicu uz karakterističnu cik-cak strukturu fosfodieterske okosnice s 12 parova baza po okretu. Takav oblik dvostruke uzvojnice najčešće poprimaju kratki oligonukleotidi koji u strukturi sadrže alternirajuće pirimidine i purine poput poli(dGdC)₂. Stabilna je u uvjetima visoke ionske jakosti s obzirom na to da je potrebna dodatna stabilizacija fosfatnih skupina koje su u ovoj strukturi znatno bliže jedna drugoj nego kod A- i B-DNA. Struktura Z-DNA je izdužena i tanka sa slabo izraženim velikim utorom, dok je mali utor uzak i dubok. U tablici 1 prikazani su neki od strukturnih parametara za sva tri oblika DNA.^{11,13}

Tablica 1. Usporedba strukturnih karakteristika A-, B- i Z-oblika molekule DNA ¹³

	A-DNA	B-DNA	Z-DNA
rotacija uzvojnice	desni	desni	lijevi
promjer uzvojnice	25,5 Å	23,7 Å	18,4 Å
broj baznih parova po navoju	11	10,5	12
visinska razlika baznih parova	2,3 Å	3,4 Å	3,8 Å
nagib baznog para prema osi zavojnice	19°	1°	9°
konformacija šećera	C-3' endo	C-2' endo	C-2' endo za pirimidine, C-3' endo za purine
konformacija glikozidne veze	<i>anti</i>	<i>anti</i>	izmjenično <i>syn</i> i <i>anti</i>
veliki utor	uzak i vrlo dubok	širok i prilično dubok	plošan
mali utor	veoma širok i plitak	uzak i prilično dubok	veoma uzak i dubok

Otkriće strukture DNA te procesa replikacije i transkripcije, koji zahtijevaju razdvajanje lanaca DNA, potaklo je daljnje istraživanje stabilnosti dvostruke uzvojnice u ovisnosti o sastavu baznih parova. Prirodni polinukleotid najčešće korišten u preliminarnim istraživanjima je DNA iz timusa goveda (engl. *calf timus DNA*, ctDNA) koja u svom sastavu sadrži 42% GC i 58% AT parova. Karakterizacija prirodnih polinukleotida otežana je uslijed njihova heterogena sastava i duljine, pa su sintetski polinukleotidi poznatog sastava i ujednačene duljine lanaca idealni u ispitivanju nekovalentnih interakcija malih organskih molekula s nukleinskim kiselinama. Geometrijska obilježja za izabrane sintetske polinukleotide sumirana su u tablici 2.

Tablica 2. Dimezije utora sintetskih nukleinskih kiselina²⁹

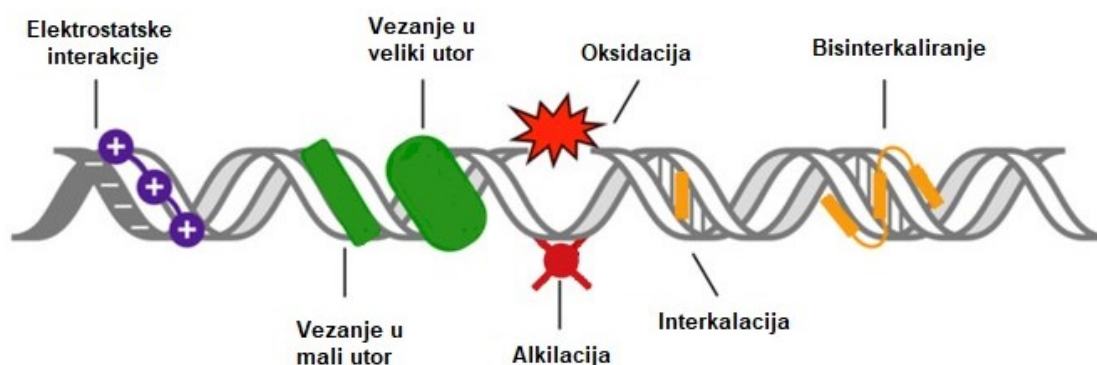
struktura	širina utora / Å		dubina utora / Å	
	veliki utor	mali utor	veliki utor	mali utor
B-DNA (ctDNA)	11,7	5,7	8,5	7,5
poli(dGdC)₂	13,5	9,5	10,0	7,2
poli(dAdT)₂	11,2	6,3	8,5	7,5
poliA-poliU	3,8	10,9	13,5	2,8

Od sinetskih polinukleotida koriste se homopolinukleotidi osnovne strukture poli X-poli Y (A-U, A-T, dA-dT, dG-dC) i alternirajući heteropolinukleotidi osnovne strukture poli XY-poli XY (dAdT-dAdT, dGdC-dG-dC) za koje su poznati parametri poput oblika uzvojnice te širine i dubine utora. Sljedovi bogati parovima baza A-T imaju izražen mali utor, dok je za parove G-C karakterističan izražen veliki utor pri čemu kod malog utora strši egzociklička amino skupina gvanina. Dvolančane molekule RNA zbog steričkih ograničenja tvore uzvojnici sličnu A-obliku DNA.¹⁶

2.2. Interakcija malih organskih molekula s polinukleotidima

Nukleinske kiseline predstavljaju multifunkcionalni receptor za vezanje malih organskih molekula. Obzirom na to da je građa polinukleotida kompleksna, prilikom interakcije u obzir se uzima mnoštvo faktora poput elektrostatskih privlačenja fosfata okosnice s malim molekulama, hidrofobni efekt, Van der Waalsove interakcije, π - π aromatske interakcije te specifična međudjelovanja (vodikove veze, Londonove disperzijske sile) supstituenata i heterocikličkih atoma interkalatora s polinukleotidom.¹⁶

S obzirom na način djelovanja interakcije se dijele na one ireverzibilnog i reverzibilnog tipa (slika 5).



Slika 5. Shematski prikaz ireverzibilnih i reverzibilnih interakcija (malih organskih molekula s polinukleotidima)¹⁹

Kod ireverzibilnih interakcija dolazi do kovalentnog povezivanja molekula s polinukleotidom ili cijepanja polinukleotidnog lanca. U tom procesu sudjeluju dva osnovna tipa spojeva: alkilirajući agensi te sredstva za cijepanje DNA.^{17,18}

Kod ravnotežnih interakcija dolazi do prepoznavanja polinukleotidnog slijeda od strane male organske molekule i formiranja termodinamički najstabilnijeg kompleksa. Ravnotežne nekovalentne interakcije malih molekula s DNA i RNA dijele se u tri skupine:

- I. elektrostatske interakcije polikationskih spojeva s negativno nabijenim fosfatima polinukleotida
- II. vezanje malih molekula u manji utor dvolančanih uzvojnica
- III. interkaliranje između parova baza¹⁶

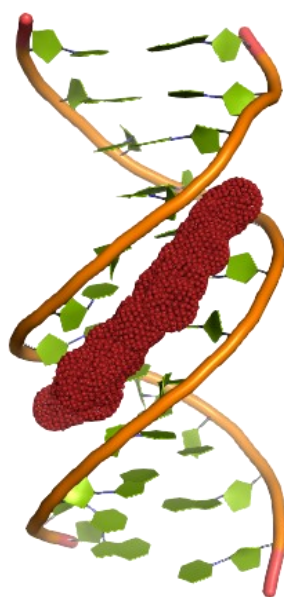
Međutim, mnoge molekule se vežu kao kombinacija više načina vezanja, što ponajprije ovisi o polinukleotidnoj sekvenci i strukturi male molekule koja ulazi u interakciju.²⁰

2.2.1. Elektrostatske interakcije polikationa s negativno nabijenim fosfatima polinukleotida

Pozitivno nabijene molekule poput poliamina vežu se elektrostatski na negativno nabijene fosfatne skupine okosnice polinukleotida.¹⁸ Sama priroda vezanja upućuje na to da ne postoji gotovo nikakva selektivnost prema polinukleotidnom slijedu. U fiziološkim uvjetima elektrostatske interakcije su veoma slabe, a afinitet vezanja direktno ovisi o broju pozitivnih naboja molekule spoja. Međutim, nije poznat točan mehanizam interakcija poliamina s DNA i RNA, pogotovo mjesto i geometrija vezanja te utjecaj vezanih molekula na DNA.²¹

2.2.2. Vezanje u utore nukleinskih kiselina

Drugi način interakcije podrazumijeva smještanje u utore dvostruke uzvojnice na način da se male organske molekule vežu na krajeve parova baza. Spomenuta skupina spojeva posjeduje karakterističnu strukturu polumjeseca (engl. *crescent-shape molecules*) koja odgovara konkavnom obliku utora uzvojnice, a samu fleksibilnost strukture osiguravaju serijski povezani heterociklički prsteni (slika 6). Raspored pozitivnih naboja u molekuli utor-vezujućeg spoja omogućuje dodatne interakcije s negativno nabijenim fosfatima.^{22,23} Vezanje se temelji na principu ključ-brava zbog čega je važno da molekula ostvari povoljne interakcije sa dijelovima dušičnih baza koje čine površinu utora. Selektivnost vezanja ovisi o kombiniranom utjecaju vodikovih veza, van der Waalsovih, hidrofobnih i elektrostatskih interakcija s veznim mjestom polinukleotida.^{16,18}



Slika 6. Kompleks utor-vezujućeg spoja netropsina s oligonukleotidnom ²⁴

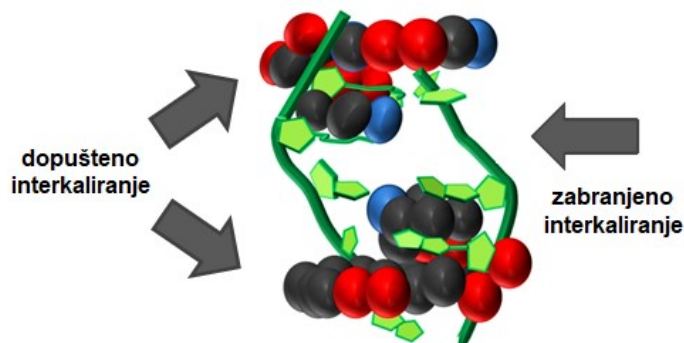
Male organske molekule većinom se vežu u mali utor DNA, dok u slučaju RNA molekule preferiraju veliki utor. Ovakav način vezanja je posljedica dimenzija malog utora RNA koji je puno širi i plići što ne odgovara obliku male organske molekule. Također, veliki utor često je vezno mjesto proteina, čija je α -uzvojnica prevelika za vezanje unutar malog utora.²² Strukturne razlike parova baza dA-dT i dG-dC unutar utora reflektiraju se u selektivnosti prema sekvenci. Većina utor-vezujućih molekula pokazuje izrazitu selektivnost prema dA-dT bogatim sljedovima baza. Par baza dG-dC čini plitak utor, a gvanin sa stršećom amino skupinom sterički dodatno otežava vezanje molekule.¹⁷

2.2.3. Interkaliranje između parova baza

Interkalacija podrazumijeva umetanje planarnih heterocikala u paralelnoj orijentaciji između parova baza polinukleotida. Ova vrsta interakcije omogućena je svojstvom fleksibilnosti dvostruke uzvojnice pri čemu interkalator ne ometa vodikove veze komplementarnih dušičnih baza. Klasični predstavnik etidijev bromid u svojoj strukturi sadrži aromatske prstenove koji interkaliranjem mijenjaju svoja luminiscentna svojstva te se stoga etidijev bromid često koristi kao biljeg nukleinskih kiselina.²⁵

Nastajanje interkalativnog kompleksa popraćeno je drastičnim promjenama u strukturi polinukleotida. Dolazi do razmatanja, deformacije i produljenja uzvojnice (3,4 Å), što rezultira stabilizacijom i ukrućivanjem polinukleotidnog lanca.²³ Mehanizam interkaliranja složen je proces koji uključuje niz događaja. Pozitivno nabijene molekule prvotno ostvaruju elektrostatske interakcije s fosfatima smještajući se u blizinu polinukleotida.¹⁶ Visoka koncentracija spoja pogoduje umetanju planarnog dijela molekule između parova baza, a proces je termodinamički povoljan zbog pozitivnog doprinosa entropije uzrokovanog desolvatacijom liganda.²⁶ Jednom umetnuti ligand stabiliziran je mnoštvom nekovalentnih interakcija poput vodikovih veza, van der Waalsovih i π - π interakcija između aromatskih prstenova interkalatora i susjednih baza te smanjenjem odbojnih sila fosfatnih skupina kao posljedica produljenja polinukleotida.^{22,23} U usporedbi s utor-vezujućim spojevima interkalatori su manje selektivni i više preferiraju dG-dC sekvence.²⁶

Važna karakteristika ove vrste interakcija je *pravilo isključenja susjeda* (engl. *neighbour exclusion principle*) koji govori da dolazi do umetanja ograničenog broja interkalatora, a interkaliranje između prvog susjednog para baza strogo je zabranjeno (slika 7).



Slika 7. Princip isključenja susjeda²⁷

Istovremeno vezanje spoja između susjednih parova baza onemogućeno je iz razloga što dolazi do velikog narušavanja lokalne strukture DNA.^{16,22}

Bisinterkalatori su spojevi koji u svojoj strukturi sadrže dvije aromatske domene premoštene lancem različitih duljina. Planarni prstenovi interkaliraju između parova baza nukleinske kiseline ukoliko su zadovoljeni sterički i elektrostatski uvjeti, dok prenosnica ostaje izložena okolnom mediju. Kako bi se poštivalo pravilo isključenja susjeda, prenosnica mora biti odgovarajuće duljine.^{22,28}

2.3. Metode ispitivanja nekovalentnih interakcija malih molekula s DNA i RNA

Najčešće primjenjivane eksperimentalne metode za ispitivanje nekovalentnih kompleksa malih organskih molekula s DNA ili RNA molekulama mogu se podijeliti u nekoliko osnovnih skupina:

- a. eksperimenti koji prate promjene strukture i stabilnosti polinukleotida uzrokovane vezanjem ispitivanog spoja:
 - promjena viskoziteta otopine DNA/RNA
 - promjena sedimentacijskog koeficijenta ili elektroforetske pokretljivosti cirkularne DNA
 - pomaci u niže magnetsko polje signala fosfatnog dijela polinukleotida u ³¹P NMR spektru polinukleotida
 - promjena temperature mekšanja dvostruke uzvojnice nakon vezanja ispitivanog spoja

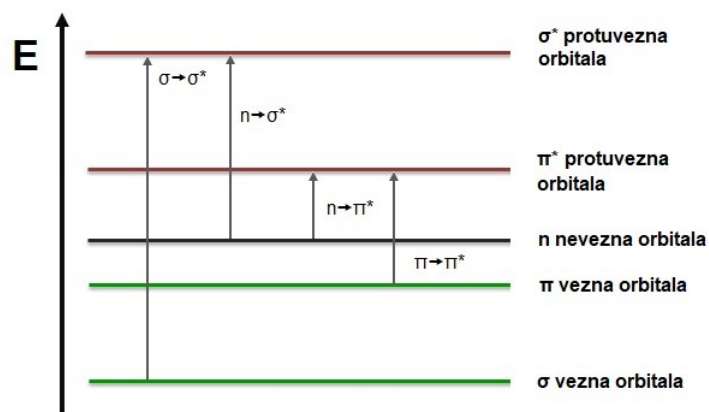
- b. metode temeljene na promjeni spektroskopskih svojstava ispitivanog spoja: UV/VIS, fluorescencijska i spektroskopija ^1H NMR
- c. metode koje upućuju na pravilnost orijentacije molekula ispitivanog spoja te dinamiku i homogenost načina vezanja na polinukleotid: spektroskopija CD i LD, polarizacija fluorescencije i anizotropija fluorescencije.¹⁶

2.3.1. UV/Vis spektroskopija

Ultraljubičasta i vidljiva spektroskopija (engl. *ultraviolet-visible spectroscopy*, UV/Vis) jedna je od najčešće korištenih metoda za identifikaciju i karakterizaciju organskih i anorganskih specija. Prednosti ove metode su široka primjenjivost, velika osjetljivost, visoka selektivnost, točnost i jednostavnost.³⁰

Ultraljubičasto i vidljivo zračenje odgovara dijelu elektromagnetskog spektra s valnim duljinama u rasponu vrijednosti od 100 do 400 nm i od 400 do 800 nm. Pobuda molekule elektromagnetskim zračenjem UV/Vis spektralnog područja uzrokuje apsorpciju kvanta energije $h\nu$. Apsorpcijom nastaje pobuđena molekula čiji su elektroni vanjske ljuske prešli u jedno od kratkotrajnih pobuđenih elektronskih stanja (10^{-9} do 10^{-8} s). Zatim slijedi relaksacija molekule, odnosno povratak elektrona u osnovno stanje uz oslobađanje topline.³¹

Elektronski prijelazi objašnjavaju se molekularno orbitalnom teorijom prema kojoj molekulske orbitale opisuju distribuciju elektrona u molekuli. Slika 8 prikazuje četiri moguća prijelaza $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \pi^*$, $\sigma \rightarrow \sigma^*$ i $n \rightarrow \sigma^*$, a odgovarajuća energija elektronskog prijelaza prati niz: $\sigma \rightarrow \sigma^* > n \rightarrow \sigma^* > \pi \rightarrow \pi^* > n \rightarrow \pi^*$.³⁰ Energijska razlika elektronskih stanja određuje potrebnu valnu duljinu fotona za ekscitaciju pojedinih elektrona. Prijelazi $\sigma \rightarrow \sigma^*$ i $n \rightarrow \sigma^*$ izuzetno su rijetki iz razloga jer zahtijevaju pobudu vakuumskim UV zračenjem ($\lambda < 200$ nm). Elektroni uključeni u formiranje nezasićenih veza nisu jako vezani pa ih je moguće pobuditi zračenjem u valnom području $\lambda = 200\text{--}800$ nm. Stoga, većina organskih molekula sadrži apsorpcijske vrpce koje su posljedica prijelaza $\pi \rightarrow \pi^*$ i $n \rightarrow \pi^*$.³²



Slika 8. Shematski prikaz molekularnih orbitala i elektronskih prijelaza uslijed pobude UV/Vis zračenjem

Kromofori su dijelovi molekule zaslužni za apsorpciju UV/Vis zračenja i uobičajeno sadrže nezasićene funkcionalne skupine poput etilenske, karbonilne, amidne, nitro, tiocianatne skupine te aromatske i konjugirane sustave.³¹ Slični UV/Vis spektri različitih organskih spojeva posljedica su prisutnosti istih kromofora.³³ Valna duljina apsorpcije karakteristična je za kromofor. Međutim, prisutnost konjugiranih sustava i auksokroma utječe na položaj i intenzitet maksimuma apsorpcije. Rezultat je povećanje (hiperkromni efekt), odnosno smanjenje (hipokromni efekt) intenziteta maksimuma apsorpcije. Kao i pomak apsorpcijskog maksimuma prema većim (batokromni efekt), odnosno manjim (hipsokromni efekt) vrijednostima valnih duljina. Najčešći auksokromi su polarne skupine poput OH, NH₂, F, Cl, Br, COCH₃, COOH, C≡N.³⁰

Molekulska apsorpcijska spektroskopija mjeri količinu apsorbiranog zračenja kao funkciju valne duljine, što omogućuje kvalitativnu i kvantitativnu analizu uzorka. Količina apsorbiranog zračenja definira se kao apsorbancija, a izražava se kao logaritam omjera intenziteta upadnog i propuštenog zračenja:

$$A = \log \left(\frac{I_0}{I} \right)$$

Količina apsorbiranog zračenja izravno je proporcionalna koncentraciji tvari u otopini, što je opisano Lambert-Beer-ovim zakonom:

$$A = \varepsilon b c$$

gdje A predstavlja apsorbanciju uzorka pri definiranoj valnoj duljini, ϵ molarni ekstinkcijski koeficijent izražen u $\text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$, b duljinu optičkog puta izraženu u cm i c molarnu koncentracija ispitivanog spoja izraženu u mol dm^{-3} . Molarni ekstinkcijski koeficijent predstavlja mjeru efikasnosti elektronskog prijelaza. Karakterističan je za svaku kemijsku vrstu i u slučaju organskih spojeva poprima vrijednosti do $10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$. U kvantitativnoj analizi poželjne su što veće vrijednosti kako bi se postigla željena osjetljivost metode. Lambert-Beerov zakon podliježe svojstvu aditivnosti, što znači ukoliko se u sustavu nalazi više specija koje apsorbiraju zračenje, ukupna apsorbancija jednaka je sumi pojedinačnih apsorbancija za svaku speciju.³²

