

# Ispitivanje interakcija peptidnih derivata fenantridina s DNA i RNA

---

Jurić, Ivona

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:483045>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-20**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Ivona Jurić

# **ISPITIVANJE INTERAKCIJA PEPTIDNIH DERIVATA FENANTRIDINA S DNA I RNA**

## **Diplomski rad**

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

Zagreb, 2023.



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).

Predan je na ocjenu Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu radi stjecanja zvanja

*magistra kemije*



## **Zahvale**

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

*Zahvaljujem se i svima u Laboratoriju za biomolekulske interakcije i spektroskopiju na pristupačnosti i ugodnoj radnoj atmosferi.*

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

*Hvala mojim najbližima na podršci i razumijevanju tijekom svih ovih godina studiranja!*



## Sadržaj

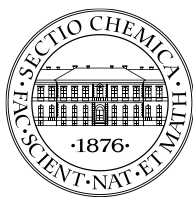
<b>SAŽETAK.....</b>	<b>X</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>15</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1. Nukleinske kiseline.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2. Interakcije malih molekula s polinukleotidima.....</b>	<b>20</b>
<b>2.3. Fenantridini .....</b>	<b>22</b>
2.3.1. Svojstva fenantridina.....	23
2.3.2. Utjecaj supstituenta.....	24
<b>2.4. Spektroskopske metode ispitivanja interakcija malih organskih molekula s DNA i RNA molekulama.....</b>	<b>26</b>
2.4.1. UV/VIS spektroskopija .....	27
2.4.2. Temperaturno mekšanje polinukleotida.....	29
2.4.3. Fluorescencijska spektroskopija .....	31
2.4.4. Cirkularni dikroizam.....	34
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>37</b>
<b>3.1. Materijali .....</b>	<b>37</b>
3.1.1. Kemikalije .....	37
3.1.2. Uređaji.....	38
<b>3.2. Spektroskopska karakterizacija spojeva .....</b>	<b>38</b>
<b>3.3. Istraživanje interakcija spojeva s polinukleotidima .....</b>	<b>39</b>
3.3.1. Fluorimetrijske titracije .....	39
3.3.2. Temperaturno mekšanje.....	40
3.3.3. CD titracije .....	41
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>42</b>
<b>4.1. Spektroskopska karakterizacija spojeva R201, R222 i R223.....</b>	<b>42</b>
4.1.1. Spektroskopska karakterizacija spojeva pri pH = 7,00 i pH = 5,00.....	42
4.1.2. Fluorescencijski spektri spojeva pri pH = 7,00 i pH = 5,00 .....	45
4.1.3. CD spektri spojeva R201, R222 i R223 .....	47
<b>4.2. Ispitivanje interakcija spojeva R201, R222 i R223 s polinukleotidima.....</b>	<b>48</b>
4.2.2. Temperaturno mekšanje.....	51
4.2.3. Cirkularni dikroizam.....	53
<b>§ 5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>56</b>



---

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	58
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	60
§ 8. DODATAK.....	XV
§ 9. ŽIVOTOPIS .....	XLI





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

Diplomski rad

## SAŽETAK

### ISPITIVANJE INTERAKCIJA PEPTIDNIH DERIVATA FENANTRIDINA S DNA I RNA

Ivona Jurić

U okviru ovog diplomskog rada spektroskopski su okarakterizirane vodene otopine tri nova derivata fenantridina s aminokiselinskim supstituentima (glicin, lizin) i gvanidinokarbonilpirolnom jedinicom. Fenantridin je poznati fluorescentni marker za polinukleotide i proteine dok aminokiselinski supstituenti pružaju dodatne mogućnosti za interakcije s biološkim makromolekulama.

Konstante stabilnosti kompleksa ispitivanih spojeva s različitim DNA i RNA polinukleotidima određene su metodom fluorescencijske spektroskopije. Način vezanja peptidnih derivata fenantridina na DNA i RNA polinukleotide određen je eksperimentima temperature mekšanja polinukleotida i spektroskopijom cirkularnog dikroizma. Konstante stabilnosti kompleksa ispitivanih derivata s polinukleotidima izračunate su pomoću Scatchardove jednadžbe metodom nelinearne regresije. Dobiveni rezultati ukazuju na vezanje spojeva (najvjerojatnije u obliku dimera) u utore DNA i RNA te uzduž fosfatne okosnice polinukleotida.

(XV + 60 stranica, 38 slika, 6 tablica, 43 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, fenantridini, fluorescencija

Mentor: dr. sc. Marijana Radić Stojković, zn. savj.

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

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
  2. izv. prof. dr. sc. Ivica Đilović
  3. izv. Prof. dr. sc. Đani Škalamera
- Zamjena: doc. dr. sc. Adriana Kendel

Datum diplomskog ispita: 28. rujna 2023.





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

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### STUDY OF INTERACTIONS OF PEPTIDE PHENANTHRIDINE DERIVATIVES WITH DNA AND RNA

Ivona Jurić

In the scope of this thesis, aqueous solutions of three new phenanthridine derivatives with amino acid substituents (glycine, lysine) and a guanidinocarbonylpyrrole unit were spectroscopically characterized. Phenanthridine is a known fluorescent marker for polynucleotides and proteins. Amino acid substituents provide additional possibilities for interactions with biological macromolecules. The stability constants of the complexes of the studied compounds with different DNA and RNA polynucleotides were determined by fluorescence spectroscopy. The binding mode of peptide phenanthridine derivatives to DNA and RNA polynucleotides was determined by thermal melting experiments and circular dichroism spectroscopy. The stability constants of the compound-polynucleotide complexes were calculated by the Scatchard equation using the nonlinear regression method. The obtained results indicate the binding of compounds (most likely in the form of dimers) in the grooves of DNA and RNA and along the phosphate backbone of polynucleotides.

(XV + 60 pages, 38 figures, 6 tables, 43 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, fluorescence, phenanthridine

Mentor: dr. sc. Marijana Radić Stojković, Senior Scientist

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

Reviewers:

1. Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor
  2. Dr. Ivica Đilović, Assoc. Prof.
  3. Dr. Đani Škalamera, Assoc. Prof.
- Substitute: Dr. Adriana Kendel, Assist. Prof.

Date of exam: 28.9.2023.





## § 1. UVOD

Nukleinske kiseline nose nasljednu informaciju, odnosno kodiraju redoslijed aminokiselina za sintezu proteina, a samim time izravno ili neizravno utječu na strukturu i funkciju stanica. Zbog svojih esencijalnih funkcija u stanici (replikacija, transkripcija i translacija) DNA i RNA predstavljaju odlične molekulske mete u antitumorskoj terapiji.<sup>1</sup> Interakcije malih organskih molekula s nukleinskim kiselinama zanimljive su za istraživanje zbog velike primjene u biokemiji i medicini.<sup>1</sup> Biološka aktivnost mnogih lijekova temelji se na interakcijama malih organskih molekula s DNA i RNA makromolekulama. Male organske molekule se najčešće nekovalentno vežu na polinukleotide bilo interkaliranjem, vezanjem u mali ili veliki utor uzvojnice ili elektrostatskim međudjelovanjem.<sup>2</sup>

Heterocikličke molekule s atomom dušika u strukturi zanimljive su za istraživanje zbog njihove reaktivnosti i bioloških svojstava, a posebice su zanimljivi fenantridini čija se jezgra može naći u mnogim spojevima u prirodi. U ovom diplomskom radu ispitan je afinitet i način vezanja tri peptidna derivata fenantridina na prirodnu DNA (dobivenu iz timusa goveda) te sintetske DNA i RNA molekule, a također je ispitan utjecaj supstituenta na afinitet i način vezanja. Ovi fenantridinski derivati u svojoj strukturi sadrže aminokiselinske supstituente (glicin, lizin) i gvanidinokarbonilpirolnu jedinicu. Interakcije derivata fenantridina s DNA i RNA molekulama ispitane su metodama UV/VIS i fluorescencijske spektroskopije i spektroskopije cirkularnog dikroizma (CD).<sup>3,4</sup>

CD titracijama i eksperimentima temperaturnog mekšanja ispitan je način vezanja cijaninskih boja na dvolančane polinukleotide. Konstante stabilnosti  $K_s$  kompleksa ispitivanih spojeva s DNA i RNA određene su metodom fluorescencijske spektroskopije, a izračunate su pomoću Scatchardove jednadžbe metodom nelinearne regresije za spektroskopski aktivni kompleks.

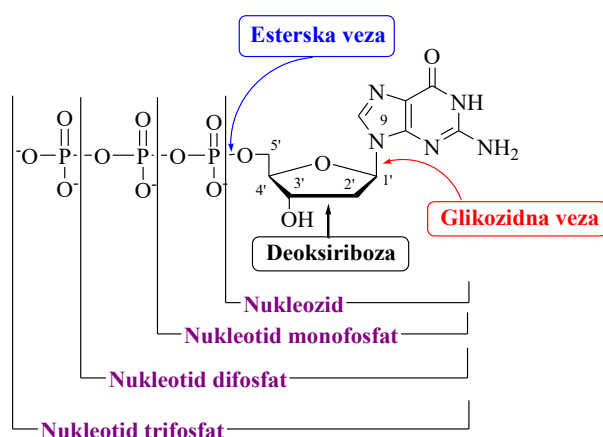


## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Nukleinske kiseline

Nukleinske kiseline su organske makromolekule građene od nukleotida. Nose nasljednu informaciju, tj. kodiraju redoslijed aminokiselina za sintezu proteina, te stoga izravno ili neizravno utječu na strukturu i funkciju stanica.<sup>5</sup>

Postoje dva tipa nukleinskih kiselina: deoksiribonukleinska kiselina (DNA) i ribonukleinska kiselina (RNA). Građene su od dušičnih baza, fosfatnih i šećernih skupina. Glavna razlika između tih nukleinskih kiselina je u vrsti šećerne skupine. U deoksiribonukleinskoj kiselini šećerna jedinica je 2 – deoksiriboza, dok je u ribonukleinskoj kiselini šećerna jedinica riboza. Fosfatna skupina veže se fosfodieterskom vezom na 3' – hidroksilnu skupinu jedne šećerne jedinice sa 5' – hidroksilnom skupinom druge šećerne jedinice. Slika 1 shematski prikazuje građevne jedinice nukleinskih kiselina.

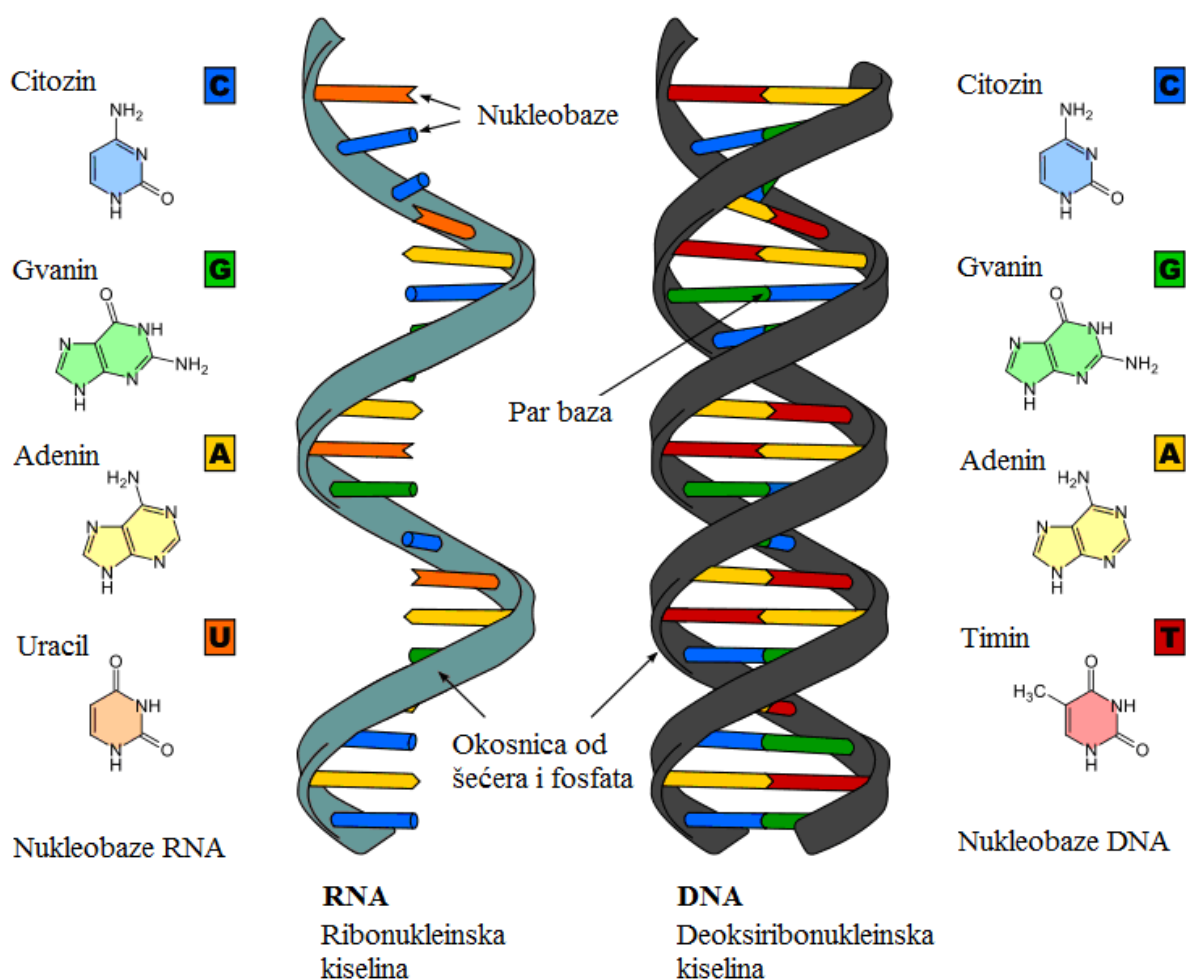


Slika 1. Shematski prikaz građevnih jedinica nukleinskih kiselina.

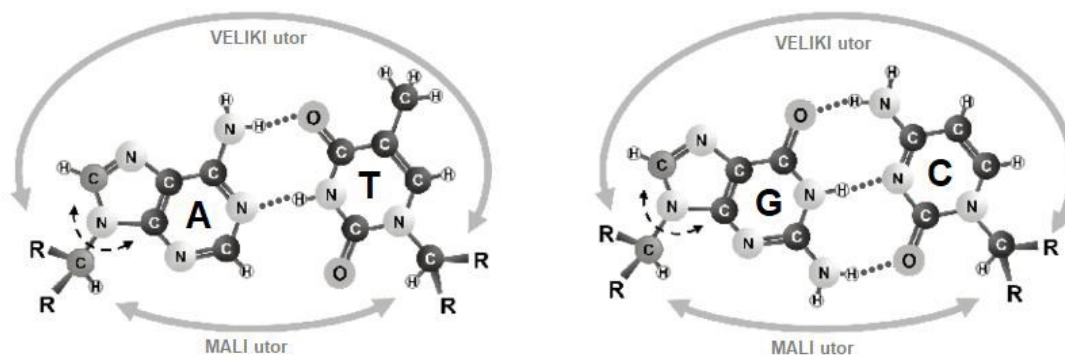
Kod nukleinskih kiselina razlikuju se purinski i pirimidinski derivati dušičnih baza. Purinski derivati imaju dvostruki prsten, a to su: adenin (A) i gvanin (G). Pirimidinske dušične baze imaju jedan prsten. Kod DNA su prisutne pirimidinske baze, citozin (C) i timin (T). Još jedna razlika između DNA i RNA nukleinskih kiselina je ta što je u RNA umjesto dušične baze timina prisutan uracil (U) koji na C5 atomu umjesto metilne skupine ima vezan vodikov atom. Nukleinske kiseline imaju tri strukturne razine: primarna, sekundarna i tercijarna struktura. Proučavanjem primarne uočava se slijed nukleotida u polinukleotidnom lancu, sekundarnom

je vidljiva lokalna uređenost lanca, a tercijarna prikazuje prostorni raspored elemenata iz sekundarne strukture.

Dva antiparalelna lanca u fiziološkim uvjetima tvore dvostruku desnu uzvojniju DNA. Okosnicu DNA uzvojnice čine fosfatne skupine koje su pri fiziološkim uvjetima u anionskom obliku, te hidrofilne šećerne skupine. Unutrašnjost čine hidrofobne dušične baze koje se povezuju hidrofobnim  $\pi - \pi$  aromatskim inetrakcijama kako bi smanjile doticaj s vodom. Ovim su načinom povezivanja ravnine pirimidinskih i purinskih baza paralelne, jedna iznad druge. Osim van der Waalsovih i dipol – dipol interakcija, stabilnosti polinukleotida doprinose i vodikove veze između parova dušičnih baza. Najčešće sparivanje parova dušičnih baza je Watson – Crickovo, prema kojem dolazi do sparivanja adenina i timina (odnosno uracila u slučaju RNA), (A – T (U)) dvjema vodikovim vezama, te citozina i gvanina (C – G) trima vodikovim vezama (slika 3).<sup>6</sup> Na slici 2 shematski su prikazane RNA i DNA nukleinske kiseline.

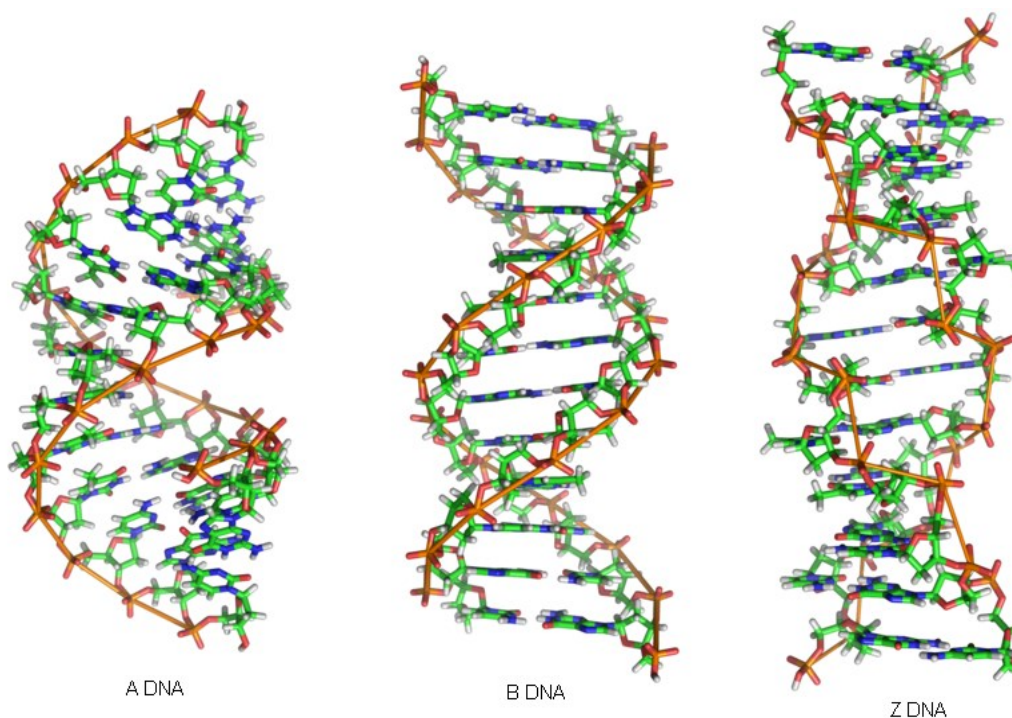


Slika 2. Shematski prikaz RNA, DNA i nukleobaza.



Slika 3. Watson – Crickovi parovi baza.

Danas su poznata i kristalografski potvrđena, tri strukturna oblika DNA uzvojnice, A, B i Z oblik (slika 4).



Slika 4. Strukturni oblici DNA.

Najčešći oblik DNA uzvojnice je B – oblik, dok A – oblik imaju RNA – DNA hibridi i dijelovi RNA sa strukturom dvostruke uzvojnice. Z – DNA oblik imaju oligonukleotidi s alternirajućim slijedom (naizmjenično ponavljanje purin – pirimidin – purin...) pirimidina (T i C) i purina (G i A). A i B – DNA imaju desnu uzvojnica, dok Z – DNA ima lijevu. B – DNA

ima dva vanjska utora uvijena oko okosnice. Utori su različitih veličina te se zbog toga zovu veliki i mali utor.<sup>7,8</sup> U tablici 1 navedena su strukturna obilježja sva tri oblika DNA.

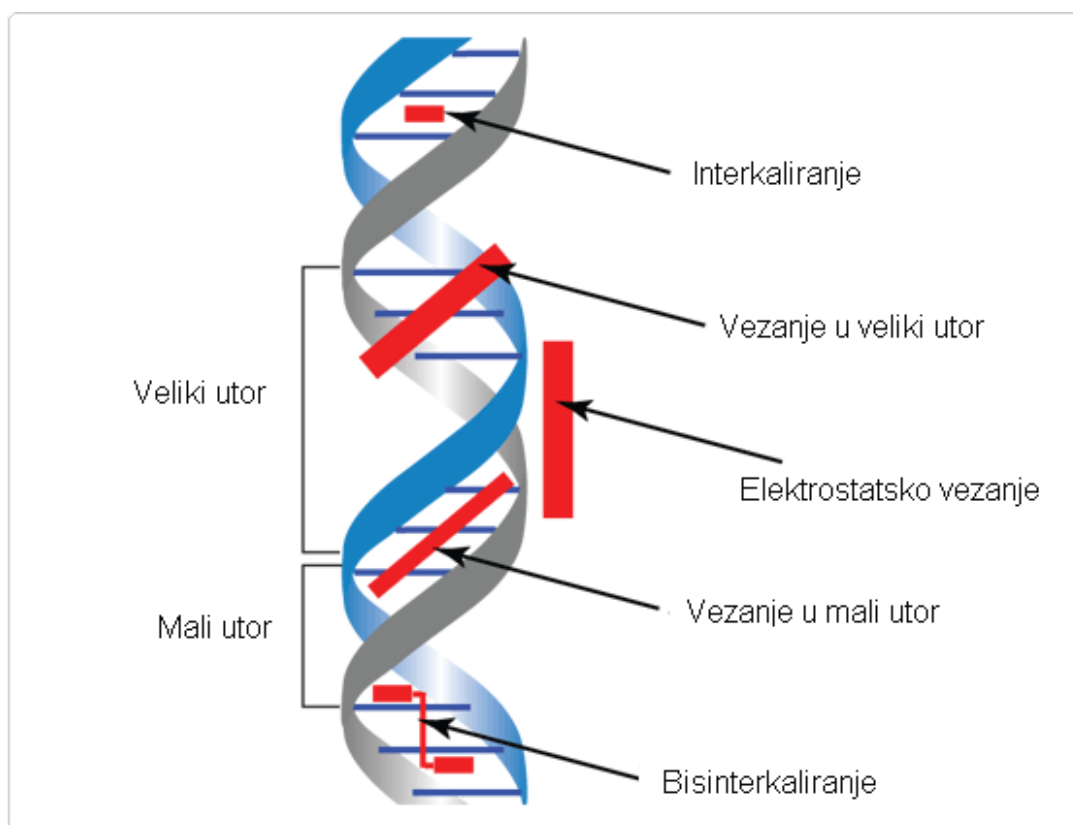
**Tablica 1.** Strukturna svojstva A – , B – i Z – DNA.

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>Z</b>
Zavijenost	desna	desna	lijeva
Broj parova baza u jednom navoju	11	10,4	12
Promjer / Å	25,5	23,7	18,4
Pomak po osi uzvojnice po zavoju / Å	25,3	35,4	45,6
Glikozidna veza <sup>1</sup>	<i>anti</i>	<i>anti</i>	naizmjenično <i>sin</i> i <i>anti</i>
Nagib baza okomito na os uzvojnice / °	20	6	7
Veliki utor	uzak i dubok	širok i dubok	plosnat
Mali utor	širok i plitak	uzak i dubok	uzak i dubok

*Sin* i *anti* se odnose na orijentaciju N-glikozidne veze između baze i deoksiriboze. U *anti* položaju baza je udaljena od deoksiriboze dok je u *sin* položaju baza iznad deoksiriboze. Pirimidini mogu biti samo u *anti* orijentaciji, a purini mogu biti i u *sin* i *anti* orijentaciji. Prirodni polinukleotid koji se najčešće koristi u preliminarnim istraživanjima je DNA izolirana 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.<sup>9</sup>

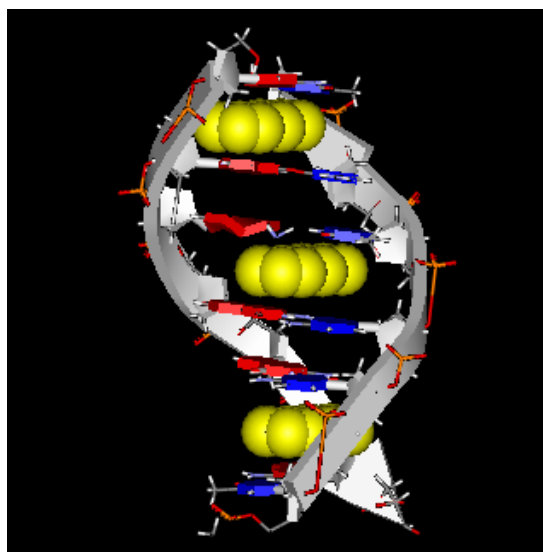
## 2.2. Interakcije malih molekula s polinukleotidima

Postoje dva tipa interakcija malih organskih molekula s polinukleotidima, ireverzibilni i ravnotežni tip interakcija. Na interakcije malih organskih molekula s polinukleotidima, zbog kompleksne strukture polinukleotida, utječu faktori kao što su: elektrostatsko privlačenje fosfata okosnice s malim organskim molekulama, vodikove veze, Londonove sile, hidrofobni efekt, Van der Waalsove i  $\pi - \pi$  interakcije.<sup>2</sup> Ireverzibilnim interakcijama nastaje ili kovalentna veza između male molekule i polinukleotida ili dolazi do cijepanja polinukleotidnog lanca. U ovoj vrsti interakcija sudjeluju alkilirajući agensi i sredstva za cijepanje DNA. Najčešći oblik interakcija malih organskih molekula i polinukleotida je nekovalentno vezanje koje je prisutno kod drugog tipa interakcija, ravnotežnih interakcija. Mala organska molekula može prepoznati polinukleotidni slijed ili strukturni oblik polinukleotida pri čemu se formira termodinamički najstabilniji nekovalentni kompleks. Najčešći tipovi nekovalentnog vezanja malih organskih molekula i polinukleotida prikazani su na slici 5, a to su: interkaliranje, vezanje u mali ili veliki utor uzvojnice, elektrostatsko međudjelovanje i bisinterkaliranje.<sup>10,11</sup>



Slika 5. Prikaz nekovalentnih interakcija malih organskih molekula s polinukleotidima.

Kod interkaliranja dolazi do umetanja malih planarnih molekula između parova baza što stabilizira i ukružuje polinukleotidni lanac. Kako bi interkaliranje bilo moguće, fosfatne skupine se moraju otvoriti te time dolazi do izduženja uzvojnice (za  $\sim 3,4$  Å). Zbog narušavanja strukture molekule DNA ovim se tipom interakcije sljedeća molekula ne može interkalirati na susjedno mjesto u DNA molekuli, nego dolazi do principa isključenja susjeda, tj. do vezanja interkalatora na svako drugo mjesto u molekuli DNA što prikazuje slika 6.<sup>12</sup>



**Slika 6.** Model principa isključenja susjeda kod interkaliranja.

Kao interkalatori se najčešće koriste pozitivno nabijene molekule koje prvotno elektrostatskim interakcijama stupaju u interakciju s negativno nabijenim fosfatnim skupinama polinukleotida, a dodatna stabilizacija potječe od hidrofobnih interakcija s DNA i RNA molekulama. Potom dolazi do preklapanja sa susjednim bazama i slaganja kompleksa  $\pi - \pi$  interakcijama. Stabilizaciji i destabilizaciji doprinose interakcije supstituenta i heterocikličkih atoma interkalatora s dijelom polinukleotida. Interkaliranjem dolazi do promjene u apsorpcijskim UV/VIS i fluorescencijskim spektrima što omogućava upotrebu interkalatora kao markera. Najbolji primjer takvog interkalatora jest etidijev bromid, EB, kod kojeg nakon pobuđivanja UV zračenjem dolazi do porasta fluorescencije u narančastom dijelu VIS spektra. Do porasta fluorescencije EB došlo je zbog prelaska iz polarne vodene otopine u nepolarnu unutrašnjost uzvojnice.<sup>2,13,14</sup>

Da bi došlo do vezanja u mali ili veliki utor DNA molekule potrebne su male organske molekule izduženih struktura s funkcionalnim skupinama koje mogu tvoriti vodikove veze. U organizmu, većina proteina se veže u velike utore DNA, dok se u male utore mogu vezati lijekovi. Vrste interakcija spojeva koji se vežu u veliki ili mali utor DNA su: vodikove veze između spoja i baza nukleinskih kiselina, elektrostatske interakcije pozitivno nabijenih skupina spoja i AT-regija u malom utoru koje imaju negativni elektrostatski potencijal, van der Waalsove interakcije s dnom i zidovima utora, specifične vodikove veze tipa voda-spoj-DNA. Dvolančane RNA imaju širok i plitak utor te ne podržavaju vezanje malih organskih molekula u mali utor te je stoga vezanje malih organskih molekula u mali utor DNA specifično.<sup>15,16</sup>

Elektrostatskim međudjelovanjem dolazi do interakcije pozitivnih naboja male organske molekule s negativno nabijenim fosfatnim skupinama te takvo vezanje nije niti specifično niti selektivno.<sup>2,16</sup>

Bisinterkalatori se sastoje od dvije planarne molekule premoštene lancem različite duljine. Sintetskim bisinterkalatorima uz dobar afinitet prema DNA molekulama nedostaje specifičnost prema određenim sljedovima.<sup>15,16</sup>

### 2.3. Fenantridini

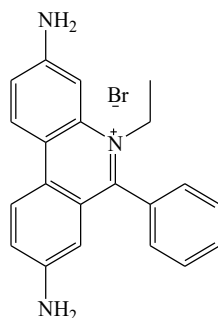
Fenantridini su analozi fenantrena kojima je ugljikov atom C9 zamijenjen dušikovim atomom (slika 7).



Slika 7. a) fenantridin b) fenantren.

Jedan od najpoznatijih fenantridinskih spojeva je etidij-bromid (EB; 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridinij-bromid) čija je struktura prikazana na slici 8. Riječ je o fenantridinskom tripanocidu, interkalatoru, koji se koristi za liječenje afričke tripanosomijaze, bolesti spavanja kod stoke. Nije ga moguće koristiti u liječenju ljudi zbog mutagenosti. 1952. godine farmaceutska tvrtka Boots objavila je sintezu ovog spoja, čije se djelovanje temelji na inhibiciji nukleinskih kiselina tripanosoma, interkalacijom između parova baza DNA. Osim

antiparazitske aktivnosti, etidij – bromid pokazuje i antitumorska te antivirusna djelovanja. Primjenjuje se i u spektrofotometrijskim istraživanjima kao fluorescentni marker za polinukleotide jer se s velikim afinitetom i specifično veže na dvostruke zavojnice DNA i RNA.<sup>17</sup>

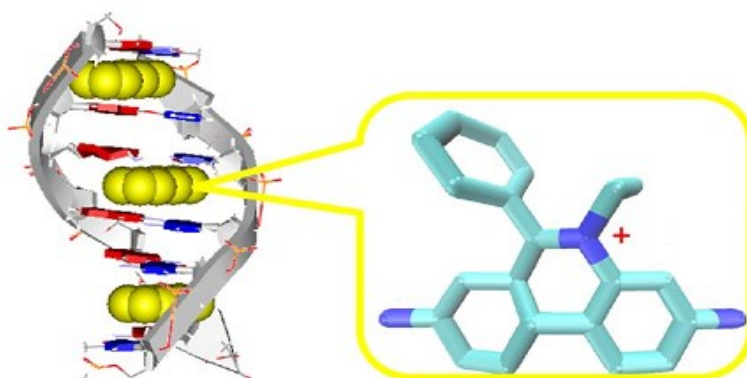


**Slika 8.** Struktura etidij-bromida.

Otkrićem alkaloidnih fenantridinskih spojeva s biološkim djelovanjem, fenantridini su ponovno u interesu istraživanja. Za alkaloidne fenantridinske derivate kao što su sangvinarin i keleritrin dokazano je da uzrokuju apoptozu različitih tumorskih stanica te su kandidati za razvoj novih lijekova s antitumorskim djelovanjem.<sup>18</sup>

### 2.3.1. Svojstva fenantridina

Područje istraživanja fenantridina i njegovih derivata najčešće se bazira na proučavanju nekovalentnih interakcija s polinukleotidima. Veličina i zakrivljenost aromatske površine fenantridina odgovaraju prostoru između parova baza u polinukleotidima (slika 9), te su pogodni za interkaliranje.<sup>4</sup>



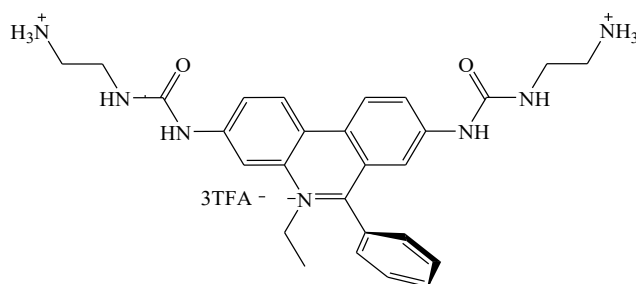
**Slika 9.** Shematski prikaz interkaliranja etidij-bromida (preuzeto i prilagođeno iz reference Tumir i sur.).



Velika polarizabilnost fenantridinskih derivata omogućava aromatske i elektrostatske interakcije s polinukleotidima što se može uočiti kod N5 alkiliranih derivata fenantridina, kao što je etidij bromid. Na jakost interakcija može se utjecati protoniranjem tog N5 atoma u kiselom mediju, a na spektroskopski odgovor (UV/VIS i fluorescencijska spektroskopija), utječu supstituenti na C3 i C8 atomima fenantridina (slika 7). Iz do sada objavljenih istraživanja o fenantridinima i derivatima može se izvući općeniti zaključak o njihovim svojstvima: 1) derivati fenantridina bez amino skupine (-NH<sub>2</sub>) pokazuju snažnu fluorescenciju u vodenoj otopini koja se gasi vezanjem s DNA molekulom, 2) derivati s jednom amino skupinom (koja je najčešće vezana na C8 atom) pokazuju malu promjenu fluorescencije i 3) derivati s dvije amino skupine (vezane na C3 i C8 atome) pokazuju slabu fluorescenciju uz snažan porast prilikom vezanja na DNA molekulu. Kako su te amino skupine odgovorne za mutagenost etidijevog bromida jer se u organizmu metabolički aktiviraju preko najmanje tri različita enzima, tako informacije dobivene istraživanjima idu u prilog tvrdnji da se derivatizacijom egzocikličkih amino skupina etidijevog bromida mogu dobiti biološki aktivni spojevi koji nisu mutageni.<sup>19,20</sup>

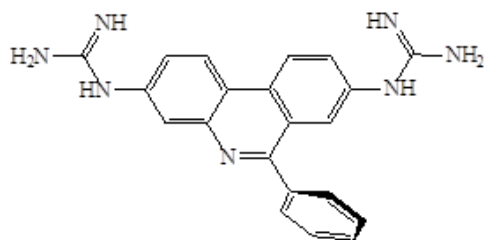
### 2.3.2. Utjecaj supstituenta

Kroz primjere dosad objavljenih istraživanja najbolje se uočava utjecaj supstituenta na fenantridinske derivate. Poznato je da fenantridinski derivat, etidijev bromid, ima sposobnost vezanja proteina HIV – 1 RRE, međutim, zbog toksičnosti nije upotrebljiv u ljudskoj terapiji. Stoga su Luedtke i suradnici sintetizirali spoj koji specifično inhibira HIV – 1 RRE. To su postignuli modifikacijom egzocikličkih amino skupina kojom se dobiju spojevi izmijenjene elektronske strukture s manjim afinitetom za DNA u odnosu na EB, te samim time i manje toksičnim. Također, elektronska struktura određuje selektivnost te je dobiven spoj veće specifičnosti za HIV – 1 REE (Rev-regulatorski protein virusa HIV-1, *engl. HIV-1 Rev Response Element*, HIV – 1 REE), a riječ je o 3,8-bis-urea-etilen-diamin-etidiju (slika 10).<sup>21</sup>



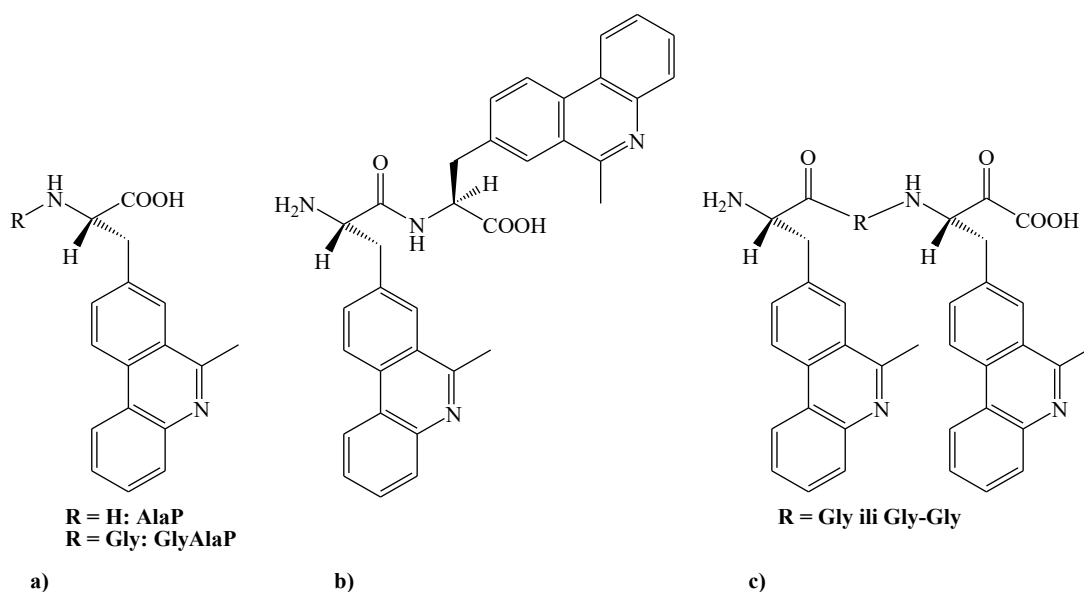
Slika 10. Struktura 3,8-bis-urea-etilen-diamin-etidija.

Idući primjer istraživanja derivata EB-a na svojstva fenantridina napravili su Bailly i suradnici. U ovom istraživanju radila se supstitucija egzocikličkih amino skupina gvanidinom, te je dobiven spoj koji se vezao u mali utor DNA što prikazuje slika 11. Međutim, ta promjena vezanja nije oslabila afinitet spoja prema DNA, čak ga je povećala u odnosu na EB.<sup>22,23</sup>



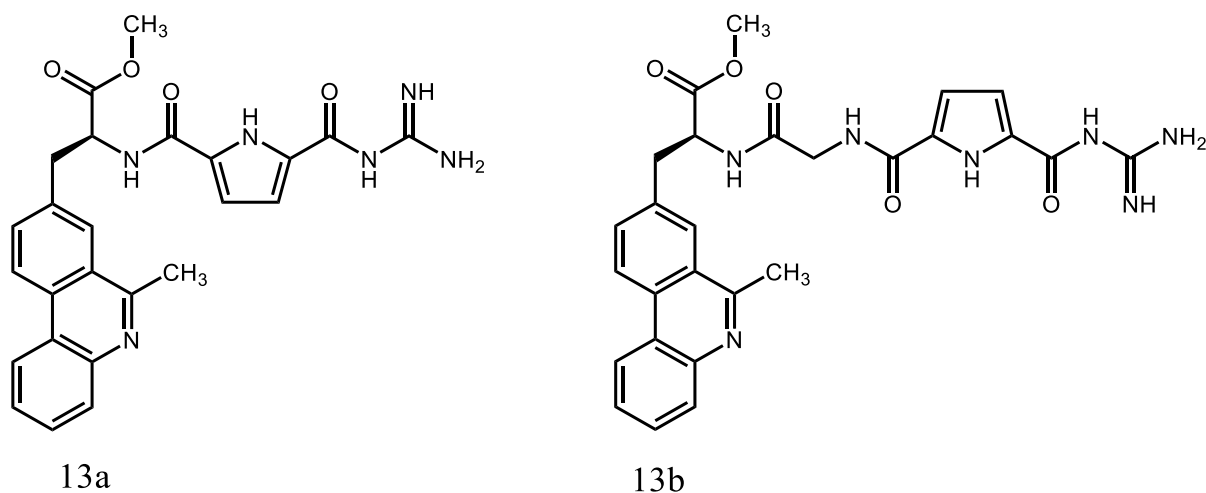
**Slika 11.** Struktura utor-vežućeg gvanidino derivata 6-fenilfenantridina.

U svrhu otkrivanja spojeva koji specifično razlikuju različite polinukleotide, sintetizirani su spojevi aminokiselina s fenantridinima u bočnom lancu, prikazani na slici 12. Njihova sinteza radila se na čvrstom nosaču. Spoj na slici 12 b), bis – fenantridinski derivat s kratkom, rigidnom poveznicom, pokazao je zanimljiva svojstva. Naime, uočeno je stvaranje intramolekulskog ekscimera u vodenoj otopini, zahvaljujući specifičnom fluorescentnom odgovoru. Sintetizirani spojevi pogodni su za stvaranje fluorescentnih markera DNA i RNA zbog svoje topljivosti u vodi i slabe toksičnosti *in vitro*.<sup>24</sup>



**Slika 12.** Peptidni derivati fenantridina; a) derivati s jednom fenantridinskom jedinicom (AlaP i GlyAlaP); b) i c) bis-fenantridinski derivati povezani različitim peptidnim poveznicama.

Još jedan primjer peptidnih derivata fenantridina prikazan je na slici 13.



**Slika 13.** Strukture peptidnih derivata fenantridina s gvanidinokarbonilpirolnom jedinicom.

U strukturi je prisutna gvanidinokarbonilpirolna jedinica (GCP jedinica) koja omogućuje dodatne interakcije s biološkim supstratom. Dovoljno duga i fleksibilna prenosnica spoja 13b (glicinska poveznica) između fenantridina i pirola omogućila je povoljno preklapanje aromatskih površina pirolnog i fenantridinskog kromofora. Kod spoja **13a**, zbog rigidnije strukture, takva konformacija nije bila moguća. Spoj **13a** se vezao u manji utor AT i GC polinukleotida te u veliki utor AU polinukleotida (RNA) dok se spoj **13b** vezao u obliku agregata uz fosfatnu okosnicu polinukleotida.

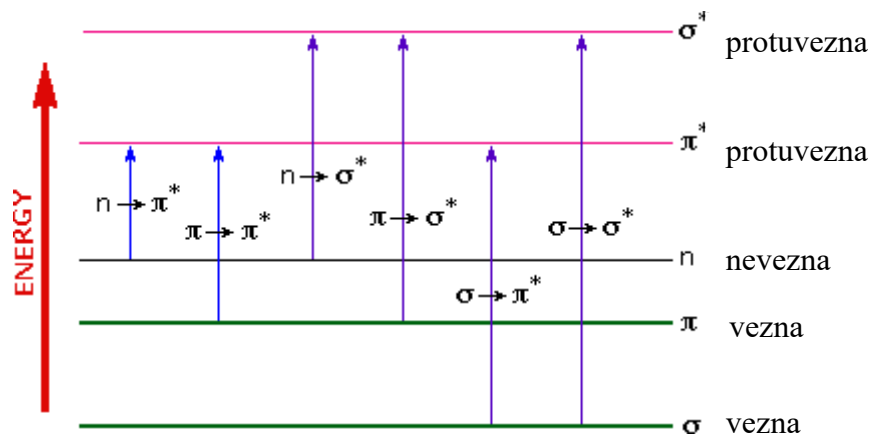
#### 2.4. Spektroskopske metode ispitivanja interakcija malih organskih molekula s DNA i RNA molekulama

Prilikom ispitivanja interakcije malih organskih molekula s DNA i RNA molekulama koriste se metode poput: promjene viskoziteta DNA/RNA, promjene sedimentacijskog koeficijenta, promjene elektroforetske pokretljivosti cirkularne DNA i promjene temperature mekšanja dvostruke uzvojnice nakon vezanja ispitivanog spoja, kojima se proučava promjena strukture i stabilnosti dvostruke uzvojnice nakon vezanja ispitivane molekule. Primjenjuju se i UV/VIS, fluorescencijska i  $^1\text{H}$  NMR spektroskopija kojima se prati spektroskopska promjena ispitivanog spoja. Još se primjenjuju cirkularni i linearni dikroizam zbog korisnih informacija o pravilnoj orijentaciji, dinamici i homogenosti vezanja ispitivanog spoja. U ovom radu

korištene su i biti će opisane UV/VIS i fluorescencijska spektroskopija, promjena temperature mekšanja dvostruke uzvojnice i cirkularni dikroizam.<sup>2</sup>

#### 2.4.1. UV/VIS spektroskopija

Ultraljubičastom – vidljivom (UV/VIS) spektroskopijom dolazi do prelaska vanjskih elektrona iz osnovnog u kratkotrajno pobuđeno elektronsko stanje, ( $10^{-9}$ – $10^{-8}$  s) apsorpcijom elektromagnetskog zračenja u valnom području od 100 do 800 nm (od 100 do 400 nm je ultraljubičasti dio, a od 400 do 800 nm je vidljivi dio spektra).<sup>25</sup> Nakon pobude molekule slijedi relaksacija, povratak elektrona u osnovno stanje, praćeno oslobađanjem topline. Mjeri se količina apsorbiranog zračenja kao funkcija valne duljine što daje kvalitativne i kvantitativne rezultate. Kromofori su nezasićene organske molekule sa specifičnim funkcionalnim skupinama (etilenska, acetilenska, karbonilna, karboksilna, azo, nitro, aromatska,...) koje apsorbiraju u UV/VIS dijelu. Različiti organski spojevi s istim kromoforima daju slične spektre. Valna duljina apsorpcije kromofora ovisi o jačini vezanja elektrona kromofora i o supstituentima (auksokromi) koji utječu na pomak valnih duljina, ali se sami ne pobuđuju (njihov utjecaj najuočljiviji je kod aromatskih molekula). Ovisno o supstituentu razlikuju se batokromni i hipsokromni efekt. Batokromni efekt ili crveni pomak je pomak apsorpcijskog maksimuma prema većim valnim duljinama, a uzrokuju ga donori elektrona kao što su: alkilna, hidroksilna, alkoksidna i amino skupina, stabilizacijom pobuđenog stanja aromata. S druge strane, elektron – akceptorske skupine poput karbonilne, sulfonilne, cijano i nitro skupine uzrokuju destabilizaciju pobuđenog stanja aromata što uzrokuje plavi pomak, tj. hipsokromni efekt. Elektronski prijelazi se klasificiraju prema tipu orbitala. Veću valnu duljinu daju elektroni koji se lakše pobuđuju, tj. imaju niži energetska razmak između molekularnih orbitala. Slika 14 prikazuje tipove orbitala kod molekula i elektronske prijelaze uzorkovane UV/VIS zračenjem.  $\pi - \pi^*$  i  $n - \pi^*$  najrazmatraniji su prijelazi jer im odgovara energija UV/VIS zračenja, dok su prijelazi  $\sigma - \sigma^*$  i  $n - \sigma^*$  vrlo rijetki zbog manjih valnih duljina ( $\lambda < 200\text{nm}$ ). Također, ova metoda ima visoku osjetljivost, selektivnost i točnost, široku primjenu te jednostavno rukovanje.<sup>26,27</sup>



**Slika 14.** Tipovi orbitala kod molekula i elektronski prijelazi uzrokovani UV/VIS zračenjem.

Količina apsorbiranog zračenja proporcionalna je koncentraciji tvari u otopini što opisuje Lambert – Beerov zakon.

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

$A$  – apsorbancija

$\varepsilon$  – molarni ekstinkcijski koeficijent, [ $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{cm}^{-1}$ ]

$l$  – duljina optičkog puta, [cm]

$c$  – molarna koncentracija, [ $\text{mol dm}^{-3}$ ]

Apsorbancija je logaritam omjera početnog snopa zračenja i propuštenog (mjenog) snopa zračenja.

$$A = \log(P_0 / P)$$

$A$  – apsorbancija

$P_0$  – intenzitet početnog snopa zračenja

$P$  – intenzitet mjenog snopa zračenja

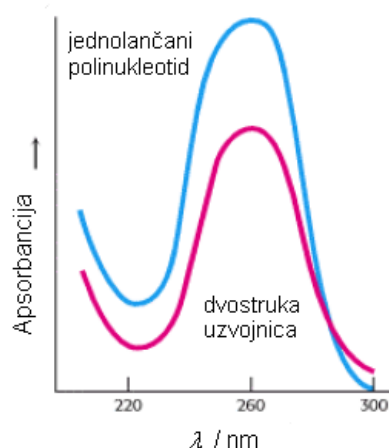
Mjeru vjerojatnosti prelaska elektrona iz osnovnog u pobuđeno stanje opisuje molarni ekstinkcijski koeficijent. Kada je  $\varepsilon$  veći od  $10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ , elektronski prijelaz je dozvoljen u kvantno-kemijskom smislu. Tri su ograničenja Lambert – Beerovog zakona, a to su: primjena zakona samo na razrijeđene otopine ( $< 2 \cdot 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ ), kemijska ograničenja zbog asocijacije, disocijacije ili reakcije ispitivanih molekula s otapalom i instrumentna ograničenja uzrokovana raspršenim zračenjem iz unutrašnjih dijelova instrumenta ili polikromatskim zračenjem ako je korišten polikromatski izvor.<sup>28</sup>

### 2.4.2. Temperaturno mekšanje polinukleotida

Temperaturnim mekšanjem određuje se stabilnost sekundarne strukture molekula DNA i RNA.<sup>29</sup> Povišenjem temperature medija narušava se uređena struktura polinukleotidne molekule, tj. dolazi do denaturacije. U tom procesu dolazi do pucanja vodikovih veza između dušičnih baza i razdvajanja dviju jednolančanih polinukleotidnih molekula. Temperatura mekšanja ( $T_m$ ) je ona temperatura pri kojoj je približno pola dvostruke uzvojnice denaturirano. Karakteristična je za pojedinu vrstu nukleotida i odgovara točki infleksije denuracijske krivulje. Čimbenici koji utječu na  $T_m$  su: priroda DNA molekule, slijed baza u DNA molekuli, ionska jakost, pH i male molekule vezane na DNA molekulu. Termička stabilnost određena je omjerom parova baza A – T(U) i G – C što je posljedica broja vodikovih veza između komplementarnih parova baza. Stoga parovi baza G – C povećavaju termičku stabilnost DNA jer su povezani trima vodikovim vezama, a A – T(U) su povezani dvjema vodikovim vezama te se denaturiraju pri nižim temperaturama. Parovi baza G – C kod međusobnog slaganja imaju jače  $\pi - \pi$  aromatske interakcije od parova baza A – T (U).<sup>8,10</sup> Potrebne su velike koncentracije da bi mala molekula, tj. ligand uzrokovao denaturaciju uzvojnice DNA jer se ligand natječe za stvaranje vodikove veze s parovima baza drugog lanca molekule DNA. Negativni naboj fosfatne skupine destabilizira dvije molekule DNA zbog međusobnog odbijanja, ali visoka ionska jakost poništava negativni naboj i stabilizira dvostruku uzvojnici. U jako kiselim, odnosno jako lužnatim uvjetima dolazi do denaturacije molekule DNA zbog protonacije odnosno deprotonacije dušičnih baza (pucanje vodikovih veza). Razlika vrijednosti  $T_m$  otopine slobodnog polinukleotida i otopine polinukleotida u kompleksu s malom organskom molekulom važan je parametar u opisivanju interakcija malih organskih molekula i polinukleotida. Vezanje malih organskih molekula na DNA molekulu može uzrokovati stabilizaciju ili destabilizaciju dvolančanog polinukleotida. U slučaju stabilizacije  $\Delta T_m$  ima pozitivnu vrijednost, dok je  $\Delta T_m$  u slučaju destabilizacije negativan. Interkalativni način vezanja stabilizira dvostruku uzvojnici, daje pozitivne vrijednosti  $\Delta T_m$ . S druge strane, utor – vežuci spojevi mogu dati i pozitivne i negativne vrijednosti  $\Delta T_m$ . Također je moguće stvaranje različitih tipova kompleksa ispitivanog spoja i polinukleotida. U tom slučaju nastaje karakteristična višefazna denuracijska krivulja.

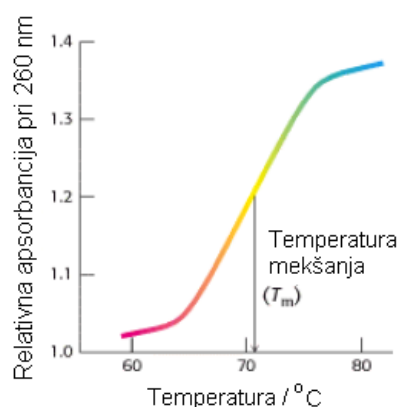
Dušične baze u svojoj strukturi imaju aromatske skupine, kromofore, te apsorbiraju zračenje u UV/VIS dijelu spektra. Zbog te činjenice prikladna metoda za praćenje

temperaturnog mekšanja DNA jest UV/VIS spektrofotometrija. Denaturacijom molekule DNA raste apsorbancija za oko 40% pri svim valnim duljinama što se naziva hiperkromni efekt do kojeg dolazi u uskom temperaturnom području (slika 15). Denaturacija uzvojnice je kooperativni proces jer se razdvajanjem uzvojnice na jednom mjestu potiče destabilizacija ostatka uzvojnice i daljnja denaturacija.<sup>30,31</sup>



Slika 15. Hiperkromni efekt.

Krivulja taljenja prikazuje ovisnost apsorbancije vodene otopine DNA pri određenoj valnoj duljini o temperaturi otopine, sigmoidalnog je oblika što potvrđuje kooperativnost procesa (slika 16).



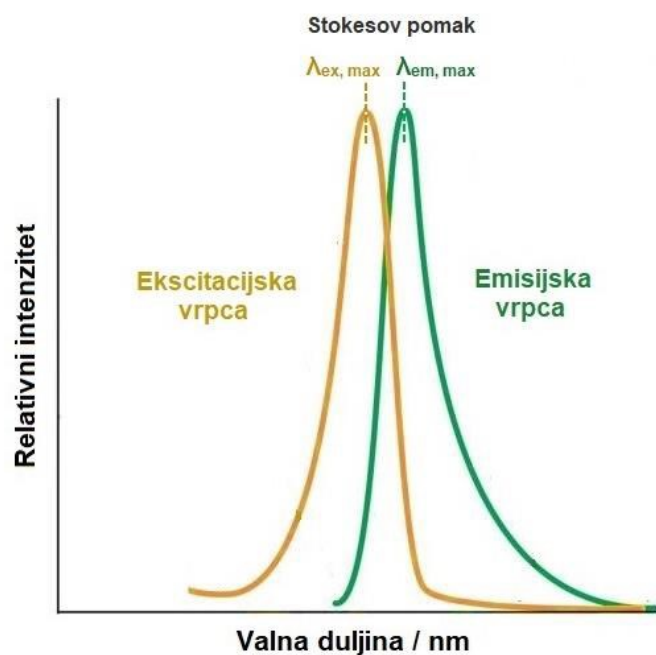
Slika 16. Krivulja taljenja DNA.

Prednosti UV/VIS spektrofotometrije u proučavanju promjena temperaturnog mekšanja su brza i jednostavna izvedba, male količine analita, jeftin uređaj i lako razlikovanje dobivenih rezultata zbog nastanka dvofaznih i višefaznih sustava. Jedan od nedostataka ove metode je

taj što spojevi moraju biti termički stabilni jer se eksperimenti provode pri temperaturama koje su bitno više od sobne, 25 °C i fiziološke, 37 °C. Nadalje, ne mogu se međusobno uspoređivati rezultati spojeva koji se vežu različitim načinama na polinukleotid, ne mogu se ispitivati jednolančani polinukleotidi te se ne mogu na temelju rezultata donositi direktni zaključci o stabilnosti kompleksa.<sup>2</sup>

#### 2.4.3. Fluorescencijska spektroskopija

Fluorescencijska spektroskopija analitička je metoda važna u kemijskim, biokemijskim i medicinskim istraživanjima zbog visoke selektivnosti i osjetljivosti. Riječ je o elektromagnetskoj spektroskopiji koja mjeri pojavu fluorescencije analita. Fluorescencijska spektroskopija i UV/VIS spektroskopija komplementarne su metode, ali fluorescencijska spektroskopija daje više informacija jer ima mogućnost snimanja i emisijskih i ekscitacijskih spektara (slika 17).<sup>32</sup>

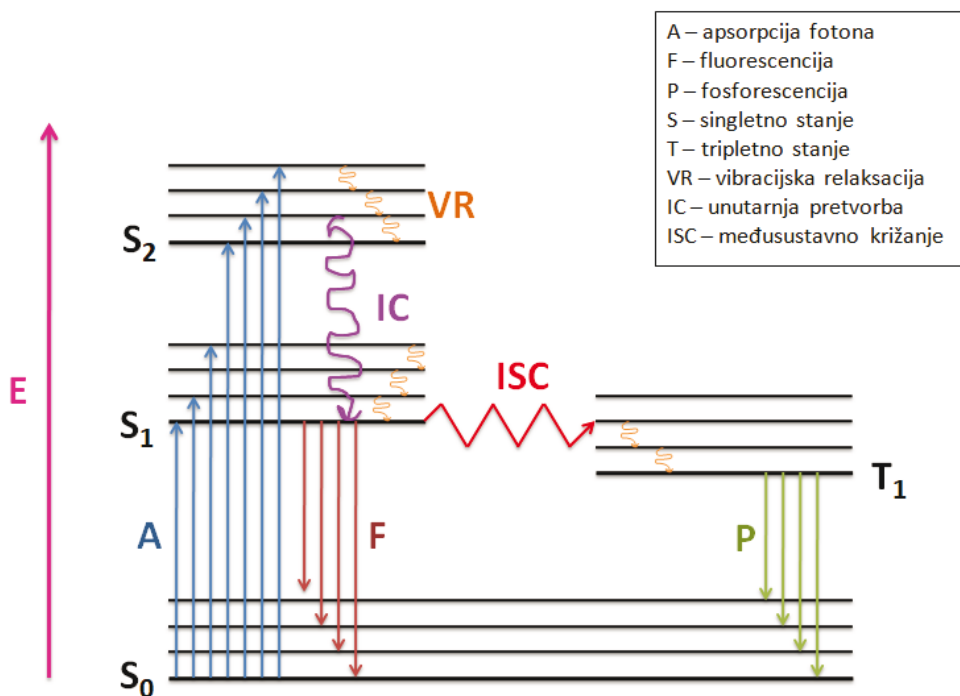


Slika 17. Prikaz ekscitacijskog i emisijskog spektra.

Ekscitacijskim spektrom prikazuje se ovisnost intenziteta fluorescencije o valnoj duljini pobude, uz snimanje pri definiranoj valnoj duljini emisije. Emisijski spektar prikazuje ovisnost fluorescencije o valnoj duljini emisije pri definiranoj valnoj duljini pobude. Spektri su zrcalno simetrični i karakteristični za molekule koje fluoresciraju.



Kod fluorescencije se elektroni eksitiraju apsorpcijom UV/VIS zračenja u više elektronsko stanje. Potom se događa relaksacija te se prati emisija pobuđenog elektrona u osnovno stanje. Dijagram Jablonskog koji je prikazan na slici 18 najbolje prikazuje i objašnjava procese koji se događaju tijekom pobude elektrona u viša elektronska stanja.



Slika 18. Dijagram Jablonskog.

Dijagrama po Jablonskom pokazuje kako molekula iz osnovnog singletnog elektronskog stanja,  $S_0$ , apsorpcijom energije fotona prelazi u jedno od pobuđenih vibracijskih singletnih stanja,  $S_1$  ili  $S_2$ . Zbog mogućih sudara s ostalim molekulama ili krutom površinom dolazi do gubitka vibracijske energije sve dok molekula ne postigne najniže vibracijsko stanje pobuđenog elektronskog stanja. Potom, unutarnjom pretvorbom (engl. *Internal Conversion*, IC) molekula iz najnižeg vibracijskog stanja pobuđenog elektronskog stanja prelazi u niže elektronsko stanje istog multipliciteta. Prosječno vrijeme života elektronskog pobuđenog stanja je  $10^{-6} - 10^{-9}$  s što je znatno manje učinkovito od vibracijske relaksacije kojoj je prosječno vrijeme života pobuđenog vibracijskog stanja samo  $10^{-15}$  s. Moguć je prelazak i u niže elektronsko stanje različitog multipliciteta, ali to se onda događa međusustavnim križanjem, (engl. *Intersystem Crossing*, ISC). Ovi prijelazi događaju se bez emisije zračenja. Postoje i relaksacije uz pojavu zračenja. Tu se ubrajaju fluorescencija i fosforescencija. Kod fluorescencije je pobuđeni elektron uparen s drugim elektronom u osnovnom stanju. Ako

pobuđeni elektron ima suprotan spin od elektrona u osnovnom stanju tada je dopušten prijelaz elektrona sa singletne razine  $S_1$  na  $S_0$  razinu uz emisiju fotona. U slučaju kada je pobuđeni elektron istog spina kao elektron u osnovnom stanju javlja se fosforescencija. Ovdje se prijelaz odvija preko tripletnog stanja,  $T_1$  pri kojem se mijenja spin elektrona. Međusustavnim križanjem dolazi do prelaska iz  $S_1$  u  $T_1$  stanje. Emisija zračenja zbog toga je sporija nego kod fluorescencije i traje dulje od pobude. Trajanje fluorescencije je od  $10^{-10}$  do  $10^{-5}$  s, dok fosforescencija traje od  $10^{-4}$  do 10 s. Učestalost unutarnje pretvorbe uzrokuje pojavu fluorescencije pri samo jednoj valnoj duljini, neovisno o valnoj duljini pobude. Stoga je prisutna pojava emisijske vrpce pri većoj valnoj duljini od apsorpcijske što se naziva Stokesovim efektom.<sup>33,34</sup>

Intenzitet fluorescencije izražava se jednadžbom:  $F = K I_0 c l \varepsilon \phi$  uz definiranu valnu duljinu pobude i emisije, gdje je:

$K$  – konstanta instrumenta

$I_0$  – intenzitet pobudnog zračenja

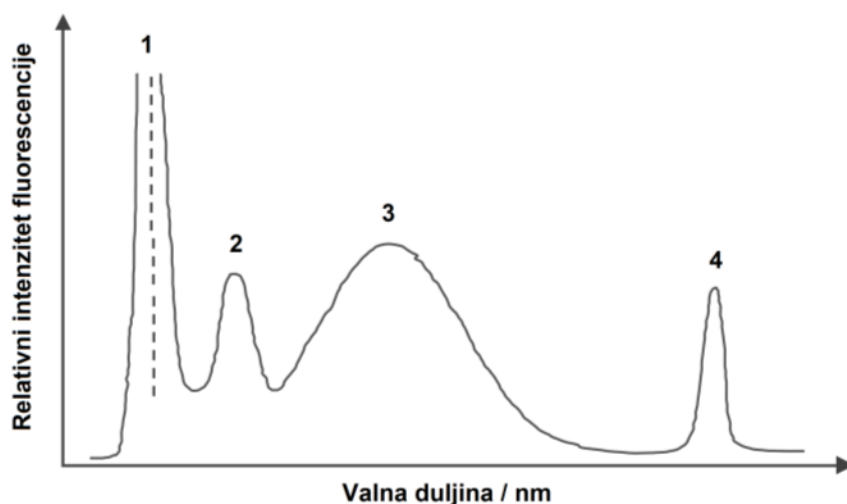
$c$  – molarna koncentracija tvari izražena u  $mol\ dm^{-3}$

$l$  – duljina puta zračenja izražena u  $cm$

$\varepsilon$  – molarni ekstinkcijski koeficijent izražen u  $mol^{-1}\ dm^3\ cm^{-1}$

$\phi$  – kvantni prinos

U emisijskom spektru mogu se pojaviti i pojavljuju se raspršenja koja ne proizlaze iz fluorescencije uzorka, slika 19. Tako postoji Rayleighovo raspršenje koje nastaje pri valnoj duljini pobude, zatim Ramanovo raspršenje kojeg karakterizira raspršenje zračenja pri manjoj ili većoj valnoj duljini od pobudnog zračenja te raspršenje drugog reda koje se uočava na dvostruko većoj valnoj duljini od valne duljine pobude i uklanja se filtrima. Signali se mogu razlikovati promjenom valne duljine pobudnog zračenja pri čemu signal emisije ostaje nepomaknut, a signal raspršenog zračenja varira ovisno o valnoj duljini. Kao signal u spektru mogu se pojaviti i kontaminacije iz otapala ili kiveta te se zbog toga uvijek oduzima spektar otapala od spektra uzorka.<sup>35,36</sup>

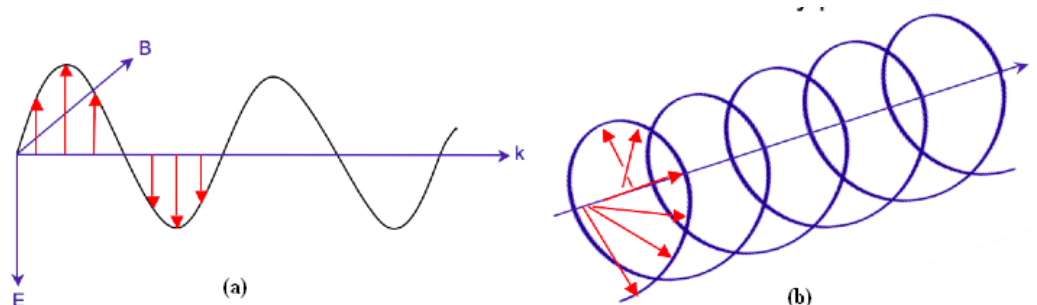


**Slika 19.** 1) Rayleighovo raspršenje, 2) Ramanovo raspršenje, 3) fluorescencija uzorka, 4) raspršenje drugog reda

#### 2.4.4. Cirkularni dikroizam

Cirkularni dikroizam, CD, optička je i spektroskopska metoda kojom se dobivaju informacije o kiralnosti molekule i o promjenama konformacija u sekundarnoj i tercijarnoj strukturi nukleinskih kiselina i proteina. Metoda se temelji na diferencijalnoj apsorpciji cirkularno polariziranog svjetla u UV, VIS i infracrvenom dijelu valnih duljina.<sup>37</sup>

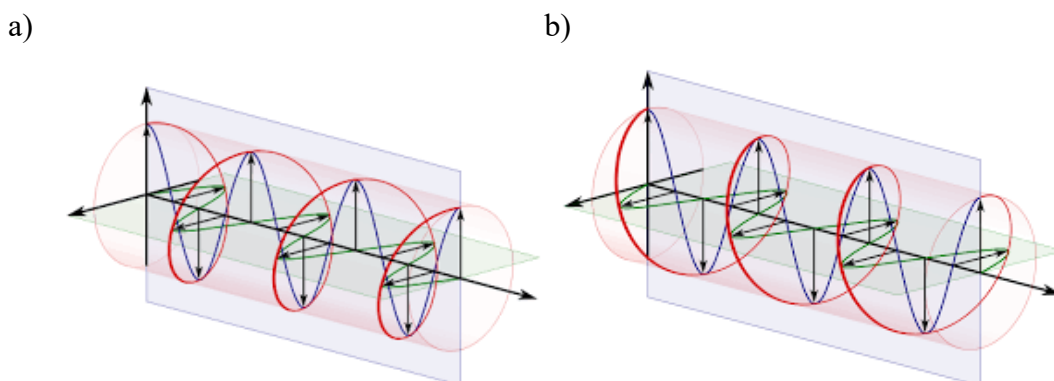
Titranjem elektromagnetskih valova u samo jednoj ravnini nastaje polarizirana svjetlost koja može biti linearno ili cirkularno polarizirana (slika 20). U slučaju kada električno polje titra samo u istoj ravnini nastaje linearno polarizirana svjetlost, a u slučaju kada se ravnina titranja električnog polja jednoliko vrti nastaje cirkularno polarizirana svjetlost.<sup>38</sup>



**Slika 20.** a) Linearno polarizirana svjetlost; b) Cirkularno polarizirana svjetlost.

Zakretanje ravnine električnog polja može biti u smjeru kazaljke na satu i u obrnutom smjeru od smjera kazaljke na satu, prikazano na slici 21. Kod prvog slučaja riječ je o desno

polariziranoj svjetlosti, a kod drugog o lijevo. Takva svjetlost je kiralna te će stoga i kiralne molekule različito apsorbirati lijevo i desno cirkularnu polariziranu svjetlost.