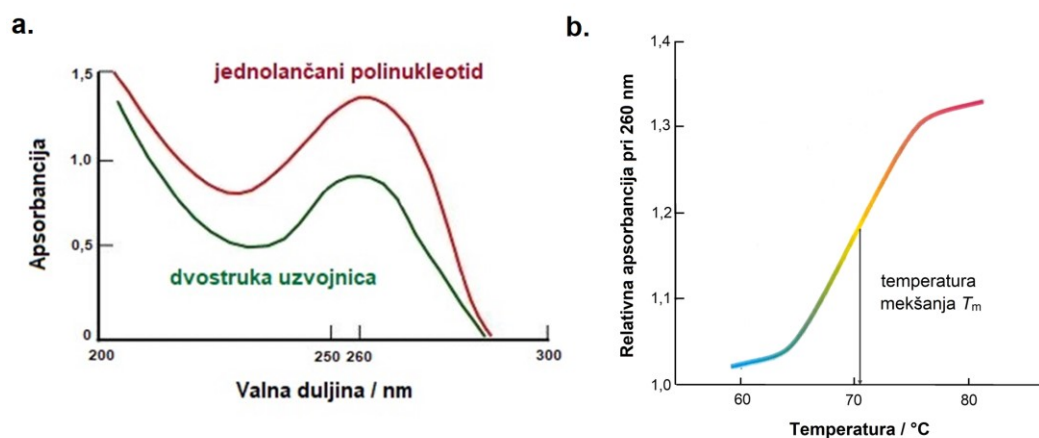
U principu Lambert-Beerov zakon primjenjiv je na razrijeđene otopine ($c < 2 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$). Pri visokim koncentracijama ostvaruju se interakcije otapalo-analit te analit-analit čime se mijenja naboj ispitivanog spoja. Posljedično, mijenja se apsorbivnost analita i dolazi do odstupanja od linearnosti Lambert-Beerovog zakona. Do odstupanja može doći i uslijed asocijacije, disocijacije ili reakcije ispitivanih molekula s otapalom pri čemu nastaju specije drugačijih apsorpcijskih karakteristika.³²

2.3.1.1. Temperaturno mekšanje

Temperaturno mekšanje (engl. *UV Melting Studies*) je eksperiment korišten u svrhu određivanja stabilnosti sekundarne strukture molekula DNA i RNA.³⁴ Dvolančani polinukleotidi su termički nestabilni, što znači da povišenjem temperature medija dolazi do denaturacije molekule. Denaturacija je proces narušavanja uređene strukture polinukleotida pri čemu dolazi do pucanja vodikovih veza između dušičnih baza, razdvajanja lanca i oslobađanja dviju jednolančanih polinukleotidnih molekula. Međusobni omjer A-T(U) i G-C parova baza određuje termičku stabilnost DNA i RNA molekule. Ovo svojstvo direktna je posljedica broja vodikovih veza koje ostvaruju komplementarni parovi baza. Dakle, molekule koje sadrže veći udio A-T(U) parova denaturiraju se pri nižim temperaturama od molekula bogatih G-C parovima.^{11,16}

Pogodna metoda za praćenje temperature mekšanja DNA jest UV/Vis spektrofotometrija. Dušične baze u svom sastavu sadrže aromatske sustave, što za posljedicu ima apsorpciju zračenja u UV/Vis spektralnom području.³⁴ Prilikom denaturacije molekule DNA dolazi do konformacijske promjene dvostruke uzvojnice, odnosno dušične baze se oslobađaju iz gusto zbijene tercijarne strukture i postaju razmjerno pokretne. Posljedično dolazi do porasta

apsorbancije za oko 40 % pri svim valnim duljinama. Učinak denaturacije na apsorpcijski spektar poznat je kao hiperkromni efekt (slika 9.a).^{35,36}



Slika 9. a. Hiperkromni efekt prilikom denaturacije polinukleotida³⁷ b. Denaturacijska krivulja polinukleotida³⁵

Do hiperkromnog efekta dolazi u uskom temperaturnom području što ukazuje na kooperativnost procesa, odnosno razdvajanje zavojnice na jednom mjestu destabilizira ostatak zavojnice i potiče daljnju denaturaciju.³⁹

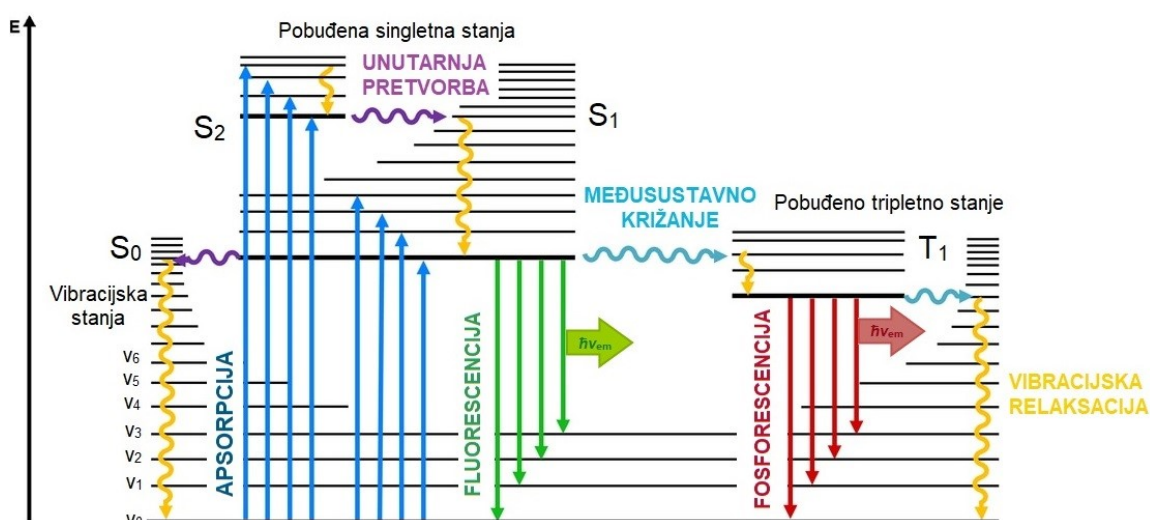
Krivulja taljenja DNA predstavlja prikaz apsorbancije DNA molekule pri određenoj valnoj duljini u ovisnosti o temperaturi medija (slika 9.b). Krivulja je sigmoidalnog oblika, što je u slaganju s tvrdnjom o kooperativnosti procesa. Temperatura *mekšanja* T_m , koja se definira kao temperatura pri kojoj je 50% dvolančane uzvojnice prešlo u jednolančani oblik, odgovara točki infleksije denaturacijske krivulje.^{34,35} Temperatura mekšanja karakteristična je za svaki polinukleotid, a na vrijednost osim sastava baza utječu ionska jakost i pH-vrijednost otopine te prisutnost malih organskih molekula koje se vežu na DNA molekulu. Ekstremne promjene pH-vrijednosti otopine uzrokuju ionizaciju funkcionalnih skupina dušičnih baza što za posljedicu ima nemogućnost ostvarivanja vodikovih veza, odnosno dolazi do destabilizacije i denaturacije DNA molekule. Stabilizacija zavojnice postiže se visokom ionskom jakošću. Dodatkom soli visoke koncentracije povećava se dielektrična konstanta medija pri čemu se zasjenjuju negativni naboji fosfatnih skupina, koji inače destabiliziraju zavojnicu.^{36,38} Ligand utječe na termičku stabilnost dvolančanih polinukleotida ostvarujući vodikove veze s funkcionalnim skupinama dušičnih baza. Međutim, potrebna je visoka koncentracija prisutnog liganda kako bi mogao konkurirati bazama komplementarnog lanca.

Razlika T_m vrijednosti otopine slobodnog polinukleotida i otopine polinukleotida u kompleksu s malom organskom molekulom važan je faktor u karakterizaciji interakcija malih molekula i polinukleotida. Veličina promjene ovisi o afinitetu i načinu vezanja liganda za polinukleotid. Vezanje malih organskih molekula uzorkuje termičku stabilizaciju (pozitivna vrijednost ΔT_m) ili destabilizaciju (negativna vrijednost ΔT_m) dvolančanog polinukleotida. Interkalativni način vezanja stabilizira dvostruku uzvojnica, dok utor-vežući spojevi mogu dati pozitivne ili negativne ΔT_m vrijednosti. U slučaju kada ispitivani spoj s polinukleotidom tvori više različitih tipova kompleksa javlja se karakteristična višefazna denaturacijska krivulja.¹⁶

2.3.2. Fluorescencijska spektroskopija

Fluorescencijska spektroskopija je analitička metoda koja promatra pojavu fluorescencije analita, a predstavlja važan istraživački alat u biokemijskim, medicinskim i kemijskim istraživanjima zbog visoke osjetljivosti i selektivnosti.⁴⁰

Temelji se na pobudi molekule apsorpcijom UV/vis zračenja u više elektronsko stanje, nakon čega slijedi relaksacija molekule uz povratak u osnovno elektronsko stanje. Dijagram Jablonskog prikazan na slici 10 najbolje vizualizira procese koji se odvijaju u molekulama u pobuđenom stanju.



Slika 10. Dijagram molekularnih enerzijskih razina i prijelaza (Jablonski dijagram)

Molekula iz osnovnog elektronskog singletnog stanja S_0 apsorpcijom zračenja odgovarajuće valne duljine prelazi u jedno od brojnih vibracijskih stanja pobuđenog singletnog stanja S_1 ili S_2 .

Molekula u sudarima s drugim molekulama ili čvrstom površinom gubi vibracijsku energiju dok ne dosegne najniže vibracijsko stanje unutar pobuđenog elektronskog stanja. Iz tog stanja prelazi u niže elektronsko stanje istog multipliciteta unutarnjom pretvorbom ili različitog multipliciteta međusustavnim križanjem. Radijativni oblik relaksacije podrazumijeva fluorescenciju, koja se definira kao deaktivacijski proces u kojem prijelazom između stanja istog multipliciteta molekula dolazi do emisije zračenja. Također, ukoliko se molekula nađe u tripletnom stanju povratak u osnovno stanje zahtjeva emisiju fosforescencije. Prijelaz između stanja različitih multipliciteta strogo je zabranjen, pa je fluorescencija (10^{-10} do 10^{-5} s) znatno brža u odnosu na fosforescenciju (10^{-4} do 10 s). Međutim, struktura većine molekula pogoduje vibracijskoj relaksaciji i unutarnjoj pretvorbi, tijekom kojih pobuđene molekule pri povratku u osnovno stanje gube energiju bez emisije zračenja. Učestalost unutarnje pretvorbe razlog je pojavi fluorescencije pri samo jednoj valnoj duljini neovisno o valnoj duljini pobude. Ovaj efekt poznat kao Stokesov pomak odnosi se na pojavu emisijske vrpce pri većoj valnoj duljini u odnosu na apsorpcijsku vrpcu.^{41,42}

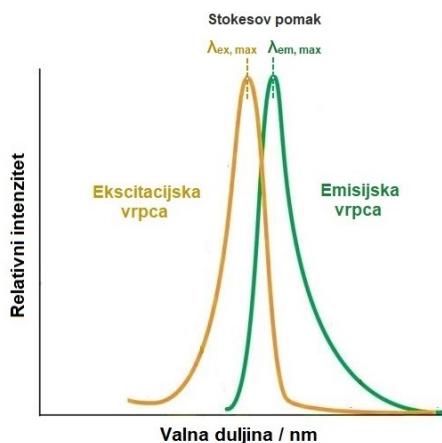
U teoriji sve molekule koje apsorbiraju elektromagnetsko zračenje mogu fluorescirati. Međutim, struktura većine molekula pogoduje bržoj neradijativnoj relaksaciji. Fluorescenciji osobito pogoduje rigidnost strukture čime se smanjuje brzina neradijativne relaksacije i osigurava dovoljno vremena za relaksaciju fluorescencijom. Najčešće, molekule koje u svojoj strukturi sadrže aromatski prsten pokazuju svojstvo fluorescencije, pri čemu kvantni prinos raste s brojem prstenova i stupnjem kondenzacije.⁴³

Uz definiranu valnu duljinu pobude i emisije intenzitet fluorescencije F definira se sljedećom jednačinom:

$$F = K I_0 c l \varepsilon \phi$$

gdje K predstavlja konstantu instrumenta, I_0 intenzitet pobudnog zračenja, c molarnu koncentraciju tvari u otopini izraženu u mol dm^{-3} , l duljinu puta zračenja izraženu u cm, ε molarni ekstinkcijski koeficijent izražen u $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{cm}^{-1}$ i ϕ kvantni prinos.^{40,42}

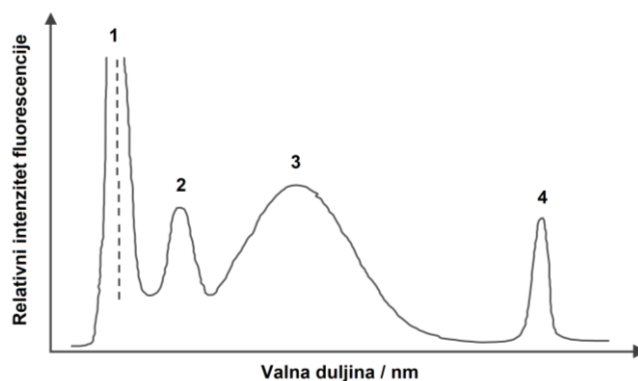
Fluorescencijska spektroskopija daje više informacija u odnosu na UV/Vis spektroskopiju jer omogućava snimanje emisijskog i ekscitacijskog spektra (slika 11).



Slika 11. Shematski prikaz ekscitacijskog i emisijskog spektra⁴⁴

Ekscitacijski spektar prikazuje ovisnost intenziteta fluorescencije o valnoj duljini pobude, a snima se pri definiranoj valnoj duljini emisije. Dok emisijski spektar pokazuje ovisnost fluorescencije o valnoj duljini emisije pri definiranoj valnoj duljini pobude. Pobudni i emisijski spektar pokazuju zrcalnu simetriju i karakteristični su za molekule koje fluoresciraju, što čini fluorescencijsku spektroskopiju selektivnom metodom.⁴³

U sirovom emisijskom spektru uzorka prikazanom na slici 12 pojavljuju se dodatni signali koji ne potječu od fluorescencijske emisije.



Slika 12. Fluorescencijski spektar uzroka: (1) Rayleighovo raspršenje, (2) Ramanovo raspršenje otapala, (3) fluorescencija uzorka, (4) raspršenje drugog reda valne duljine pobude

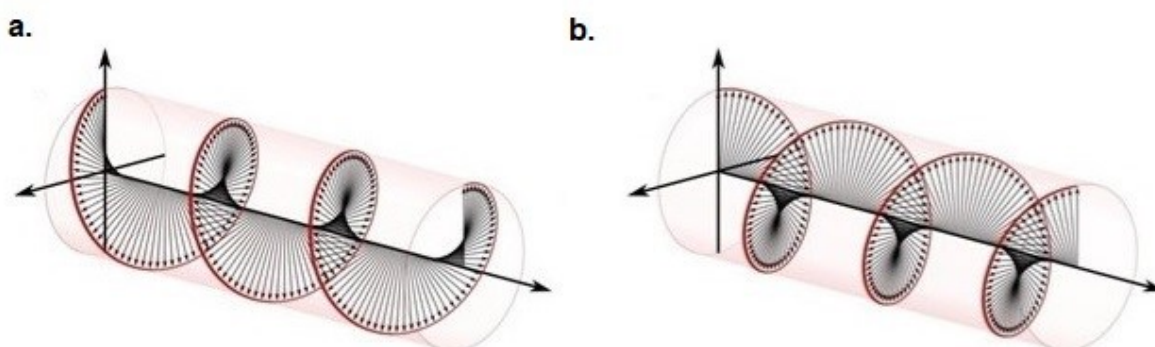
Najčešća je pojava signala uslijed raspršenja zračenja na molekulama otapala. Raspršenje se može pojaviti pri valnoj duljini pobude i tada govorimo o Rayleighovom raspršenju (1). Dok Ramanovo raspršenje podrazumijeva raspršenje zračenja pri većoj ili manjoj valnoj duljini od pobudnog zračenja (2). Razlikovanje signala postiže se promjenom valne duljine pobudnog

zračenja pri čemu signal koji odgovara emisiji uzorka ostaje na istom mjestu, dok signal raspršenog zračenja varira ovisno o valnoj duljini. Raspršenje drugog reda javlja se na valnoj duljini dvostruko većoj od valne duljine pobude (4). Ono se uklanja iz spektra upotrebom filtera koji ne propuštaju raspršeno zračenje koje je posljedica emisije. Osim toga pojavljuju se dodatni signali koji potječu od nečistoća kao posljedica kontaminacija samog otapala ili zagađenja kiveta. Ovaj problem se rješava oduzimanjem spektra otapala od spektra uzorka.⁴⁵

2.3.3. Spektroskopija cirkularnog dikrozima (CD)

Cirkularni dikrozizam je spektroskopska metoda koja pruža informacije o optički aktivnim spojevima.¹⁸ Metoda se temelji na diferencijalnoj apsorpciji lijevo i desno kružno polarizirane svjetlosti u UV/Vis spektralnom području što uzrokuje ekscitaciju molekule u jedno ili više pobuđenih stanja.⁴⁶

Elektromagnetsko zračenje definira se kao sinusoidni val sastavljen od električnog i magnetskog polja čiji vektori osciliraju u međusobno okomitim ravninama. Za većinu izvora zračenja vrijedi da se oscilirajući vektori nalaze u fazi i osciliraju u svim smjerovima okomito na smjer širenja zračenja. Suprotno tome, polarizirano zračenje karakterizira pojava nesimetrične oscilacije električnog i magnetnog polja. Ukoliko vektor električnog polja oscilira u jednoj ravnini radi se o linearno polariziranoj svjetlosti. Za cirkularno polariziranu svjetlost vrijedi da vektor električnog i magnetskog polja rotira oko osi duž koje se širi uz konstantni intenzitet.⁴⁷ Ovisno o smjeru rotacije oscilirajućeg električnog polja, razlikujemo lijevu i desnu polariziranu svjetlost (slika 13).



Slika 13. A. desno i b. lijevo cirkularno polarizirano svjetlo⁴⁹

Ako električni vektor rotira u smjeru kazaljke na satu riječ je o desno cirkularno polariziranom zračenju, dok se kod rotacije u smjeru obrnutom od kazaljke na satu radi o lijevo cirkularno polariziranom zračenju. Ovakva vrsta elektromagnetskog zračenja posjeduje svojstvo kiralnosti, pa će i kiralne molekule različito apsorbirati lijevo i desno cirkularno polariziranu svjetlost.⁴⁸

U CD eksperimentu jednake količine lijevo i desno cirkularno polariziranog svjetla definirane valne duljine naizmjenično obasjavaju kiralni uzorak. Cirkularno polarizirano zračenje međudjeluje s električnim i magnetskim prijelaznim momentom kiralnog medija što rezultira apsorpcijom zračenja. Prolaskom cirkularno polariziranog svjetla kroz kiralni medij, brzina i apsorpcijski koeficijent se razlikuju za lijevu i desnu komponentu zbog čega dolazi do pomaka u fazi i razlike u intenzitetima vektora električnog polja čija suma daje resultantni rotirajući vektor. Resultantni vektor oscilira iscrtavajući elipsu, a okarakteriziran je kutom eliptičnosti ψ :

$$\psi = \frac{\pi}{\lambda} (\epsilon_M - \epsilon_P)$$

gdje su ϵ_M i ϵ_P apsorpcijski koeficijenti za lijevu i desnu polariziranu komponentu, a izražava se kao radijan po jedinici duljine puta. Upravo iz tog razloga CD spektar se prikazuje kao funkcija molarne eliptičnosti [mdeg] u ovisnosti o valnoj duljini.