**Slika 21.** a) Lijevo cirkularno polarizirana svjetlost; b) Desno cirkularno polarizirana svjetlost.

Kako je kod polinukleotida najčešće riječ o desnim uzvojnica, promjene konformacija prate se spektrom cirkularnog dikroizma koji prikazuje razliku apsorbancija lijeve i desne cirkularno polarizirane svjetlosti  $\Delta A$ . Primjenom Lambert – Beerovog zakona dobije se:

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

$\varepsilon_L$  i  $\varepsilon_D$  – molarni apsorpcijski koeficijent za lijevu i desnu cirkularno polariziranu svjetlost

$c$  – molarna koncentracija

$l$  – duljina optičkog puta

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

$\Delta\varepsilon$  – molarni cirkularni dikroizam kojemu se dodaje korekcijski molarni faktor i dobije se molarna eliptičnost koja se prikazuje u stupnjevima.

Simetrični i akiralni spojevi jednako apsorbiraju lijevu i desnu polariziranu svjetlost i stoga nemaju spektar CD. Međutim u interakciji s kiralnim polinukleotidima takvi spojevi mogu imati inducirani spektar CD, ICD. ICD se javlja na valnoj duljini apsorpcijskog maksimuma kromofora male molekule.<sup>38</sup>

Prilikom izvođenja CD titracija polinukleotida s malim organskim molekulama prati se promjena spektra polinukleotida pri valnim duljinama u kojima apsorbiraju molekule DNA i RNA (od 200 nm do 300 nm) te iznad 300 nm kada se prati apsorpcija kiralnih (CD spektar) ili akiralnih (ICD spektar) malih organskih molekula. Jačina signala ICD određuje tip interakcija. Slabi pozitivni ili negativni signali ICD govore da se radi o interkaliranju, jači signali ukazuju da je riječ o vezanju spoja u mali utor polinukleotida. Bisignatni signal ICD je

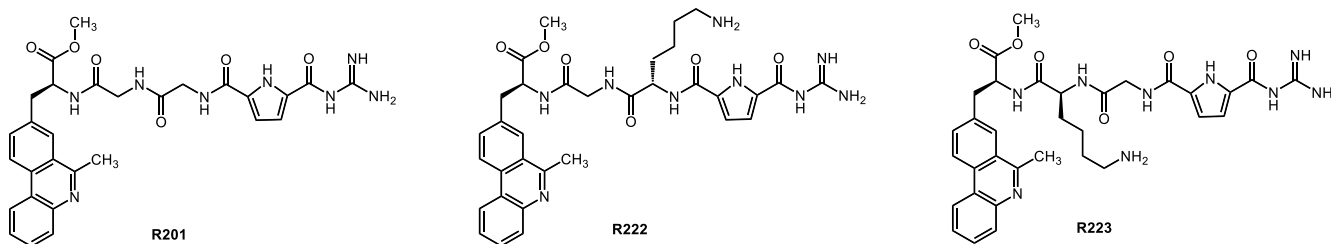
onaj signal koji daje i pozitivni i negativni signal i upućuje na vezanje dimera u utor polinukleotida. Predznak signala ICD određuje orijentaciju male organske molekule. Naprimjer kod interkaliranja se pojavljuje slabi pozitivni signal na osnovu kojeg se može pretpostaviti da je aromatska ravnina organske molekule koplanarna s aromatskim ravninama parova baza, ali je duža os organske molekule okomita na dužu os parova nukleobaza. U slučaju jakog pozitivnog signala CD (vezanje u utor) mala molekula orijentirana je duž utora pod kutem od  $45^\circ$  u odnosu na ravninu parova baza.<sup>38</sup>

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Kemikalije

Prilikom izrade ovog diplomskog rada korištena su tri spoja: **R201**, **R222** i **R223**. Riječ je o tri nova derivata fenantridina s aminokiselinskim supstituentima (glicin, lizin) i gvanidinokarbonilpirolnom jedinicom čije su strukturne formule prikazane na slici 22. Spojevi su pripremljeni u Laboratoriju za biomolekularne interakcije na Institutu Ruđer Bošković.



Slika 22. Strukturne formule derivata fenantridina **R201**, **R222** i **R223**.

Otopine navedenih spojeva pripravljene su u redestiliranoj vodi uz ultrazvučnu kupelj te su čuvane pri sobnoj temperaturi.

Pri izvođenju eksperimenata korišten je pufer natrijeva kakodilata pri dvije različite pH vrijednosti ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7,00$  i  $\text{pH} = 5,00$ ). Pripravljene su miješanjem točno određenih volumena vodenih otopina natrijeva kakodilata ( $c = 0,02 \text{ mol dm}^{-3}$ ) i klorovodične kiseline ( $c = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ ), razrjeđivanjem do konačnog volumena i podešavanjem konačnog pH pH-metrom.

Polinukleotidi korišteni prilikom izvođenja eksperimenata otopljeni su u puferu, natrijevom kakodilatu ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7,00$ ) prema uputama proizvođača. Otopina ctDNA<sup>9</sup> dodatno je sonicirana i profiltrirana kako bi se uklonili veći DNA lanci i dobila homogenija otopina. Pripravljene otopine skladištene su u hladnjaku pri temperaturi od

-18 °C. Koncentracije otopina polinukleotida određene su spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini maksimuma apsorpcije i izražene su kao koncentracije fosfata (podaci navedeni u **tablici 2**).

**Tablica 2.** Molarni ekstinkcijski koeficijenti,  $\varepsilon$ , dvolančanih polinukleotida i pripadne valne duljine maksimuma apsorbcije  $\lambda_{\max}$ .

polinukleotid	$\varepsilon / \text{mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$	$\lambda_{\max} / \text{nm}$
ctDNA	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*

## 3.2. Spektroskopska karakterizacija spojeva

Prije istraživanja interakcije spojeva s polinukleotidima provedena je spektroskopska karakterizacija spojeva snimanjem UV/Vis spektara u kvarcnim kivetama. Pri izradi baždarnog pravca korišten je UV/VIS spektrometar, Scan program. U kvarcnu kivetu optičkog puta 1 cm dodan je 1  $\text{cm}^{-3}$  pufera natrijeva kakodilata ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) te je snimljena bazna linija, tj. apsorbancija pufera. Potom su dodani alikvoti ishodne otopine spoja i snimljeni su UV/VIS spektri. Mjerenja su provedena pri temperaturi od 25 °C, i za pH = 5,00 i za pH = 7,00. Snimanje je provedeno u rasponu od 350 do 600 nm. Svi podaci obrađeni su u program *OriginPro 7.5*.

Prilikom određivanja termičke stabilnosti polinukleotida snimljeni su UV/VIS spektri pri temperaturama od 25 °C, 35 °C, 55 °C, 75 °C i 95 °C, u kvarcnoj kiveti od 1  $\text{cm}^3$ , optičkog

puta 1 cm. Nakon što je snimljen spektar pri 95 °C, sustav je ohlađen i snimljen je spektar na 25 °C.

Za ispitivanje fluorescencije spojeva korišten je program Scan na instrumentu Agilent Cary Eclipse. U kvarcnu kivetu optičkog puta 1 cm, dodano je 2 cm<sup>3</sup> pufera te je snimljen spektar pufera. Nakon što je snimljen emisijski spektar, očitana je maksimum, a ekscitacijski spektar je snimljen pri valnoj duljini očitano maksimuma. Dobiveni podaci obrađeni su u programu OriginPro 7.5.

### 3.3. Istraživanje interakcija spojeva s polinukleotidima

#### 3.3.1. Fluorimetrijske titracije

Prilikom izvođenja fluorimetrijskih titracija snimljeni su fluorescencijski spektri pomoću fluorimetra Varian Cary Eclipse. Ova metoda korištena je kako bi se odredila jakost vezanja prema polinukleotidima preko fluorofora. Pobuđivanje spojeva provedeno je na valnim duljinama apsorpcije većim od 300 nm. U tom području valnih duljina polinukleotidi nemaju apsorpciju zračenja. Emisija je praćena u rasponu valnih duljina od 350 do 600 nm i za pH = 5,00 i za pH = 7,00. Širine pukotina, *slitovi*, prilagođene su svakom ispitivanom spoju snimanjem emisijskih spektara spojeva uz dodatak ctDNA.

Za izvođenje fluorimetrijskih titracija korištene se kvarcne fluorimetrijske kivete. Optički put kivete je 1 cm, a u nju je dodano 2,00 cm<sup>3</sup> kakodilatnog pufera ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH = 7,00 ili pH = 5,00). Zatim se najprije snima spektar samog pufera, natrijeva kakodilata, tj. bazna linija za jednu i za drugu pH vrijednost. Nakon snimljene bazne linije, otopini pufera dodan je alikvot spoja da bi konačna koncentracija bila  $1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ . Kada je postignuta željena koncentracija otopine započinje se titracija s ishodnim otopinama polinukleotida. Prilikom titriranja računski se odredi za svaki novi spoj volumen alikvota polinukleotida koji se dodaje otopini uzorka, a isti taj volumen se povećava za duplu vrijednost sve dok ima promjena intenziteta fluorescencije. Titracija se provodi sve dok se ne postigne zasićenje, tj. dok sljedećim dodatkom alikvota više ne dolazi do promjene intenziteta fluorescencije. Nakon svakog dodatka polinukleotida i inkubacije od 90 s, snima se fluorescencijski spektar. Promjena koncentracije polinukleotida tijekom većine titracija bila je u rasponu od  $10^{-7}$  do  $10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  što pretpostavlja raspon koncentracija za nastanak kompleksa u kojem je vezano 20 – 80 % ispitivanog spoja.



Dobiveni fluorescencijski spektri obrađeni su u programu *OriginPro 7.5*. Spektri su korigirani obzirom na baznu liniju, a volumeni za razrjeđenje nakon dodatka alikvota polinukleotida. Konstante stabilnosti izračunate su pomoću Schatchardove jednadžbe za spektroskopski aktivan kompleks metodom nelinearne regresije prema jednadžbi:

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

$c$  - koncentracija ispitivanog spoja u otopini

$c_s$  - koncentracija polinukleotida

$n$  - omjer koncentracije vezanog spoja i polinukleotida

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

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

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

$K_s$  - konstanta stabilnosti kompleksa.

### 3.3.2. Temperaturno mekšanje

Eksperimentima temperaturnog mekšanja polinukleotida dobivaju se informacije o utjecaju ispitivanih spojeva na temperaturu mekšanja polinukleotida. U provedbi eksperimenta korišten je uređaj UV/VIS *Varian Cary 100 Bio*. Gornja granica mjernog područja instrumenta je pri temperaturi od 95 °C što je ispod temperature mekšanja polinukleotida poli(dGdC)<sub>2</sub>, te je stoga on izostavljen u izvedbi eksperimenta. U kvarcne kivete optičkog puta 1 cm dodan je 1,00 cm<sup>-3</sup> kakodilatnog pufera ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH = 7,00 ili pH = 5,00). Najprije se mjeri apsorbancija pufera pri valnoj duljini maksimuma apsorpcije polinukleotida (tablica 2) i ta vrijednost se uzima kao nulta vrijednost otopine. Vrijednosti se očitavaju u programu *Simple Reads*. Nakon toga se dodaju alikvoti polinukleotida i ponovno se očitava apsorbancija zbog provjere koncentracije. Iz dobivenih podataka apsorbancije i tabličnih molarnih ekstinkcijskih koeficijenata (tablica 2) računa se alikvotni dodatak ispitivanih spojeva koji se dodaje otopini pufera i polinukleotida. Taj dodatak odgovara prethodno određenom molarnom omjeru spoja i polinukleotida. Kontrolna kiveta sadrži samo čisti polinukleotid. Svaka kombinacija polinukleotida i spoja radi se u duplikatu da bi se dobili što točniji rezultati. Parametri zagrijavanja postavljaju se u programu *Thermal*. Uzorak

se zagrijava postupno u temperaturnom rasponu od 25 do 95 °C brzinom od 1 °C u minuti uz očitavanje vrijednosti apsorbancije svakih 0,5 °C.

Rezultati se obrađuju u programu *OriginPro 7.5*, a krivulje prikazuju ovisnost apsorbancije pri valnoj duljini maksimuma apsorpcije polinukleotida o temperaturi. Krivulje ovisnosti su normalizirane. Vrijednosti temperaturnog mekšanja,  $T_m$ , određuju se očitavanjem točaka maksimuma prve derivacije sigmoidalnih krivulja, a provjeravaju se grafički metodom tangenti. Vrijednosti  $\Delta T_m$  računaju se oduzimanjem vrijednosti  $T_m$  slobodnog polinukleotida od vrijednosti  $T_m$  kompleksa ispitivanih spojeva s polinukleotidima. Izražene vrijednosti  $\Delta T_m$  (s pogreškom  $\pm 0,5$  °C) su srednja vrijednost dvaju paralelnih mjerenja.

### 3.3.3. CD titracije

CD spektri snimljeni su na *JASCO J – 815 CD* spektrometru uz stalan protok dušika i pri sobnoj temperaturi ( $\sim 25$  °C). Snimanje spektara provedeno je u uvjetima standardne osjetljivosti s brzinom skeniranja od 200 nm min<sup>-1</sup>. Prilikom snimanja istovremeno je praćena promjena cirkularnog dikroizma i UV/VIS apsorpcije u rasponu valnih duljina od 220 nm do 500 nm. Za svaku titraciju rađene su dvije akumulacije, a krajnji spektar rezultat je uprosječivanja spektara dobivenih akumulacijama. Kemijsko posuđe za izvođenje eksperimenta su kvarcne fluorimetrijske ili UV/VIS kivete optičkog puta 1 cm. Prvo se snima bazni spektar, tj. spektar kakodilatnog pufera, 2 cm<sup>-3</sup>, ( $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>, pH = 7,00 ili pH = 5,00), a potom se snima spektar polinukleotida dodanog otopini pufera (konačna koncentracija:  $c = 3 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>). Zatim se dodavaju alikvoti vodenih otopina spojeva u zadanim molarnim omjerima spoja i polinukleotida ( $r = 0,1, 0,2, 0,3, 0,4$  i  $0,5$ ). Prije obrađivanja spektara u programu *OriginPro 7.5*, dobiveni spektri su korigirani obzirom na snimljeni spektar čistog pufera.

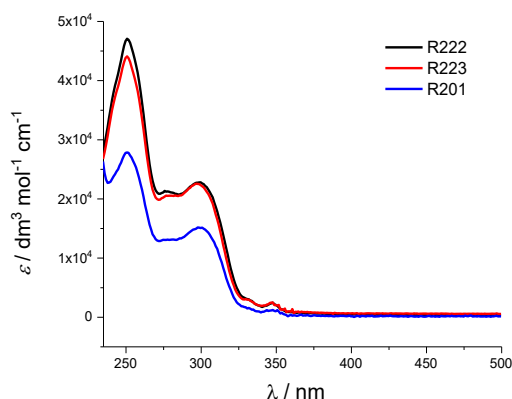
## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Spektroskopska karakterizacija spojeva R201, R222 i R223

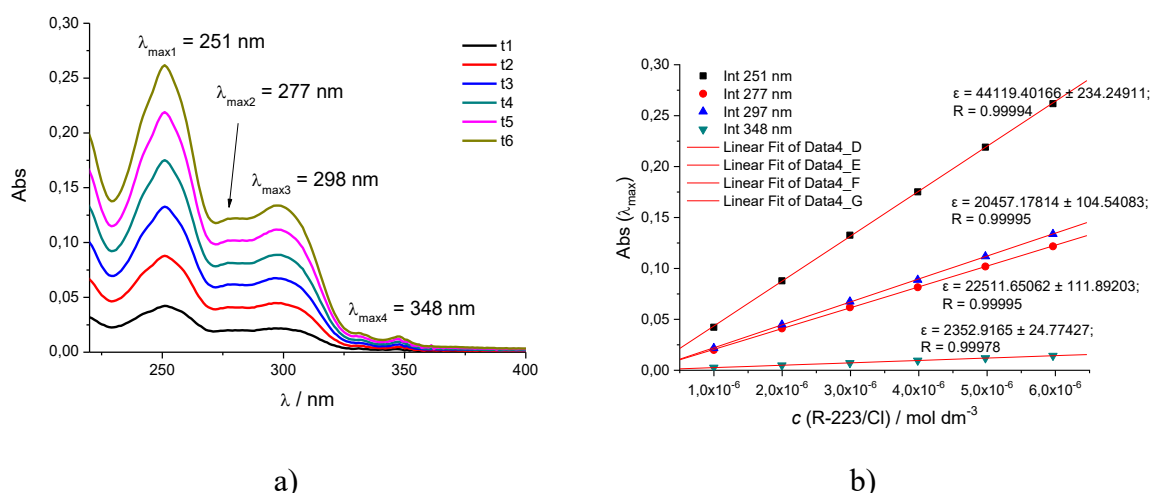
Kako bi se utvrdili eksperimentalni uvjeti za istraživanje interakcija novih fenantridinskih derivata s polinukleotidima, provedena je spektroskopska karakterizacija spojeva **R201**, **R222** i **R223** u neutralnim (pH = 7,00) i blago kiselim (pH = 5,00) uvjetima.

#### 4.1.1. Spektroskopska karakterizacija spojeva pri pH = 7,00 i pH = 5,00

Snimljeni su UV/VIS spektri puferiranih vodenih otopina spojeva. UV/Vis spektri su prikazani kao ovisnost apsorbancije o valnoj duljini u koncentracijskom rasponu  $c = 5 \times 10^{-6}$  -  $2,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  kod spoja **R201** i u rasponu  $c = 1 \times 10^{-6}$  -  $6 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  kod spojeva **R222** i **R223** (slike 24 i 26, i slika D46 i D47). Apsorbancije puferiranih vodenih otopina ispitivanih spojeva pri pH = 7,00 i pH = 5,00 proporcionalne su navedenim koncentracijama. Apsorpcijski maksimumi i molarni ekstinkcijski koeficijenti,  $\varepsilon$ , prikazani su u tablici 3. **R201** bio je vrlo higroskopan što je ometalo točno vaganje. Koncentracija osnovne otopine određena je prema koeficijentu ekstinkcije tetrapeptida **R223** (tablica 3). Apsorpcijski maksimumi i molarni ekstinkcijski koeficijenti,  $\varepsilon$ , prikazani su u tablici 4.



**Slika 23.** UV/VIS spektri **R201**, **R222** i **R223** pri  $c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ; pH = 7,00, pufer natrijev kakodilat / HCl,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ .



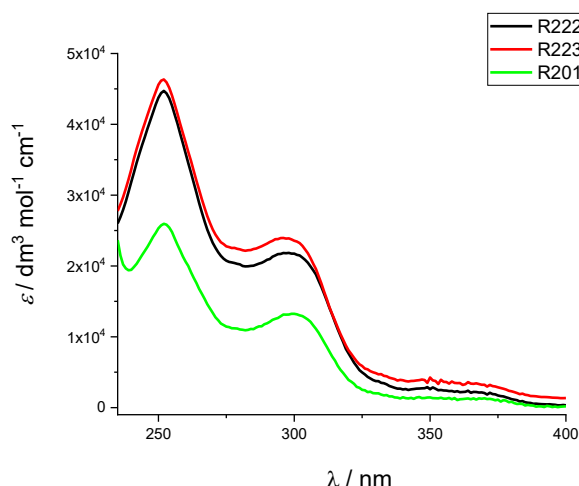
**Slika 24.** a) UV/VIS spektri spoja **R223** pri različitim koncentracijama ( $c = 1 \times 10^{-6}$ -  $6 \times 10^{-6}$  mol dm $^{-3}$ ), pH = 7,00, pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05$  mol dm $^{-3}$  b) ovisnost apsorbancije o koncentraciji spoja **R223** pri valnim duljinama maksimuma apsorpcije  $\lambda = 251$  nm, 277 nm, 298 nm i 348 nm.

UV/VIS spektri pokazuju apsorpcijske maksimume pri valnim duljinama  $\lambda_{\max} = 251$  nm i 300 nm za spoj **R222**, a za spoj **R223** apsorpcijski maksimumi su pri valnim duljinama  $\lambda_{\max} = 251$  i 297 nm. Za svaki apsorpcijski maksimum, linearnom regresijskom analizom izračunat je molarni ekstinkcijski koeficijent iz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji ispitivanog spoja (tablica 3.).

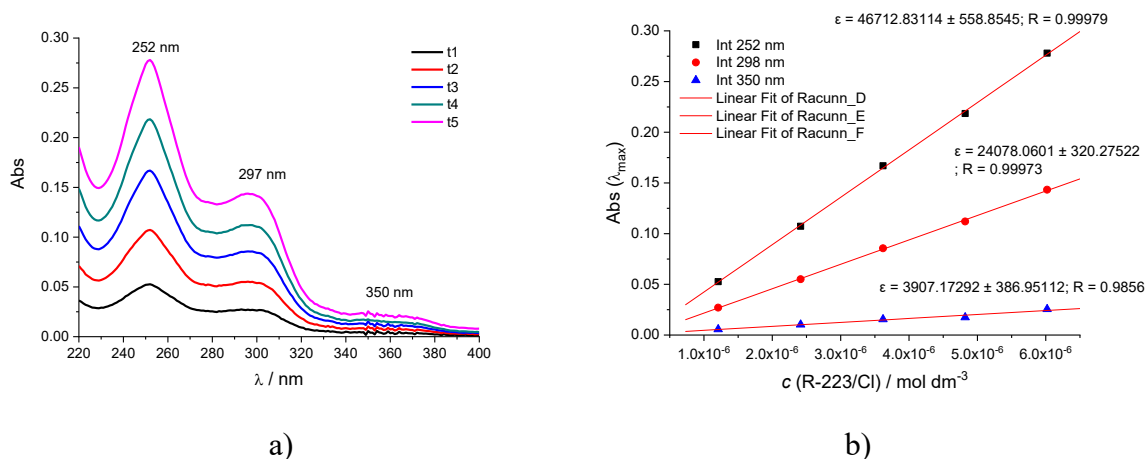
**Tablica 3.** Apсорpcijski maksimumi i molarni ekstinkcijski koeficijenti spojeva **R222** i **R223**.

	pH = 7,0 <sup>a</sup>	
	$\lambda_{\max}$ / nm	$\epsilon \times 10^3$ / mmol $^{-1}$ cm $^2$
<b>R222</b>	251	48.3
	300	23.3
<b>R223</b>	251	44.1
	297	22.5

<sup>b</sup> pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05$  mol dm $^{-3}$ , pH = 7,00.



Slika 25. UV/VIS spektri spojeva **R201**, **R222** i **R223** pri  $c = 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ; pH = 5,00, pufer natrijev kakodilat / HCl,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ .



Slika 26. a) UV/VIS spektar spoja **R223** pri različitim koncentracijama ( $c = 1 \times 10^{-6}$ -  $6 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ), pH = 5,00, pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05 \text{ M}$  b) ovisnost apsorbancije o koncentraciji spoja **R223** pri valnim duljinama maksimuma apsorpcije  $\lambda = 252 \text{ nm}$ ,  $297 \text{ nm}$  i  $350 \text{ nm}$ .

UV/VIS spektri pokazuju apsorpcijske maksimume pri valnim duljinama  $\lambda_{\text{max}} = 252$  i  $298 \text{ nm}$  za spoj **R222**, a za spoj **R223** apsorpcijski maksimumi su pri valnim duljinama  $\lambda_{\text{max}} = 252$  i  $297 \text{ nm}$ . Za svaki apsorpcijski maksimum, linearnom regresijskom analizom izračunat je molarni ekstinkcijski koeficijent iz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji ispitivanog spoja (tablica 4.).

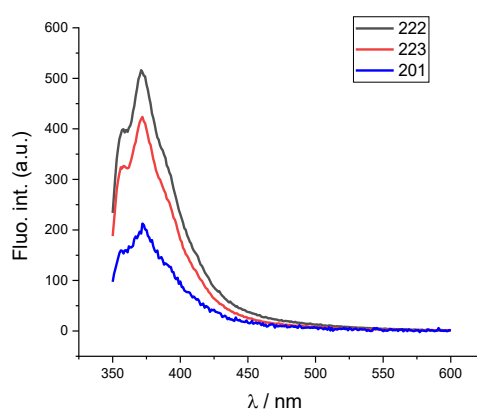
**Tablica 4.** Apsorpcijski maksimumi i molarni ekstinkcijski koeficijenti spojeva **R222** i **R223**.

	pH = 5,0 <sup>a</sup>	
	$\lambda_{\max}$ / nm	$\varepsilon \times 10^3$ / mmol <sup>-1</sup> cm <sup>2</sup>
<b>R222</b>	252	43.6
	298	21.4
<b>R223</b>	252	46.7
	297	24.1

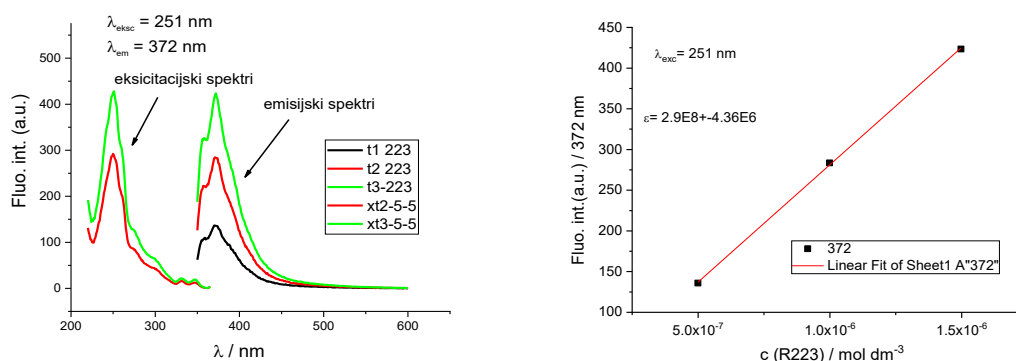
<sup>c</sup> pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH = 5,00.

#### 4.1.2. Fluorescencijski spektri spojeva pri pH = 7,00 i pH = 5,00

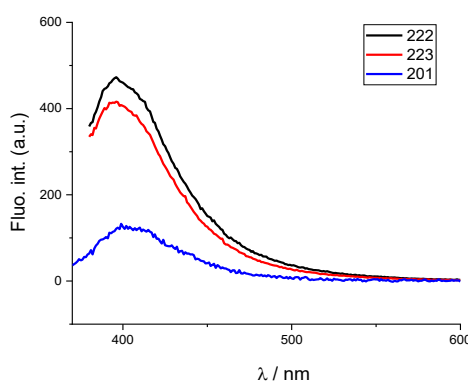
Intenziteti emisije puferiranih vodenih otopina (pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH = 7,00 i pH = 5,00) ispitivanih spojeva proporcionalni su njihovim koncentracijama do  $c = 6 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ . Širine pukotina, *slitovi*, prilagođene su svakom ispitivanom spoju snimanjem emisijskih spektara spojeva uz dodatak ctDNA. Oznake:  $S_{\text{eksc}}$  i  $S_{\text{em}}$  odnose se na ekscitacijski odnosno emisijski slit. Fluorimetrijska mjerenja provedena su u području gdje se spektri emisije i ekscitacije ne preklapaju, a dobiveni spektri prikazani su na slikama 27 - 30.



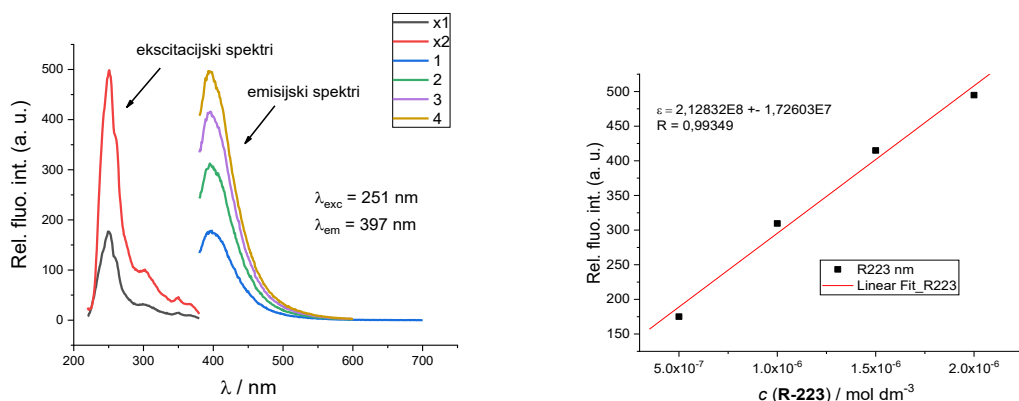
**Slika 27.** Emisijski spektri spojeva **R201**, **R222** i **R223** pri koncentraciji  $c = 1,5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  na valnoj duljini ekscitacije  $\lambda_{\text{exc}} = 251 \text{ nm}$  ( $S_{\text{eksc}} = 5, S_{\text{em}} = 5$ ), pH = 7,00, pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ .



**Slika 28.** Promjene emisijskih ( $\lambda_{em} = 372$  nm) i ekscitacijskih ( $\lambda_{exc} = 251$  nm) spektara spoja **R223** pri različitim koncentracijama (raspon koncentracije  $c = 5 \times 10^{-7} - 1,5 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>), pH = 7,00, pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>.



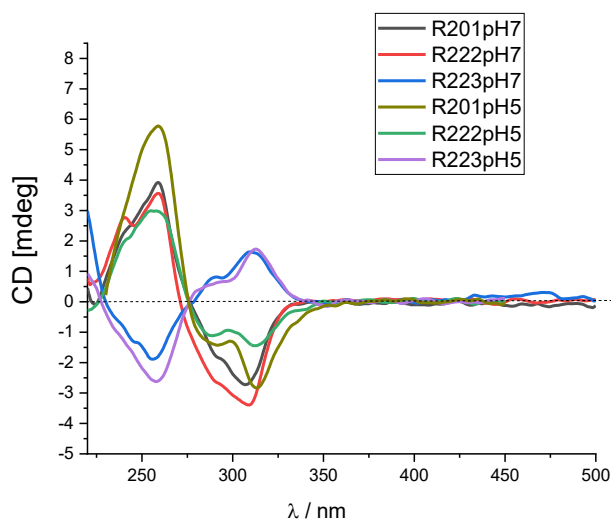
**Slika 29.** Emisijski spektri spojeva **R201**, **R222** i **R223** pri koncentraciji  $c = 1,5 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup> na valnoj duljini ekscitacije  $\lambda_{exc} = 251$  nm ( $S_{eksc} = 5, S_{em} = 5$ ), pH = 5,00, pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>.



**Slika 30.** Promjene emisijskih ( $\lambda_{em} = 397$  nm) i ekscitacijskih spektara ( $\lambda_{exc} = 251$  nm) spoja **R223** pri različitim koncentracijama na valnoj duljini ekscitacije  $\lambda_{exc} = 251$  nm (raspon koncentracije  $c = 5 \times 10^{-7} - 2 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>), pH = 5,00, pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>.

#### 4.1.3. CD spektri spojeva **R201**, **R222** i **R223**

CD spektri pri pH = 7,00 i pri pH = 5,00 prikazani su na slici 31. Iz snimljenih podataka mogu se uočiti dominantne CD vrpce, negativna i pozitivna, sličnih intenziteta (na valnim duljinama  $\lambda = 309$  nm i  $\lambda = 260$  nm). Spojevi **R201** i **R222** pri pH = 5,00 imaju dodatnu CD vrpce na valnoj duljini  $\lambda = 288$  nm. Spoj **R223** lako se prepoznaje zbog specifične bisignatne CD vrpce i u neutralnim, pH = 7,00, i u blago kiselim, pH = 5,00 uvjetima. Obje bisignatne vrpce imaju slične intenzitete, oko 257 nm, odnosno 310 nm, ali suprotnih predznaka u odnosu na intrinzične CD signale spojeva **R201** i **R222**. Te vrijednosti valnih duljina odgovaraju apsorpcijskim maksimumima kromofora fenantridina i pirola u ispitivanim spojevima. Takvi bisignantni CD signali mogu upućivati na stvaranje intramolekularnih ili intermolekularnih dimera.<sup>39,40</sup> Iz literature je poznato da je heterociklički dušik fenantridina protoniran u kiselim uvjetima ( $pK_a \approx 6$ ) iz čega slijedi da su spojevi **R201**, **R222** i **R223** u blago kiselim uvjetima, pH = 5,00, u protoniranom stanju.<sup>41,42</sup> Nadalje, gvanidinska skupina vezana je na pirol preko acetilne skupine smanjujući time vrijednost  $pK_a$  slobodne gvanidinske skupine s 13,5 na otprilike 6 – 7. Vrijednost  $pK_a$  aminoalkilne jedinice lizina je oko 10,5 te se može pretpostaviti da spoj **R201** posjeduje dva pozitivna naboja pri pH = 5,00, dok pri pH = 7,00 samo GCP jedinica može biti djelomično protonirana. S druge strane, spojevi **R222** i **R223** imaju jedan pozitivan naboj pri pH = 7,00 i tri pozitivna naboja pri pH = 5,00.



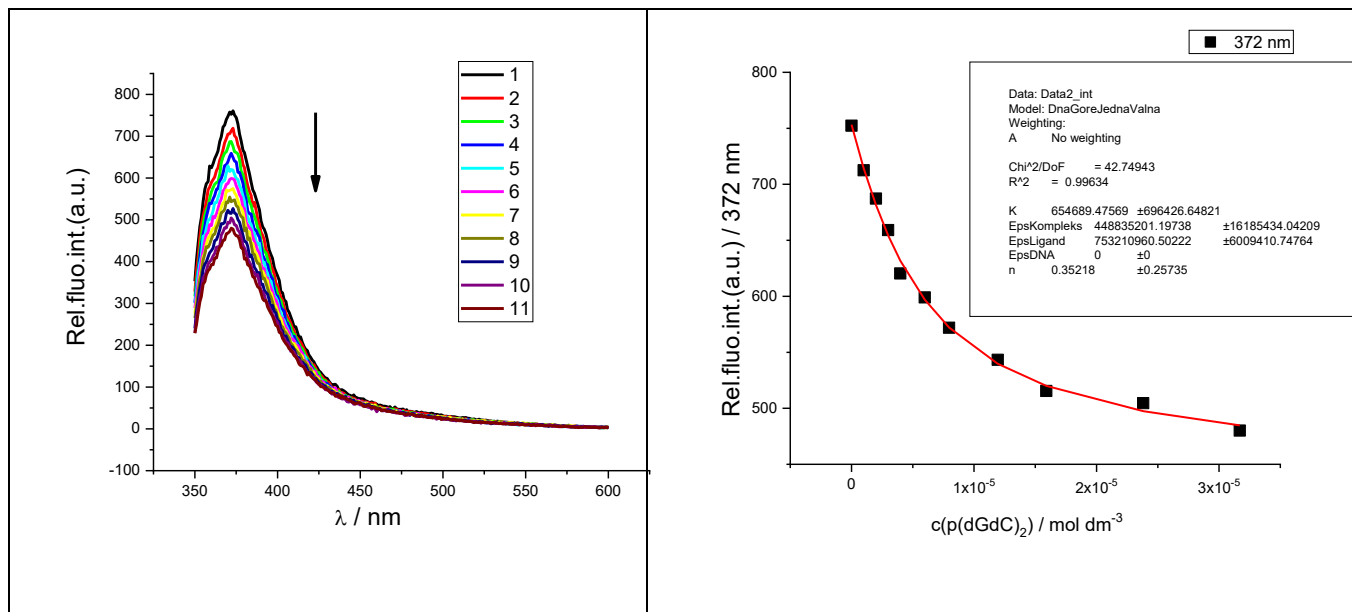
**Slika 31.** CD spektri spojeva **R201**, **R222** i **R223** ( $c = 1.5 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>) pri pH = 7,00 i pri pH = 5,00 (pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>).



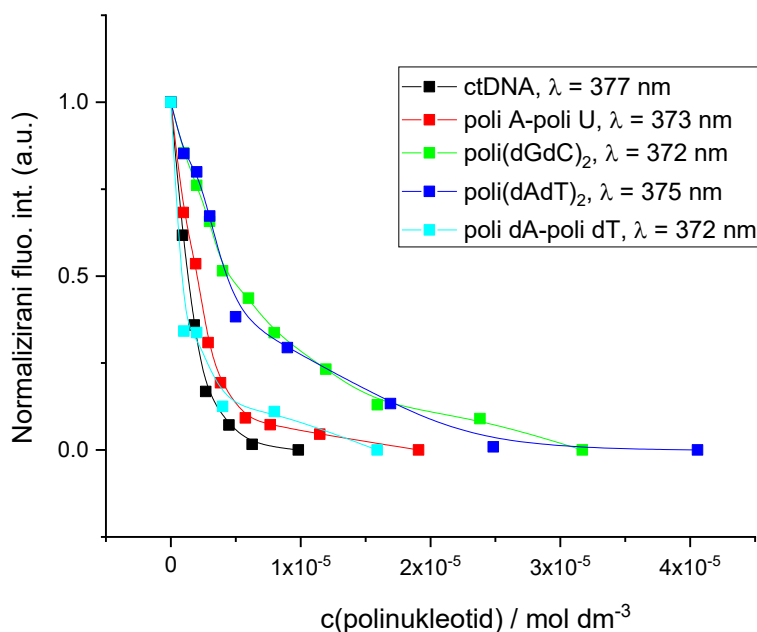
## 4.2. Ispitivanje interakcija spojeva R201, R222 i R223 s polinukleotidima

### 4.2.1. Fluorimetrijske titracije

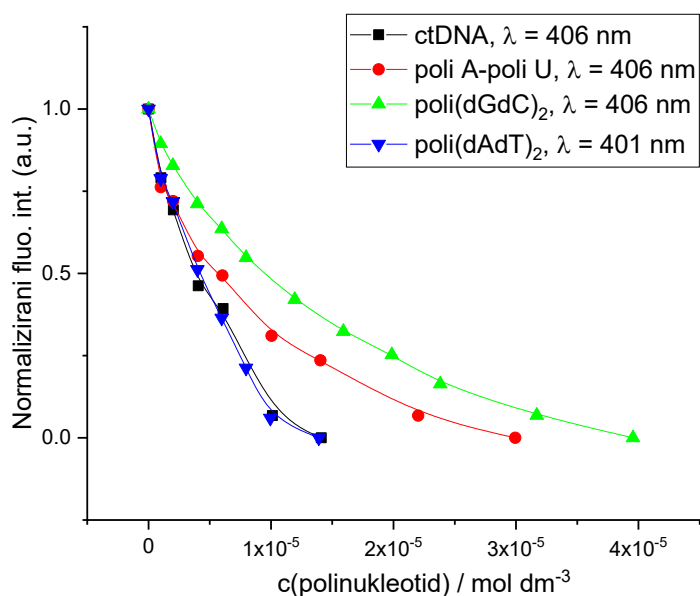
Fluorimetrijskim titracijama istraživao se afinitet vezanja spojeva **R201**, **R222** i **R223** prema polinukleotidima. Agregacija spojeva nije poželjna u izvođenju eksperimenata te su stoga provedeni pri niskoj koncentraciji spojeva ( $c = 1 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>). Dodavanje polinukleotida puferiranoj vodenoj otopini spojeva **R201**, **R222** i **R223** rezultiralo je slabim ili umjerenim smanjenjem fluorescencije što je prikazano na slikama (slika **32**, **33** i **34** te slike **D9** – **D35**). Međutim, fluorimetrijske promjene spoja **R223** nakon dodatka poli dA-poli dT otkrile su drugačiji odgovor u usporedbi s drugim proučavanim polinukleotidima. Točnije, pri pH 5,00 dodatak poli dA-poli dT inducirao je gašenje fluorescencije spoja **R223** pri maksimalnoj vrijednosti apsorbancije na 406 nm, dok je pri drugoj vrijednosti apsorbancije, na 453 nm, povećao fluorescenciju spoja **R223** (slika **35**). Ta promjena upućuje na stvaranje dva različita kompleksa **R223** – poli dA – poli dT. Ovaj način vezanja **R223** s poli dA-poli dT dodatno je ispitan drugim neovisnim metodama (CD spektroskopija i temperaturno mekšanje polinukleotida). Podaci dobiveni fluorimetrijskim titracijama, prikupljeni pri suvišku polinukleotida u odnosu na spoj, obrađeni su pomoću Scatchardove jednadžbe pri čemu su dobivene konstante vezanja,  $K_s$ , i omjeri  $n[\text{vezani spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  (Tablica 5).<sup>41,42</sup> U slučaju spoja **R223** s poli dA – poli dT, titracijski podaci dobiveni gašenjem odnosno povećanjem intenziteta fluorescencije posebno su obrađeni pomoću Scatchardove jednadžbe. U neutralnim uvjetima, spoj **R223** je pokazao jači afinitet prema poli dA – poli dT, poli(dAdT)<sub>2</sub> i poli rA – poli rU u usporedbi s poli(dGdC)<sub>2</sub>. Dodatno, izračunati afiniteti vezanja kompleksa **R223** – DNA/RNA u neutralnim uvjetima, pH = 7,00, su bili viši ( $\log K_s > 6$ ) od onih u blago kiselim uvjetima, pH = 5,00, ( $\log K_s < 6$ ). Iznimka su titracije spoja **R223** s homo – polinukleotidom, poli dA – poli dT gdje su obradom titracijskih podataka pomoću Scatchardove jednadžbe dobivene veće vrijednosti konstanti vezanja ( $\log K_s > 6$ ). Spoj **R222**, analog spoja **R223**, pokazao je sličan trend u veličini afiniteta vezanja, viši  $\log K_s$  u neutralnim uvjetima i jedan red veličine niže vrijednosti  $K_s$  pri slabo kiselom pH. Za razliku od spoja **R223**, spoj **R222** nije inducirao dvojakli fluorimetrijski odgovor s poli dA – dT pri pH = 5,00. U neutralnim uvjetima, samo u titracijama spoja **R222** s poli(dAdT)<sub>2</sub> i poli(dGdC)<sub>2</sub> promjene emisije su bile dovoljne za izračunavanje afiniteta vezanja. Promjene fluorescencije spoja **R201** u titracijama sa svim proučavanim polinukleotidima pri obje pH vrijednosti bile su premale za točan izračun konstanti vezanja.



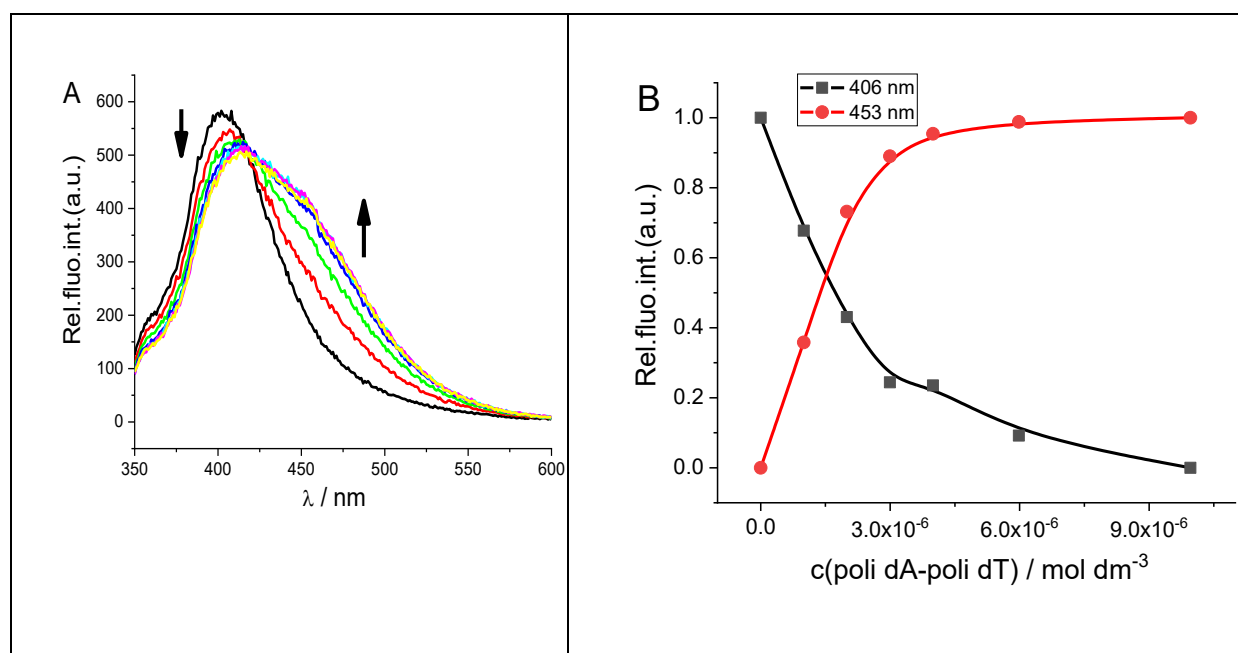
**Slika 32.** a) Promjene u fluorescencijskom spektru spoja **R223** ( $c = 1,0 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>,  $\lambda_{\text{eksc}} = 300$  nm) uslijed vezanja s poli(dGdC)<sub>2</sub> ( $c = 1,0 \times 10^{-6} - 3,1 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>); b) Ovisnost intenziteta fluorescencije spoja **R223** na  $\lambda_{\text{maks}} = 372$  nm o koncentraciji  $c(\text{poli}(\text{dGdC})_2)$  pri pH = 7,00 (pufer natrijev kakovodilat,  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>).



**Slika 33.** Promjene intenziteta fluorescencije normalizirane na najviši intenzitet emisije spoja **R223** tijekom titracije s polinukleotidima ( $\lambda_{\text{eksc}} = 300$  nm,  $c = 1 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>) u puferu natrijeva kakovodilata ( $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>, pH = 7,00).



**Slika 34.** Promjene intenziteta fluorescencije normalizirane na najviši intenzitet emisije spoja **R223** tijekom titracije s polinukleotidima ( $\lambda_{\text{eksc}} = 300 \text{ nm}$ ,  $c = 1 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u puferu natrijeva kakodilata ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 5,00).



**Slika 35.** a) Promjene u fluorescencijskom spektru **R223** ( $c = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{eksc}} = 300 \text{ nm}$ ) uslijed vezanja s poli dA-poli dT ( $c = 1,0 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); b) Ovisnost intenziteta fluorescencije **R223** na  $\lambda_{\text{maks}} = 406$  i  $453 \text{ nm}$  o koncentraciji  $c(\text{poli dA-poli dT})$  pri pH = 5,00 (pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )

**Tablica 5.** Konstante vezanja ( $\log K_s$ )<sup>a</sup> i omjeri  $n^a$  [vezani spoj] / [polinukleotid] izračunati iz podataka dobivenih fluorimetrijskim titracijama spojeva **R201**, **R222** i **R223** s polinukleotidima pri pH = 7,00 i pH = 5,00 (pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).

pH		ctDNA			poli(dAdT) <sub>2</sub>			poli(dGdC) <sub>2</sub>			poli A - poli U			poli dA - poli dT		
		$\log K_s$	$n$	$I/I_0^b$	$\log K_s$	$n$	$I/I_0^b$	$\log K_s$	$n$	$I/I_0^b$	$\log K_s$	$n$	$I/I_0^b$	$\log K_s$	$n$	$I/I_0^b$
7	<b>222</b>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	6.7	0.26	0.94	6.09	0.8	0.86	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>
	<b>223</b>	6.96	0.47	0.82	6.67	0.17	0.92	5.81	0.35	0.59	7.06	0.3	0.82	6.59	0.3	0.88
5	<b>222</b>	5.66	0.33	0.7	5.32	0.53	0.63	5.31	0.35	0.31	5.5	0.56	0.8	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>
	<b>223</b>	5.45	0.51	0.8	5.98	0.21	0.61	5.33	0.3	0.3	5.76	0.2	0.82	6.3 <sup>d</sup>	0.52	0.84
														7.4 <sup>e</sup>	0.4	2.13

<sup>a</sup> Obrada titracijskih podataka pomoću Scatchardove jednadžbe dala je omjer  $n$  [vezani spoj] / [polinukleotid]; koeficijenti korelacije iznose  $> 0,99$  za većinu izračunatih  $K_s$

<sup>b</sup>  $I_0$  – početni intenzitet fluorescencije **R201**, **R222** i **R223**;  $I$  – intenzitet fluorescencije kompleksa **R201**, **R222** i **R223** / polinukleotid izračunat Scatchardovom jednadžbom;

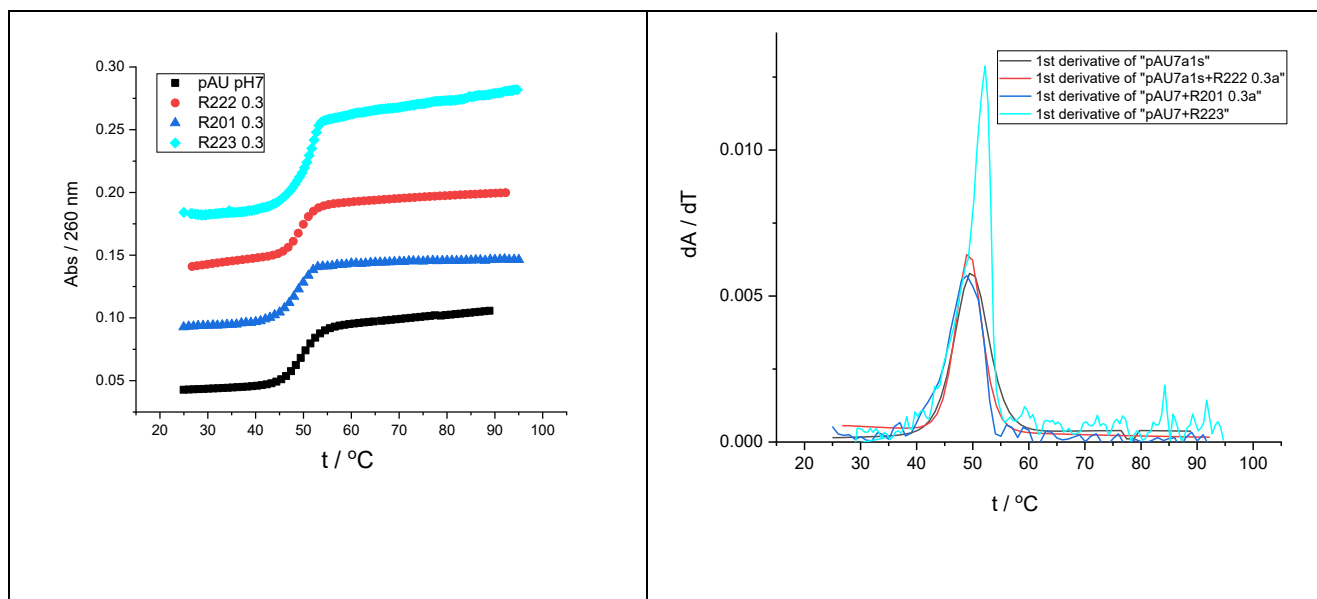
<sup>c</sup> Mala promjena fluorescencije ili malo točaka u nelinearnom dijelu krivulje onemogućili su točan izračun konstanti vezanja

<sup>d</sup> Podaci izračunati pomoću Scatchardove jednadžbe za dio krivulje ( $\lambda_{\text{maks}} = 406 \text{ nm}$ ) sa poli dA–poli dT gdje je početni intenzitet fluorescencije spoja **R223** snižen

<sup>e</sup> Podaci izračunati pomoću Scatchardove jednadžbe za dio krivulje ( $\lambda_{\text{maks}} = 453 \text{ nm}$ ) sa poli dA–poli dT gdje je fluorescencija primarnog kompleksa povećana zbog stvaranja sekundarnog kompleksa.

#### 4.2.2. Temperaturno mekšanje

Slika **36** i slike **D36 – D42** prikazuju ovisnost apsorbancije polinukleotida o temperaturi, a vrijednost  $T_m$  odgovara točki infleksije denaturacijske krivulje. Vrijednosti promjene temperature mekšanja dobivene ovom metodom prikazane su u **tablici 6**.



**Slika 36.** a) Krivulja taljenja poli A – poli U nakon dodatka spojeva **R201**, **R222** i **R223** u omjeru,  $r = 0,3$  pri  $\text{pH} = 7,00$  (pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ); b) prva derivacija apsorbancije.

**Tablica 6.**  ${}^a\Delta T_m$  vrijednost ( ${}^\circ\text{C}$ ) nakon dodatka spojeva **R201**, **R222** i **R223** pri omjeru  ${}^b r = 0,3$ ,  $\text{pH} = 7,00$  i  $\text{pH} = 5,00$  (pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).

	${}^b r = 0.3$	ctDNA	pA - pU	pdA - pdT	$\text{p(dAdT)}_2$
pH7	<b>R201</b>	0.6	0	0.7	1.2
	<b>R222</b>	0.9	0	1.5	2.6
	<b>R223</b>	0.7	2.5	-/2.1 <sup>c</sup>	1.0
pH5	<b>R201</b>	1.3	1.1/1.0 <sup>d</sup>	0.5	1.3
	<b>R222</b>	1.2	0/0.8 <sup>d</sup>	1.3	3.9
	<b>R223</b>	1.3	0/0.8 <sup>d</sup>	-/0.7 <sup>c</sup>	3.0

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

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

<sup>c</sup> bifazni temperaturni denuracijski prijelazi

<sup>d</sup> bifazni prijelaz: prvi prijelaz pri  $T_m = 46,5 \text{ }^\circ\text{C}$  odgovara denuraciji poli A – poli U, dok drugi prijelaz pri  $T_m = 61 \text{ }^\circ\text{C}$  odgovara denuraciji poli  $\text{AH}^+$  – poli  $\text{AH}^+$  koji nastaje pri  $\text{pH} = 5,00$ .<sup>43</sup>

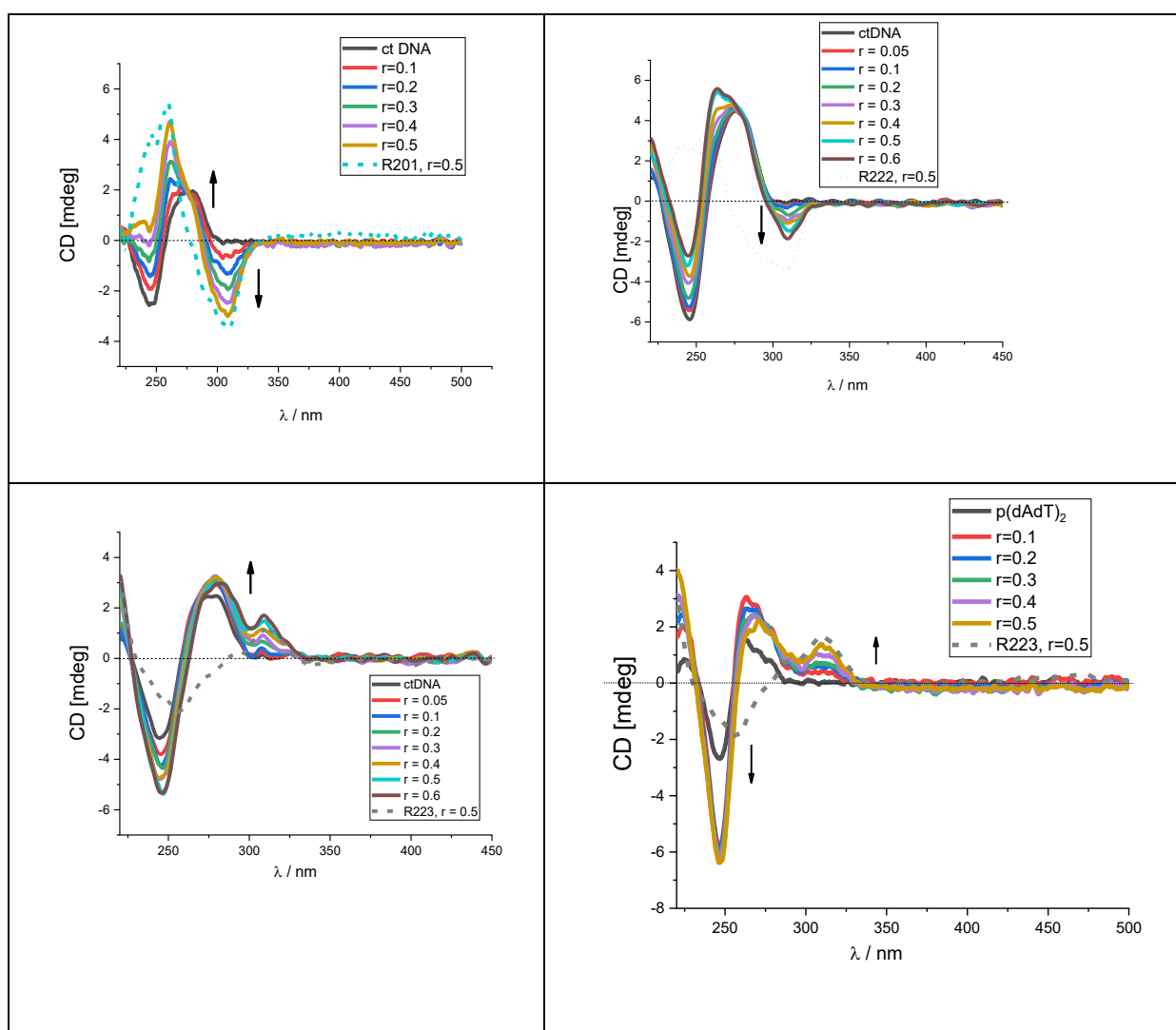
Svi ispitivani spojevi pokazali su bolji učinak stabilizacije polinukleotida u slabo kiselim, pH = 5,00, nego u neutralnim uvjetima, pH = 7,00. Iznimka je spoj **R223**, koji pokazuje bolju stabilizaciju u neutralnim uvjetima s poli A – poli U i poli dA–poli dT. Spoj **R223** pokazao je dvofaznu krivulju s poli dA–poli dT (tablica 6) i u neutralnim i u blago kiselim uvjetima (slike D37 i D42). Kako bi se utvrdilo je li postojeća dvofazna krivulja rezultat dva različita tipa vezanja ili indukcije stvaranja tripleksa, potrebno je provesti dodatna ispitivanja s tripleksom, dAdTdT pri većoj ionskoj jakosti,  $I = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ .

#### 4.2.3. Cirkularni dikroizam

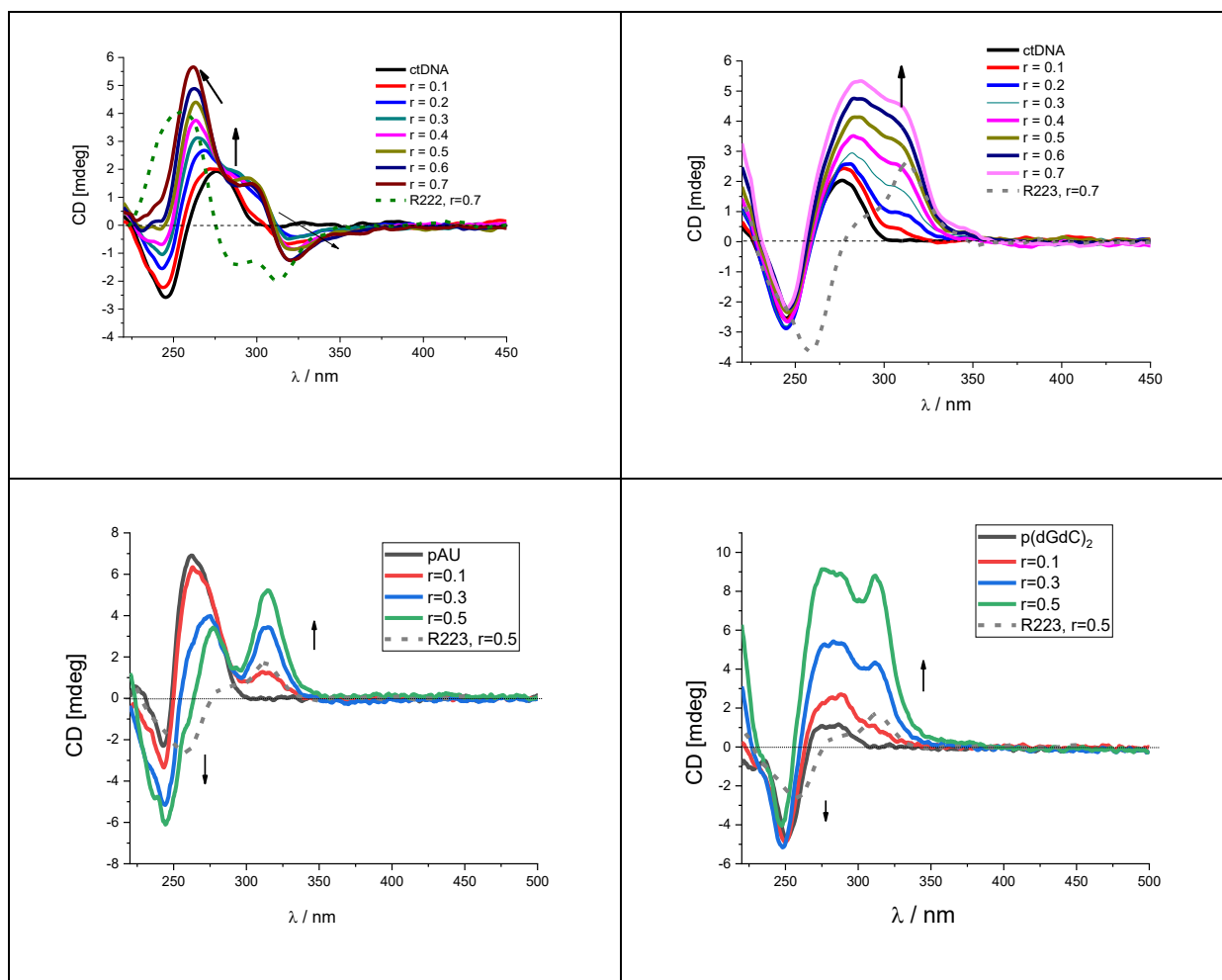
Budući da su proučavani spojevi kiralni i posljedično posjeduju intrinzičnu aktivnost CD, snimljeni su i spektri samih spojeva **R201**, **R222** i **R223** (slike 37 i 38) zbog lakšeg razumijevanja utjecaja malih organskih spojeva na konformaciju polinukleotida. Promjene u spektrima CD polinukleotida ne mogu se lako interpretirati u području valne duljine  $< 300 \text{ nm}$  jer ligandi također apsorbiraju svjetlost u tom području (slike 37 i 38 te slike u dodatku **D43** – **D46**). Budući da spojevi **R201**, **R222** i **R223** posjeduju UV/Vis spektre i na valnim duljinama  $\lambda > 300 \text{ nm}$ , CD promjene u ovom rasponu mogu se pripisati njihovim kromoforima u interakciji s DNA i RNA. Dodatak spojeva **R201**, **R222** i **R223** uzrokovao je značajne promjene u spektrima CD polinukleotida DNA i RNA (260 – 280 nm) kako u neutralnim, pH = 7,00, tako i u slabo kiselim uvjetima, pH = 5,00. U titracijama spojem **R201** na pH = 7,0 zamječen je porast CD signala polinukleotida (260 – 280 nm) i nastanak negativnih ICD signala na 309 nm. Te su promjene bile sličnog oblika i intenziteta kao i intrinzični signali CD **R201**. Samo u slučaju poli(dGdC)<sub>2</sub>, signali ICD na 260 – 280 nm i negativni signali ICD na 309 nm bili su manjeg intenziteta od intrinzičnih signala CD pri titraciji spojem **R201**. Za razliku od dodatka **R201**, u titracijama ispitivanih polinukleotida spojem **R222**, negativni signali ICD u području valnih duljina od 309 – 311 nm bili su manjeg intenziteta u usporedbi s intrinzičnim signalima CD pri titraciji spojem **R222**. Dodatak **R223** u otopinu polinukleotida na pH = 7,00 uzrokovao je nastanak pozitivnih signala ICD na 311 nm koji su bili nižeg inteziteta od intrinzičnih signala CD pri titraciji spojem **R223**. Takva sličnost signala CD nastalih kompleksa i intrinzičnih signala CD proučavanih spojeva ukazuje da se spojevi **R201**, **R222** i **R223** vežu na polinukleotide najvjerojatnije u obliku dimera ili u utorima ili u njihovoj blizini duž polinukleotidne okosnice. Ipak, u titracijama sa svim polinukletidima na pH = 5,0, signali ICD bili su značajno većeg intenziteta (pozitivni ICD) od

intrinzičnih signala CD za titraciju spojem **R223**. Povećanje ICD intenziteta na 310 nm bilo je najočitije u titracijama sa poli(dAdT)<sub>2</sub> i poli(dGdC)<sub>2</sub> (slike 37 i 38). Stabilizacijski učinci poli(dAdT)<sub>2</sub> i pozitivni signali ICD u titracijama CD s ctDNA, poli dA – poli dT i poli(dGdC)<sub>2</sub> upućuju na vezanje spoja **R223** u manji utor koje je izraženije pri pH = 5,00. Vezanje **R223** na poli A – poli U također je rezultiralo pozitivnim ICD signalom na 314 nm. Uzimajući u obzir dimenzije manjeg utora (širok i vrlo plitak) ovog polinukleotida, može se zaključiti da je veliki utor dominantno mjesto vezanja.<sup>43</sup>

Samo u titracijama sa poli(dGdC)<sub>2</sub> i ctDNA (koja sadrži GC parove baza) (slika 37 i 38) dodatak **R223** je uzrokovao značajni porast intenziteta polinukleotida pri 275 nm.