Optički aktivna molekula u interakciji sa zračenjem apsorbira različitu količinu lijevo i desno cirkularno polariziranog zračenja:

$$\Delta A = A_L - A_D$$

Količina diferencijalno apsorbiranog lijevog i desnog cirkularno polariziranog zračenja kvantificira se primjermom Beer-Lambertovog zakona:

$$\Delta A = (\epsilon_L - \epsilon_D) c l = \Delta \epsilon c l$$

gdje su ϵ_L i ϵ_D molarni apsorpcijski koeficijenti za lijevu, odnosno desnu cirkularno polariziranu svjetlost, c je molarna koncentracija, a l je duljina optičkog puta.⁴⁸

CD spektroskopija pronalazi primjenu u istraživanju strukture nukleinskih kiselina, kao i njihove interakcije s malim organskim molekulama. Analiza CD spektra provodi se obzirom na dva

spektralna područja. Prvo područje obuhvaća valne duljine u rasponu $\lambda = 180\text{-}300\text{ nm}$ u kojemu UV/Vis zračenje apsorbiraju DNA i RNA molekule.⁴⁶ Iako su dušične baze same po sebi akiralne molekule, poprimaju svojstvo kiralnosti vezanjem za fosfatno-šećernu okosnicu koja sadrži kiralne centre. Također, DNA posjeduje i kiralnu helikoidalnu os.¹⁸ Svaka spektralna promjena pripisuje se odgovarajućim promjenama u sekundarnoj strukturi polinukleotida uslijed formiranja kompleksa s ligandom. Međutim, ukoliko ligand apsorbira u istom području spektralne promjene nije moguće jednoznačno interpretirati.⁵⁰

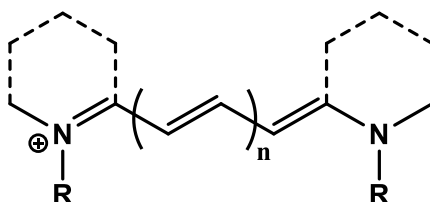
Valno područje iznad 300 nm, u kojemu DNA i RNA molekule ne apsorbiraju zračenje, prati isključivo spektralne promjene spektra liganda u kompleksu s polinukleotidom.⁵⁰ Kiralne molekule posjeduju vlastiti CD signal u području apsorpcijske vrpce analita. Međutim, male organske molekule koje se vežu na nukleinske kiseline u pravilu su akiralne ili se nalaze u obliku racemične smjese zbog čega su optički neaktivne. Akiralne molekule u interakciji s DNA uzrokuju pojavu induciranog CD signala (engl. *induced circular dichroism*, ICD) pri valnoj duljini maksimuma apsorpcije kromofora male molekule. Signal je posljedica sprege električnih prijelaznih momenata liganda i DNA koji daju resultantni prijelazni moment paralelan s vektorom električnog polja cirkularno polarizirane svjetlosti. Također, signal može biti i posljedica promjene u strukturi i simetriji male molekule nakon vezanja na DNA.⁵¹

Temeljem jačine ICD signala određuje se tip interakcija male molekule i polinukleotida. Za elektrostatske interakcije karakteristična je odsutnost signala zbog heterogene orijentiranosti molekule liganda u odnosu na kiralnu os polinukleotida. Slabi negativni ili pozitivni ICD signali upućuju na interkaliranje ($\Delta\varepsilon < 10\text{ mol}^{-1}\text{ dm}^3\text{ cm}^{-1}$) pri čemu intenzitet i predznak signala ovise o orijentaciji i položaju liganda. Slab signal je posljedica interakcije prijelaznog momenta male molekule s prijelaznim momentima dušičnih baza koje okružuju interkalator.⁵¹ Utor-vežući spojevi pokazuju ICD signale i do dva puta većeg intenziteta nego interkalatori. Jak pozitivni signal očekuje se u slučaju prijelaznog momenta liganda orijentiranog duž utora pod kutem od 45° u odnosu na ravninu dušičnih baza. Bisignatni signali karakteristični su za vezanje dimera spoja unutar utora, a posljedica su sprege prijelaznih momenata susjednih kromofora.⁵²

2.4. Cijaninske boje

Cijaninske boje pojavile su se još prije 150 godina, a 1856. godine objavljena je prva sinteza plave krutine po čemu su zapravo i dobile ime.⁵³ Radi se o spojevima koji pronalaze široku primjenu u brojim industrijskim granama. Prvotno su se koristile u razvoju fotografskih filmova, a zatim kao luminiscentni biljezi biomakromolekula i osjetljive probe za praćenje svojstava u okolišu poput viskoznosti ili polarnosti.⁵⁴ U sintetskim laboratorijima pripravljene su cijaninske boje koje apsorbiraju u području valnih duljina od 400 do 1000 nm,³ topive su u vodi i širokom spektru organskih otapala, te posjeduju reaktivne skupine koje omogućuju povezivanje s drugim molekulama.⁵⁶

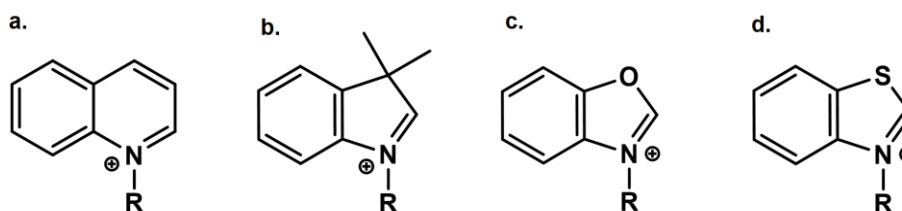
Cijaninske boje prikazuju se općenitom strukturnom formulom kao na slici 14.



Slika 14. Općenita strukturna formula cijaninskih boja

Radi se o kationskim molekulama u kojima su dva terminalna dušikova atoma povezana polimetinskim lancem. S obzirom da konjugacijski sustav sadrži neparan broj atoma ugljika pozitivan naboj je delokaliziran rezonancijom preko oba dušikova atoma. Ovisno o broju ugljikovih atoma u polimetinskom lancu razlikujemo cijanine (1), dikarbocijanine (5) i trikarbocijanine (7).⁴

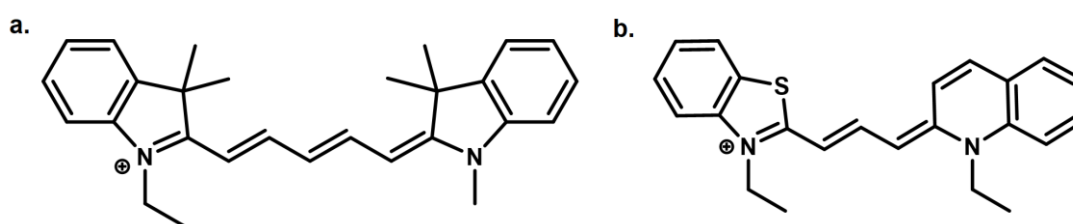
Uobičajeno, dušikovi atomi su dio heterocikličke aromatske skupine koje su nerijetko i dodatno alkilirane. Najčešće heterocikličke podjedinice cijaninskih boja (kinolin, indol, benzooksazol, benzotiazol) prikazane su na slici 15.



Slika 15. Strukturne formule a. kinolina, b. indola c. benzooksazola i d. benzotiazola

Supstituenti postavljeni na različite položaje aromatskog sustava koriste se za poboljšanje svojstava cijaninskih boja poput topljivosti u vodi, sklonosti agregaciji, interakcija s DNA kao i promjena elektronskih svojstava kromofora.⁴

Daljnja podjela cijaninskih boja odnosi se na simetriju kromofora. Ukoliko se molekula sastoji od identičnih heterocikala povezanih na istom položaju u sustavu, pripada u skupinu simetričnih cijaninskih boja. Za razliku od simetričnih, asimetrične cijaninske boje sastoje se od dva različita heterocikla ili dva identična heterocikla, ali povezana na različitim položajima u sustavu (slika 16).⁴



Slika 16. Strukturna formula a. simetrične i b. nesimetrične cijaninske boje

2.4.1. Interakcija cijaninskih boja s DNA i RNA molekulama

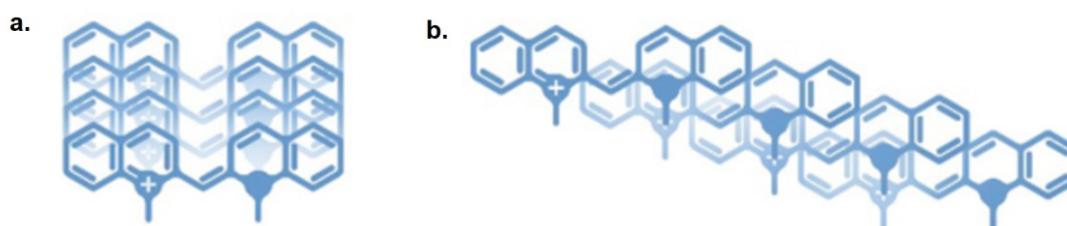
Cijaninske boje, kao male organske molekule, međudjeluju s nukleinskim kiselinama na više različitih načina. Promjena duljine polimetinskog lanca, supstituenata ili nukleotidnog sastava nukleinske kiseline reflektira se u različitom načinu vezanja cijaninskih boja.

U fiziološkim uvjetima, elektrostatske interakcije kationa s negativno nabijenom fosfodieterskom okosnicom su veoma slabe, dok je vezanje u veliki utor rijetko. Najčešći tip vezanja cijaninskih boja upravo je interkaliranje ili vezanje u mali utor dvostruke uzvojnice.⁴ Planarni heterociklički sustavi pokazuju tendenciju (bis)interkaliranja, dok fleksibilni polimetinski lanac omogućuje savijanje molekule u oblik pogodan za vezanje u utore. Budući da interkaliranje zahtjeva razmicanje dva susjedna para baza u svrhu stvaranja veznog džepa za ligand, preferirano je vezanje u mali utor koje uzrokuje puno manju deformaciju strukture DNA.^{57,58}

2.4.2. Spektroskopska svojstva cijaninskih boja

Cijaninske boje apsorbiraju svjetlost u ultraljubičastom, vidljivom i bliskom infracrvenom području elektromagnetskog spektra. Apsorpciju omogućavaju π -elektroni delokalizirani duž polimetinskog mosta, a ekstincijski koeficijenti dosežu vrijednosti do $10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$. Proširenje polimetinskog mosta za svaku podjedinicu uzrokuje batokromni pomak za 100 nm.⁵⁹ Cijaninske boje, kao slobodni ligandi, ne pokazuju emisiju fluorescencije. Razlog toj pojavi je brza neradijativna relaksacija iz pobuđenog stanja kroz torzijsko gibanje polimetinskog mosta. Suprotno tome, u kompleksu s polinukleotidom dolazi do naglog pojačanja emisijskog signala zbog ograničenja konformacijske mobilnosti. Onemogućavanjem rotacije jednostruke veze polimetinskog mosta osigurava se dovoljno vremena za relaksaciju molekule fluorescencijom.⁶⁰ Pri nižim temperaturama, visokoj ionskoj jakosti otopine i velikim koncentracijama, cijaninske boje pokazuju sklonost agregaciji što proizlazi iz polarizabilnosti i hidrofobnosti molekule. Agregacija dovodi do promjene u fizikalno-kemijskim svojstvima, poput viskoznosti, gustoće i površinske napetosti medija, u usporedbi s monomernom formom. Također, fenomen agregacije uzorkuje niz spektralnih promjena poput pojave dodatnih vrpca uz pomak valnih duljina apsorpcije i emisije.⁶¹

Cijaninske boje ovisno o načinu slaganja u prostoru tvore J-tip ili H-tip agregata (slika 17). Za nesupstituirane cijaninske boje dominantno je stvaranje agregata H-tipa zbog maksimalnog broja ostvarenih van der Waalsovih interakcija. Supstituirane cijaninske boje preferiraju stvaranje J-tipa agregata gdje molekule samoasociraju tvoreći lančaste strukture uslijed steričkih ili elektrostatskih smetnji uzrokovanih supstituentima.⁴



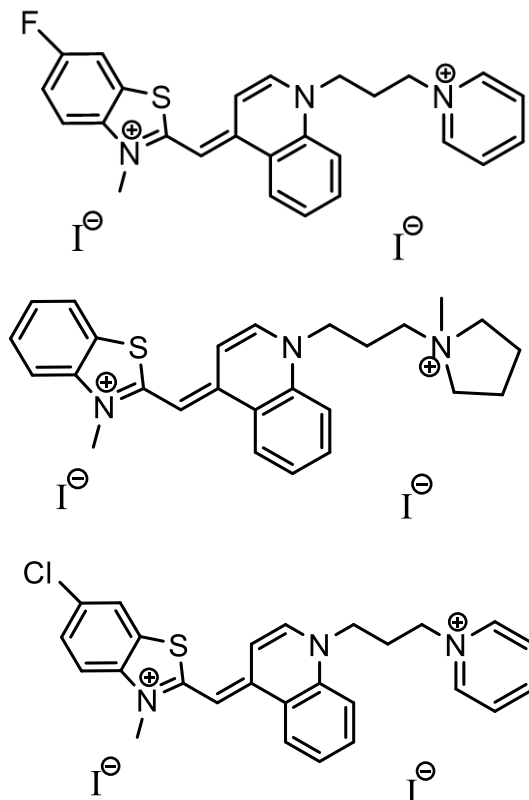
Slika 17. Prikaz a. H-tip i b. J-tip agregata cijaninskih boja⁶²

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

U okviru ovog rada korištene su tri cijaninske boje: 6-fluoro-3-metil-2-[[[(4E)-1-[3-(piridin-1-ijev-1-il)propil]-1,4-dihidrokinolin-4-iliden)metil]-1,3-benzotiazol-3-ijev diiodid (**AK-1**), 3-metil-2-[[[(4E)-1-[3-(1-metilpirolidin-1-ijev-1-il)propil]-1,4-dihidrokinolin-4-iliden)metil]-1,3-benzotiazol-3-ijev diiodid (**AK-2**), 6-kloro-3-metil-2-[[[(4E)-1-[3-(piridin-1-ijev-1-il)propil]-1,4-dihidrokinolin-4-iliden)metil]-1,3-benzotiazol-3-ijev diiodid (**AK-3**). Spojevi AK serije, čije su strukture prikazane na slici 18, praškaste su krutine narančasto-crvene boje. Spojevi su ujedno i strukturni analozi komercijalno dostupne boje TO (engl. *thiazole orange*). Spojevi su sintetizirani u grupi dr. sc. A. Kurutosa (*Institute of Organic Chemistry with Centre of Phytochemistry, Bulgarian Academy of Sciences, Sofija, Bugarska*).



Slika 18. Strukturne formule molekula **AK-1**, **AK-2** i **AK-3**

Ishodne otopine spojeva su pripravljene otapanjem male količine spojeva u redestiliranoj vodi prema tablici 3 uz primjenu ultrazvučne kupelji.

Tablica 3. Priprava ishodnih otopina za spektrofotometrijsku karakterizaciju spojeva AK serije u vodenom mediju

	<i>m</i> / mg	<i>V</i> / μL	<i>M</i> / g mol^{-1}	<i>c</i> / mol dm^{-3}
AK-1	1,57	959,49	683,37	$2,39 \times 10^{-3}$
AK-2	1,21	1060,43	671,42	$1,70 \times 10^{-3}$
AK-3	1,50	1128,68	699,82	$1,90 \times 10^{-3}$

S obzirom da su ishodne otopine pokazale sklonost agregaciji pripravljene su radne otopine za eksperimente fluorimetrijske titracije razrjeđivanjem s redestiliranom vodom u omjeru 1:10 te za ostale eksperimente otopine konačne koncentracije $c = 8 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$. Sve otopine su čuvane pri sobnoj temperaturi.

Kao medij za provedbu eksperimenta pripremljen je pufer natrijeva kakodilata ($I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 7,00$) miješanjem odgovarajućeg volumena vodene otopine natrijevog kakodilata ($c = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$) i klorovodične kiseline ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$), razrjeđivanjem do konačnog volumena i podešavanjem konačnog pH pomoću pH-metra.

Polinukleotidi korišteni u eksperimentima (*Sigma Aldrich*, SAD) otopljeni su u puferu natrijeva kakodilata ($I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 7,00$) prema uputama proizvođača. Otopina ctDNA je dodatno sonicirana i filtrirana preko filtra veličine pora $0,45 \mu\text{m}$ kako bi se uklonili veći lanci DNA i dobila što homogenija otopina. Koncentracije otopina polinukleotida određene su spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini maksimuma apsorpcije prema podacima proizvođača (tablica 4), a izražene su kao koncentracije fosfata. Otopine polinukleotida čuvane su u hladnjaku na $-18 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tablica 4. Molarni ekstinkcijski koeficijenti ε dvolančanih polinukleotida i pripadne valne duljine maksimuma apsorbancije λ_{\max}

polinukleotid	$\varepsilon / \text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$	$\lambda_{\max} / \text{nm}$
<i>calf-timus</i> DNA	6600	260
poli A-poli U	6000	260
poli dA-poli dT	6000	260
poli dAdT-poli dAdT	6600	262
poli dGdC-poli dGdC	8400	254

3.1.2. Uređaji

- Spektrofotometar *Varian Cary Bio 100* s internom kontrolom temperature i automatskim držačem 12 kiveta (*Agilent Technologies, SAD*)
- Fluorimetar *Varian Cary Eclipse* s automatskim držačem 4 kivete (*Agilent Technologies, SAD*)
- Spektrometar JASCO J-815 CD
- Analitička vaga *Mettler Toledo*

3.2. Spektroskopska karakterizacija spojeva

Prije istraživanja interakcije spojeva s polinukleotidima provedena je spektroskopska karakterizacija spojeva snimanjem UV/Vis spektra u termostatiranim kivetama ($T = 25 \text{ °C} \pm 0,1 \text{ °C}$) u rasponu valnih duljina 210-600 nm korištenjem programa spektrofotometra *Scan UV/Vis*.

Baždarni dijagram izrađen je na način da je prvo snimljen spektar pufera natrijeva kakodilata ($I = 0,05 \text{ mmol dm}^{-3}$, pH 7,00). Zatim su u kvarcnu kivetu duljine optičkog puta 1 cm, koja sadrži prethodno nadodan 1,00 mL pufera natrijeva kakodilata, dodavani alikvoti ishodne otopine cijaninske boje ($c = 8 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) tako da su dobivene otopine u koncentracijskom rasponu od 5×10^{-7} do $4 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. Za svaki dodatak je snimljen UV/Vis spektar, koji je u programu automatski korigiran obzirom na baznu liniju natrijeva kakodilata. Svi dobiveni podaci obrađeni su programom *OriginPro 7.5*.

Za određivanje termičke stabilnosti snimljeni su UV/Vis spektri ispitivanih spojeva ($c = 4 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) pri temperaturama 25, 45, 70 i 95 °C u kvarcnoj kiveti od 1,00 mL optičkog puta zračenja od 1 cm. Nakon hlađenja ponovno je snimljen UV/Vis spektar pri 25 °C.

3.3. Istraživanje interakcija spojeva s polinukleotidima

3.3.1. Fluorimetrijske titracije

Za snimanje fluorescencijskih spektara koristi se fluorimetar *Varian Cary Eclipse*. Ispitivani spojevi pobuđuju se pri valnoj duljini maksimuma apsorpcije s tim da je korišten maksimum pri $\lambda > 300$ nm kako bi se izbjegla apsorpcija polinukleotida ($\lambda(\text{AK-1}) = 508$ nm, $\lambda(\text{AK-2}) = 507$ nm, $\lambda(\text{AK-3}) = 510$ nm). Emisija je praćena u rasponu valnih duljina od 512 do 650 nm, a odabir širine pukotina je proveden na način da su snimljeni emisijski spektri spoja uz dodatak ctDNA pri različitim širinama pukotina, a odabrana je ona koja je dala najbolji odziv instrumenta.

Fluorimetrijske titracije provode se u kvarcnim fluorimetrijskim kivetima duljine optičkog puta 1 cm u 2,00 mL pufera natrijeva kakodilata ($I = 0,05$ mmol dm⁻³, pH 7,00). Najprije je snimljena bazna linija, odnosno spektar pufera natrijeva kakodilata ($I = 0,05$ mol dm⁻³, pH = 7,00), a onda spektar vodene otopine spoja u puferu nakon dodatka alikvota spoja do konačne koncentracije $c = 2 \times 10^{-7}$ mol dm⁻³. Zatim su dodavani alikvoti ishodnih otopina polinukleotida u kivetu s otopinom cijaninske boje, počevši od omjera $r_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]} = 0,5$ sve dok se ne postigne zasićenje, odnosno kada daljnjim dodatkom ne dolazi do promjene u intenzitetu fluorescencije. Po svakom dodatku polinukleotida i nakon 5 minuta inkubacije snimljen je fluorescencijski spektar ispitivanog spoja. Provedena je kontrola stabilnosti novonastalog kompleksa na način da je kod svakog petog dodatka nakon 2 dodatne minute inkubacije ponovno snimljen spektar. Koncentracija polinukleotida tijekom titracije mijenjala se u području 10⁻⁷ do 10⁻⁵ mol dm⁻³ što u većini slučajeva odgovara nastanku kompleksa u kojem je vezano 20-80 % ispitivanog spoja. Dobiveni spektri obrađeni su u programu *OriginPro 7.5*. Svaki spektar korigiran je obzirom na baznu liniju, a volumeni su korigirani za razrjeđenje uslijed dodatka polinukleotida.

Budući da interkalativni model vezanja jedini pruža mogućnost jasne definicije veznih mjesta na polinukleotidu, razvijen je niz jednadžbi za izračun konstante stabilnosti nastalih kompleksa na osnovi podataka titracije ispitivanog spoja s polinukleotidom.¹⁶ Konstanta stabilnosti K_s i omjer $n_{[\text{vezani spoj}]/[\text{polinukleotid}]}$ izračunati su temeljem Schatchardove inačice Langmuirove izoterme metodom nelinearne regresije za spektroskopski aktivan kompleks prema jednadžbi:

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

gdje je c koncentracija ispitivanog spoja u otopini, c_s koncentracija polinukleotida, n omjer koncentracije vezanog spoja i polinukleotida ($n_{[\text{vezani spoj}]/[\text{polinukleotid}]}$), 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.⁹

3.3.2. Temperaturno mekšanje

Eksperimentom temperaturnog mekšanja polinukleotida određen je utjecaj ispitivanih spojeva na vrijednost temperature mekšanja polinukleotida. Jedino je izostavljen poli(dGdC)₂ s obzirom da je njegova temperatura mekšanja izvan mjernog područja instrumenta ($T_m > 95$ °C).