Slika 37. CD titracije spojeva **R201**, **R222** i **R223** sa ctDNA i **R223** sa poli(dAdT)<sub>2</sub> ( $c = 3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri različitim molarnim omjerima  $r$  [spoj] / [polinukleotid] u puferu natrijeva kakodilata ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,00).



Slika 38. CD titracije spojeva **R222** i **R223** sa ctDNA i **R223** sa poli A – poli U i poli(dGdC)<sub>2</sub> ( $c = 3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri različitim molarnim omjerima  $r$  [spoj] / [polinukleotid] u puferu natrijeva kakodilata ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH = 5,00).



## § 5. ZAKLJUČAK

U okviru ovog rada spektroskopski su okarakterizirane tri nova peptidna derivata fenantridina **R201**, **R222** i **R223**. UV-Vis spektroskopijom utvrđeno je da i u neutralnim i blago kiselim uvjetima dolazi do linearnog porasta apsorbancije s povećanjem koncentracije spoja **R201** do koncentracije  $c = 2,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  i spojeva **R222** i **R223** do koncentracije  $c = 6 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ . Intenzitet fluorescentne emisije spojeva **R201**, **R222** i **R223** bio je proporcionalan koncentraciji spoja do koncentracije,  $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ .

Interakcije peptidnih derivata fenantridina s polinukleotidima DNA i RNA istražene su UV/Vis i fluorescencijskom spektroskopijom te spektroskopijom cirkularnog dikroizma u neutralnom i blago kiselom mediju. Istraživanja su pokazala utjecaj strukture spojeva (razlika u vrsti i rasporedu aminokiselina u peptidnoj poveznici) i pH vrijednosti otopine na jačinu i način vezanja spojeva na polinukleotide.

Bisignatni signali zamjećeni u spektrima CD spojeva pri obje pH vrijednosti otopine ukazuju na nastajanje dimera. Tu pretpostavku potrebno je provjeriti dodatnim eksperimentima što nije bilo predviđeno u okviru ovog diplomskog rada.

Fluorimetrijskim titracijama utvrđen je visok afinitet vezanja dvaju peptidnih derivata fenantridina s aminokiselinom lizin u peptidnoj okosnici (**R222** i **R223**) prema polinukleotidima ( $\log K_s = 5,3-7,4$ ). Opažen je specifični fluorimetrijski odgovor u titraciji spoja **R223** (koji sadrži lizin bliže fenantridinskom prstenu) samo sa DNA polinukleotidom, poli dA-poli dT (na početku titracije pad fluorescencije, a zatim porast).

Eksperimentima temperaturnog mekšanja utvrđena je zanemariva do umjerena stabilizacija dvolančanih polinukleotida. Svi proučavani spojevi pokazali su bolji učinak stabilizacije svih polinukleotida pri slabo kiselom pH nego u neutralnim uvjetima. Jedino je spoj **R223** pokazao bolji stabilizacijski učinak u neutralnim uvjetima s poli A-poli U (RNA) i poli dA – poli dT.

U titracijama sa spojevima **R201** i **R222** pri obje ispitivane pH vrijednosti otopine opažen je porast intenziteta CD spektra za polinukleotide DNA i RNA (u području 260 do 280 nm) i pojava negativnih ICD signala (u području od 309-313 nm). Te su promjene po intenzitetu i obliku bile vrlo slične intrinzičnim signalima CD samih spojeva. Na temelju tih promjena te neznatne ili umjerene stabilizacije polinukleotida može se zaključiti da se spojevi vežu (najvjerojatnije u obliku dimera) uzduž polinukleotidne okosnice. Dodatak spoja **R223** u

otopinu polinukleotida u neutralnim uvjetima izazvao je nastanak pozitivnog signala ICD pri 311 nm koji je intenzitetom bio manji nego intrinzični CD signal samog spoja. U blago kiselim uvjetima je u CD spektrima spoja **R223** zamjećen veliki porast intenziteta signala CD pri 311 nm sa svim polinukleotidima. Takve promjene kao i male do umjerene stabilizacije polinukleotida upućuju na vezanje spoja (najvjerojatnije u obliku dimera) uzduž polinukleotidne okosnice u neutralnim uvjetima te u utore polinukleotida u blago kiselim uvjetima.

U blago kiselim uvjetima u CD spektru dodatkom spoja **R223** opažen je porast intenziteta pri 275 nm samo za polinukletide koji sadrže GC parove baza (GC-DNA i ctDNA koja sadrži 42% GC parova baza).

Na temelju provedenih istraživanja može se zaključiti da spojevi, osobito **R222** i **R223**, pokazuju značajne interakcije s biomakromolekulama DNA i RNA. Najzanimljiviji je spoj **R223** kod kojeg je opažen specifični fluorimetrijski odgovor samo sa poli dA-poli dT i koji bi mogao imati primjenu kao jednostavna kiralna proba za DNA koje sadrže GC parove baza.

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

A – adenin

$A$  – apsorbancija

$c$  – množinska koncentracija

C – citozin

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

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

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

EB – etidijev bromid

$\epsilon$  – molarni ekstinkcijski koeficijent

F - fluorescencija

G – gvanin

GCP – gvanidinokarbonilpirolni supstituent

HIV-1 RRE – Rev–regulatorski protein virusa HIV-1 (engl. *HIV-1 Rev response element*)

I – intenzitet

IC – unutarnja pretvorba (engl. *internal conversion*)

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

ISC – međusustavno križanje (engl. *intersystem crossing*)

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

$\lambda$  – valna duljina

$l$  – duljina optičkog puta

M – mol dm<sup>-3</sup>

$n$  – omjer koncentracije vezanog spoja i polinukleotida

$P_0$  – intenzitet početnog snopa zračenja

$P$  – intenzitet mjerenog snopa zračenja

P – fosforescencija

$pK_a$  – negativni logaritam konstante disocijacije kiseline

poli A-poli U – dvolančani homopolinukleotid adeninske i uracilne kiseline

poli (dAdT)<sub>2</sub> – dvolančani alternirajući polinukleotid adeninske i timinske kiseline

poli (dGdC)<sub>2</sub> – dvolančani alternirajući polinukleotid gvaninske i citozinske kiseline

$r$  – omjer koncentracije spoja i polinukleotida

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

S – singletno stanje

T – timin

T – tripletno stanje

$T_m$  – temperaturno mekšanje

$\Delta T_m$  – promjena temperature mekšanja

U – uracil

UV/VIS – ultraljubičasto/vidljivo elektromagnetsko zračenje (engl. *ultraviolet/visible*)

VR – vibracijska relaksacija

$\phi$  – kvantni prinos

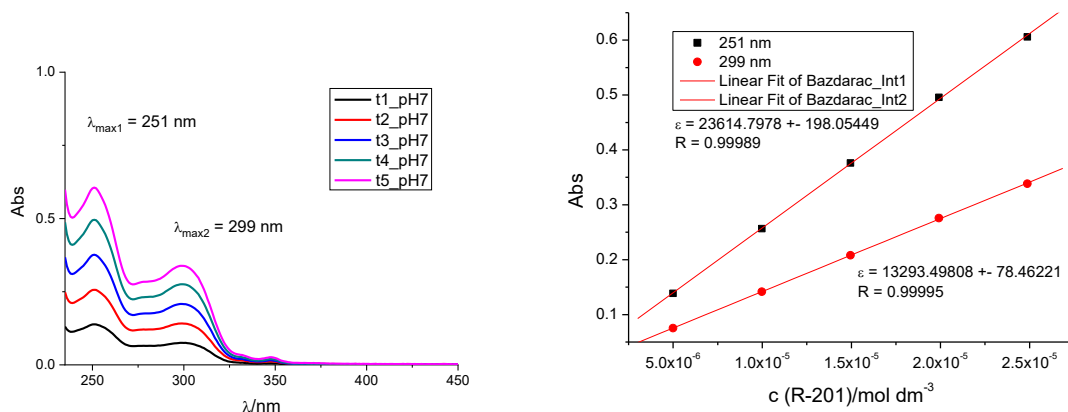
## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. B. Dervan, *Bioorg. Med. Chem.* **9**, 2001, str. 2215-2235.
2. I. Piantanida, *Kem. Ind.* **52**, 2003, str. 545-552.
3. J. Matić, L.-M. Tumir, M. Radić Stojković, I. Piantanida, *Curr. Protein Pept. Sci.* **17**, 2016, str. 127–134.
4. L.-M. Tumir, M. Radić Stojković, I. Piantanida, *Beilstein J. Org. Chem.* **10**, 2014, str. 2930–2954.
5. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013., str. 107-111.
6. J. A. McCleverty, T. J. Meyer, *Comprehensive Coordination Chemistry II*, Elsevier Science, 2003, str. 787-813.
7. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W.H. Freeman & Company, New York, 2008, str. 271-287.
8. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013., str. 763-788.
9. E. Chargaff, R. Lipshitz, *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 1953, str. 3658. – 3661.
10. K. R. Sangeetha Gowda, B. B. Mathew, C. N. Sudhamani, H. B. Naik, *J. Biomed. Biotechnol.* **2**, 2014, str. 1-9.
11. S. U. Rehman, T. Sarwar, M. A. Husain, H. M. Ishqi, M. Tabish, *Arch. Biochem. Biophys.* **576**, 2015 str. 49-60.
12. R. Palchaudhuri, P. J. Hergenrother, *Curr. Opin. Biotechnol.* **18**, 2007, str. 497-503.
13. Interna skripta za praktikum biokemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zavod za biokemiju, Zagreb, 2019., str. 36.
14. M. K. Goftar, N. M. Kor, Z. M. Kor, *Int. J. Adv. Biol. Biomed. Res.* **2**, 2014, str. 811-822.
15. H. Ihmels, D. Otto, *Top. Curr. Chem.* **258**, 2005, str. 161-204.
16. J. Dai, C. Punchihewa, P. Mistry, A. T. Ooi, D. Yang, *J. Biol. Chem.* **279**, 2004, str. 46096 – 46103.
17. T. I. Watkins, G. Woolfe, *Nature* **169**, 1952, str. 506–507.
18. J. Malikova, A. Zdarilova, A. Hlobilkova, *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palack. Olomouc Czech Repub.* **150**, 2006, str. 5–12.

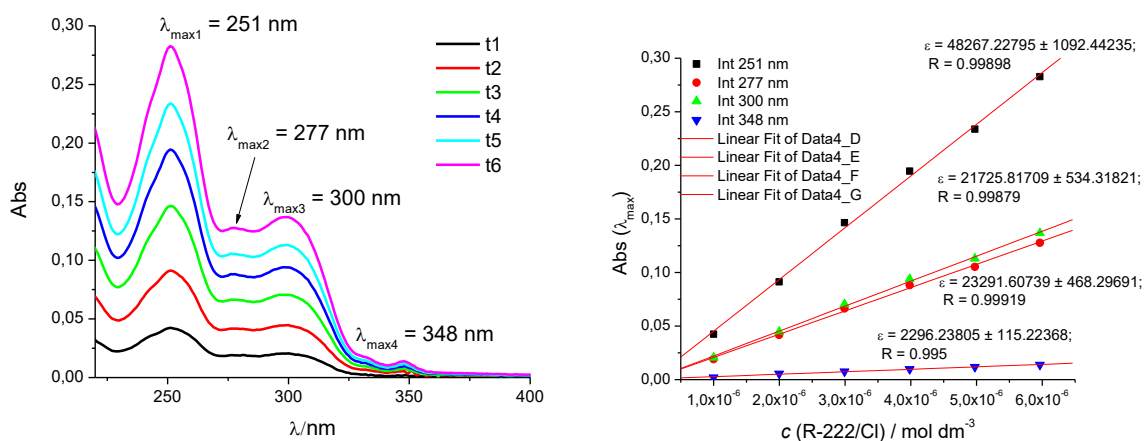
19. N. W. Luedtke, Q. Liu, Y. Tor, *Chem.–Eur. J.* **11**, 2005, str. 495–508.
20. N. W. Luedtke, Q. Liu, Y. Tor, *Bioorg. Med. Chem.* **11**, 2003, str. 5235–5247.
21. C. Bailly, R. K. Arafa, F. A. Tanius, W. Laine, C. Tardy, A. Lansiaux, P. Colson, D. W. Boykin i W. D. Wilson, *Biochemistry* **44**, 2005, str. 1941–1952.
22. M. Dukši, D. Baretić, V. Čaplar, I. Piantanida, *Eur. J. Med. Chem.* **45**, 2010, str. 2671–2676;
23. M. Dukši, D. Baretić, I. Piantanida, *Acta Chim. Slov.* **59**, 2012, str. 464–472.
24. P. Novak, T. Jednačak, *Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama*, TIVA Tiskara Varaždin, Varaždin, 2013., str. 74-77.
25. 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.
26. D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*, Cengage Learning, Boston, 2017, str. 304-306.
27. Interna skripta za praktikum biokemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zavod za biokemiju, Zagreb, 2019., str. 43-44
28. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013., str. 114-115.
29. J. Matić, F. Šupljika, T. Tandarić, M. Dukši, P. Piotrowski, R. Vianello, A. Brozović, I. Piantanida, C. Schmuck, MR. Stojković *Int. J. Biol. Macromol.* **134**, 2019, str. 422-434.
30. 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.
31. J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, Singapore, 2006, str. 1-12.
32. D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*, Cengage Learning, Boston, 2017, str. 361-388.
33. 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.
34. S. Rončević, *Fluorescencijska spektroskopija*, predavanje iz kolegija Instrumentna analitika 1, Zagreb, 2019.
35. J. Kypr, I. Kejnovská, D. Renčiuik, M. Voričková, *Nucleic Acids Res.* **37**, 2009, str. 1713–1725.

36. A. Rodger, *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation*, John Wiley & Sons, New York, 2014, str. 1-34.
37. T. Šmidlehner, I. Piantanida, G. Pescitelli, *Beilstein J. Org. Chem.* **14**, 2018 str. 84-105.
38. N. C. Garbett, P. A. Ragazzon, J. B. Chaires, *Nat. Protoc.* **2**, 2007, str. 3116-3172.
39. R. L. Jones, W. D. Wilson, *Biopolymers* **20**, 1981, str. 141-154.
40. M. Eriksson, B. Norden, *Meth. Enzymol.* **340**, 2001, str. 68–98.
41. G. Scatchard, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **51** , 1949, str. 660.
42. J. D. McGhee, P. H. von Hippel, *J. Mol. Biol.* **86**, 1974, str. 469-89.
43. C. R. Cantor, P. R. Schimmel, *Biophysical Chemistry*, ed. W. H. Freeman, San Francisco, SAD, 1980.

## § 8. DODATAK

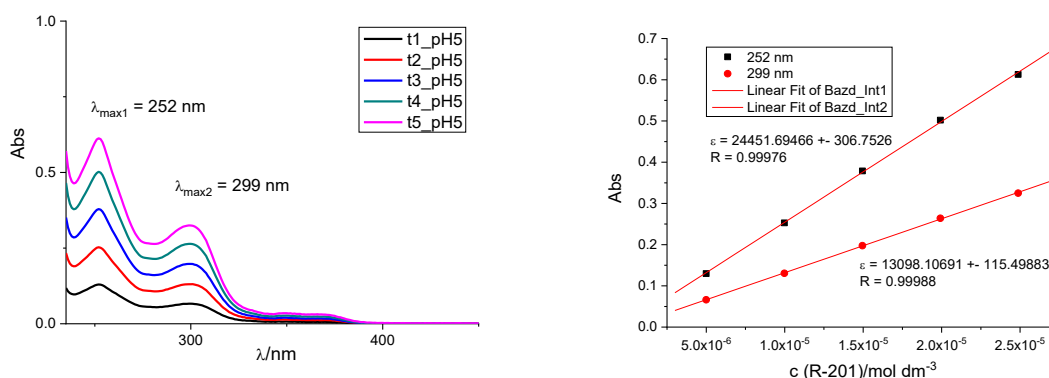


Slika D1. UV/VIS spektar spoja **R201** pri različitim koncentracijama ( $c = 5 \times 10^{-6}$ -  $2.5 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>), pH = 7,00, pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05$  M.

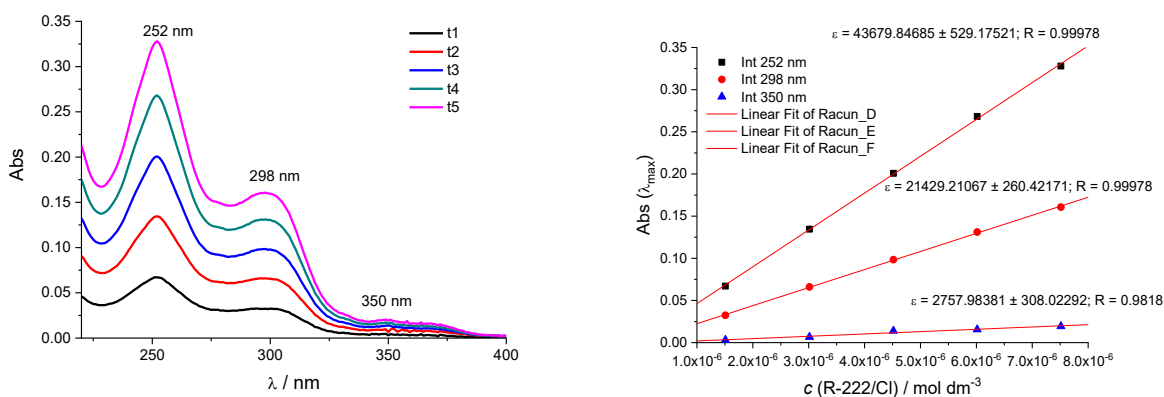


Slika D2. UV/VIS spektar spoja **R222** pri različitim koncentracijama ( $c = 1 \times 10^{-6}$ -  $6 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>), pH = 7,00, pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05$  M.

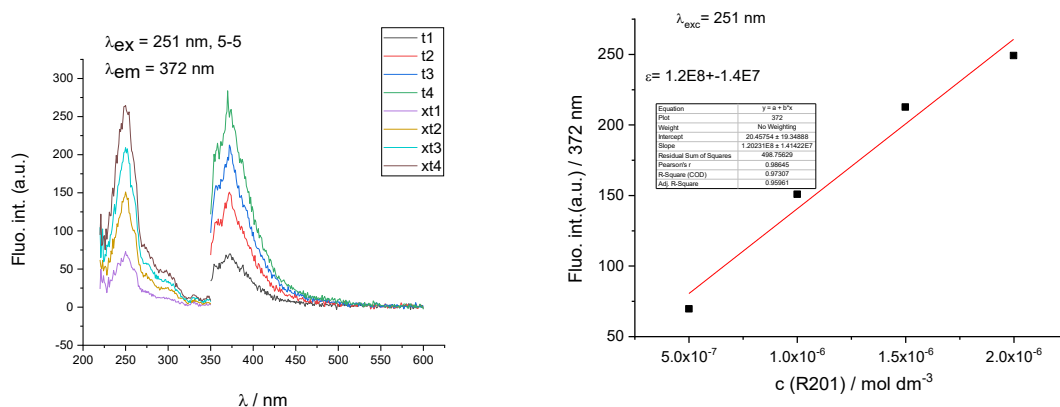




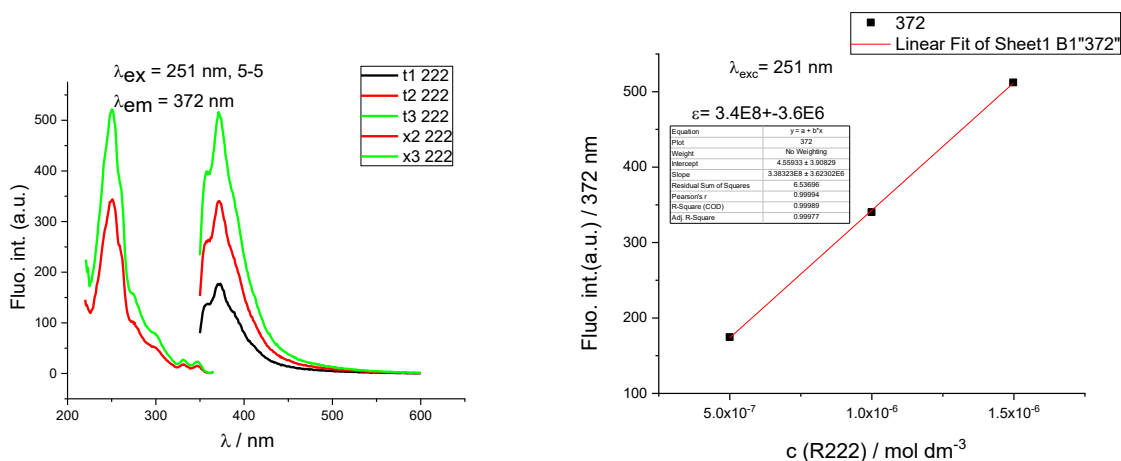
Slika D3. UV/VIS spektar spoja **R201** pri različitim koncentracijama ( $c = 5 \times 10^{-6}$ -  $2.5 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>), pH = 5,00, pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05$  M.



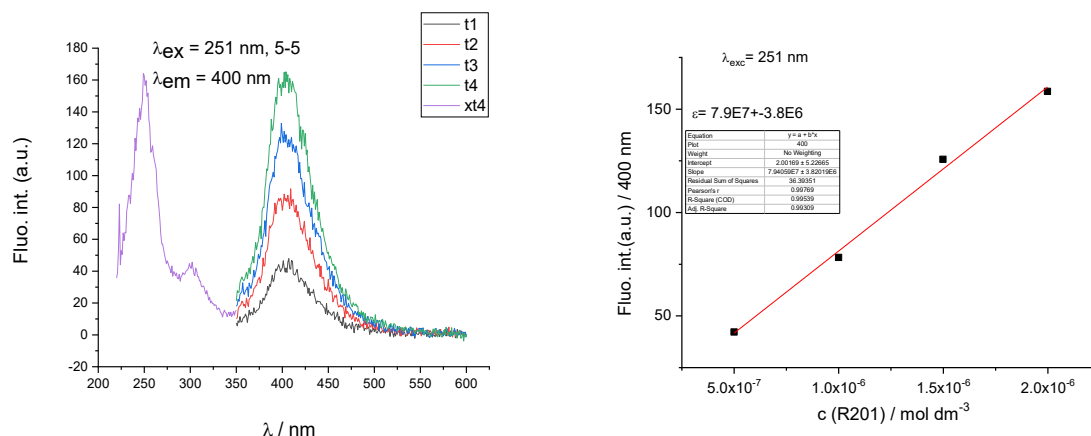
Slika D4. UV/VIS spektar spoja **R222** pri različitim koncentracijama ( $c = 1 \times 10^{-6}$ -  $6 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>), pH = 5,00, pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05$  M.



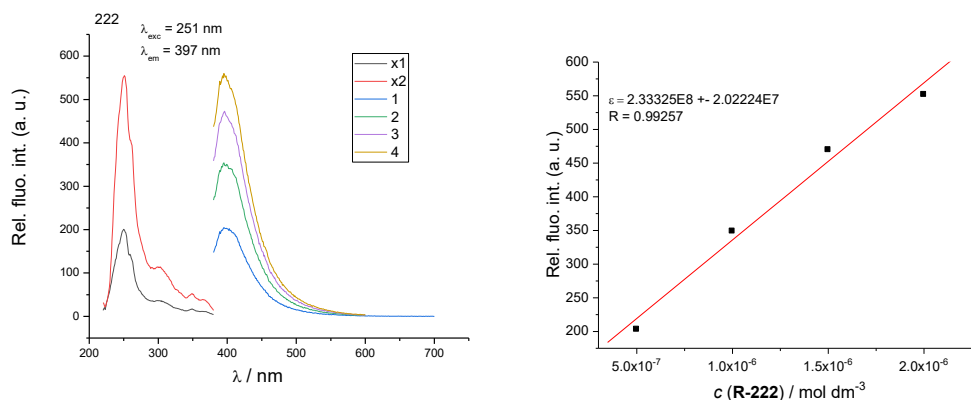
Slika D5. Promjene emisijskog i ekscitacijskog spektra spoja **R201** pri različitim koncentracijama na valnoj duljini ekscitacije  $\lambda_{exc} = 251$  nm (raspon koncentracije  $c = 5 \times 10^{-7}$  -  $2 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>), pH = 7,00, pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>.



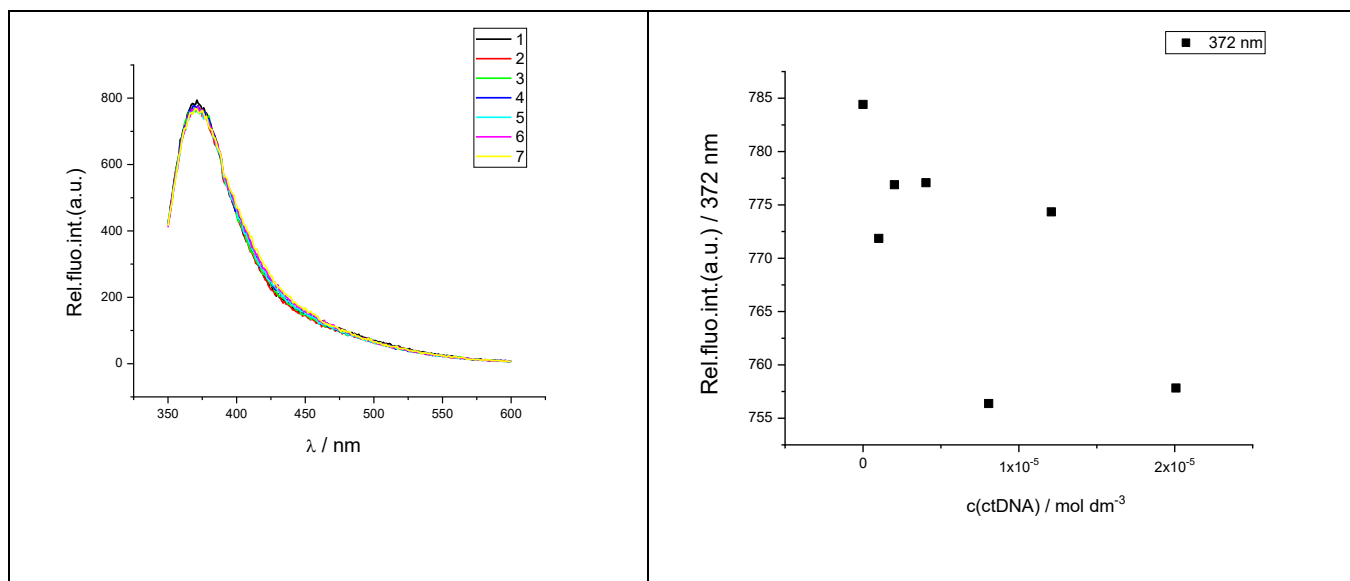
Slika D6. Promjene emisijskog i ekscitacijskog spektra spoja **R222** pri različitim koncentracijama na valnoj duljini ekscitacije  $\lambda_{exc} = 251$  nm (raspon koncentracije  $c = 5 \times 10^{-7} - 1,5 \times 10^{-6}$   $\text{mol dm}^{-3}$ ), pH = 7,00, pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05$   $\text{mol dm}^{-3}$ .



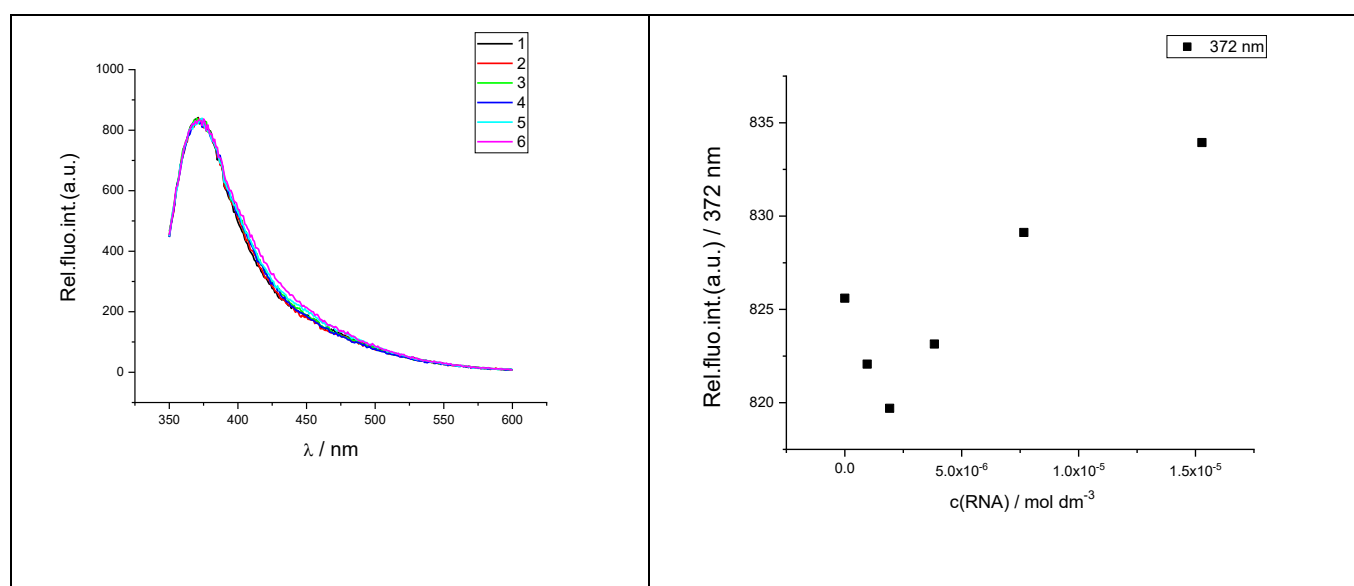
Slika D7. Promjene emisijskog i ekscitacijskog spektra spoja **R201** pri različitim koncentracijama na valnoj duljini ekscitacije  $\lambda_{exc} = 251$  nm (raspon koncentracije  $c = 5 \times 10^{-7} - 2 \times 10^{-6}$   $\text{mol dm}^{-3}$ ), pH = 5,00, pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05$   $\text{mol dm}^{-3}$ .