Za eksperiment korišten je spektrometar UV/Vis *Varian Cary 100 Bio*. U svaku kvarcnu kivetu duljine optičkog puta 1 cm stavljen je 1,00 mL pufera natrijeva kakovilata ($I = 0,05$ mol dm⁻³, pH = 7,00). Koristeći program *Simple Reads* očitane su vrijednosti apsorbancije pufera pri valnoj duljini maksimuma apsorpcije odabranog polinukleotida (tablica 4), koje se onda koriste kao nulte vrijednosti otopine. Nadodan je alikvot polinukleotida do približne konačne koncentracije $c = 2,2 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³ nakon čega je ponovno očitana apsorbancija radi provjere koncentracije. Temeljem izmjerene vrijednosti apsorbancije i pripadnih vrijednosti molarnih ekstinkcijskih koeficijenata (tablica 4) određen je potrebnii dodatak ispitivanog spoja tako da odgovara unaprijed određenom molarnom omjeru spoja i polinukleotida. Kao kontrola koristi se otopina čistog polinukleotida, dok ostale kivete sadržavaju otopine ispitivanog spojeva i polinukleotida u omjerima $r_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]} = 0,05, 0,1$ i $0,2$ s time da se sva mjerenja rade u duplikatu. U programu *Thermal* postavljeni su parametri zagrijavanja: uzorak je zagrijavan postupno u temperaturnom rasponu od 25 °C do 95 °C brzinom od 1 °C min⁻¹ uz očitavanje vrijednosti apsorbancije svakih 0,5 °C.

Dobiveni rezultati prikazani su grafički u programu *OriginPro 7.5* kao krivulje ovisnosti apsorbancije pri valnoj duljini maksimuma apsorpcije polinukleotida o temperaturi. Svaka krivulja je normalizirana. Vrijednosti temperature mekšanja T_m određene su očitavanjem točki maksimuma prve derivacije sigmoidalnih krivulja i provjerene grafički metodom tangenti. Vrijednosti ΔT_m izračunate su oduzimanjem vrijednosti T_m slobodnog polinukleotida od vrijednosti T_m kompleksa ispitivanih spojeva s polinukleotidima. Izražene vrijednosti ΔT_m (s pogreškom $\pm 0,5$ °C) predstavljaju srednju vrijednost dva paralelna mjerenja.

3.3.3. CD titracije

CD spektri snimaju se na JASCO J-815 CD spektrometru pri sobnoj temperaturi i uz konstantan protok dušika. Spektri su snimani uz standardnu osjetljivost instrumenta i brzinu skeniranja 200 nm min⁻¹. Za svaki spektar rađene su dvije akumulacije, a konačni spektar rezultat je njihovog uprosječivanja. Istodobno je praćena promjena cirkularnog dikroizma i UV/Vis apsorpcije u području od 220 nm do 650 nm.

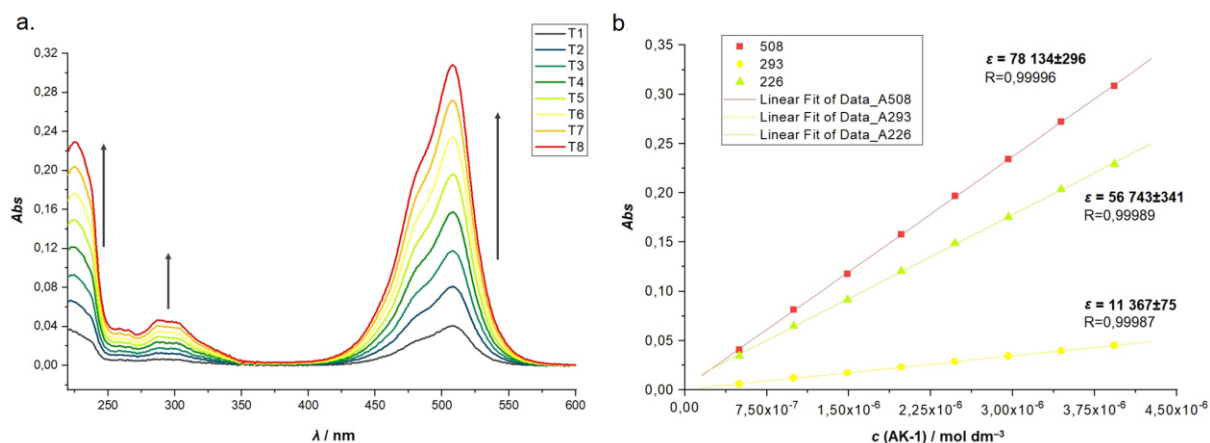
Ekperiment se provodi u kvarcnim fluorimetrijskim kivetama duljine optičkog puta 1 cm. Najprije je snimljena bazna linija, odnosno spektar pufera natrijeva kakodilata ($I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, pH = 7,00). Zatim je snimljen spektar odabranog polinukleotida nadodanog u 2,00 mL pufera do konačne koncentracije $c = 3,00 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$. Naposljetku slijedi dodatak alikvota vodenih otopina spojeva ($c = 8 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$) u zadanim molarnim omjerima spoja i polinukleotida ($r = 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4$ i $0,5$). Snimljeni CD spektar nakon svakog dodatka korigiran je obzirom na spektar prethodno snimljenog pufera, a dobiveni spektri su obrađeni programom *OriginPro* 7.5.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Spektroskopska karakterizacija spojeva serije AK

4.1.1. UV/Vis spektroskopija

U svrhu utvrđivanja eksperimentalnih uvjeta za istraživanje interakcija novosintetiziranih cijaninskih boja s dvolančanim polinukleotidima provedena je spektrofotometrijska karakterizacija ispitivanih spojeva. Snimljeni su UV/Vis spektri pripravljenim puferiranim otopinama spojeva kao što je opisano u poglavlju 3.2. UV/Vis spektri (slika 19 i D1-D2) prikazani su kao ovisnost apsorbancije o valnoj duljini u koncentracijskom rasponu $c = 5 \times 10^{-7} - 4 \times 10^{-6}$ mol dm^{-3} . Kod svih ispitivanih spojeva dolazi do linearnog povećanja apsorbancije UV/Vis zračenja s povećanjem koncentracije spoja sukladno Beer-Lambertovom zakonu (poglavlje 2.3.1.). Proporcionalni odnos apsorbancije i koncentracije spoja u gore navedenom koncentracijskom području potvrđuje da ne dolazi do formiranja agregata cijaninskih boja koji bi uzrokovali hipokromni efekt.



Slika 19. a. koncentracijska ovisnost UV/Vis spektara spoja **AK-1** ($c = 5 \times 10^{-7} - 4 \times 10^{-6}$ mol dm^{-3}) u puferu natrijeva kakodilata ($I = 0,05$ mol dm^{-3} , pH = 7,00) b. ovisnost apsorbancije o koncentraciji spoja **AK-1** pri valnim duljinama maksimuma apsorbancije $\lambda = 226$ nm, 293 nm i 508 nm.

UV/Vis spektri spojeva pokazuju po tri apsorpcijska maksimuma u valnim područjima $\lambda = 225$ - 228 nm, $\lambda = 289$ - 293 nm i $\lambda = 507$ - 510 nm. Za svaki apsorpcijski maksimum izračunat je molarni ekstinkcijski koeficijent linearnom regresijom ovisnosti apsorpcije o koncentraciji ispitivanog spoja, kao što je prikazano u tablici 5.

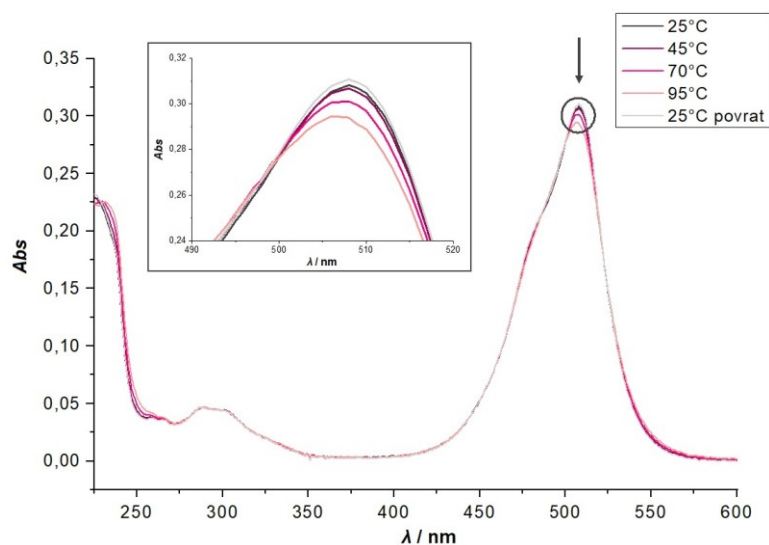
Tablica 5. Molarni ekstinkcijski koeficijenti i valne duljine maksimuma apsorpcije spojeva **AK-1**, **AK-2** i **AK-3** u puferu natrijeva kakovilata ($I = 0,05$ mol dm⁻³, pH=7,00)

AK-1		AK-2		AK-3	
λ_{\max} / nm	ε / mol ⁻¹ dm ³ cm ⁻¹	λ_{\max} / nm	ε / mol ⁻¹ dm ³ cm ⁻¹	λ_{\max} / nm	ε / mol ⁻¹ dm ³ cm ⁻¹
226	56 743	228	64 778	225	57 660
293	11 367	289	13 227	290	11 461
508	78 134	507	74 181	510	71 631

Izračunate vrijednosti molarnih ekstinkcijskih koeficijenata za sva tri ispitivana spoja poprimaju međusobno usporedive vrijednosti, a ujedno dobivene vrijednosti odgovaraju literaturnim podacima za cijaninske boje.⁶³

4.1.2. Temperaturna stabilnost vodenih otopina spojeva

Nakon snimljenih UV/Vis spektara svih spojeva ispitana je i termička stabilnost vodenih otopina spojeva ($c = 4 \times 10^{-6}$ mol dm⁻³) na način koji je opisan u poglavlju 3.2. Slike 20 i D3-D4 prikazuju UV/Vis spektre vodenih otopina spojeva AK-1, AK-2 i AK-3 nakon temperaturnog zagrijavanja. Uočljiva je neznatna promjena u vrijednostima apsorpcije i valne duljine maksimuma apsorpcije. Nakon hlađenja spektri se gotovo poklapaju s polaznim UV/Vis spektrima. Ovakva opažanja potvrđuju termičku stabilnost vodenih otopina spojeva AK-1, AK-2 i AK-3, a time i prikladnost za eksperimente temperaturnog mekšanja.

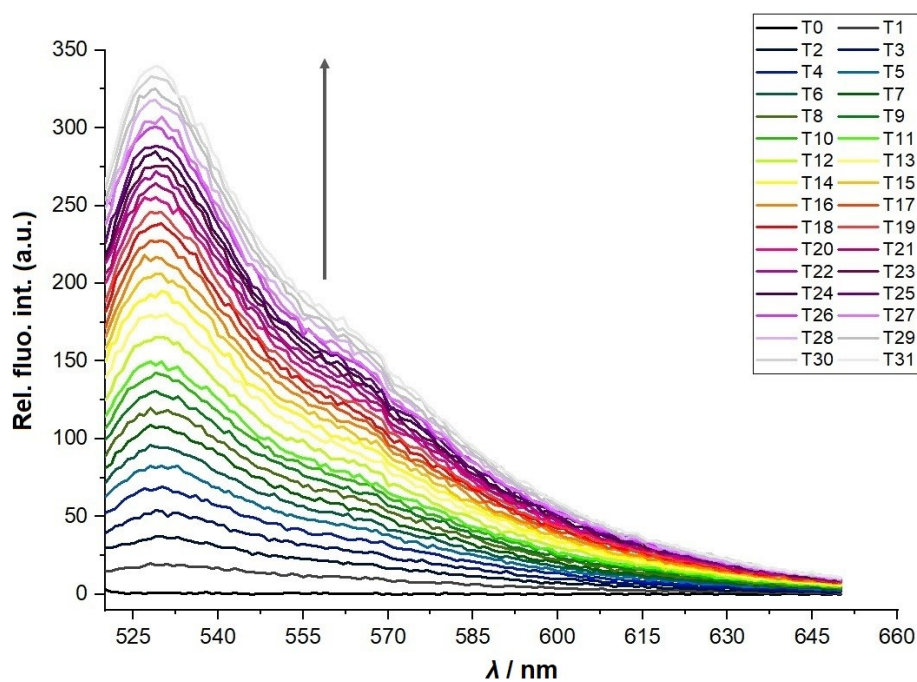


Slika 20. Temperaturna ovisnost UV/Vis spektra spoja **AK-1** ($c = 4 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) u puferu natrijeva kakovilata ($I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 7,00$)

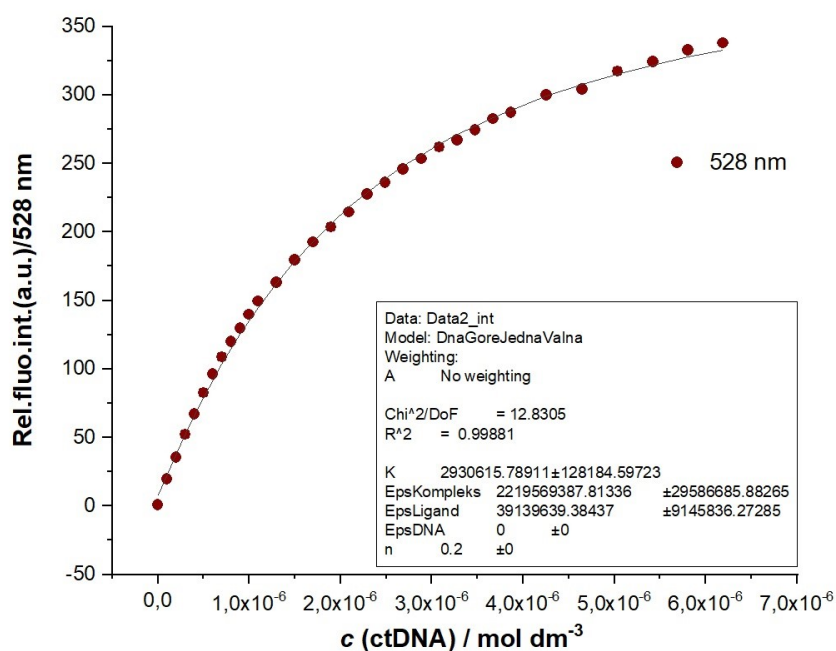
4.2. Proučavanje interakcije spojeva AK serije s polinukleotidima

4.2.1. Fluorimetrijske titracije

Afinitet vezanja ispitivanih spojeva prema različitim polinukleotidima određen je pomoću fluorimetrijskih titracija. Eksperimenti su provedeni pri niskim koncentracijama spojeva ($c = 2,0 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$) kako ne bi došlo do agregacije spojeva. U takvim uvjetima, emisijski odgovor predstavlja vezanje neovisne molekule spoja na dvolančani polinukleotid. Spojevi AK serije su cijaninske boje koje ne pokazuju intrinzičnu emisiju fluorescencije. No, dodatak polinukleotida rezultira značajnim hiperkromnim efektom (slika 21 i D5.a-D15.a) uslijed zakočenja mehanizma vibracijske relaksacije cijaninskih boja (poglavlje 2.4.2.).⁶⁰ Općenito visok intenzitet emisije cijaninskih boja upućuje na vezanje spojeva s polinukleotidima. Dodatak većine polinukleotida uzrokovao je blagi batokromni ili hipsokromni pomak ($\Delta = 1-4 \text{ nm}$) emisijskog maksimuma.



Slika 21. Promjene u fluorescencijskom spektru AK-1 ($c = 2,0 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$) tijekom titracije s ctDNA ($c = 1,0 \times 10^{-7} - 6,2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) uz pobudu pri $\lambda_{\text{exc}} = 508 \text{ nm}$



Slika 22. Ovisnost intenziteta fluorescencije pri $\lambda = 528 \text{ nm}$ o koncentraciji ctDNA u puferu natrijeva kakodilata ($I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,00)

Eksperimenti su provedeni u suvišku polinukleotida ($r < 0,1$) kada se smatra da se molekule interkalatora vežu na izolirana, međusobno neovisna vezna mjesta. U takvim uvjetima, kada je zapravo zanemariv kooperativni utjecaj na vezanje liganda, za određivanje afiniteta ispitivanih spojeva prema polinukleotidima temeljem podataka fluorimetrijske titracije korištena je Scatchardova jednadžba (slika 22 i D5.b-D15.b).¹⁶ Dobivene vrijednosti konstanti stabilnosti K_s i omjera $n_{[\text{vezani spoj}]/[\text{polinukleotid}]}$ prikazani su u tablici 6.

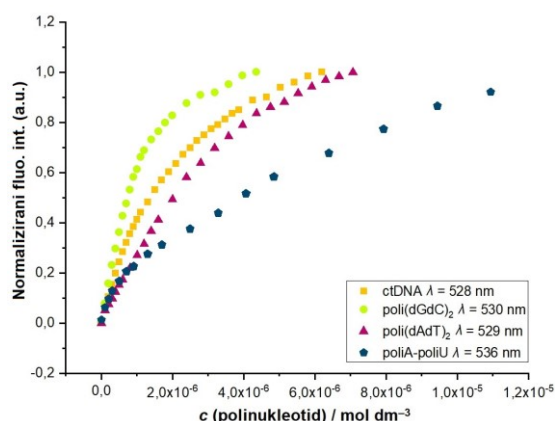
Tablica 6. Konstante stabilnosti ($\log K_s$)^{a,b} kompleksa spojeva AK serije s polinukleotidima, izračunate obradom spektara fluorimetrijskih titracija po Scatchardovoj jednadžbi⁹ u puferu natrijeva kakodilata ($I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,00)

	$\log K_s$			
	ctDNA	poliA-poliU	poli(dGdC) ₂	poli(dAdT) ₂
AK-1	6,47	5,50	7,24	6,10
AK-2	6,36	6,08	7,52	5,70
AK-3	7,32	6,67	6,78	5,24

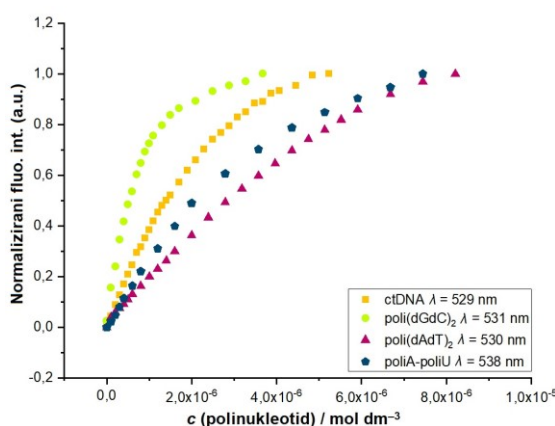
^aObrada podataka titracije pomoću Scatchardove jednadžbe dala je vrijednosti omjera $n_{[\text{vezani spoj}]/[\text{polinukleotid}]}$ = 0,1-0,3, za lakšu usporedbu sve vrijednosti $\log K_s$ postavljene su na $n = 0,2$. Koeficijenti korelacije iznose $> 0,99$ za većinu izračunatih K_s

^bU slučaju titracije AK-3 s ctDNA $\log K_s$ je izračunat za fiksiranu vrijednost $n = 0,5$ radi preciznijeg prilagođavanja krivulje eksperimentalnim podacima

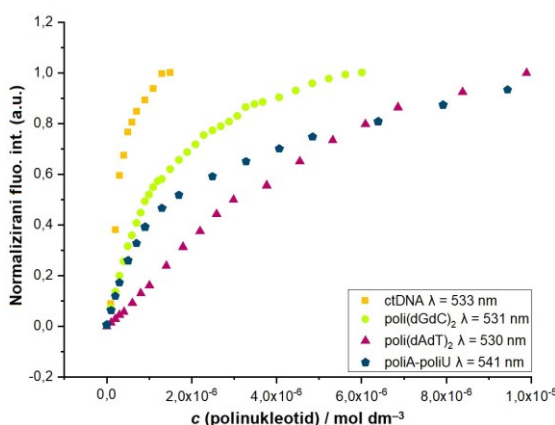
Rezultati ukazuju na vrlo visok afinitet istraživanih spojeva prema polinukleotidima, s $\log K_s$ vrijednostima u rasponu od 5 do 7,5. Za vizualnu procjenu afiniteta određene boje prema polinukleotidima, napravljen je grafički prikaz ovisnosti intenziteta fluorescencije o koncentraciji polinukleotida normaliziran na ekstrapoliranu vrijednost maksimalnog intenziteta emisije (slika 23-25). Unatoč relativno sličnom afinitetu prema većini polinukleotida, spojevi AK serije pokazuju preferenciju prema poli(dGdC)₂. Također, spoj AK-3 pokazuje znatno veći afinitet za ctDNA u odnosu na spojeve AK-1 i AK-2. S obzirom na usporediv afinitet spojeva prema svim polinukleotidima, slijedi da se spojevi vežu na slično vezno mjesto pri čemu je razlika u afinitetu posljedica sekundarne strukture polinukleotida i strukturnih razlika ispitivanih spojeva.



Slika 23. Promjene intenziteta fluorescencije normalizirane na najviši intenzitet emisije u ovisnosti o koncentraciji polinukleotida tijekom titracije spoja **AK-1** s polinukleotidom ($\lambda_{\text{exc}} = 508$ nm, $c = 2 \times 10^{-7}$ mol dm⁻³) u puferu natrijeva kakodilata ($I = 0,05$ mol dm⁻³, pH 7,00)



Slika 24. Promjene intenziteta fluorescencije normalizirane na najviši intenzitet emisije u ovisnosti o koncentraciji polinukleotida tijekom titracije spoja **AK-2** s polinukleotidom ($\lambda_{\text{exc}} = 507$ nm, $c = 2 \times 10^{-7}$ mol dm⁻³) u puferu natrijeva kakodilata ($I = 0,05$ mol dm⁻³, pH 7,00)



Slika 25. Promjene intenziteta fluorescencije normalizirane na najviši intenzitet emisije u ovisnosti o koncentraciji polinukleotida tijekom titracije spoja **AK-3** s polinukleotidom ($\lambda_{\text{exc}} = 510$ nm, $c = 2 \times 10^{-7}$ mol dm⁻³) u puferu natrijeva kakodilata ($I = 0,05$ mol dm⁻³, pH 7,00)

4.2.2. Temperaturno mekšanje

Interakcija spojeva AK serije s ctDNA, poli(dAdT)₂ i poli A-poli U pratila se mjerenjem apsorbancije na valnoj duljini karakterističnoj za pojedini dvolančani polinukleotid ($\lambda = 262$ nm za ctDNA i poli(dAdT)₂ te $\lambda = 260$ nm za poli A-poli U). Slike D17-D25 prikazuju ovisnost apsorbancije polinukleotida o temperaturi, a vrijednost T_m odgovara točki infleksije denuracijske krivulje. Tablica 7 sadržava promjene temperature mekšanja (ΔT_m) dvolančanih DNA i RNA polinukleotida uslijed vezanja ispitivanih spojeva pri različitim omjerima $r_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]}$, a prikazani rezultati odgovaraju srednjoj vrijednosti dviju izmjerenih vrijednosti T_m za svaki spoj i polinukleotid.

Tablica 7. ΔT_m^a vrijednosti dvolančanih polinukleotida uslijed dodatka spojeva AK serije u omjeru $r^b = 0,05, 0,1$ i $0,2$ u puferu natrijeva kakodilata ($I = 0,05$ mol dm⁻³, pH 7,00)

spoj	r	$\Delta T_m / ^\circ\text{C}$		
		ctDNA	poli(dAdT) ₂	poliA-poliU
AK-1	0,05	4,7	15,1	-2,0 / 11,0
	0,1	7,5	17,4	11,8 / 29,7
	0,2	10,3	23,8	11,4 / 40,2
AK-2	0,05	8,2	21,7	-2,6 / 18,0
	0,1	11,4	26,6	8,7 / 21,8
	0,2	— ^c	31,5	11,4 / 23,2
AK-3	0,05	6,0	14,3	0,8 / 8,4
	0,1	8,4	17,3	6,0 / 11,1
	0,2	11,6	22,5	6,1 / 12,8

^a instrumentna pogreška mjerenja ΔT_m : $\pm 0,5^\circ\text{C}$

^b molarni omjer $r_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]}$

^c T_m vrijednost je izvan mjernog područja instrumenta ($T_m > 100^\circ\text{C}$)

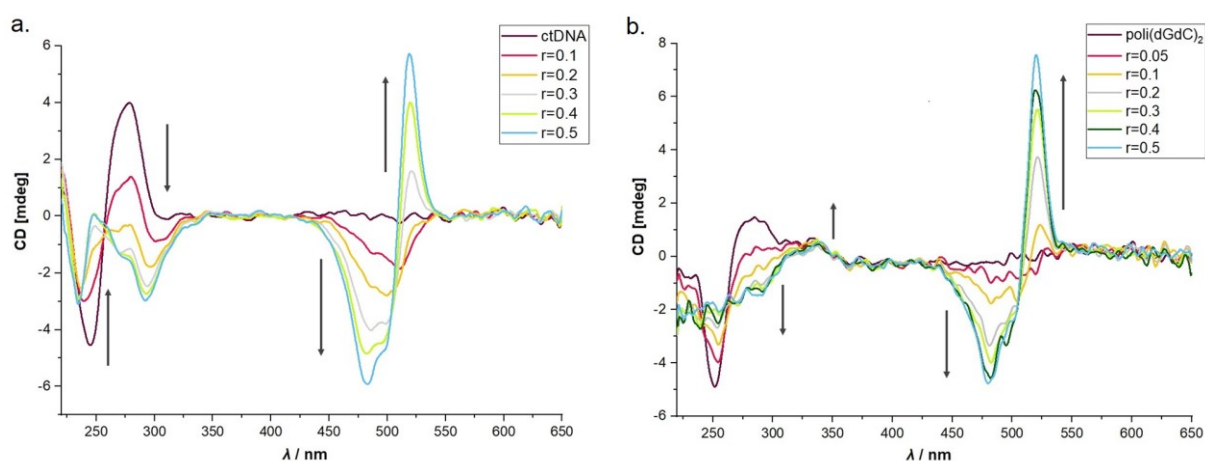
Spojevi AK serije pri svim omjerima $r_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]}$ umjereno do jako stabiliziraju ispitivane polinukleotide. Pozitivne ΔT_m vrijednosti rezultat su značajnog stabilizacijskog efekta karakteristično za interkalativni način vezanja. Očekivano, stabilizacija denaturacije polinukleotida raste s porastom omjera r . Spoj AK-2 pokazuje najveći stabilizacijski učinak na T_m vrijednost dvolančanih DNA i RNA molekula. Takav efekt vjerojatno je posljedica pozitivno nabijenog pirolidinskog prstena. Sve cijaninske boje pokazuju najmanji učinak na vrijednost T_m ctDNA

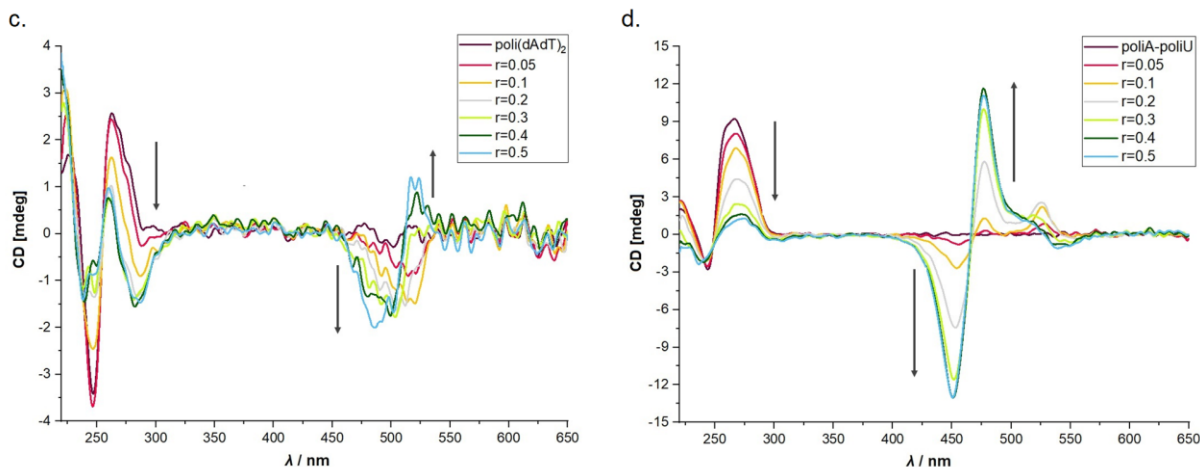
uslijed miješanog sastava baza polinukleotidnog lanca (48% GC i 58% AT parova baza) kao što je vidljivo na slikama D17-D19.

Suprotno DT_m eksperimentima s ctDNA i alternirajućim AT polinukleotidom, cijanini u interakciji s poli A-poli U daju bifazne denuracijske krivulje polinukleotida (slika D23-D25) pri čemu najveću stabilizaciju daje spoj AK-1. U principu, vrijednost prvog prijelaza je znatno manja u odnosu na drugi prijelaz, a ponekad čak i negativna. Takvi bifazni profili ukazuju na različite načine vezanja. Dakle, čak i u suvišku veznih mjesta polinukleotida u odnosu na koncentraciju ispitivanih spojeva ($r < 0,1$) dolazi do mješovitog načina vezanja, interkalacije popraćene vezanjem agregata u veliki utor polinukleotida.

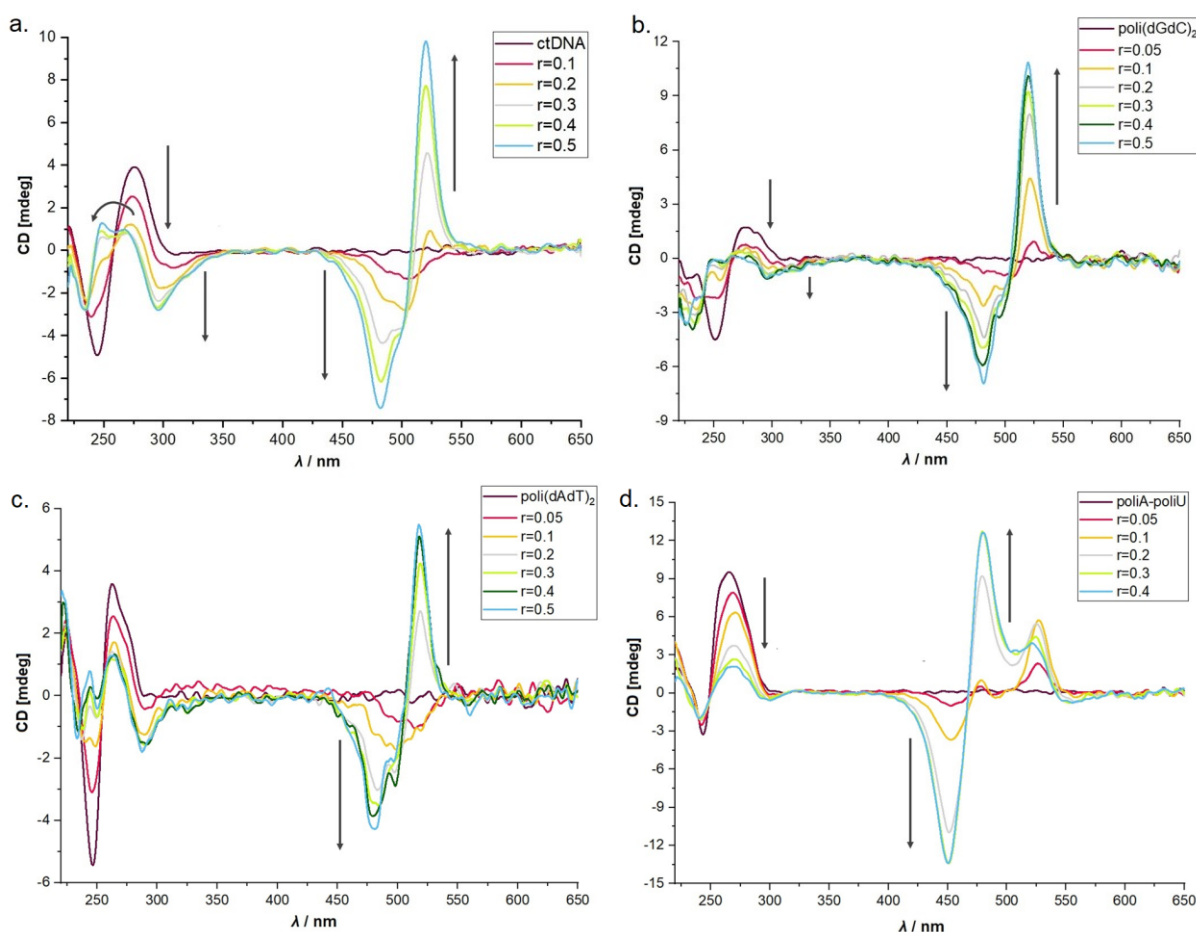
4.2.3. CD titracije

Ono što se može opaziti iz prikazanih rezultata da spojevi AK serije uzrokuju smanjenje CD signala u području apsorpcijske vrpce polinukleotida ($\lambda = 260-275$ nm) što ukazuje na značajni utjecaj na sekundarne strukture nukleinskih kiselina. Spojevi AK serije kao akiralni spojevi ne posjeduju intrinzični CD spektar, pa se pojava snažnih ICD signala u regiji koja odgovara apsorpcijskim vrpama ispitivanih spojeva ($\lambda = 300-570$ nm) jednoznačno pripisuje interakcijama spoja s kiralnom osi polinukleotida (slika 26-28). Promjene u tom području indikativne su za način vezanja spoja za polinukleotid. Oblik ICD krivulja kod svih ispitivanih spojeva mijenjao se u ovisnosti o molarnom omjeru $r_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]}$.

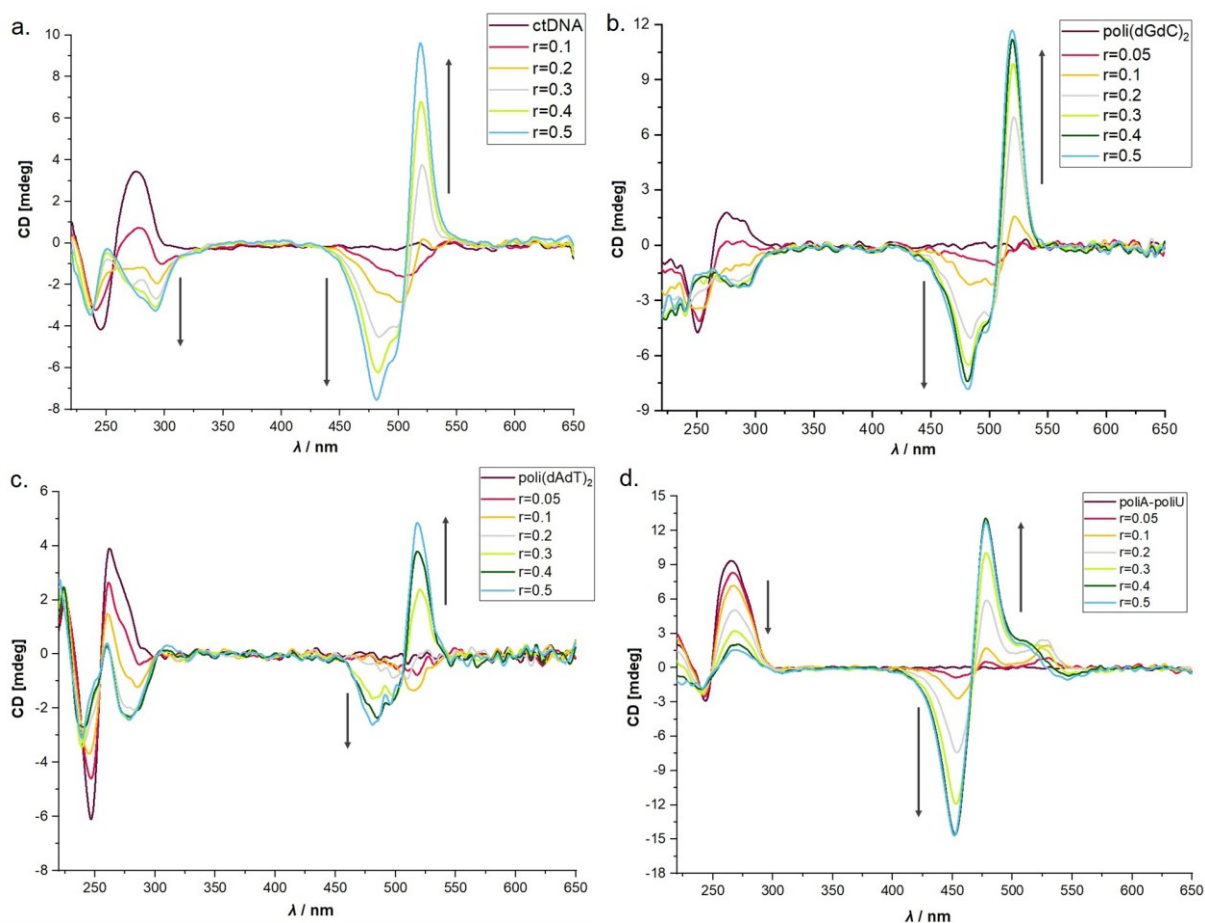




Slika 26. CD titracija a. ctDNA, b. poli(dGdC)₂, c. poli(dAdT)₂ i d. poli A-poli U ($c = 3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) sa spojem AK-1 pri različitim molarnim omjerima $r_{\text{[spoju]}} / \text{[polinukleotid]}$ u puferu natrijeva kakovilata ($I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,00)



Slika 27. CD titracija a. ctDNA, b. poli(dGdC)₂, c. poli(dAdT)₂ i d. poli A-poli U ($c = 3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) sa spojem AK-2 pri različitim molarnim omjerima $r_{\text{[spoju]}} / \text{[polinukleotid]}$ u puferu natrijeva kakovilata ($I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,00)



Slika 28. CD titracija a. ctDNA, b. poly(dGdC)₂, c. poly(dAdT)₂ i d. poly A-poly U ($c = 3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) sa spojem AK-3 pri različitim molarnim omjerima $r_{\text{[spoju] / [polinukleotid]}}$ u puferu natrijeva kadolidata ($I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,00)

Profili ICD većine titracija odgovara mješovitom načinu vezanja. Pri nižim omjerima ($r = 0,05$ i $0,1$) uočljivi su slabi negativni ICD signali u valnom području $\lambda \sim 300 \text{ nm}$ i $\lambda = 505\text{-}515 \text{ nm}$ što je karakteristično za interkalativni način vezanja. No, pri višim omjerima ($r > 0,1$) pojavljuju se bisignatne vrpce s pozitivnim maksimumom pri 520 nm i negativnim maksimumom pri 480 nm . Jaki simetrični ICD signali posljedica su sprege susjednih kromofora koje potječu od vezanja dimera ili većih agregata cijaninskih boja unutar utora polinukleotida. Nulta točka prijelaza bisignatne vrpce u valnom području $\lambda = 507\text{-}510 \text{ nm}$ poklapa se s apsorpcijskim maksimumima spojeva AK serije. Dokaz mješovitog načina vezanja je i opažanje da ICD signali indikativni za interkalaciju u valnom području $\lambda = 300\text{-}320 \text{ nm}$ ne nestaju pri višim omjerima r . Potvrda ove tvrdnje je i odsutnost izoeliptičke točke, koja se pojavljuje u slučaju dominantnog načina vezanja jedne vrste specija.

Isključivo se kod spoja AK-1 u interakciji s poli(dGdC)₂ mogao zamjetiti pozitivni ICD signal pri $\lambda = 340$ nm. Ova promjena ukazuje na interkalativni način vezanja gdje je ligand orijentiran okomito u odnosu na os susjednih parova baza. Različita orijentacija kromofora AK-1 u odnosu na spoj AK-3 mogla bi biti posljedica prisutnosti različitih halogena na benzotiazolnom prstenu.

Titracije poli(dGdC)₂ i poli(dAdT)₂ s cijaninima daju slične ICD profile uz različiti intenzitet maksimuma. Ovakvi spektri posljedica su slične orijentacije spoja u odnosu na kiralnu os DNA. Dakle, spojevi se vežu istim ili sličnim načinom na polinukleotid. Rezultati su u skladu i s rezultatima fluorimetrijskih titracija koje su pokazale preferencijalno vezanje spojeva prema poli(dGdC)₂.

Suprotno tome, spojevi AK serije uzrokuju drugačije ICD profile interakcije s RNA molekulama. Pri nižim omjerima ($r \leq 0,1$) pojavljuje se pozitivni ICD signal pri $\lambda = 527$ nm, koji pri višim omjerima poprima bisignatni profil. Bisignatna vrpca s pozitivnim maksimumom pri $\lambda = 480$ nm i negativnim maksimumom pri $\lambda = 450$ nm hipsokromatski je pomaknuta u odnosu na ICD signal polideoksiribonukleotida. Također, pri $\lambda = 510$ nm je vidljiv dodatni manji maksimum pozitivnog predznaka. Ovakav ICD profil ukazuje na mješoviti način vezanja pri višim omjerima, odnosno uz interkalaciju prisutno je i vezanje agregata unutar velikog utora. Na osnovu svega navedenog, može se zaključiti da spojevi AK serije razlikuju sekundarnu strukturu DNA i RNA molekula. S obzirom da je mali utor RNA molekula plitak i širok ne dozvoljava vezanje malih organskih molekula. Stoga, veliki utor RNA, koji je širi i dublji u odnosu na klasični mali utor dvostruke uzvojnice (tablica 2), omogućava smještaj većih agregata cijaninskih boja.

§ 5. ZAKLJUČAK

U okviru ovog rada spektroskopski su okarakterizirane tri novosintetizirane cijaninske boje **AK-1**, **AK-2** i **AK-3**. Ispitivani spojevi pokazuju linearno povećanje apsorbancije s povećanjem koncentracije spoja u koncentracijskom području od $c = 5 \times 10^{-7} - 4 \times 10^{-6}$ mol dm⁻³ sukladno Lambert-Beerovom zakonu. Proporcionalni odnos ovih dviju fizikalnih veličina dokaz je odsutnosti intermolekulskog slaganja cijaninskih boja u navedenom koncentracijskom području. Očekivano, cijanini ne pokazuju značajnu intrinzičnu fluorescenciju.