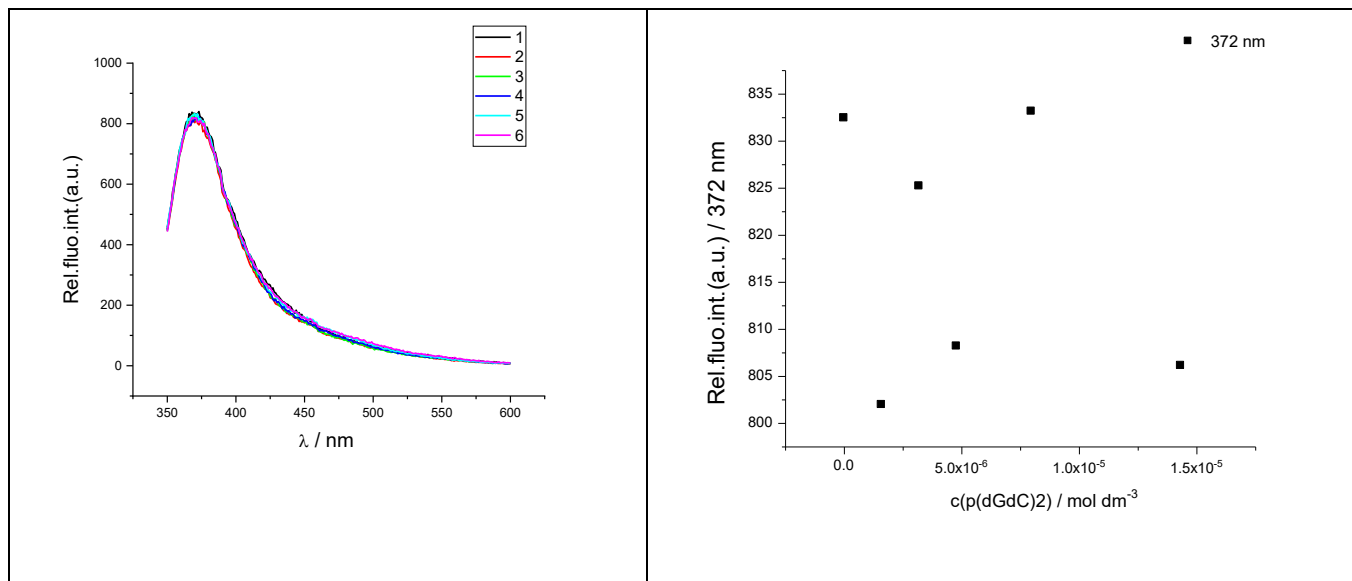
Slika D8. Promjene emisijskog i ekscitacijskog spektra spoja **R222** pri različitim koncentracijama na valnoj duljini ekscitacije  $\lambda_{exc} = 251$  nm (raspon koncentracije  $c = 5 \times 10^{-7} - 2 \times 10^{-6}$   $\text{mol dm}^{-3}$ ), pH = 5,00, pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05$   $\text{mol dm}^{-3}$ .



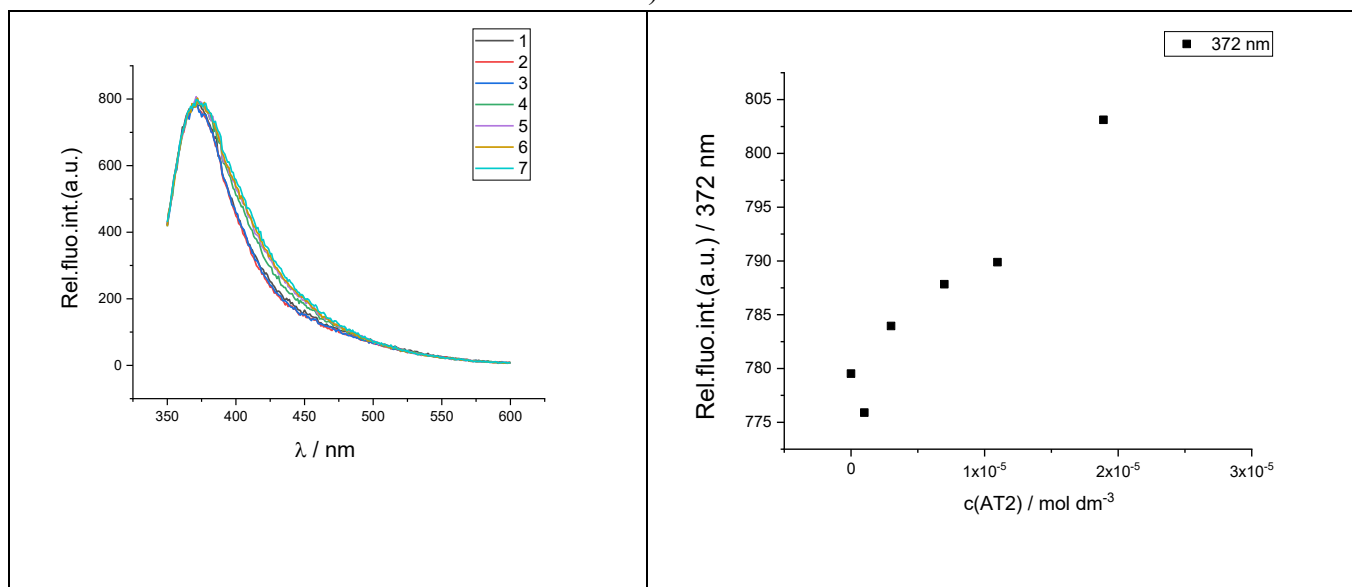
Slika D9. a) Fluorescencijske promjene titracije **R201** ( $c = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}}=300 \text{ nm}$ ) s ctDNA ( $c = 1,0 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); b) Ovisnost apsorbancije **R201** na  $\lambda_{\text{max}} = 372 \text{ nm}$  o koncentraciji  $c(\text{ctDNA})$  pri pH = 7,00 (pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).



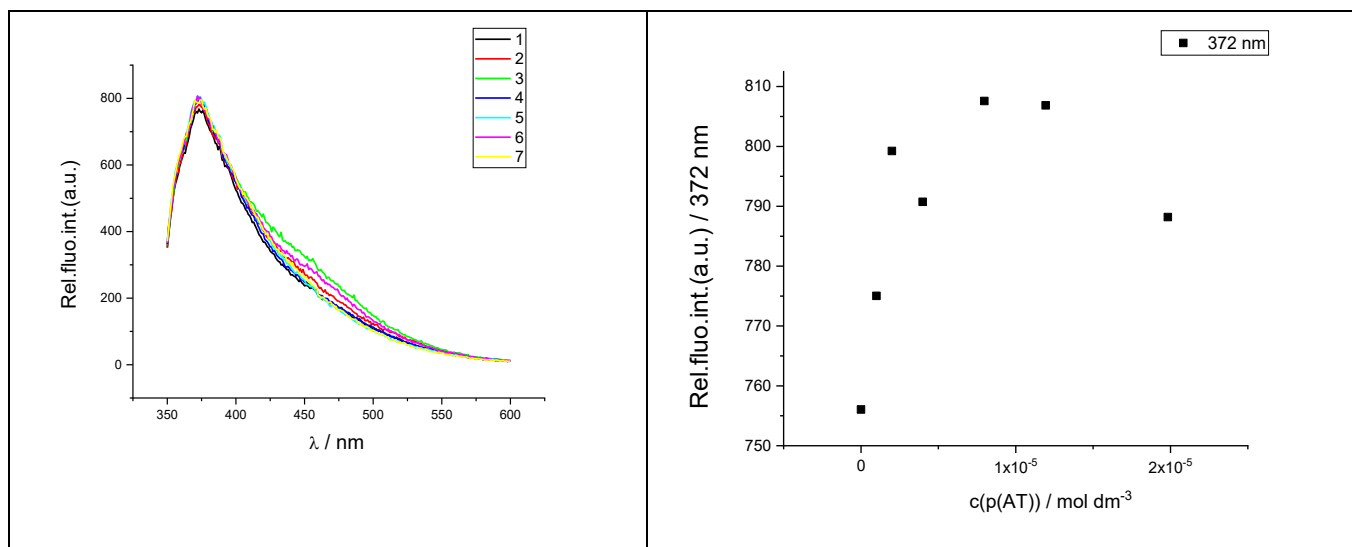
Slika D10. a) Fluorescencijske promjene titracije **R201** ( $c = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}}=300 \text{ nm}$ ) s poli A – poli U ( $c = 1,0 \times 10^{-6} - 1,9 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); b) Ovisnost apsorbancije **R201** na  $\lambda_{\text{max}} = 372 \text{ nm}$  o koncentraciji  $c(\text{poliA} - \text{poliU})$  pri pH = 7,00 (pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).



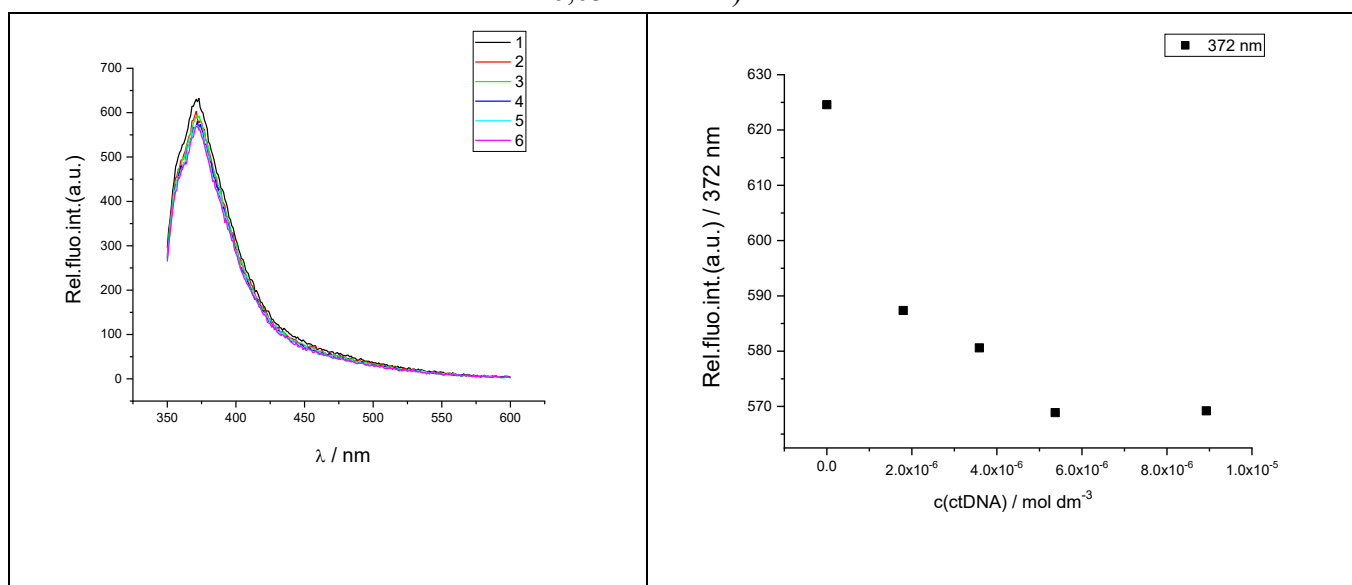
Slika D11. a) Fluorescencijske promjene titracije **R201** ( $c = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 300 \text{ nm}$ ) s poli(dGdC)<sub>2</sub> ( $c = 1,6 \times 10^{-6} - 1,4 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); b) Ovisnost apsorbancije **R201** na  $\lambda_{\text{max}} = 372 \text{ nm}$  o koncentraciji  $c(\text{poli(dGdC)}_2)$  pri pH = 7,00 (pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).



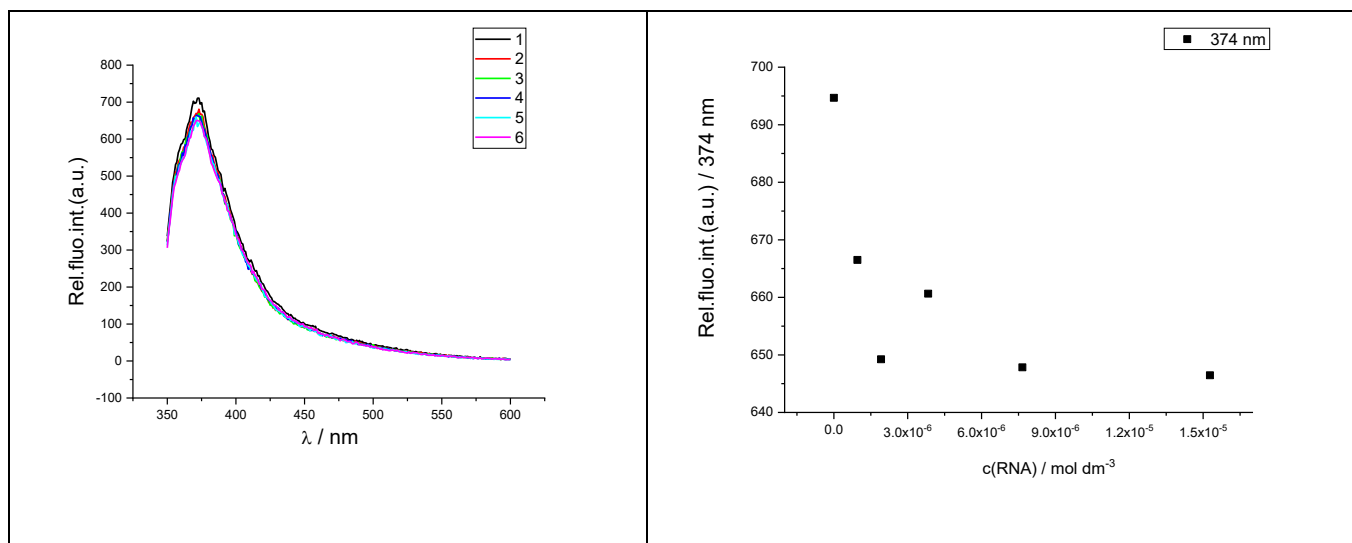
Slika D12. a) Fluorescencijske promjene titracije **R201** ( $c = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 300 \text{ nm}$ ) s poli(dAdT)<sub>2</sub> ( $c = 1,0 \times 10^{-6} - 1,9 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); b) Ovisnost apsorbancije **R201** na  $\lambda_{\text{max}} = 372 \text{ nm}$  o koncentraciji  $c(\text{poli(dAdT)}_2)$  pri pH = 7,00 (pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).



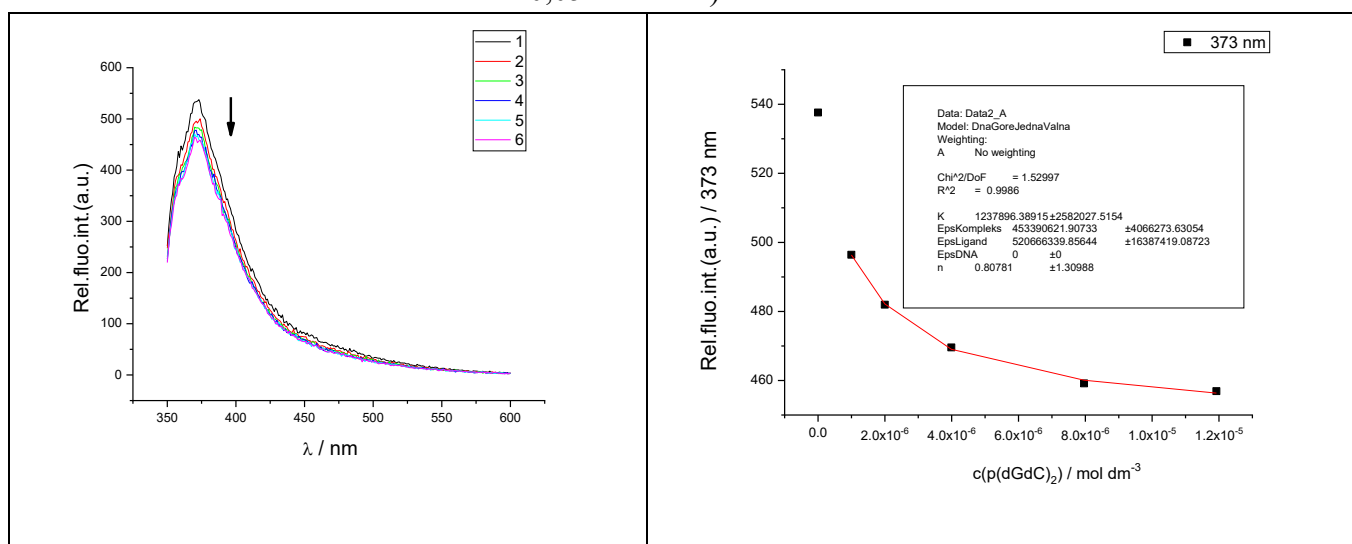
Slika D13. a) Fluorescencijske promjene titracije **R201** ( $c = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}}=300 \text{ nm}$ ) s poli dA – poli dT ( $c = 1,0 \times 10^{-6} - 2,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); b) Ovisnost apsorbancije **R201** na  $\lambda_{\text{max}} = 372 \text{ nm}$  o koncentraciji  $c(\text{poli dA} - \text{poli dT})$  pri pH = 7,00 (pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).



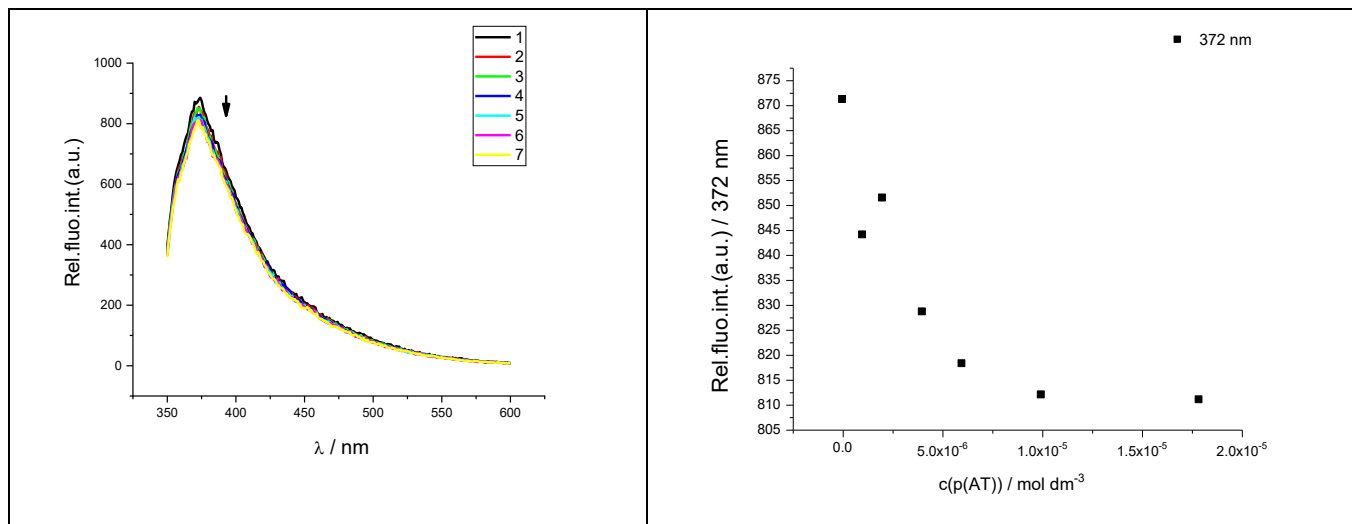
Slika D14. a) Fluorescencijske promjene titracije **R222** ( $c = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}}=300 \text{ nm}$ ) s ctDNA ( $c = 9,0 \times 10^{-7} - 9,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ); b) Ovisnost apsorbancije **R222** na  $\lambda_{\text{max}} = 372 \text{ nm}$  o koncentraciji  $c(\text{ctDNA})$  pri pH = 7,00 (pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).



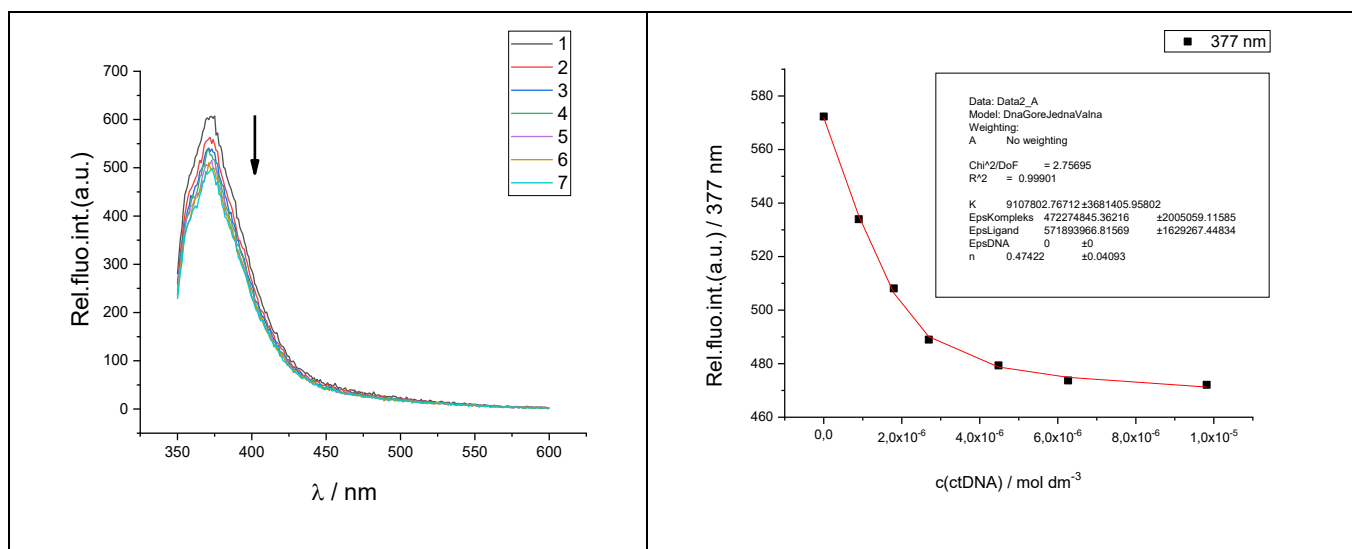
Slika D15. a) Fluorescencijske promjene titracije **R222** ( $c = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}}=300 \text{ nm}$ ) s poli A – poli U ( $c = 1,0 \times 10^{-6} - 1,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); b) Ovisnost apsorbancije **R222** na  $\lambda_{\text{max}} = 374 \text{ nm}$  o koncentraciji  $c(\text{poliA} - \text{poliU})$  pri pH = 7,00 (pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).



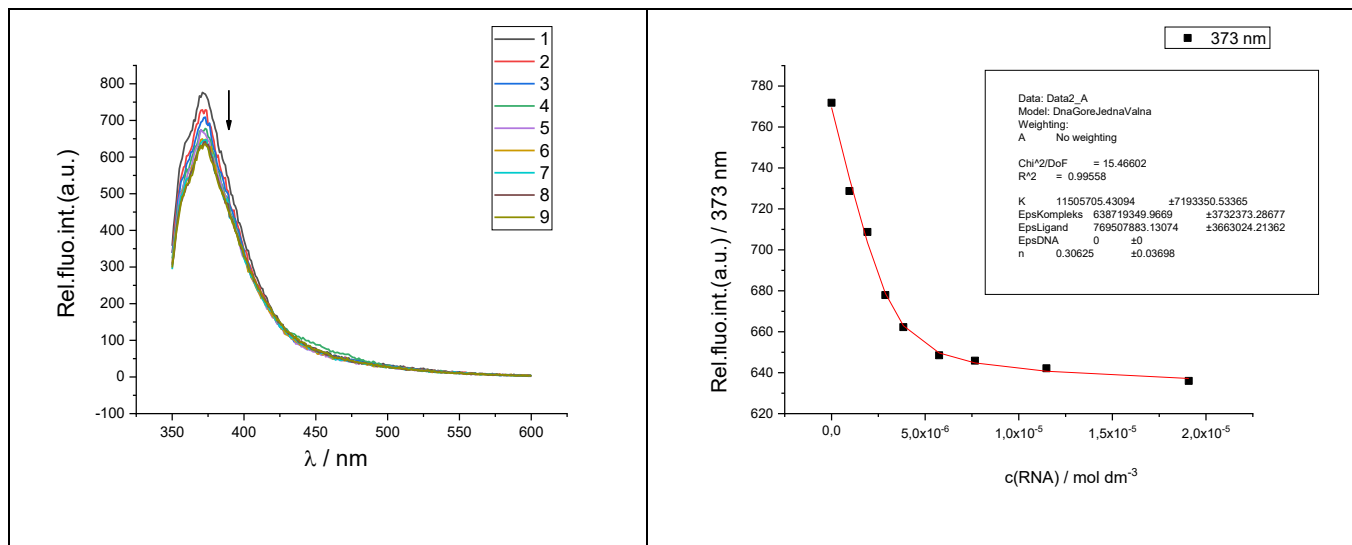
Slika D16. a) Fluorescencijske promjene titracije **R222** ( $c = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}}=300 \text{ nm}$ ) s poli(dGdC)<sub>2</sub> ( $c = 1,0 \times 10^{-6} - 1,2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); b) Ovisnost apsorbancije **R222** na  $\lambda_{\text{max}} = 373 \text{ nm}$  o koncentraciji  $c(\text{poli}(\text{dGdC})_2)$  pri pH = 7,00 (pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).



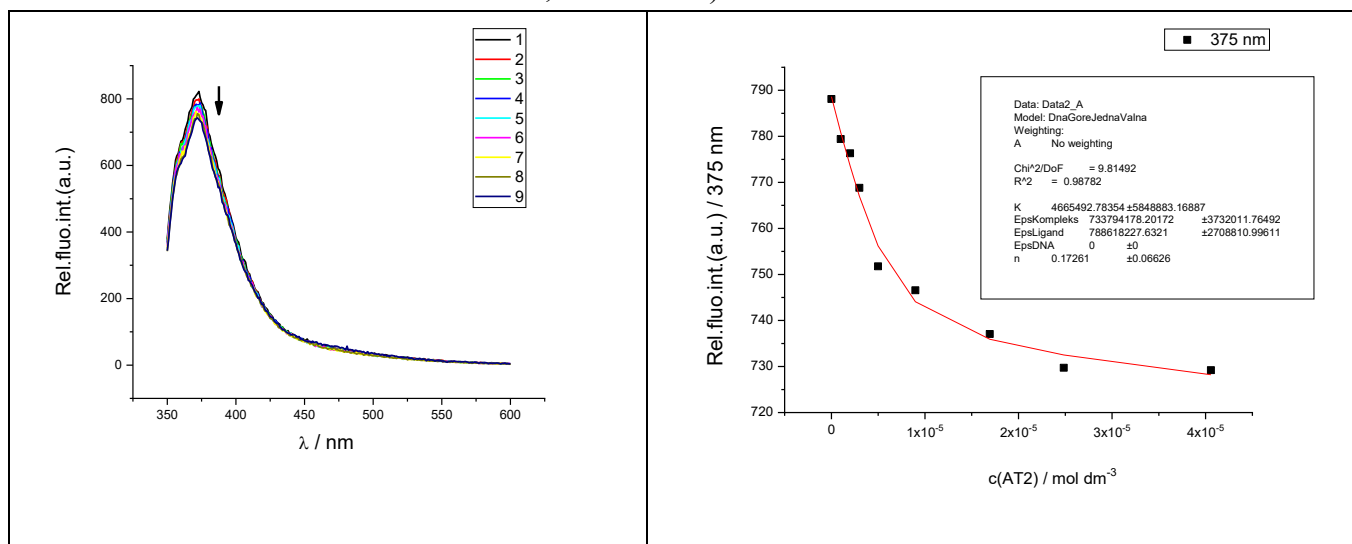
Slika D17. a) Fluorescencijske promjene titracije **R222** ( $c = 1,0 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>,  $\lambda_{\text{exc}}=300$  nm) s poli dA – poli dT ( $c = 1,0 \times 10^{-6} - 1,8 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>); b) Ovisnost apsorbancije **R222** na  $\lambda_{\text{max}} = 374$  nm o koncentraciji  $c(\text{poli dA – poli dT})$  pri pH = 7,00 (pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>).



Slika D18. a) Fluorescencijske promjene titracije **R223** ( $c = 1,0 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>,  $\lambda_{\text{exc}}=300$  nm) s ctDNA ( $c = 1,0 \times 10^{-6} - 9,82 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>); b) Ovisnost apsorbancije **R223** na  $\lambda_{\text{max}} = 377$  nm o koncentraciji  $c(\text{ctDNA})$  pri pH = 7,00 (pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>).

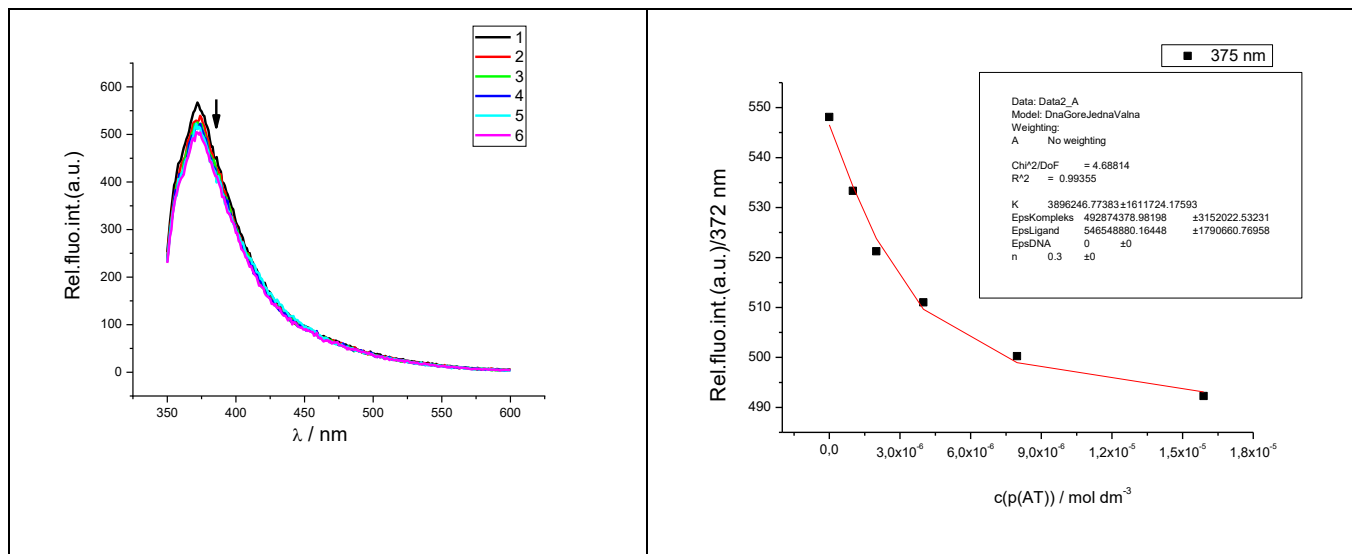


Slika D19. a) Fluorescencijske promjene titracije **R223** ( $c = 1,0 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>,  $\lambda_{exc}=300$  nm) s poli A – poli U ( $c = 1,0 \times 10^{-6} - 1,9 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>); b) Ovisnost apsorbancije **R223** na  $\lambda_{max} = 373$  nm o koncentraciji  $c(\text{poliA} - \text{poliU})$  pri pH = 7,00 (pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>).

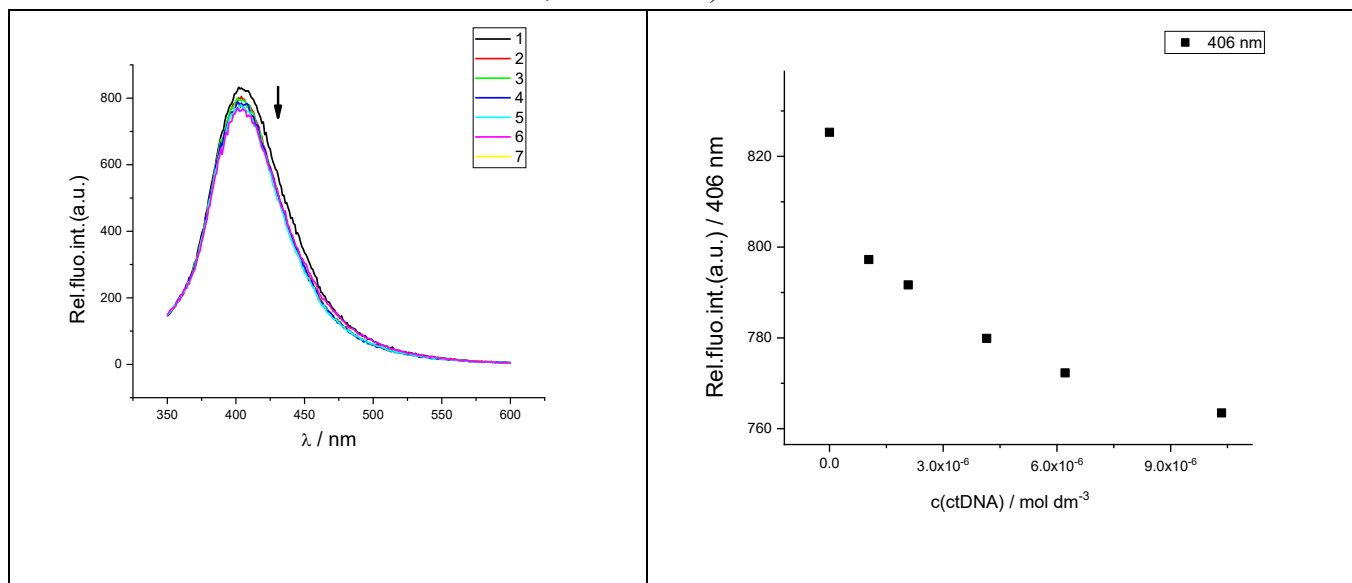


Slika D20. a) Fluorescencijske promjene titracije **R223** ( $c = 1,0 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>,  $\lambda_{exc}=300$  nm) s poli(dAdT)<sub>2</sub> ( $c = 1,0 \times 10^{-6} - 3,1 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>); b) Ovisnost apsorbancije **R223** na  $\lambda_{max} = 375$  nm o koncentraciji  $c(\text{poli(dAdT)}_2)$  pri pH = 7,00 (pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>).