Interakcije cijaninskih boja s različitim sintetskim polinukleotidima istražene su standardnim spektrofotometrijskim metodama (UV/Vis spektrofotometrija, fluorimetrija, CD spektrofotometrija). Provedena istraživanja pokazala su povezanost strukture s afinitetom i načinom vezanja spojeva. Strukturne razlike spojeva, odnosno prisutnost različitih halogena i cikličkih amina, utječu na interakciju s polinukleotidima.

Eksperimentima temperaturnog mekšanja utvrđena je umjerena do jaka stabilizacija dvolančanih polinukleotida. Spoj **AK-2**, koji posjeduje pozitivno nabijeni pirolidinski prsten, pokazuje najizraženiji stabilizacijski učinak. Vezanje spojeva na ctDNA uzrokuje manju stabilizaciju dvostruke uzvojnice u usporedbi s drugim polinukleotidima najvjerojatnije zbog heterogenog sastava baza polinukleotidnog lanca.

Fluorimetrijskim titracijama utvrđen je vrlo visok afinitet cijanina prema polinukleotidima ($\log K_s = 5-7,5$). Opaženo je preferencijalno vezanje prema poli(dGdC)₂. Pokazano je da spojevi tvore isti tip kompleksa uz različit afinitet kao posljedica sekundarne strukture polinukleotida i strukturnih razlika ispitivanih spojeva.

CD profili spojeva pri niskim molarnim omjerima ($r \leq 0,1$) odgovaraju interkalativnom načinu vezanja. Međutim, pri višim molarnim omjerima ($r \geq 0,1$) dolazi do pojave snažnih bisignatnih ICD signala što ukazuje na vezanje dimera ili većih agregata cijaninskih boja unutar utora polinukleotida. Također, pri višim molarnim omjerima ($r \geq 0,1$) još su uvijek prisutni i ICD signali indikativni za interkaliranje što upućuje na mješovit način vezanja spojeva pri tim omjerima. Također, zbog steričkih i elektrostatskih ograničenja uslijed prisutnosti različitog halogena kod spojeva **AK-1** i **AK-3** dolazi do različitih orijentacija liganada unutar interkalativnog veznog mjesta.

Spojevi AK serije pokazali su mogućnost razlikovanja sekundarne strukture DNA i RNA molekula. Cijanini u interakciji s poli A-poli U daju bifazne denaturacijske krivulje polinukleotida pri čemu najveću stabilizaciju daje spoj **AK-1**. Bifazni profili ukazuju na različite načine vezanja, odnosno dolazi do interkalacije uz vezanje dimera ili većih agregata u veliki utor polinukleotida. Ovo opažanje potvrđeno je i CD titracijama. ICD signal, koji pri nižim molarnim omjerima ($r = 0,05$ i $0,1$) poprima pozitivnu vrijednost, pri višim omjerima poprima bisignatni profil. Plitak i širok mali utor RNA ne dozvoljava vezanje malih organskih molekula, dok je značajno dublji veliki utor dostatan za vezanje većih agregata cijaninskih boja.

Na temelju provedenih istraživanja možemo zaključiti da spojevi pokazuju biološki značajne interakcije s DNA i RNA molekulama, zbog čega bi u budućnosti mogle pronaći primjenu kao potentni luminiscentni senzori u specifičnoj detekciji nukleinskih kiselina.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

A – apsorbancija

AK-1–6-fluoro-3-metil-2-[[[(4E)-1-[3-(piridin-1-ijev-1-il)propil]-1,4-dihidrokinolin-4-iliden)metil]-1,3-benzotiazol-3-ijev dihidrid]

AK-2–3-metil-2-[[[(4E)-1-[3-(1-metilpirolidin-1-ijev-1-il)propil]-1,4-dihidrokinolin-4-iliden)metil]-1,3-benzotiazol-3-ijev dihidrid]

AK-3–6-kloro-3-metil-2-[[[(4E)-1-[3-(piridin-1-ijev-1-il)propil]-1,4-dihidrokinolin-4-iliden)metil]-1,3-benzotiazol-3-ijev dihidrid]

c – množinska koncentracija

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

ctDNA – DNA iz timusa goveda (engl. *calf timus DNA*)

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

ε – molarni ekstinkcijski koeficijent

h – Planckova konstanta ($6,626 \times 10^{-34}$ J s)

I – intenzitet

ICD – inducirani cirkularni dikroizam (engl. *induced circular dichroism*)

K_s – konstanta stabilnosti kompleksa (engl. *stability constant*)

λ – valna duljina

L-CP – lijevo cirkularno polarizirana svjetlost (engl. *left circular polarised light*)

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

ν – frekvencija

n – omjer koncentracije vezanog spoja i polinukleotida

poli rA – jednolančani homopolinukleotid adeninske kiseline

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

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

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

R-CP – desno cirkularno polarizirana svjetlost (engl. *right circular polarised light*)

r – omjer koncentracije spoja i polinukleotida

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

T – transmitancija

T_m – temperatura mekšanja

ΔT_m – promjena temperature mekšanja

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

UV/Vis – ultraljubičasto/vidljivo elektromagnetsko zračenje (engl. *ultraviolet/visible electromagnetic radiation*)

ψ – kut eliptičnosti (engl. *degree of ellipticity*)

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. E. Trinquet, G. Mathis, *Mol. Bio Syst.* **2** (2006) 380-387.
2. R. B. Siverman, *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, Elsevier Academic Press, 2. izdanje, 2004.
3. M. Demeunynck, C. Bailly, W. D. Wilson, *DNA and RNA binders*, Wiley-VCH, Weinheim, 2003.
4. B. A. Armitage, *Top. Curr. Chem.* **253** (2005) 55-76.
5. A. N. Glazer, H. S. Rye, *Nature* **359** (1992) 859.-861.
6. H. S. Rye, S. Yue, D. E. Wemmer, M. A. Quesada, R. P. Haugland, R. A. Mathies, *Nucleic Acids Res.* **20** (1992) 2803.-2812.
7. S. Laib, S. Seeger, *J. Fluor.* **14** (2004) 187.-191.
8. S. Berndl, H. A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed.* **48** (2009) 2148.-2421.
9. G. Scatchard, *Ann. NY Acad. Sci.* **51** (1949) 660.-672.
10. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013., str. 107-111.
11. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W.H. Freeman & Company, New York, 2008, str. 271-287.
12. L. Accardi, W. Freudenberg, M. Ohya, *Quantum Bio-Informatics V*, Vol. 30, World Scientific, Singapore, 2013, str. 353.
13. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013., str. 763-788.
14. S. Neidle, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Elsevier, London, 2008, str. 20-37.
15. U. Heinemann, Y. Roske, *Symmetry* **12** (2020) 1-18.
16. I. Piantanida, *Kem. Ind.* **52** (2003) 545-552.
17. K. R. Sangeetha Gowda, B. B. Mathew, C. N. Sudhamani, H. B. Naik, *J. Biomed. Biotechnol.* **2** (2014) 1-9.
18. S. U. Rehman, T. Sarwar, M. A. Husain, H. M. Ishqi, M. Tabish, *Arch. Biochem. Biophys.* **576** (2015) 49-60.

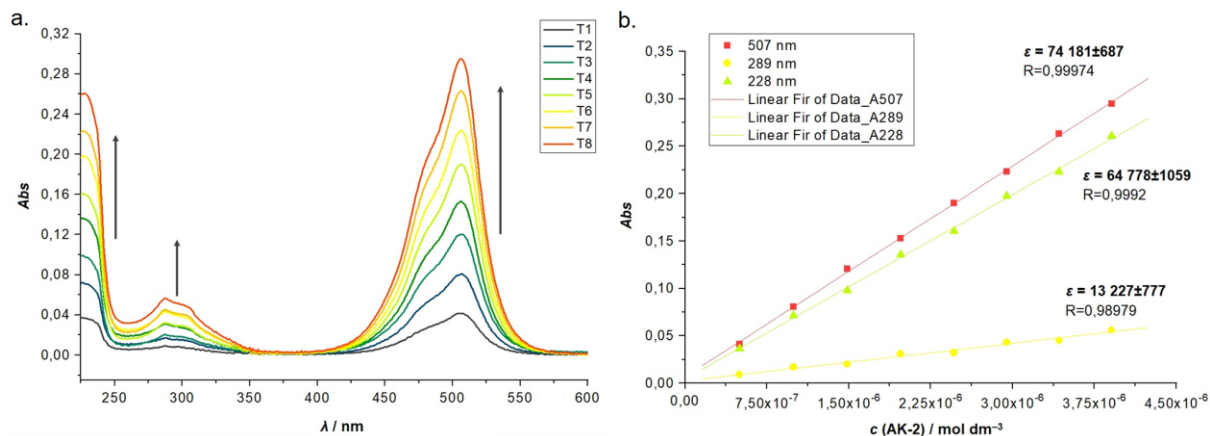
19. N.Z. Fantoni, T. Brown, A. Kellett, *Chem. Bio. Chem.* **22** (2021) 2184-2205.
20. A. A. Elkordy (ur.), *Applications of Calorimetry in a wide context – differential scanning calorimetry, isothermal titration calorimetry and microcalorimetry*, InTech, Rijeka, 2013., str. 129-132.
21. A. A.Ouameur, H. A. Tajmir-Riahi, *J. Biol. Chem.* **279** (2004) 42041 – 42054.
22. H. Ihmels, D. Otto, *Top. Curr. Chem.* **258** (2005) 161-204.
23. R. Palchaudhuri, P. J. Hergenrother, *Curr. Opin. Biotechnol.* **18** (2007) 497-503.
24. <https://www.rcsb.org/structure/6BNA>
25. Interna skripta za praktikum biokemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zavod za biokemiju, Zagreb, 2019., str. 36.
26. M. K. Gofar, N. M. Kor, Z. M. Kor, *Int. J. Adv. Biol. Biomed. Res.* **2** (2014) 811-822.
27. https://en.wikipedia.org/wiki/Anthracycline#cite_note-1 (datum pristupa 20. kolovoza 2021.)
28. J. Dai, C. Punchihewa, P. Mistry, A. T. Ooi, D. Yang, *J. Biol. Chem.* **279** (2004) 46096 – 46103.
29. W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer-Verlag, New York, 1983, str. 221-228.
30. P. Novak, T. Jednačak, *Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama*, TIVA Tiskara Varaždin, Varaždin, 2013., str. 74-77.
31. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Brooks/Cole, Cengage Learning, Belmont, 2014, str. 722-744.
32. D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*, Cengage Learning, Boston, 2017, str. 304-306.
33. S. H. Pine, *Organic Chemistry*, McGraw-Hill, New York, 1987, str. 1113-1120.
34. J-L. Mergny, L. Lacroix, *Oligonucleotides* **13** (2003) 515-537.
35. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013., str. 114-115.
36. Interna skripta za praktikum biokemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zavod za biokemiju, Zagreb, 2019., str. 43-44
37. <http://pratclif.com/biologie-moleculaire/dna/transition.html> (datum pristupa 10. kolovoza 2021.)
38. H. F. Gilbert, *Basic Concepts in Biochemistry*, McGraw-Hill, New York, 2000, str. 37-38.

39. D. Voet, J. G. Voet, *Biochemistry*, John Wiley & Sons, New York, 2011, str.92-93.
40. S. Miljanić, N. Galić, *Viši praktikum analitičke kemije 1*, Interna skripta za studente Diplomskog sveučilišnog studija Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2018, str. 18-19.
41. J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, Singapore, 2006, str. 1-12.
42. D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*, Cengage Learning, Boston, 2017, str. 361-388.
43. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Brooks/Cole, Cengage Learning, Belmont, 2014, str. 760-773.
44. <https://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=4812>
45. S. Rončević, *Fluorencencijska spektroskopija*, predavanje iz kolegija Instrumenta analitika 1, Zagreb, 2019.
46. J. Kypr, I. Kejnovská, Daniel Renčiuk, M. Voričková, *Nucleic Acids Res.* **37** (2009) 1713–1725.
47. A. Rodger, *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation*, John Wiley & Sons, New York, 2014, 1-34.
48. R. W. Woody, *Methods Enzymol.* **246** (1995) 34-71.
49. https://en.wikipedia.org/wiki/Circular_polarization (datum pristupa 26. kolovoza 2021.)
50. T. Šmidlehner, I. Piantanida, G. Pescitelli, *Beilstein J. Org. Chem.* **14** (2018) 84-105.
51. N. C. Garbett, P. A. Ragazzon, J. B. Chaires, *Nat. Protoc.* **2** (2007) 3116-3172.
52. N. Berova (ur.), K. Nakanishi (ur.), R. W. Woody (ur.), *Circular Dichroism: Principles and Applications*, Wiley-VCH, New York, 2000, str. 1035-1040.
53. C. H. G. Williams, *Trans. R. Soc. Edinburgh* 21:377 (1856).
54. A. Mishra, R. K. Behera, P. K. Behera, B. K. Mishra, G. B. Behera, *Chem. Rev.* **100** (2000) 1973–2011.
55. D. M. Sturmer, A. Weissberger, E. C. Taylor, *The chemistry of heteroaromatic compounds*, **30**, Wiley, New York, 1997, 441-587.
56. R. B. Mujumdar, L. A. Ernst, S. R. Mujumdar, C. J. Lewis, *Bioconjug. Chem.* **4** (1993) 105–111.
57. L. S. Lerman, *J. Mol. Biol.* **3** (1961) 18-30.

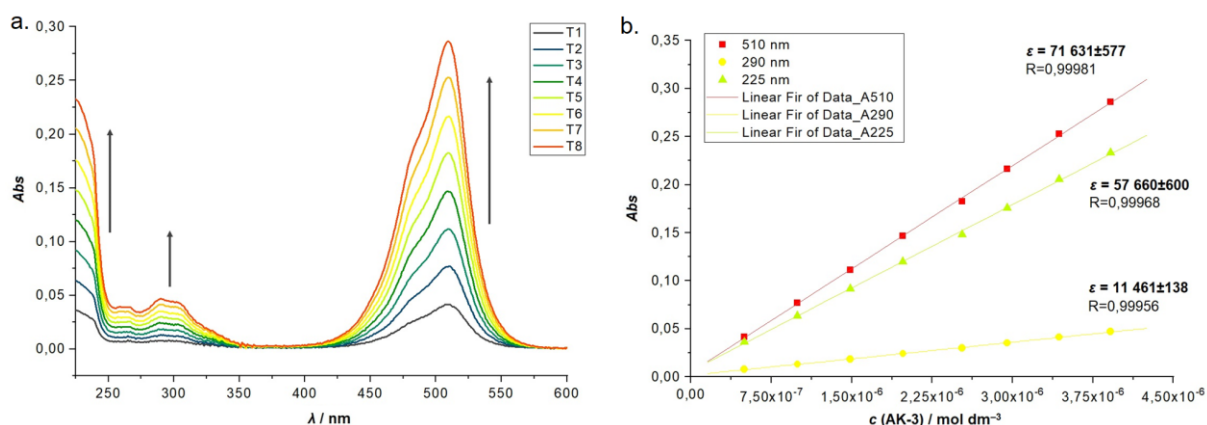
58. B. H. Geierstanger, D. E. Wemmer, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **24** (1995) 463-93.
59. R. C. Benson, H. A. Kues, *J. Chem. Eng. Data* **22** (1977) 378-383.
60. R. R. Gupta, *Heterocyclic Polymethine Dyes: Synthesis, Properties and Applications*, Springer-VBH, 2008, str.183-221.
61. S. Dash, M. Panigrahi, S. Baliyarsingh, P. K. Behera, S. Patel, B. K. Mishra, *Curr. Org. Chem.* **15** (2011) 2673-2689.
62. J. L. Bricks, Y. L. Slominskii, I. D. Panas, A. P. Demchenko, *Methods Appl. Fluoresc.* **6** (2018) 1-31.
63. <https://www.aatbio.com/resources/extinction-coefficient/> (datum pristupa 26. kolovoza 2021.)

§ 8. DODATAK

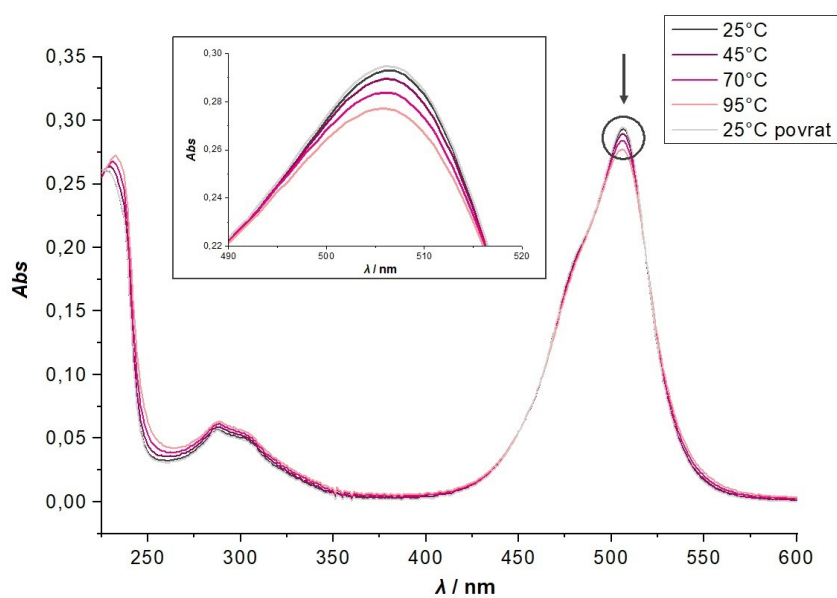
8.1. Podaci i spektri vezani uz spektroskopsku karakterizaciju spojeva



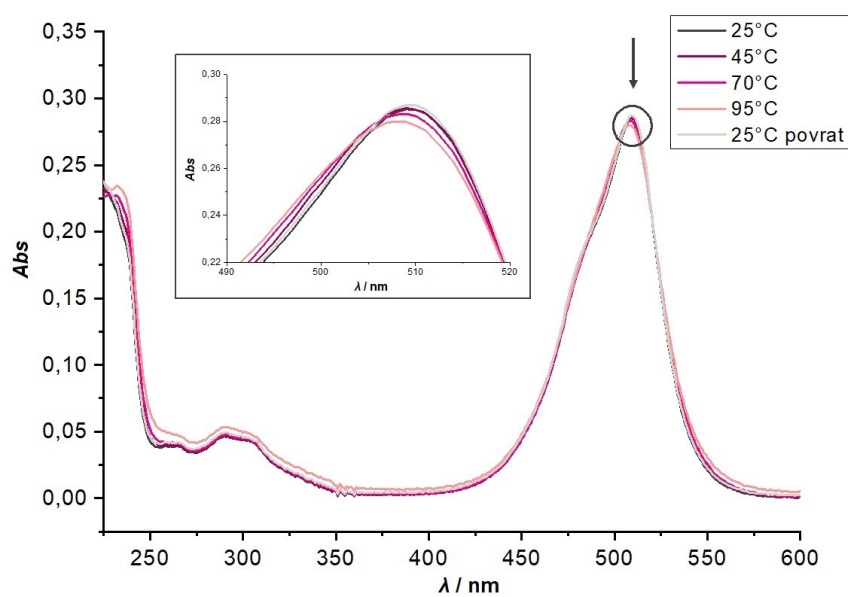
Slika D1. a. koncentracijska ovisnost UV/Vis spektara spoja **AK-2** ($c = 5 \times 10^{-7} - 4 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) u puferu natrijeva kakodilata ($I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 7,00$) b. ovisnost apsorbancije o koncentraciji spoja **AK-2** pri valnim duljinama maksimuma apsorpcije $\lambda = 228 \text{ nm}$, 289 nm i 507 nm .



Slika D2. a. koncentracijska ovisnost UV/Vis spektara spoja **AK-3** ($c = 5 \times 10^{-7} - 4 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) u puferu natrijeva kakodilata ($I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 7,00$) b. ovisnost apsorbancije o koncentraciji spoja **AK-3** pri valnim duljinama maksimuma apsorpcije $\lambda = 225 \text{ nm}$, 290 nm i 510 nm .

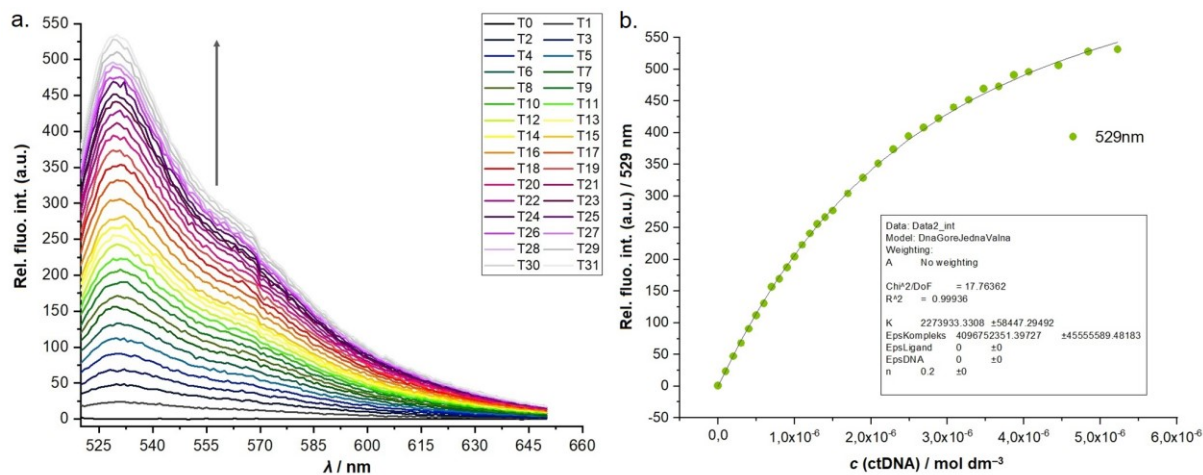


Slika D3. Temperaturna ovisnost UV/Vis spektra spoja **AK-2** ($c = 4 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) u puferu natrijeva kakodilata ($I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 7,00$)

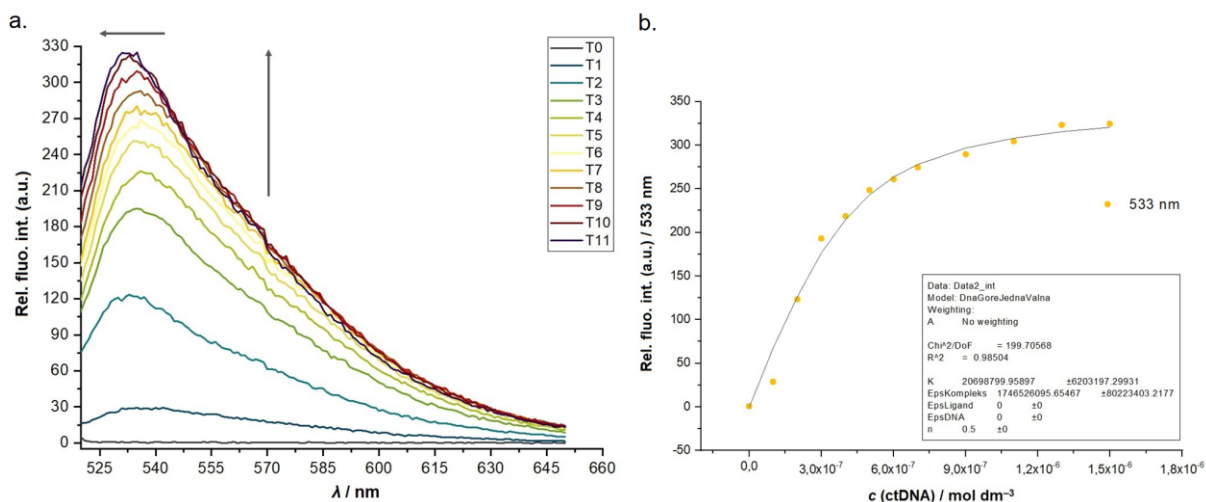


Slika D4. Ovisnost UV/Vis spektra spoja **AK-3** o temperaturi ($c = 4 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) u puferu natrijeva kakodilata ($I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 7,00$)

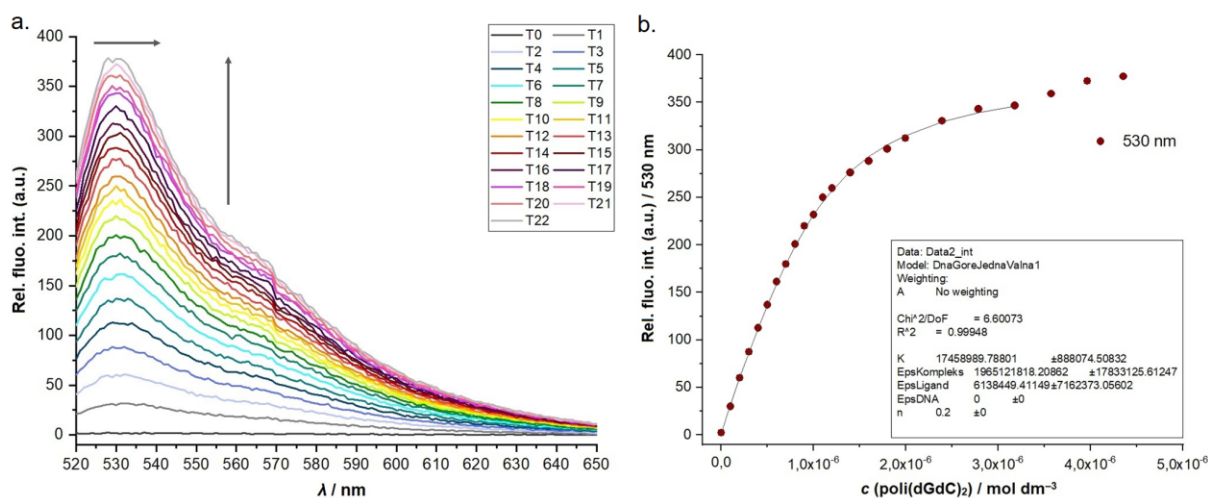
8.2. Podaci i spektri vezani uz metodu fluorimetrijske titracije



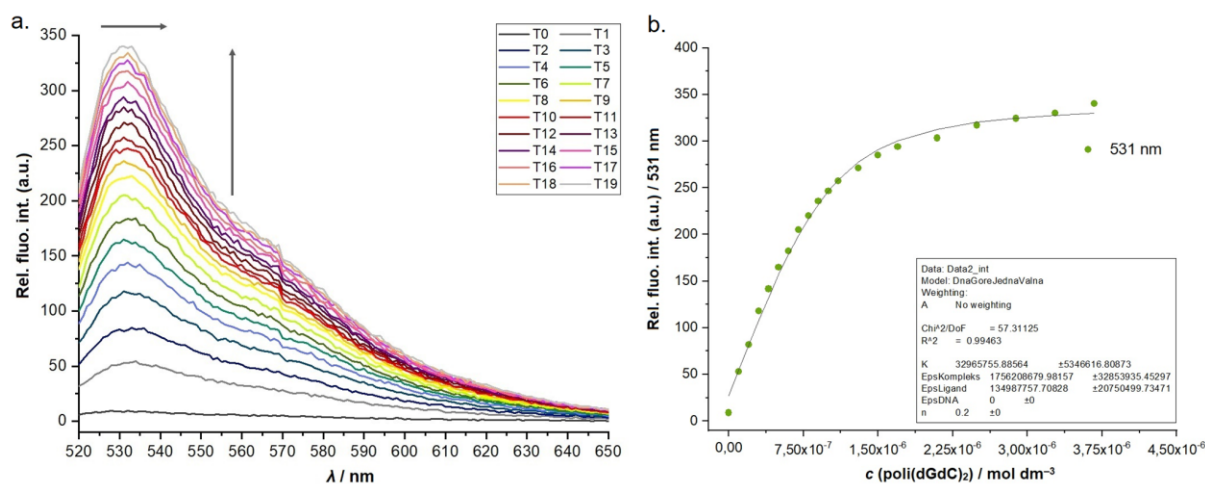
Slika D5. a. Promjene u fluorescencijskom spektru **AK-2** ($c = 2,0 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$) tijekom titracije s **ctDNA** ($c = 1,0 \times 10^{-7} - 5,2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) uz pobudu pri $\lambda_{\text{exc}} = 508 \text{ nm}$ u puferu natrijeva kakodilata ($I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,00) b. ovisnost intenziteta fluorescencije pri $\lambda = 529 \text{ nm}$ o koncentraciji **ctDNA**



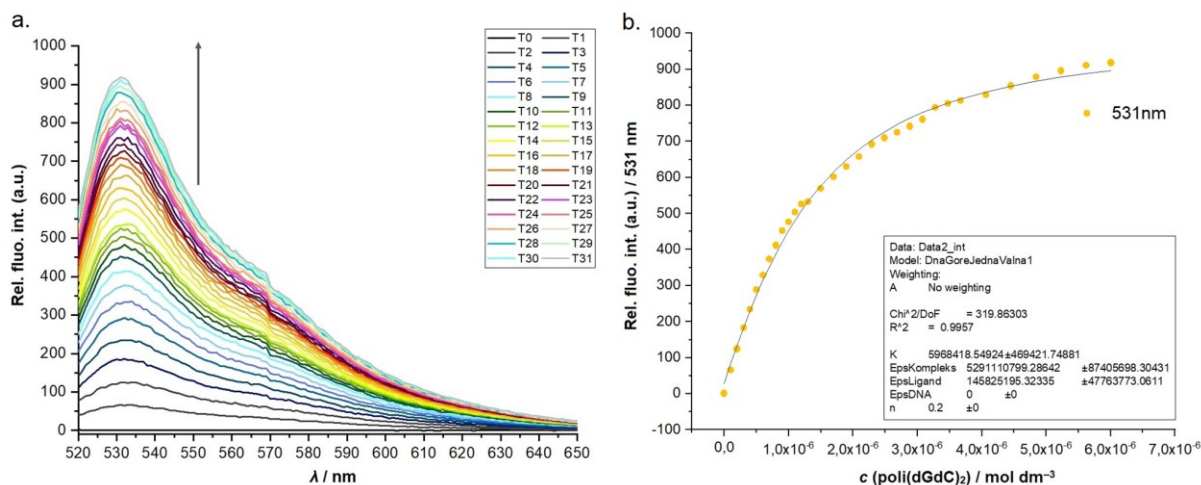
Slika D6. a. Promjene u fluorescencijskom spektru **AK-3** ($c = 2,0 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$) tijekom titracije s **ctDNA** ($c = 1,0 \times 10^{-7} - 1,5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) uz pobudu pri $\lambda_{\text{exc}} = 508 \text{ nm}$ u puferu natrijeva kakodilata ($I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,00) b. ovisnost intenziteta fluorescencije pri $\lambda = 533 \text{ nm}$ o koncentraciji **ctDNA**



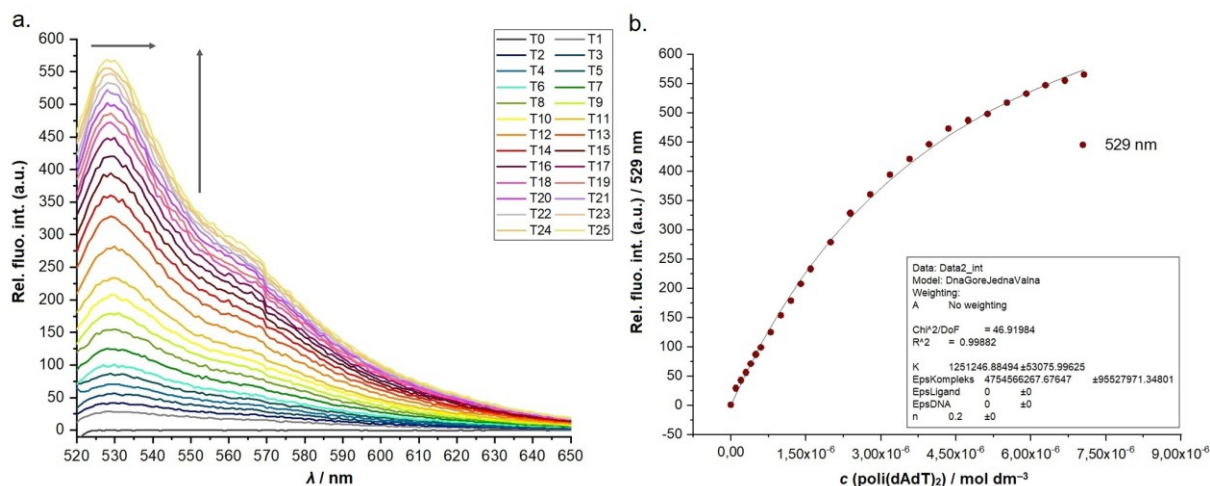
Slika D7. a. Promjene u fluorescencijskom spektru **AK-1** ($c = 2,0 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$) tijekom titracije s **poli(dGdC)₂** ($c = 1,0 \times 10^{-7} - 4,4 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) uz pobudu pri $\lambda_{\text{exc}} = 508 \text{ nm}$ u puferu natrijeva kakodilata ($I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,00) b. ovisnost intenziteta fluorescencije pri $\lambda = 530 \text{ nm}$ o koncentraciji **poli(dGdC)₂**



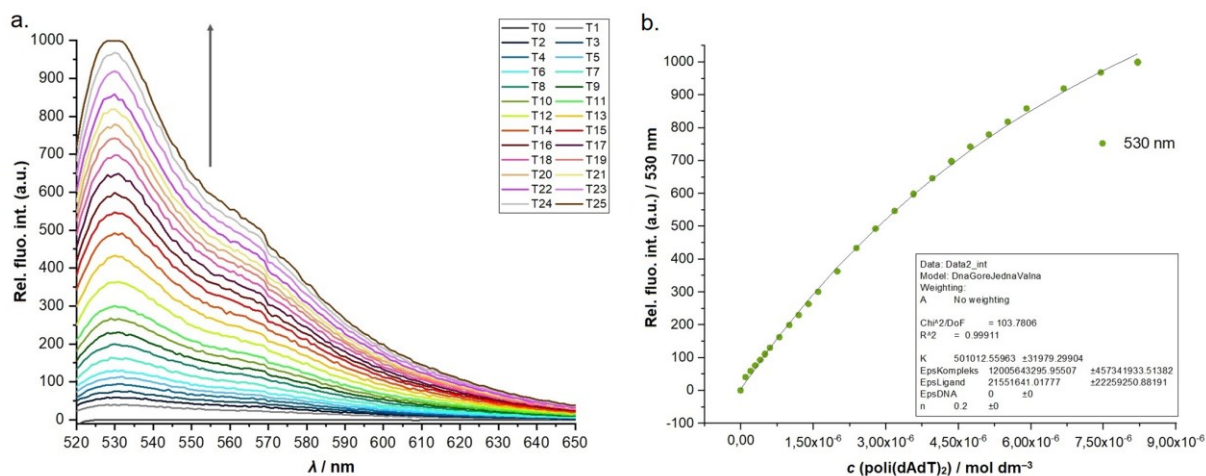
Slika D8. a. Promjene u fluorescencijskom spektru **AK-2** ($c = 2,0 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$) tijekom titracije s **poli(dGdC)₂** ($c = 1,0 \times 10^{-7} - 3,7 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) uz pobudu pri $\lambda_{\text{exc}} = 508 \text{ nm}$ u puferu natrijeva kakodilata ($I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,00) b. ovisnost intenziteta fluorescencije pri $\lambda = 531 \text{ nm}$ o koncentraciji **poli(dGdC)₂**



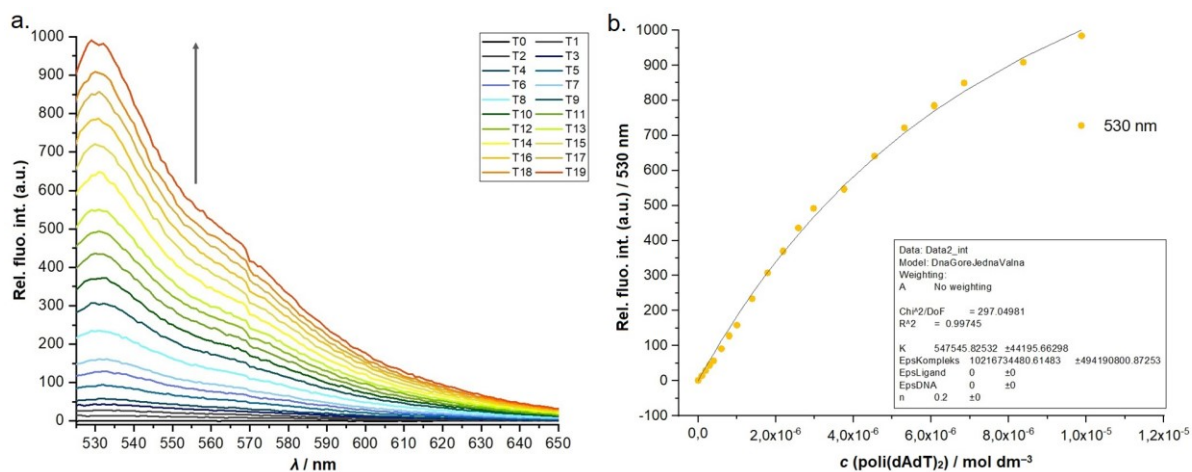
Slika D9. a. Promjene u fluorescencijskom spektru **AK-3** ($c = 2,0 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$) tijekom titracije s **poli(dGdC)₂** ($c = 1,0 \times 10^{-7}$ - $6,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) uz pobudu pri $\lambda_{\text{exc}} = 508 \text{ nm}$ u puferu natrijeva kakodilata ($I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,00) b. ovisnost intenziteta fluorescencije pri $\lambda = 531 \text{ nm}$ o koncentraciji **poli(dGdC)₂**



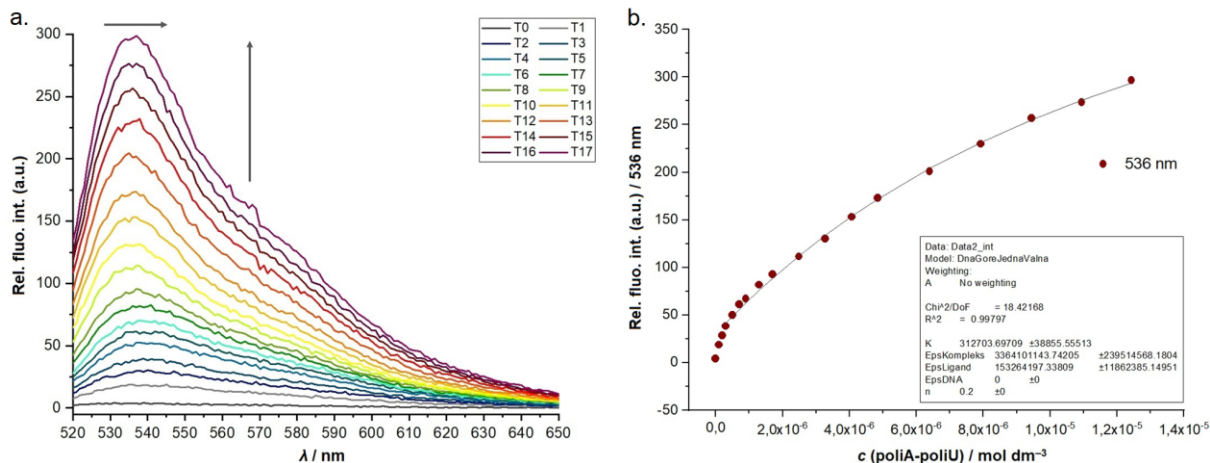
Slika D10. a. Promjene u fluorescencijskom spektru **AK-1** ($c = 2,0 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$) tijekom titracije s **poli(dAdT)₂** ($c = 1,0 \times 10^{-7}$ - $7,1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) uz pobudu pri $\lambda_{\text{exc}} = 508 \text{ nm}$ u puferu natrijeva kakodilata ($I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,00) b. ovisnost intenziteta fluorescencije pri $\lambda = 529 \text{ nm}$ o koncentraciji **poli(dAdT)₂**



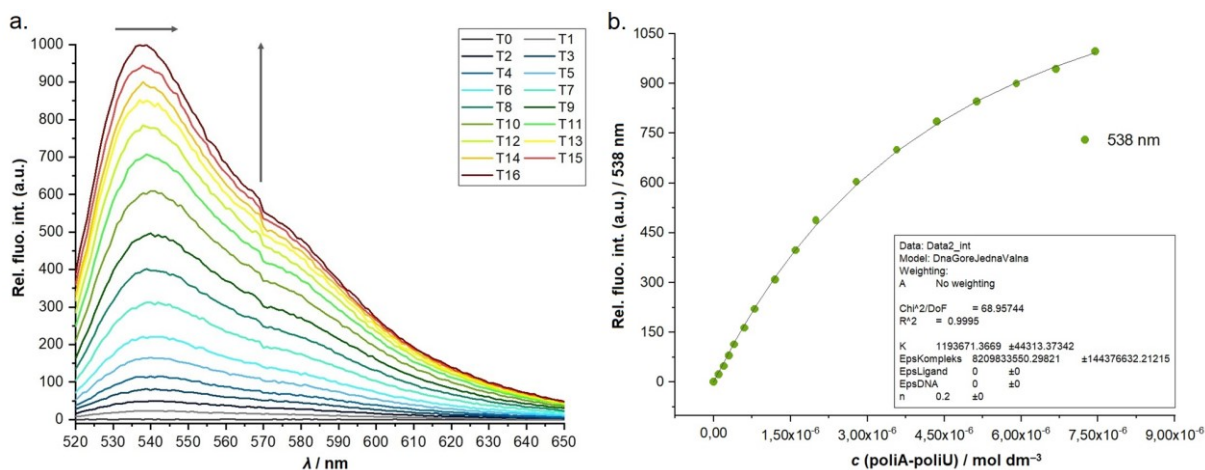
Slika D11. a. Promjene u fluorescencijskom spektru **AK-2** ($c = 2,0 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$) tijekom titracije s **poli(dAdT)₂** ($c = 1,0 \times 10^{-7}$ - $8,2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$) uz pobudu pri $\lambda_{\text{exc}} = 508 \text{ nm}$ ($I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,00) b. ovisnost intenziteta fluorescencije pri $\lambda = 530 \text{ nm}$ o koncentraciji **poli(dAdT)₂** u puferu natrijeva kakodilata