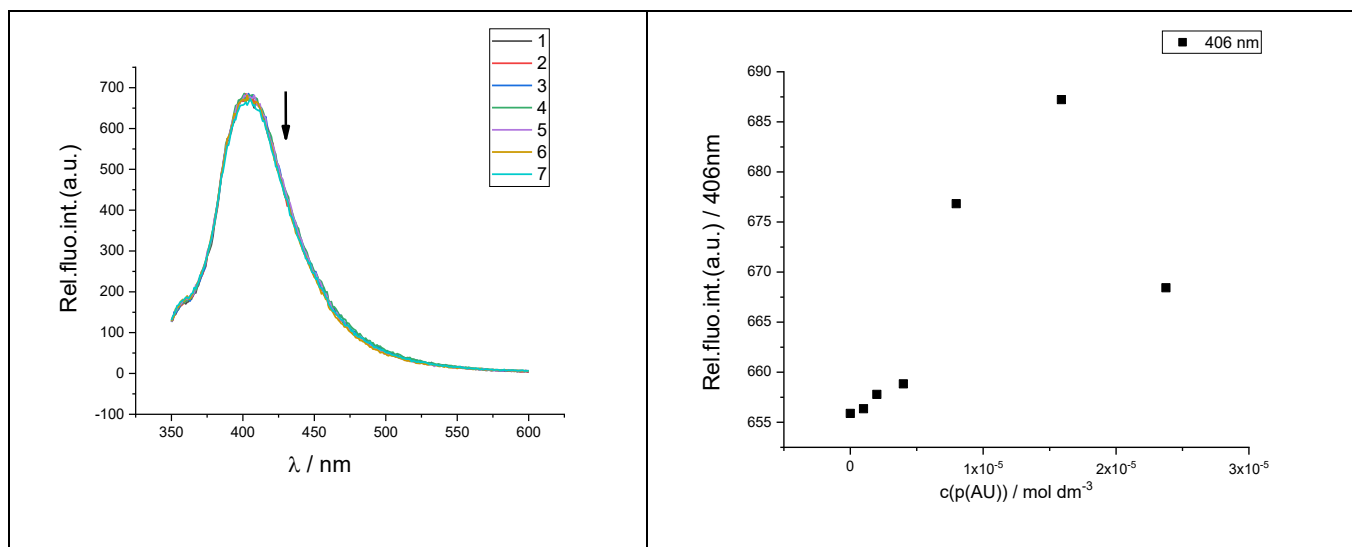




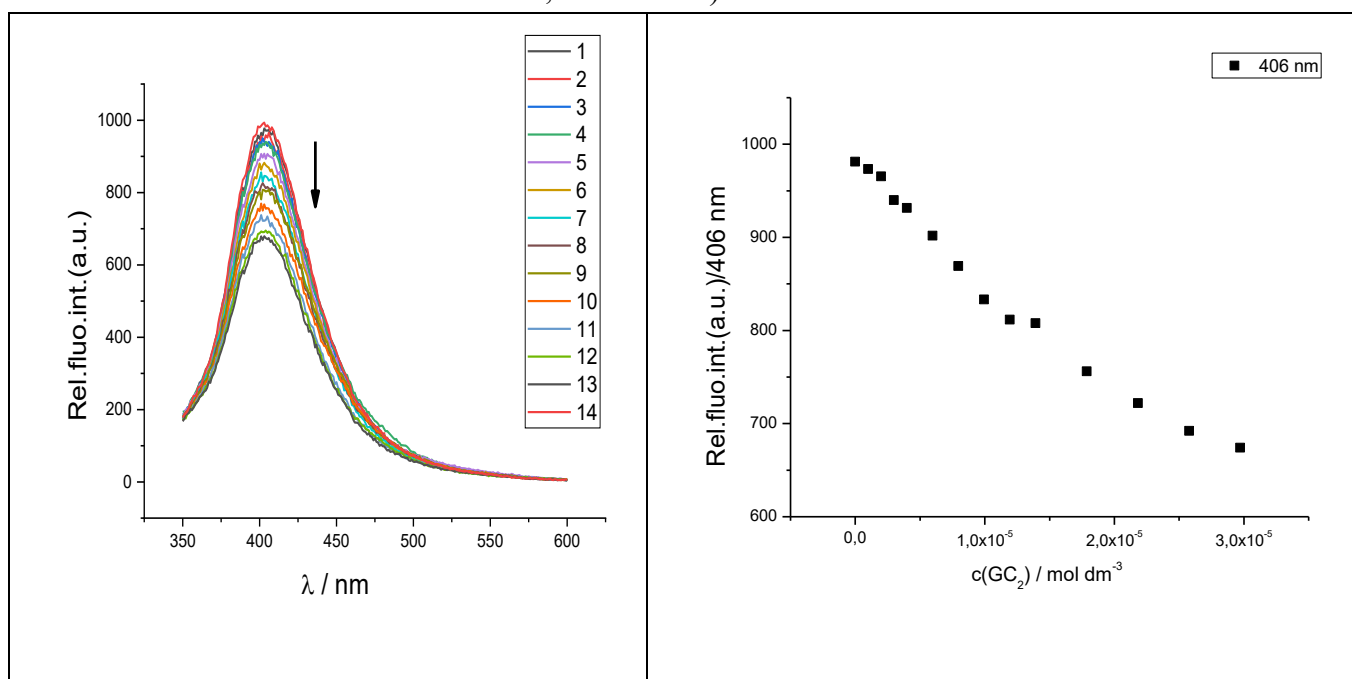
Slika D21. a) Fluorescencijske promjene titracije **R223** ( $c = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}}=300 \text{ nm}$ ) s poli dA – poli dT ( $c = 1,0 \times 10^{-6} - 1,6 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); b) Ovisnost apsorbancije **R223** na  $\lambda_{\text{max}} = 375 \text{ nm}$  o koncentraciji  $c(\text{poli}(\text{dAdT})_2)$  pri pH = 7,00 (pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).



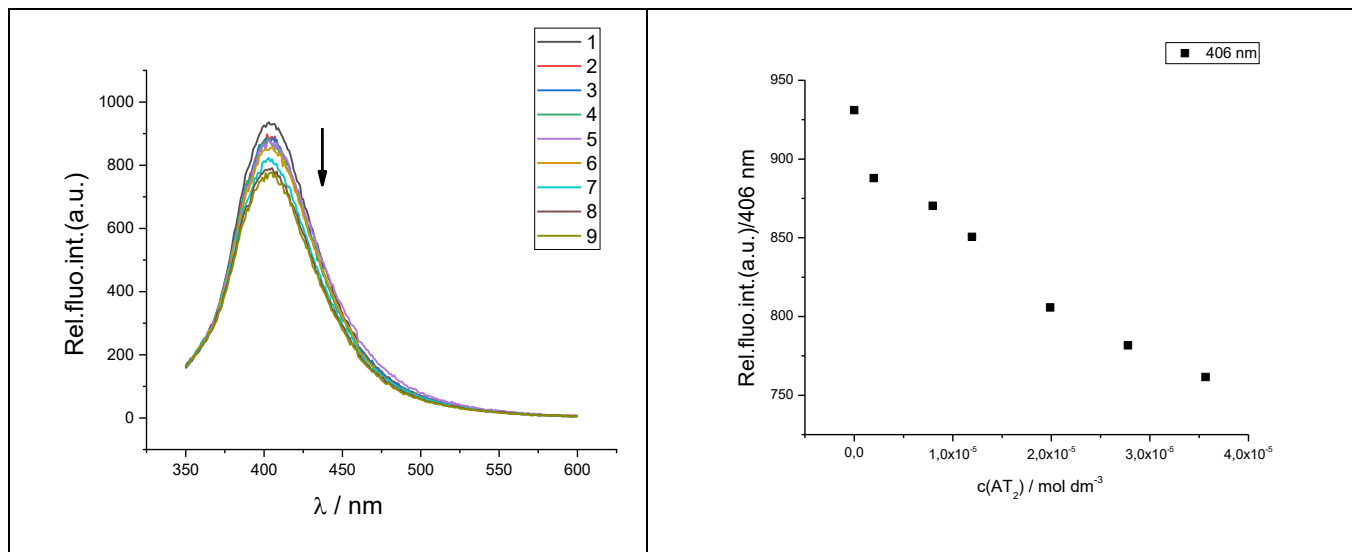
Slika D22. a) Fluorescencijske promjene titracije **R201** ( $c = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}}=300 \text{ nm}$ ) s ctDNA ( $c = 1,0 \times 10^{-6} - 1,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); b) Ovisnost apsorbancije **R201** na  $\lambda_{\text{max}} = 406 \text{ nm}$  o koncentraciji  $c(\text{ctDNA})$  pri pH = 5,00 (pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).



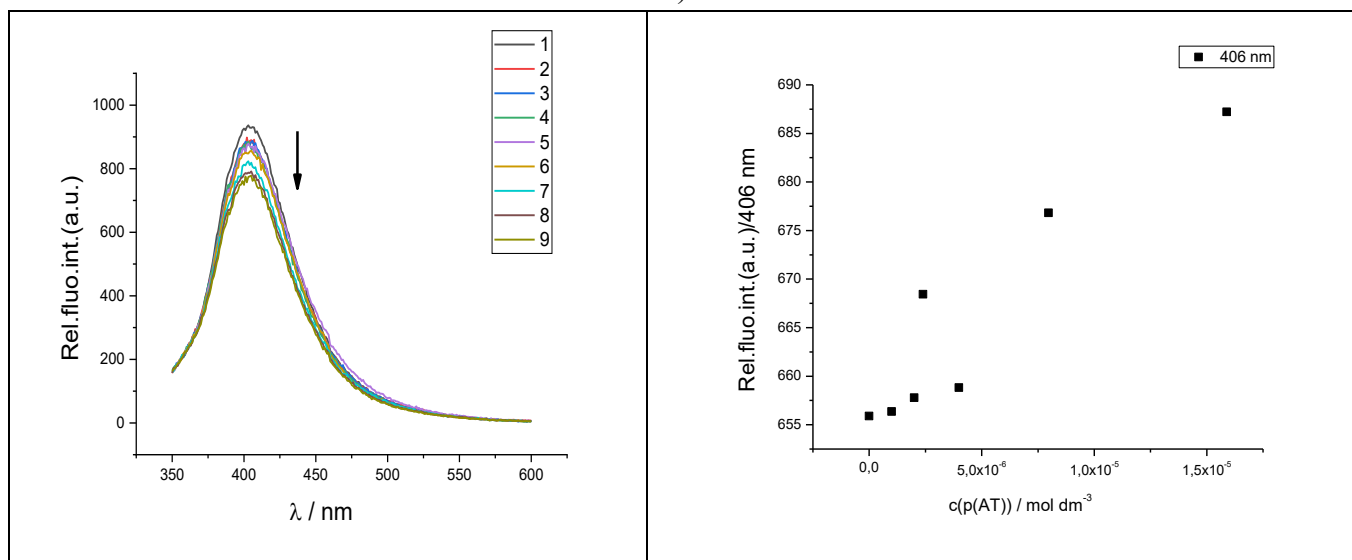
Slika D23. a) Fluorescencijske promjene titracije **R201** ( $c = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}}=300 \text{ nm}$ ) s poli A – poli U ( $c = 1,0 \times 10^{-6} - 1,8 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); b) Ovisnost apsorbancije **R201** na  $\lambda_{\text{max}} = 406 \text{ nm}$  o koncentraciji  $c(\text{poliA} - \text{poliU})$  pri pH = 5,00 (pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).



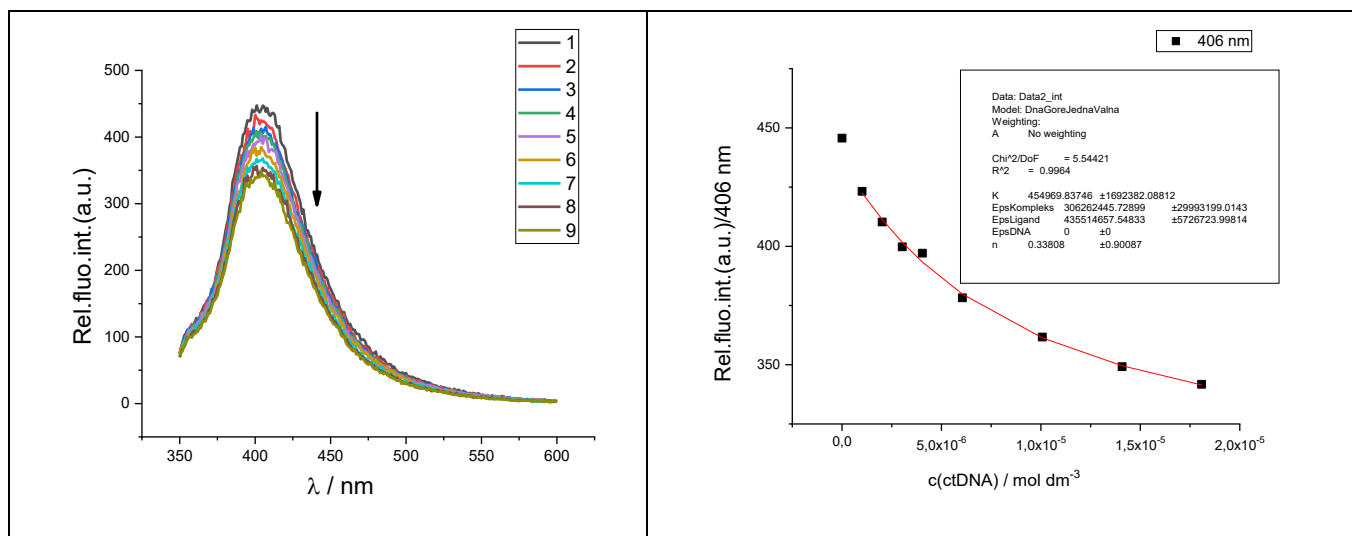
Slika D24. a) Fluorescencijske promjene titracije **R201** ( $c = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}}=300 \text{ nm}$ ) s poli(dGdC)<sub>2</sub> ( $c = 1,0 \times 10^{-6} - 2,9 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); b) Ovisnost apsorbancije **R201** na  $\lambda_{\text{max}} = 406 \text{ nm}$  o koncentraciji  $c(\text{poli(dGdC)}_2)$  pri pH = 5,00 (pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).



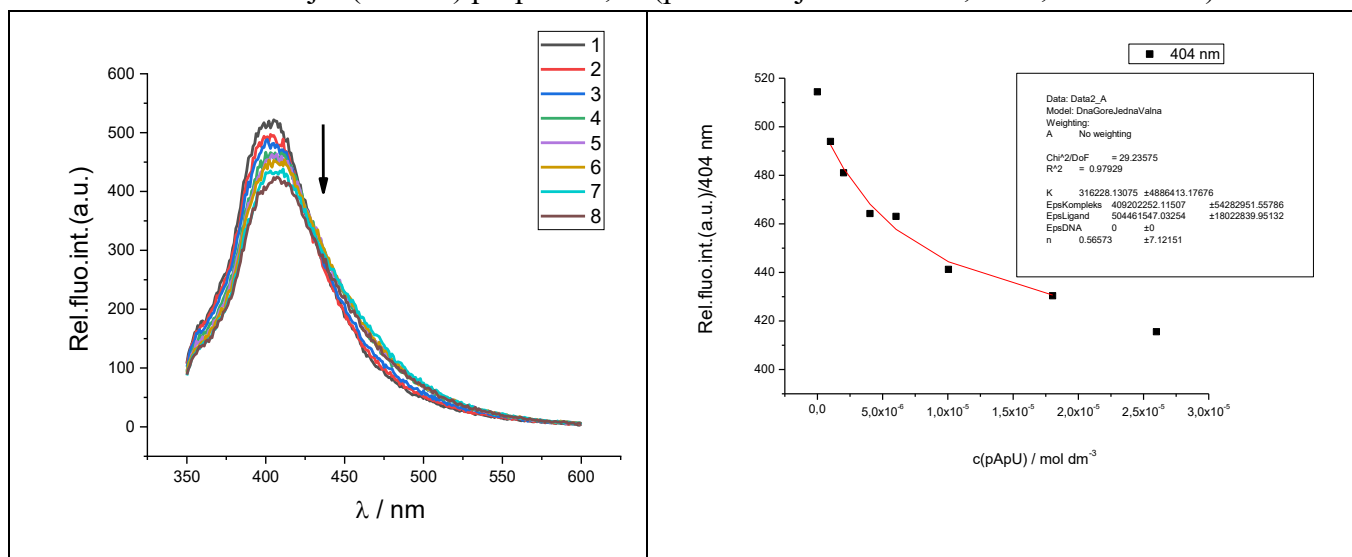
Slika D25. a) Fluorencijske promjene titracije **R201** ( $c = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}}=300 \text{ nm}$ ) s poli(dAdT)<sub>2</sub> ( $c = 1,0 \times 10^{-6} - 3,6 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); b) Ovisnost apsorbancije **R201** na  $\lambda_{\text{max}} = 406 \text{ nm}$  o koncentraciji  $c(\text{poli(dAdT)}_2)$  pri pH = 5,00 (pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).



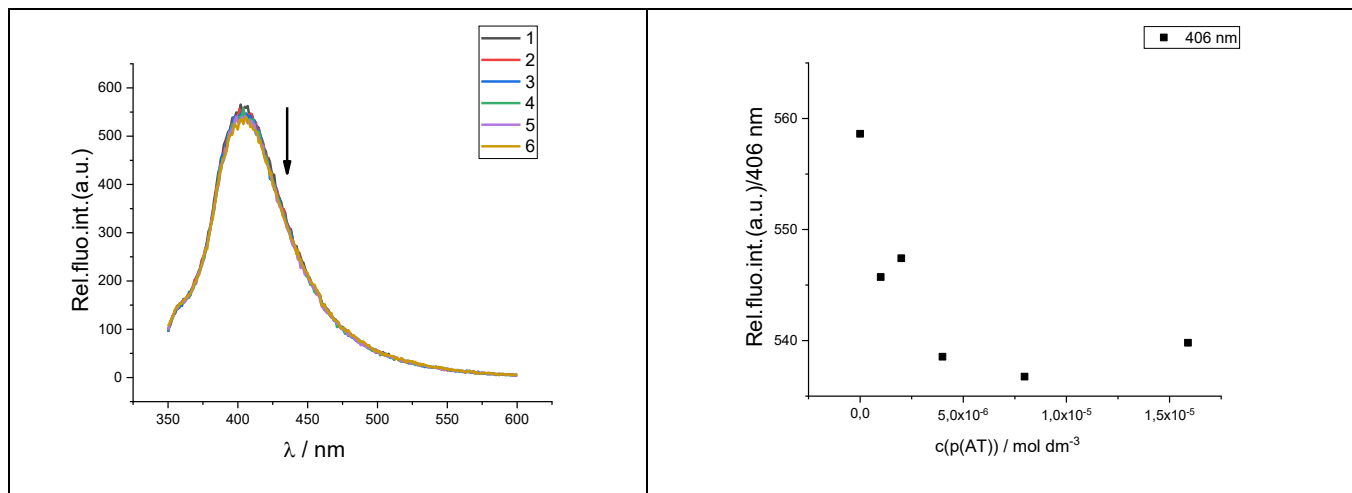
Slika D26. a) Fluorencijske promjene titracije **R201** ( $c = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}}=300 \text{ nm}$ ) s poli dA – poli dT ( $c = 1,0 \times 10^{-6} - 3,6 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); b) Ovisnost apsorbancije **R201** na  $\lambda_{\text{max}} = 406 \text{ nm}$  o koncentraciji  $c(\text{poli dA – poli dT})$  pri pH = 5,00 (pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).



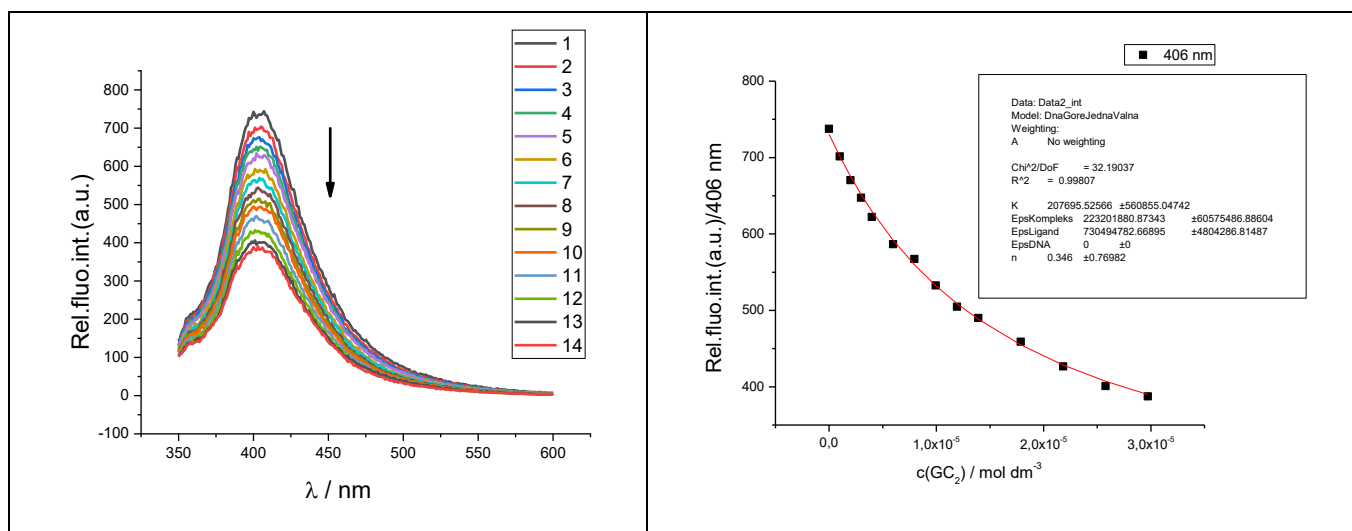
Slika D27. a) Fluorescencijske promjene titracije **R222** ( $c = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}}=300 \text{ nm}$ ) s ctDNA ( $c = 1,0 \times 10^{-6} - 1,8 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); b) Ovisnost apsorbancije **R222** na  $\lambda_{\text{max}} = 406 \text{ nm}$  o koncentraciji  $c(\text{ctDNA})$  pri pH = 5,00 (pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).



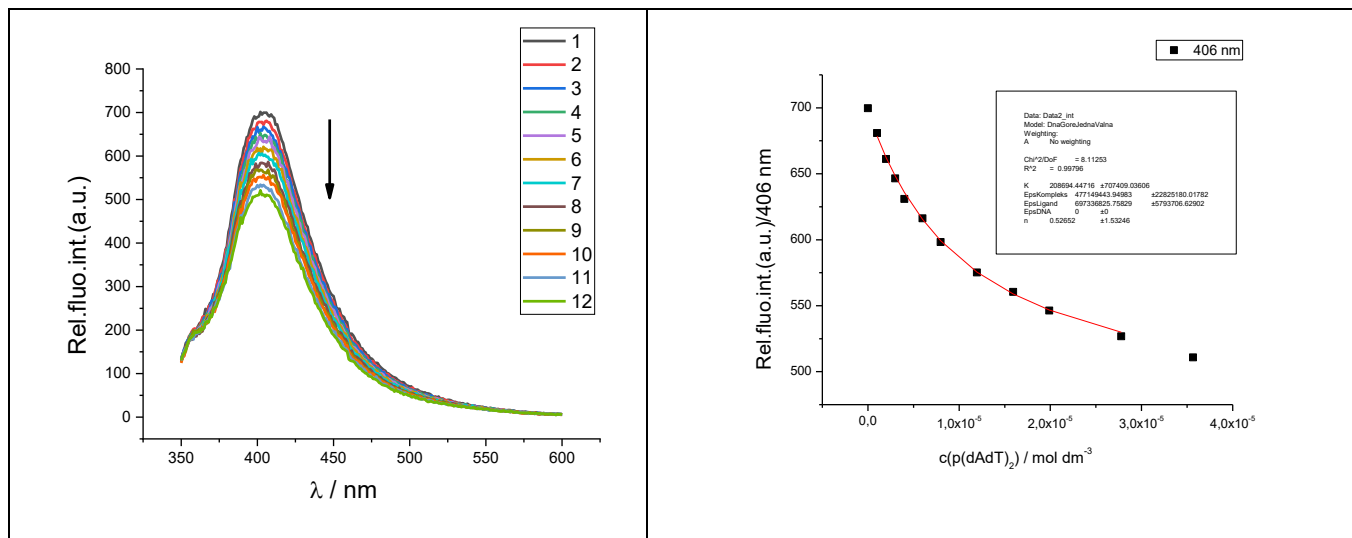
Slika D28. a) Fluorescencijske promjene titracije **R222** ( $c = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}}=300 \text{ nm}$ ) s poli A – poli U ( $c = 1,0 \times 10^{-6} - 2,6 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); b) Ovisnost apsorbancije **R222** na  $\lambda_{\text{max}} = 473 \text{ nm}$  o koncentraciji  $c(\text{poliA} - \text{poliU})$  pri pH = 5,00 (pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).



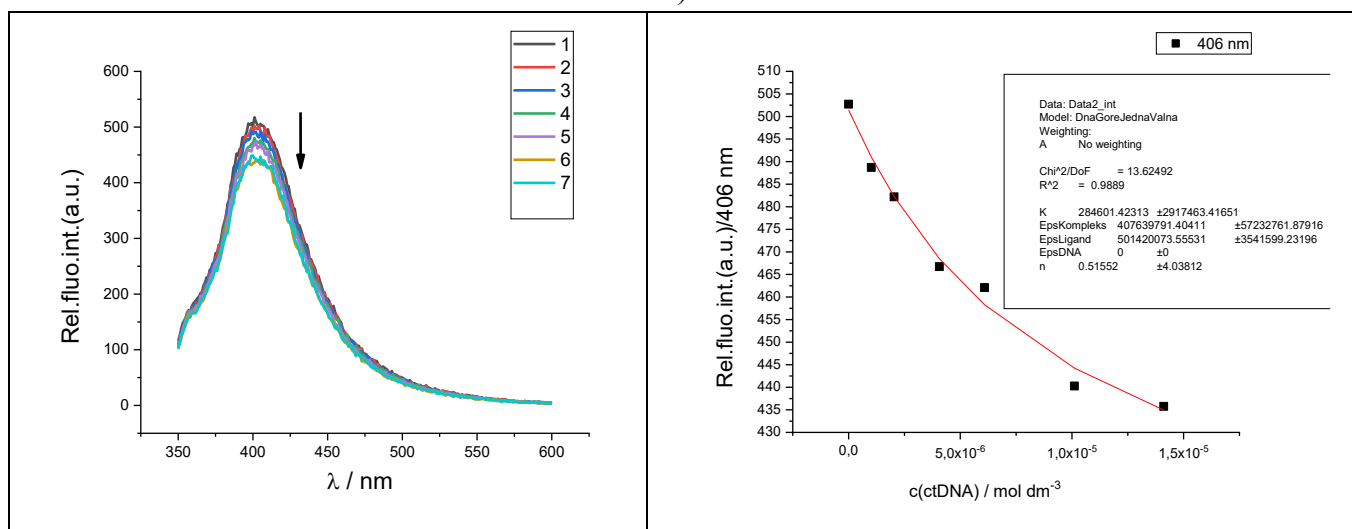
Slika D29. a) Fluorescencijske promjene titracije **R222** ( $c = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}}=300 \text{ nm}$ ) s poli dA – poli dT ( $c = 1,0 \times 10^{-6} - 1,6 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); b) Ovisnost apsorbancije **R222** na  $\lambda_{\text{max}} = 473 \text{ nm}$  o koncentraciji  $c(\text{poli dA} - \text{poli dT})$  pri pH = 5,00 (pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).



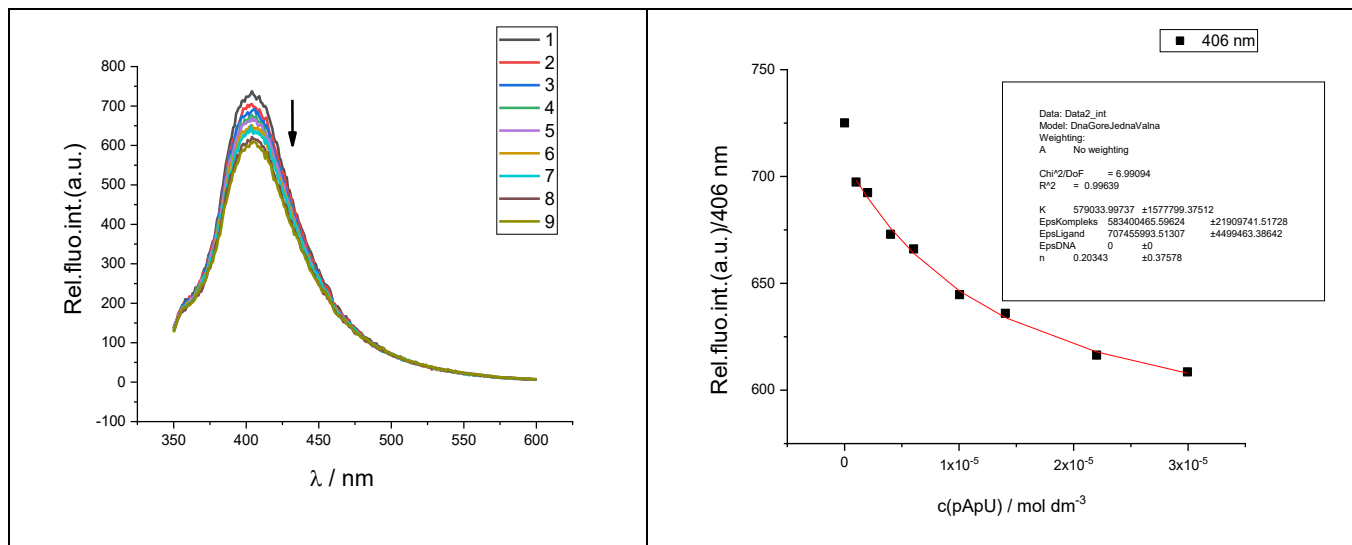
Slika D30. a) Fluorescencijske promjene titracije **R222** ( $c = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}}=300 \text{ nm}$ ) s poli(dGdC)<sub>2</sub> ( $c = 9,9 \times 10^{-7} - 2,9 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); b) Ovisnost apsorbancije **R222** na  $\lambda_{\text{max}} = 406 \text{ nm}$  o koncentraciji  $c(\text{poli(dGdC)}_2)$  pri pH = 5,00 (pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).



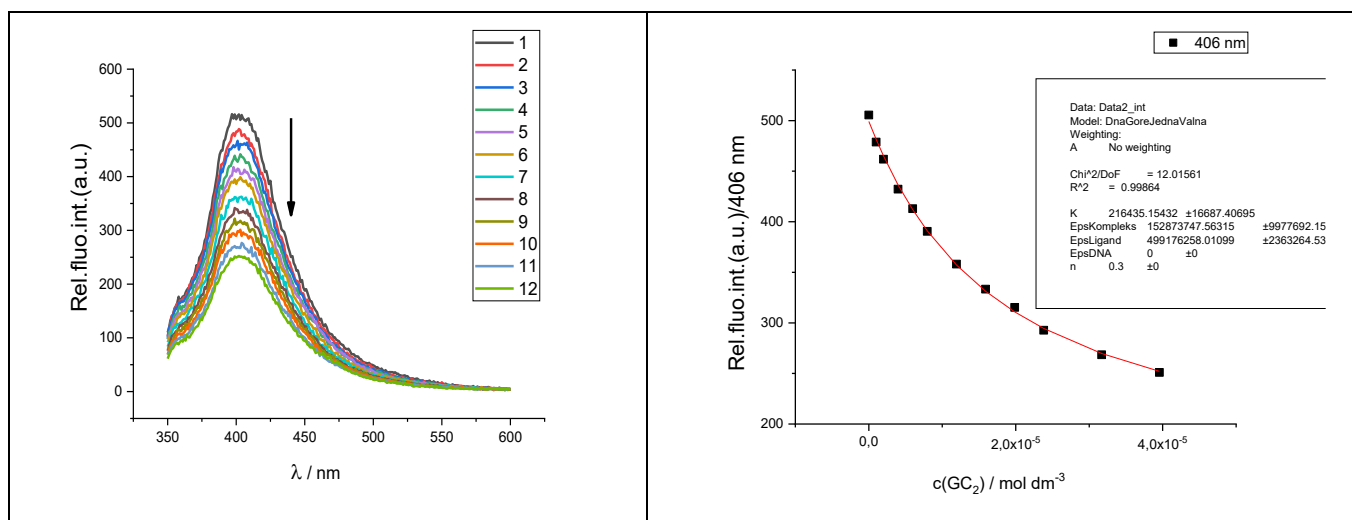
Slika D31. a) Fluorescencijske promjene titracije **R222** ( $c = 1,0 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>,  $\lambda_{\text{exc}}=300$  nm) s poli(dAdT)<sub>2</sub> ( $c = 1,0 \times 10^{-6} - 3,6 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>); b) Ovisnost apsorbancije **R222** na  $\lambda_{\text{max}} = 406$  nm o koncentraciji  $c(\text{poly}(\text{dAdT})_2)$  pri pH = 5,00 (pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>).