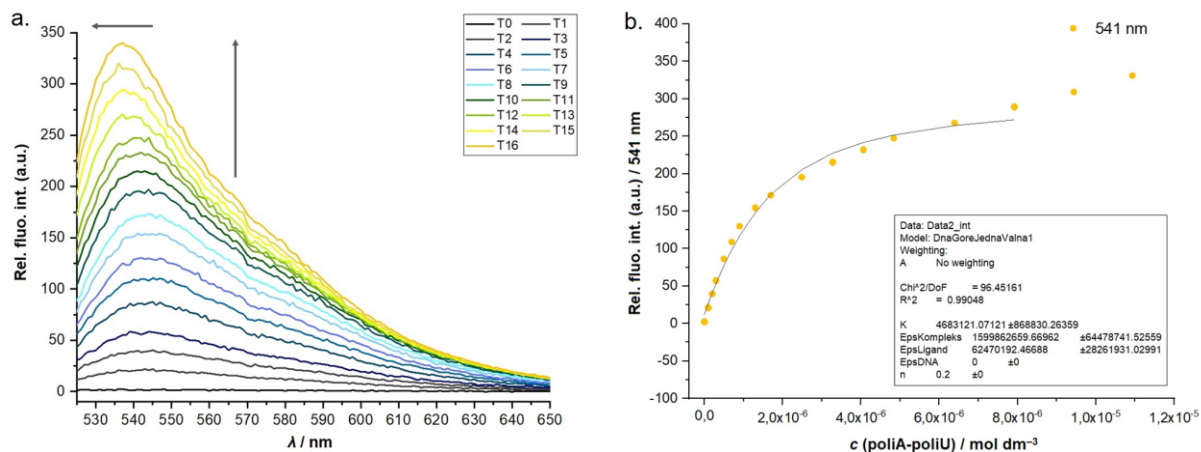
Slika D12. a. Promjene u fluorescencijskom spektru **AK-3** ($c = 2,0 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$) tijekom titracije s **poli(dAdT)₂** ($c = 1,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) uz pobudu pri $\lambda_{\text{exc}} = 508 \text{ nm}$ u puferu natrijeva kakodilata ($I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,00) b. ovisnost intenziteta fluorescencije pri $\lambda = 530 \text{ nm}$ o koncentraciji **poli(dAdT)₂**



Slika D13. a. Promjene u fluorescencijskom spektru **AK-1** ($c = 2,0 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$) tijekom titracije s **poli A-poli U** ($c = 1,0 \times 10^{-7} - 1,2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) uz pobudu pri $\lambda_{\text{exc}} = 508 \text{ nm}$ u puferu natrijeva kakodilata ($I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,00) b. ovisnost intenziteta fluorescencije pri $\lambda = 536 \text{ nm}$ o koncentraciji **poli A-poli U**

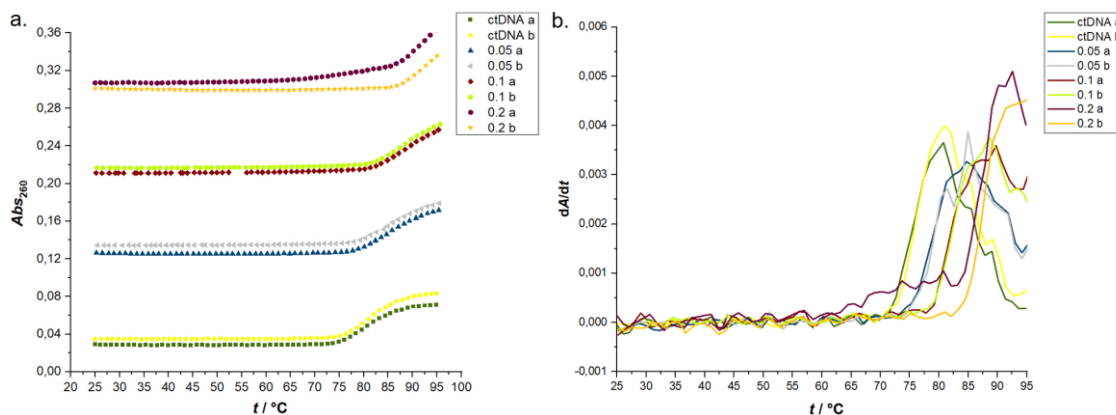


Slika D14. a. Promjene u fluorescencijskom spektru **AK-2** ($c = 2,0 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$) tijekom titracije s **poli A-poli U** ($c = 1,0 \times 10^{-7} - 7,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) uz pobudu pri $\lambda_{\text{exc}} = 508 \text{ nm}$ u puferu natrijeva kakodilata ($I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,00) b. ovisnost intenziteta fluorescencije pri $\lambda = 538 \text{ nm}$ o koncentraciji **poli A-poli U**

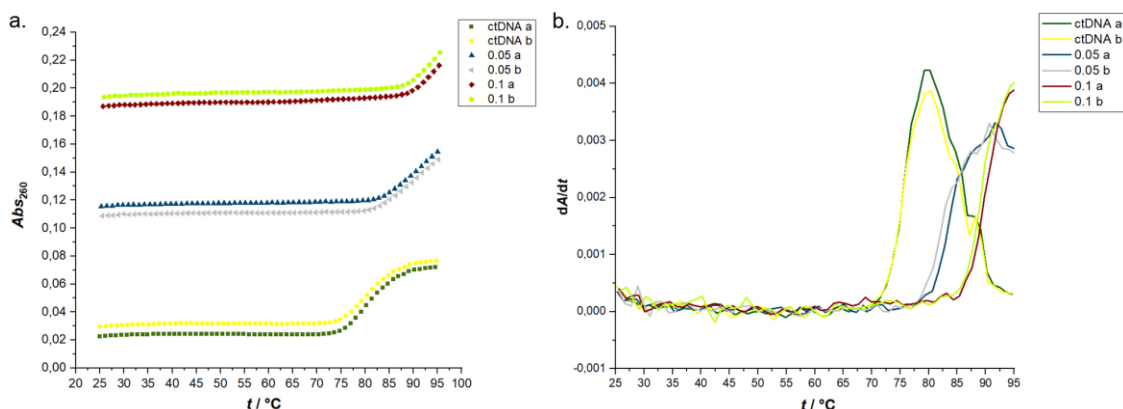


Slika D15. a. Promjene u fluorescencijskom spektru **AK-3** ($c = 2,0 \times 10^{-7}$ mol dm⁻³) tijekom titracije s **poli A-polu U** ($c = 1,0 \times 10^{-7}$ - $1,1 \times 10^{-5}$ mol dm⁻³) uz pobudu pri $\lambda_{\text{exc}} = 508$ nm u puferu natrijeva kakodilata ($I = 0,05$ mol dm⁻³, pH 7,00) b. ovisnost intenziteta fluorescencije pri $\lambda = 541$ nm o koncentraciji **poli A-polu U**

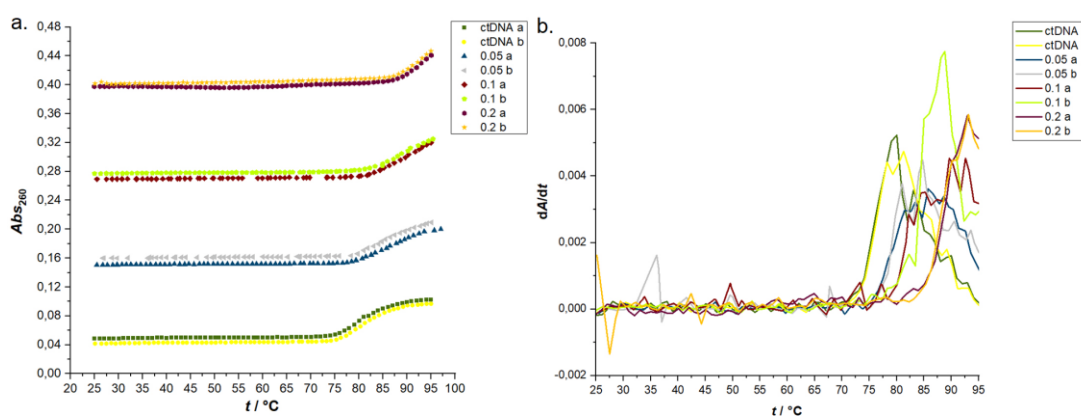
8.3. Podaci i spektri vezani uz metodu temperaturnog mekšanja



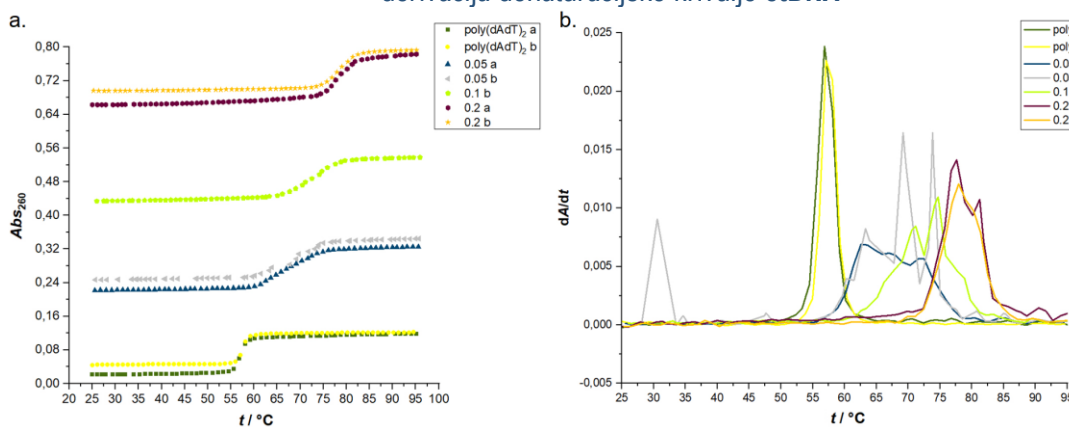
Slika D16. a. krivulja mekšanja **ctDNA** ($c = 1,06 \times 10^{-2}$ mol dm⁻³) uz dodatak **AK-1** u omjerima $r_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]} = 0,05, 0,1$ i $0,2$ u puferu natrijeva kakodilata ($I = 0,05$ mol dm⁻³, pH 7,00) b. prva derivacija denaturacijske krivulje **ctDNA**



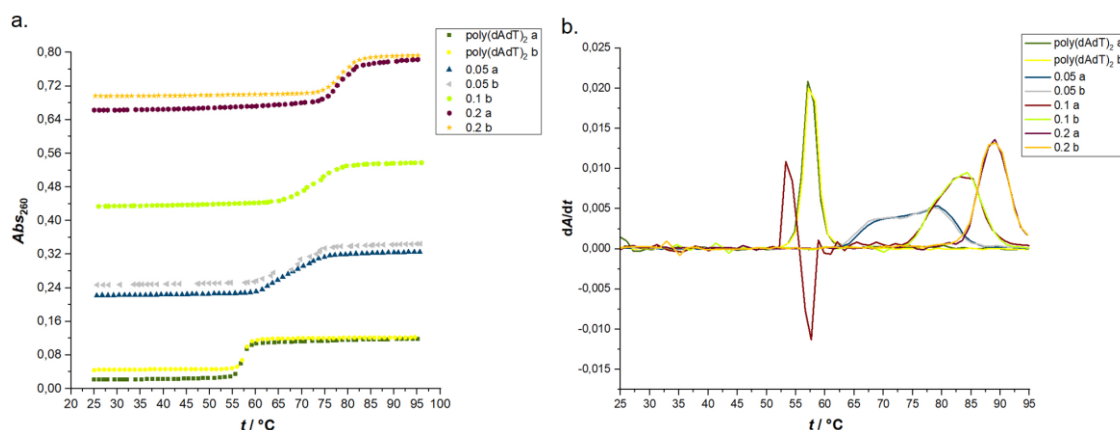
Slika D17. a. krivulja mekšanja ctDNA ($c = 1,06 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) uz dodatak AK-2 u omjerima r [spoj]/[polinukleotid] = 0,05 i 0,1 u puferu natrijeva kakovilata ($I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,00) b. prva derivacija denuracijske krivulje ctDNA



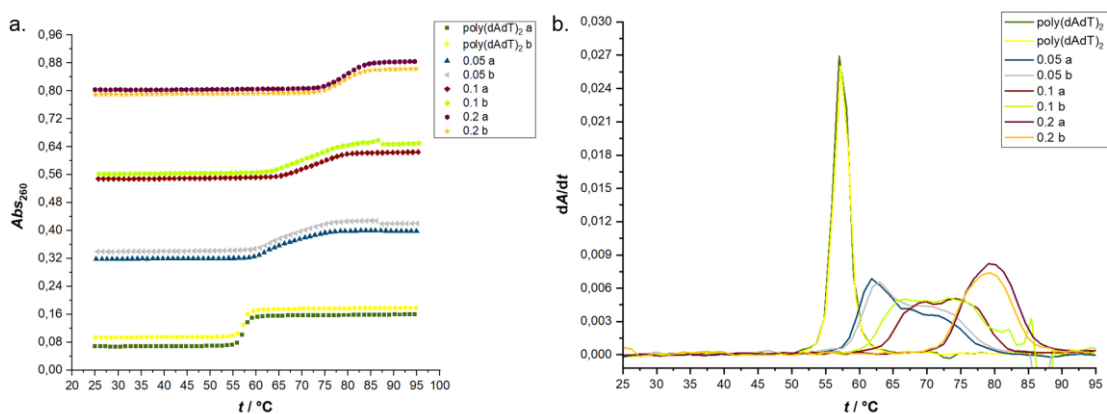
Slika D18. a. krivulja mekšanja ctDNA ($c = 1,06 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) uz dodatak AK-3 u omjerima r [spoj]/[polinukleotid] = 0,05, 0,1 i 0,2 u puferu natrijeva kakovilata ($I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,00) b. prva derivacija denuracijske krivulje ctDNA



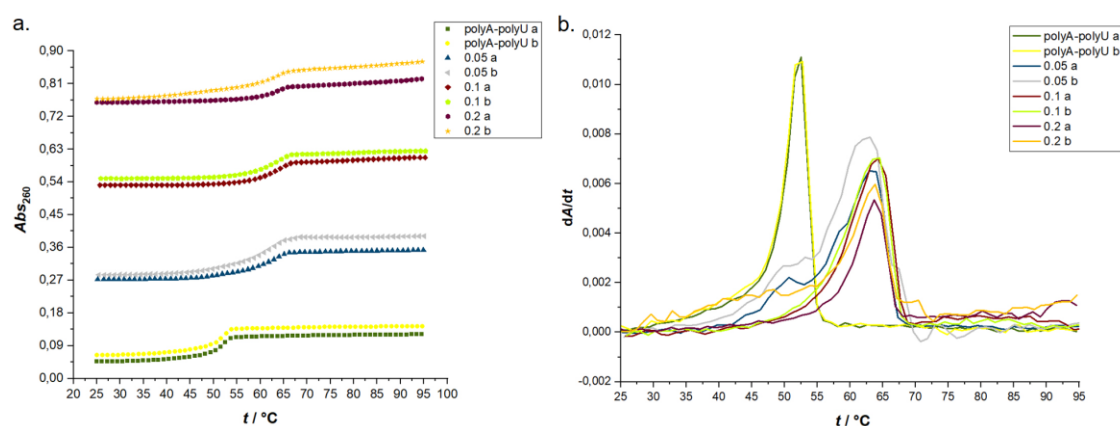
Slika D19. a. krivulja mekšanja poli(dAdT)₂ ($c = 2,10 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) uz dodatak AK-1 u omjerima r [spoj]/[polinukleotid] = 0,05, 0,1 i 0,2 u puferu natrijeva kakovilata ($I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,00) b. prva derivacija denuracijske krivulje poli(dAdT)₂



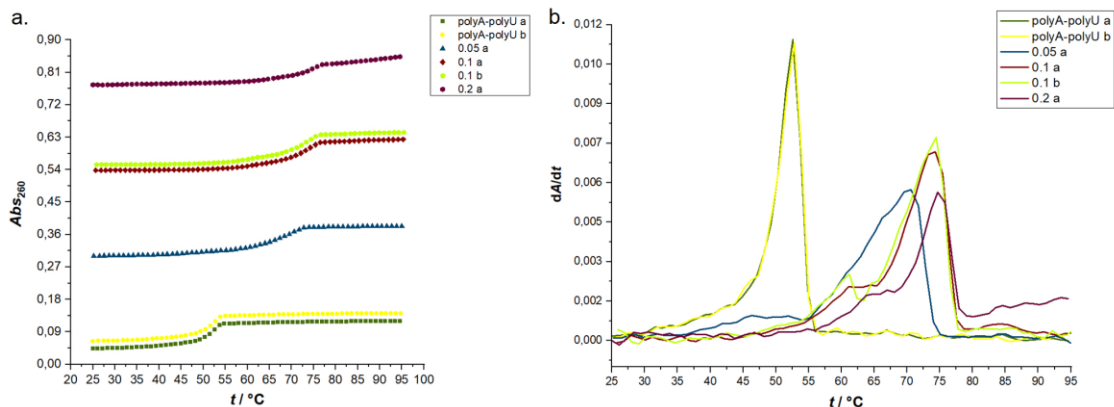
Slika D20. a. krivulja mekšanja **poli(dAdT)₂** ($c = 2,10 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) uz dodatak **AK-2** u omjerima $r_{[spoj]}/[polinukleotid] = 0,05, 0,1 \text{ i } 0,2$ u puferu natrijeva kakodilata ($I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,00) b. prva derivacija denaturacijske krivulje **poli(dAdT)₂**



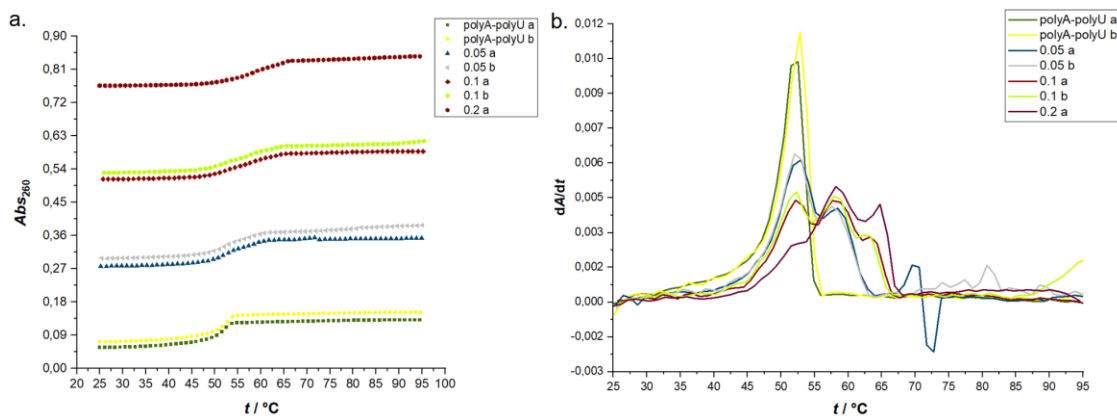
Slika D21. a. krivulja mekšanja **poli(dAdT)₂** ($c = 2,10 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) uz dodatak **AK-3** u omjerima $r_{[spoj]}/[polinukleotid] = 0,05, 0,1 \text{ i } 0,2$ u puferu natrijeva kakodilata ($I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,00) b. prva derivacija denaturacijske krivulje **poli(dAdT)₂**



Slika D22. a. krivulja mekšanja **poli A-poli U** ($c = 1,26 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) uz dodatak **AK-1** u omjerima $r_{[spoj]}/[polinukleotid] = 0,05, 0,1 \text{ i } 0,2$ u puferu natrijeva kakodilata ($I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,00) b. prva derivacija denaturacijske krivulje **poli A-poli U**



Slika D23. a. krivulja mekšanja **poli A-poli U** ($c = 1,26 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) uz dodatak **AK-2** u omjerima $r_{[spoj]}/[polinukleotid] = 0,05, 0,1 \text{ i } 0,2$ u puferu natrijeva kakodilata ($I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,00) b. prva derivacija derivacija denaturacijske krivulje **poli A-poli U**



Slika D24. a. krivulja mekšanja **poli A-poli U** ($c = 1,26 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$) uz dodatak **AK-3** u omjerima $r_{[spoj]}/[polinukleotid] = 0,05, 0,1 \text{ i } 0,2$ u puferu natrijeva kakodilata ($I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,00) b. prva derivacija derivacija denaturacijske krivulje **poli A-poli U**

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Petra Mihovilović

Datum rođenja: 22. rujna 1997.

Mjesto rođenja: Split

Obrazovanje

2004.–2012. Osnovna škola *Braća Seljan*, Karlovac

2012.–2016. Gimnazija Karlovac, Karlovac

2016.-2019. Preddiplomski studij Kemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

2019.-2021. Diplomski studij kemije, smjer: Analitička kemija i biokemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2019. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka (Dan i noć na PMF-u)

Nagrade i priznanja

2017.-2019. Državna stipendija u STEM područjima znanosti