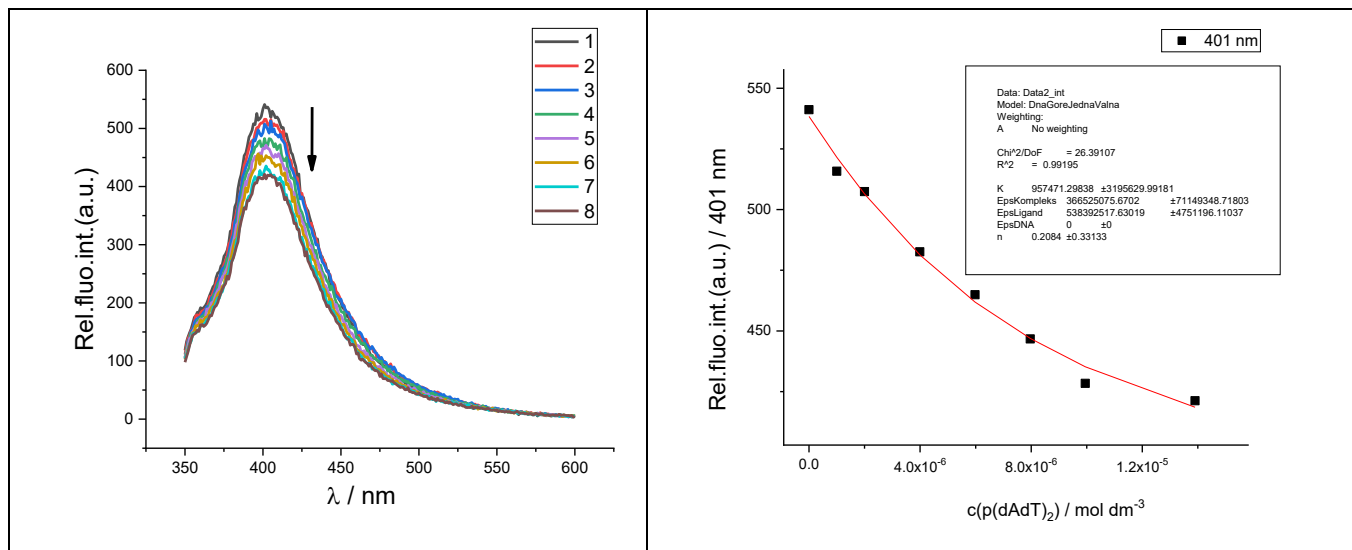
Slika D32. a) Fluorescencijske promjene titracije **R223** ( $c = 1,0 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>,  $\lambda_{\text{exc}}=300$  nm) s ctDNA ( $c = 1,0 \times 10^{-6} - 1,4 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>); b) Ovisnost apsorbancije **R223** na  $\lambda_{\text{max}} = 406$  nm o koncentraciji  $c(\text{ctDNA})$  pri pH = 5,00 (pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>).



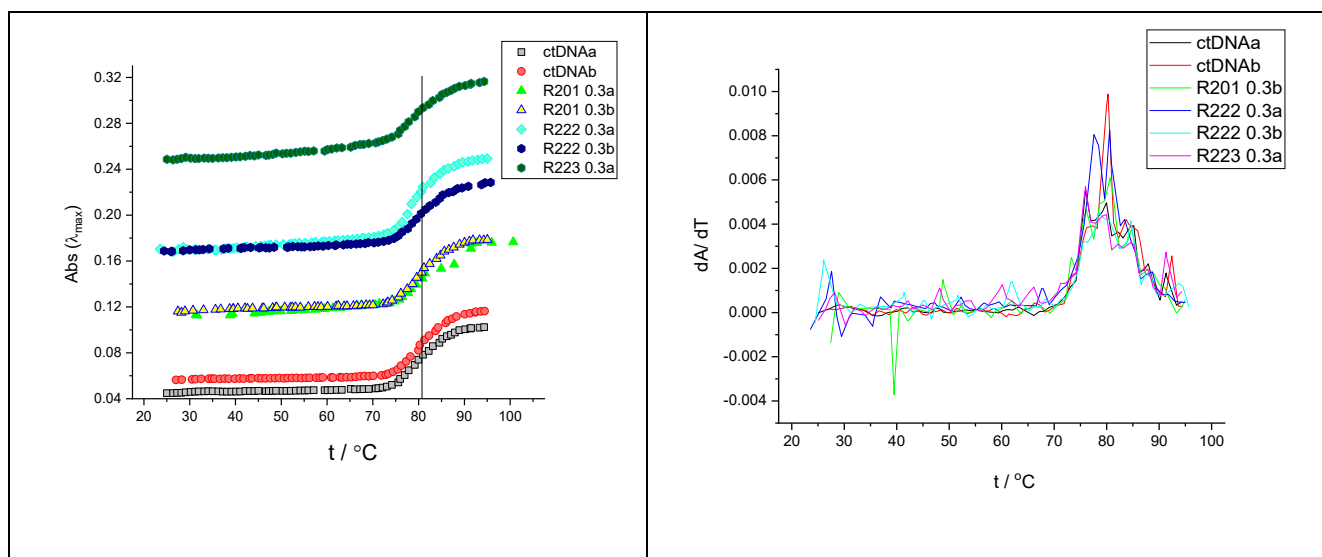
Slika D33. a) Fluorescencijske promjene titracije **R223** ( $c = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}}=300 \text{ nm}$ ) s poli A – poli U ( $c = 1,0 \times 10^{-6} - 2,99 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); b) Ovisnost apsorbancije **R223** na  $\lambda_{\text{max}} = 406 \text{ nm}$  o koncentraciji  $c(\text{ctDNA})$  pri pH = 5,00 (pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).



Slika D34. a) Fluorescencijske promjene titracije **R223** ( $c = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}}=300 \text{ nm}$ ) s poli(dGdC)<sub>2</sub> ( $c = 1,0 \times 10^{-6} - 3,96 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); b) Ovisnost apsorbancije **R223** na  $\lambda_{\text{max}} = 406 \text{ nm}$  o koncentraciji  $c(\text{poli}(\text{dGdC})_2)$  pri pH = 5,00 (pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ).

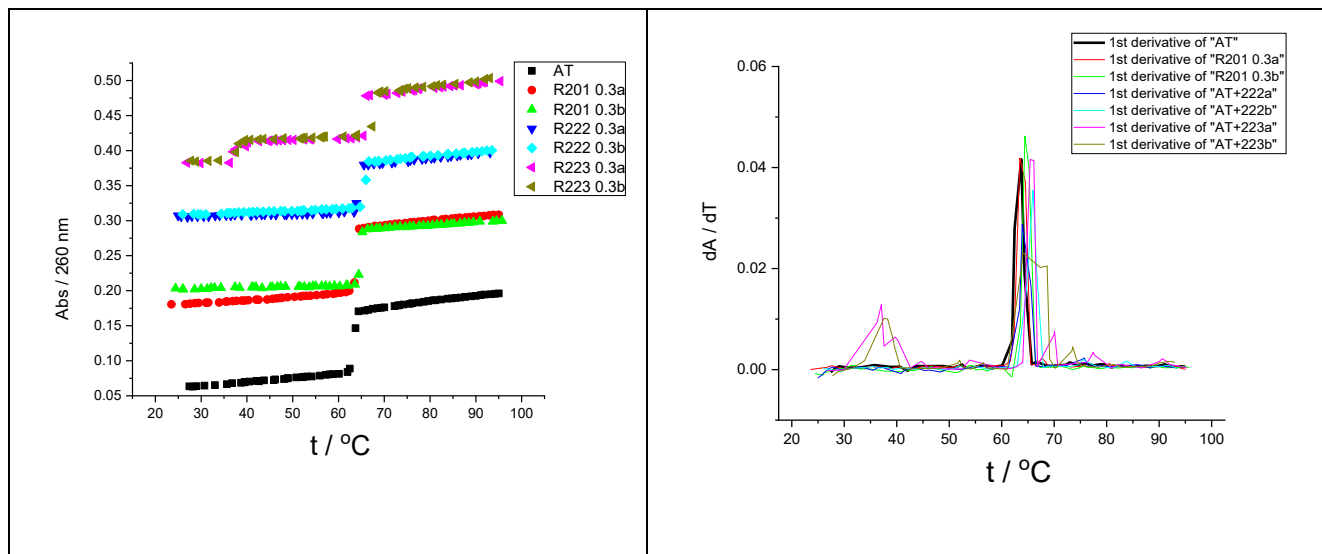


Slika D35. a) Fluorencijske promjene titracije **R223** ( $c = 1,0 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>,  $\lambda_{exc}=300$  nm) s poli(dAdT)<sub>2</sub> ( $c = 1,0 \times 10^{-6} - 1,39 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>); b) Ovisnost apsorbancije **R223** na  $\lambda_{max} = 401$  nm o koncentraciji  $c(\text{poli}(\text{dAdT})_2)$  pri pH = 5,00 (pufer natrijev kakovilat,  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>).

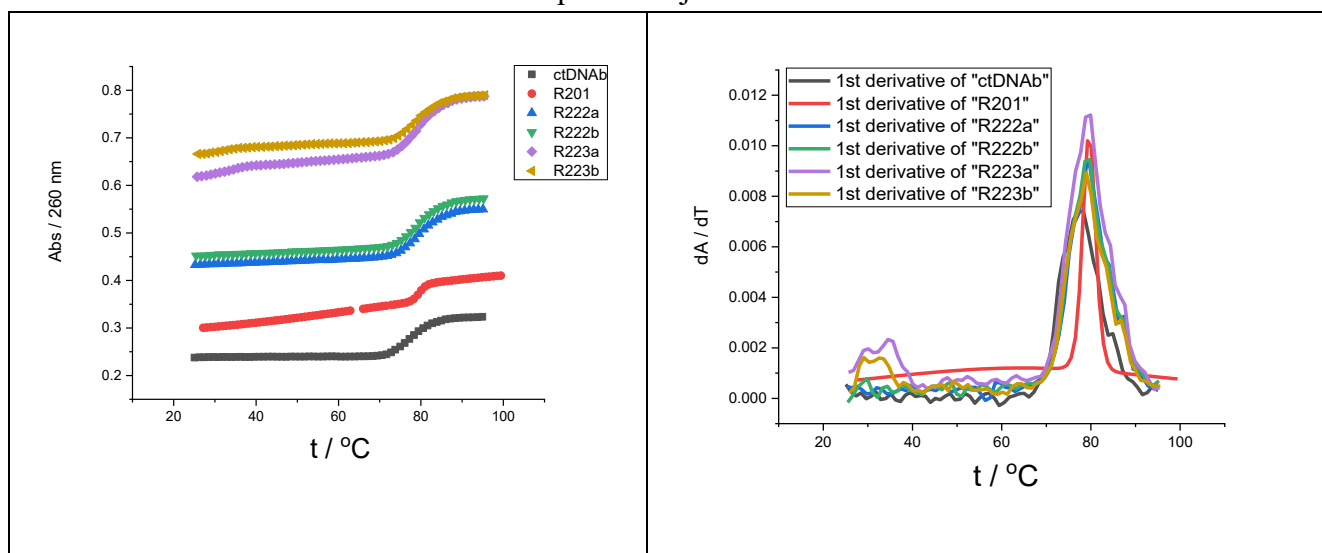


Slika D36. a) Krivulja taljenja ctDNA nakon adicije  $r = 0,3$  spojeva **R201**, **R222** i **R223** pri pH = 7,00 (pufer natrijev kakovilat,  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>); b) prva derivacija apsorbancije.

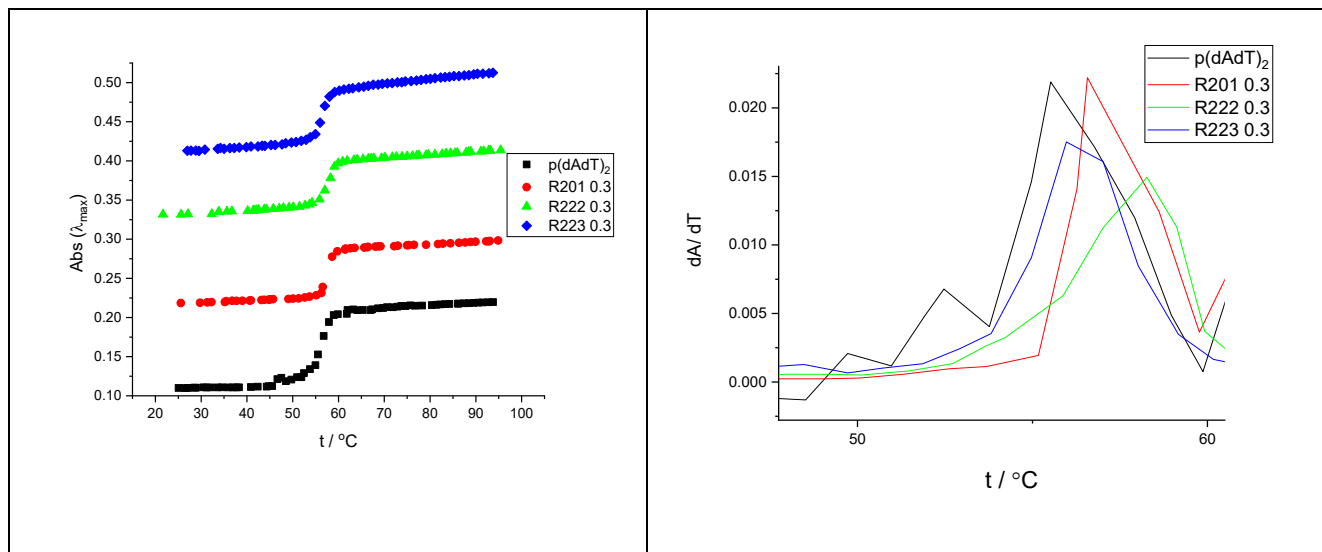




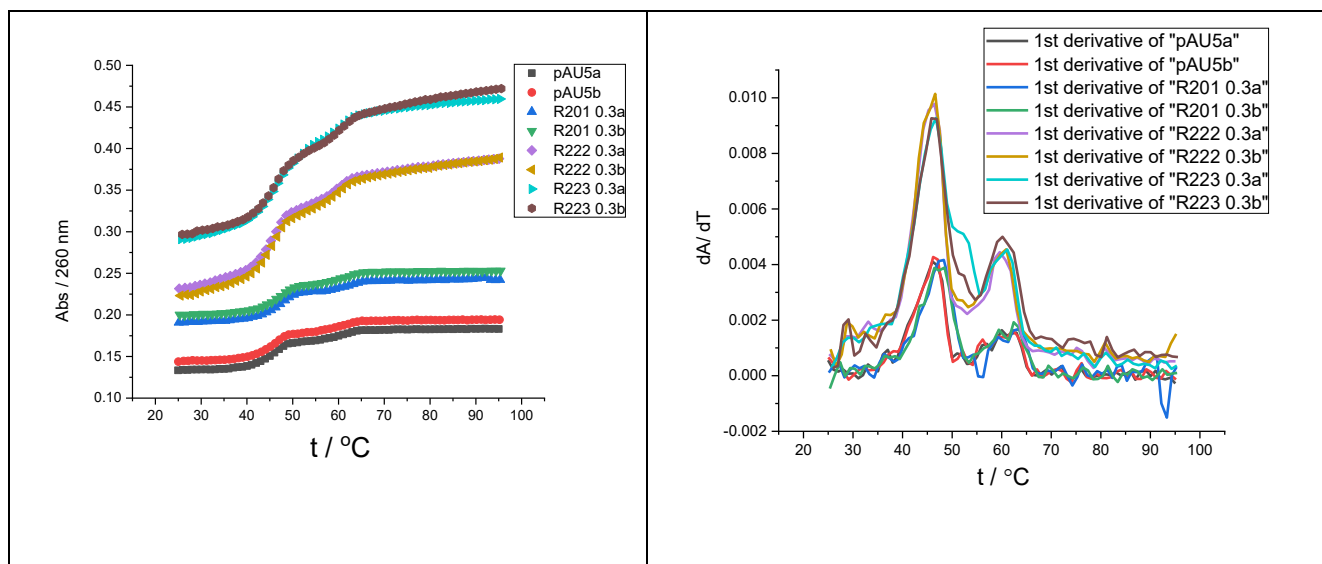
Slika D37. a) Krivulja taljenja poli dA – poli dT nakon adicije  $r = 0,3$  spojeva R201, R222 i R223 pri pH = 7,00 (pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ); b) prva derivacija apsorbancije.



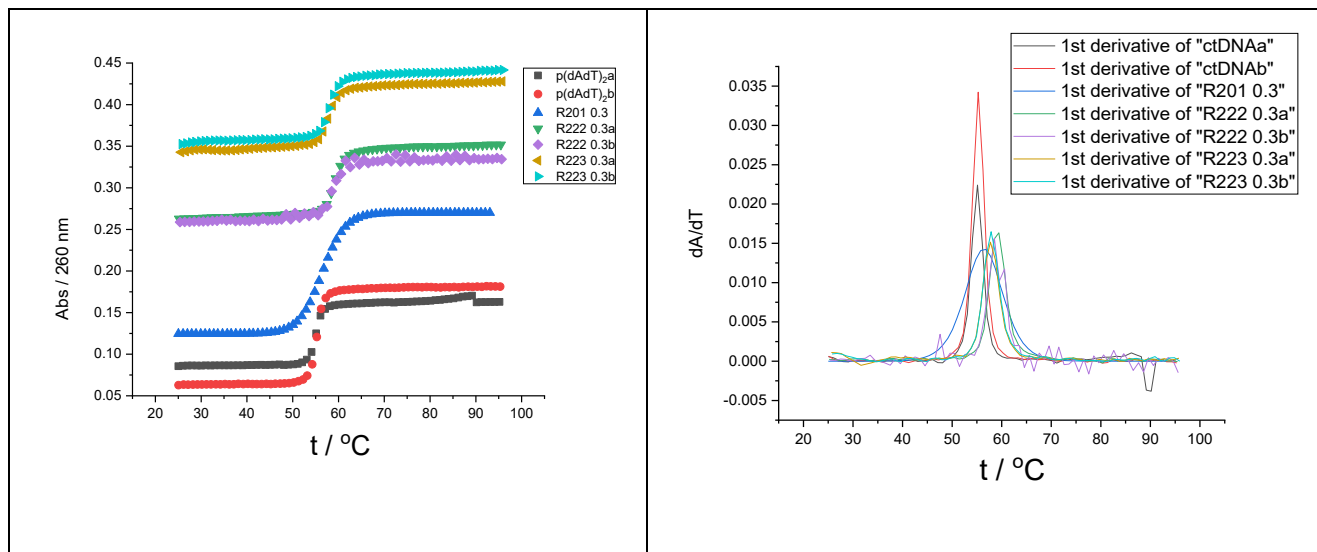
Slika D38. a) Krivulja taljenja ctDNA nakon adicije  $r = 0,3$  spojeva R201, R222 i R223 pri pH = 5,00 (pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ); b) prva derivacija apsorbancije.



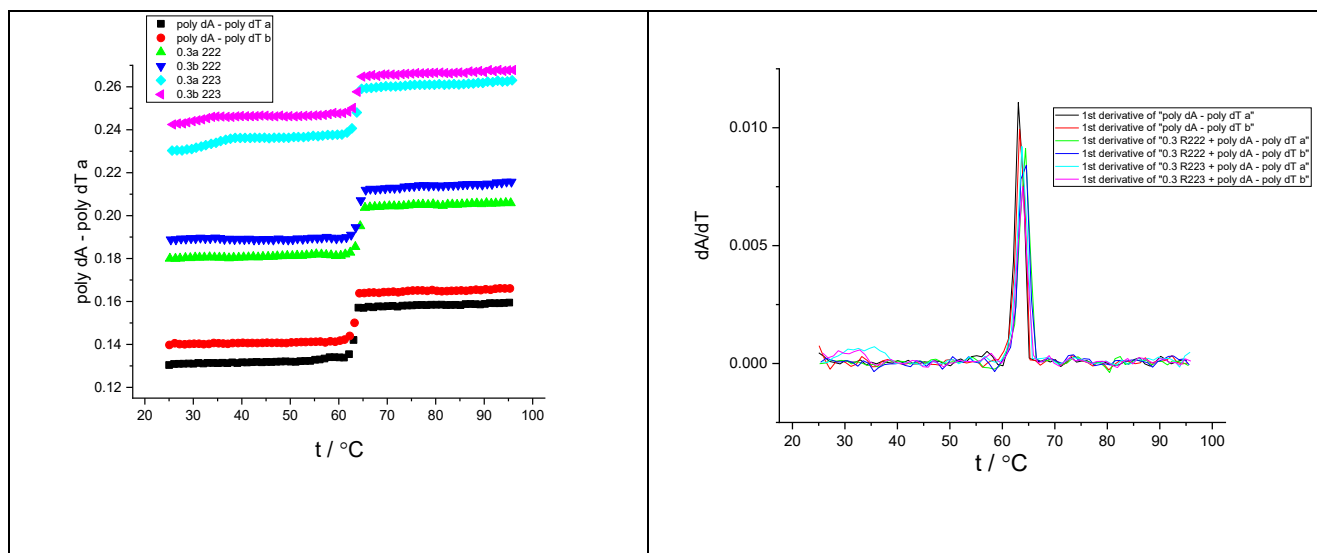
Slika D39. a) Krivulja taljenja **poli(dAdT)<sub>2</sub>** nakon adicije  $r = 0,3$  spojeva **R201**, **R222** i **R223** pri  $\text{pH} = 7,00$  (pufer natrijev kakovodilat,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ); b) prva derivacija apsorbancije.



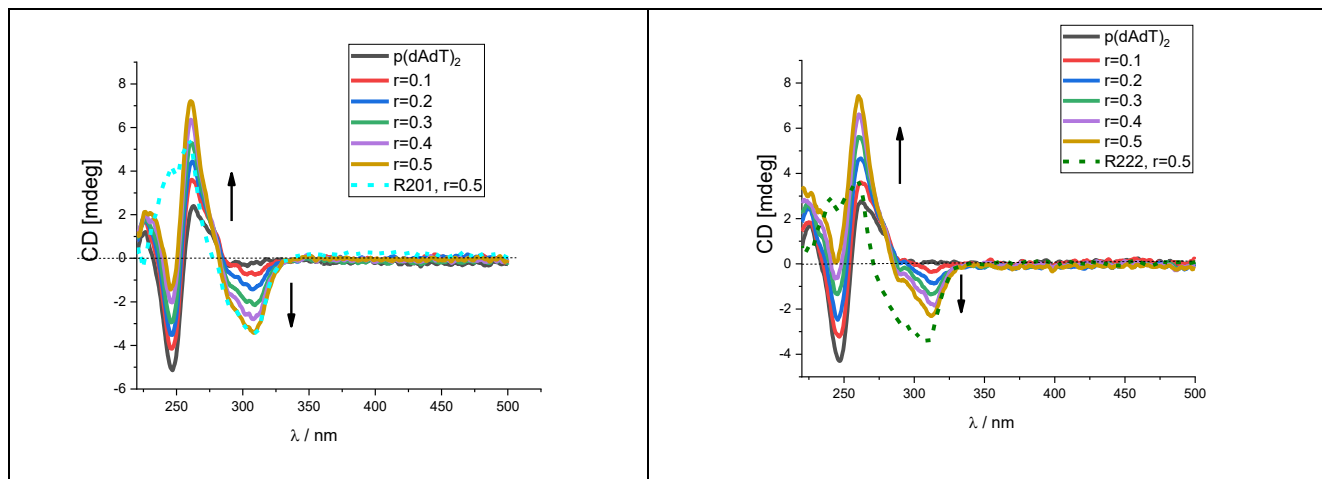
Slika D40. a) Krivulja taljenja **poli A – poli U** nakon adicije  $r = 0,3$  spojeva **R201**, **R222** i **R223** pri  $\text{pH} = 5,00$  (pufer natrijev kakovodilat,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ); b) prva derivacija apsorbancije.



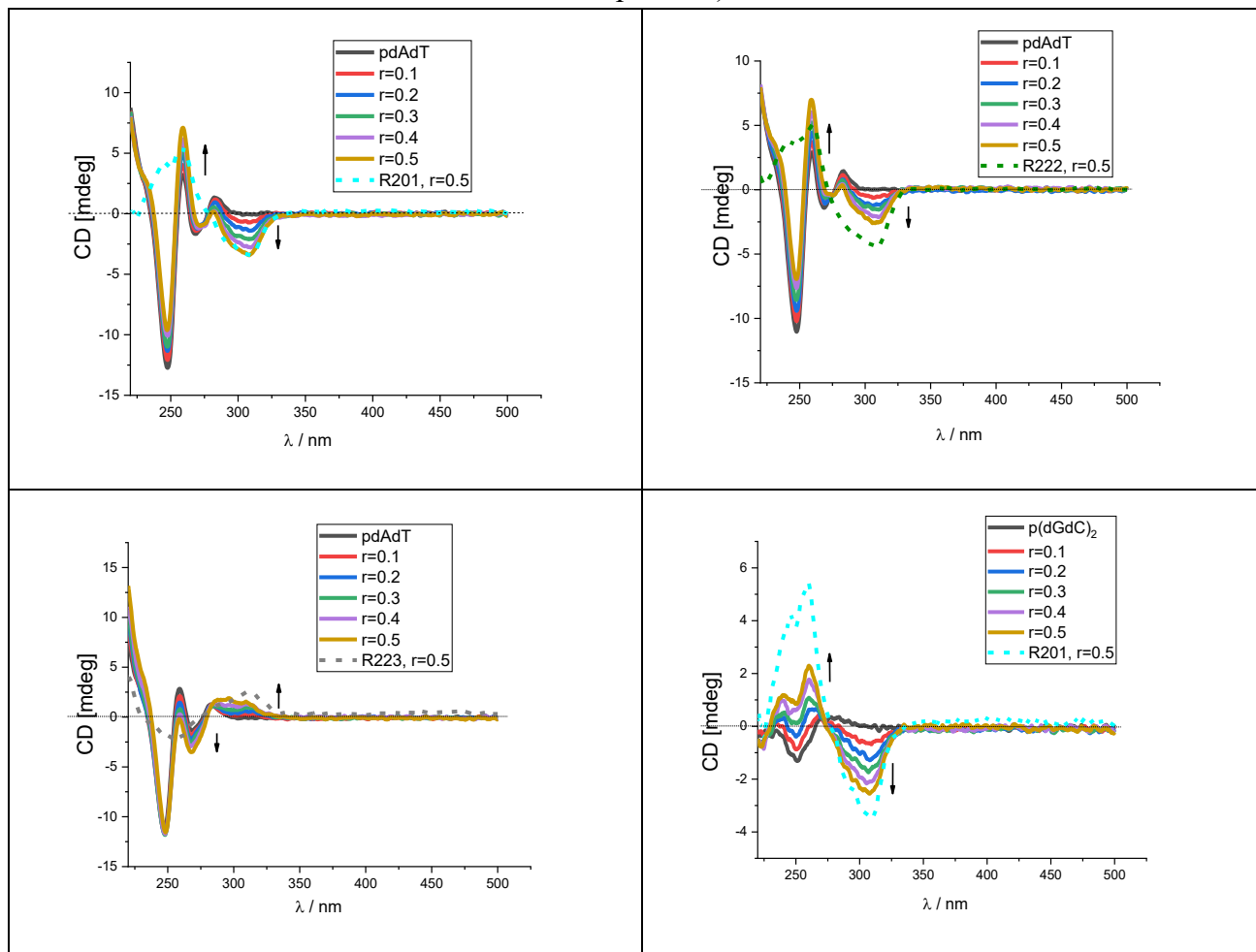
Slika D41. a) Krivulja taljenja **poli(dAdT)<sub>2</sub>** nakon adicije  $r = 0,3$  spojeva **R201**, **R222** i **R223** pri pH = 5,00 (pufer natrijev kakovilat,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ); b) prva derivacija apsorbancije.

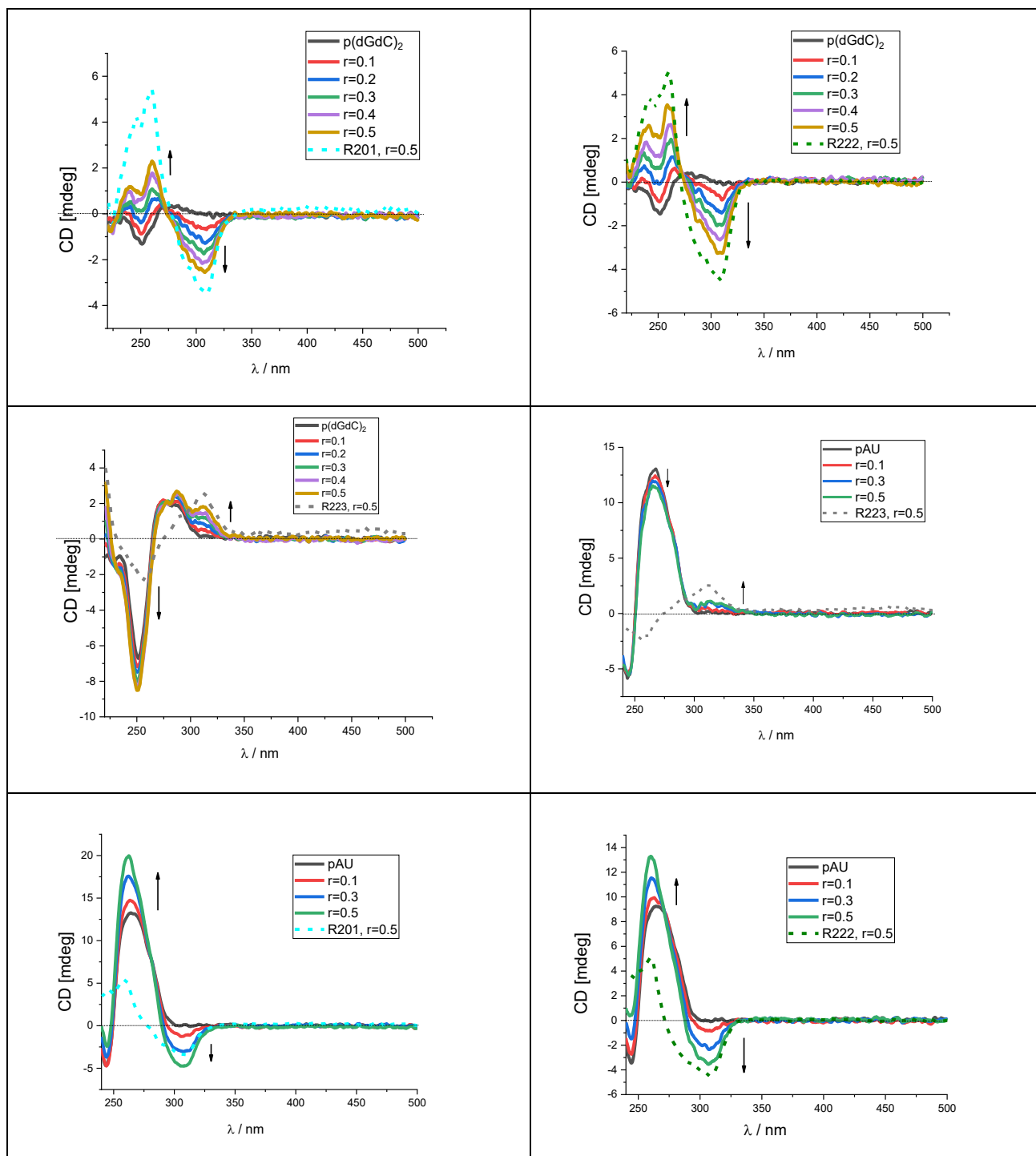


Slika D42. a) Krivulja taljenja **poli dA – poli dT** nakon adicije  $r = 0,3$  spojeva **R201**, **R222** i **R223** pri pH = 5,00 (pufer natrijev kakovilat,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ); b) prva derivacija apsorbancije.

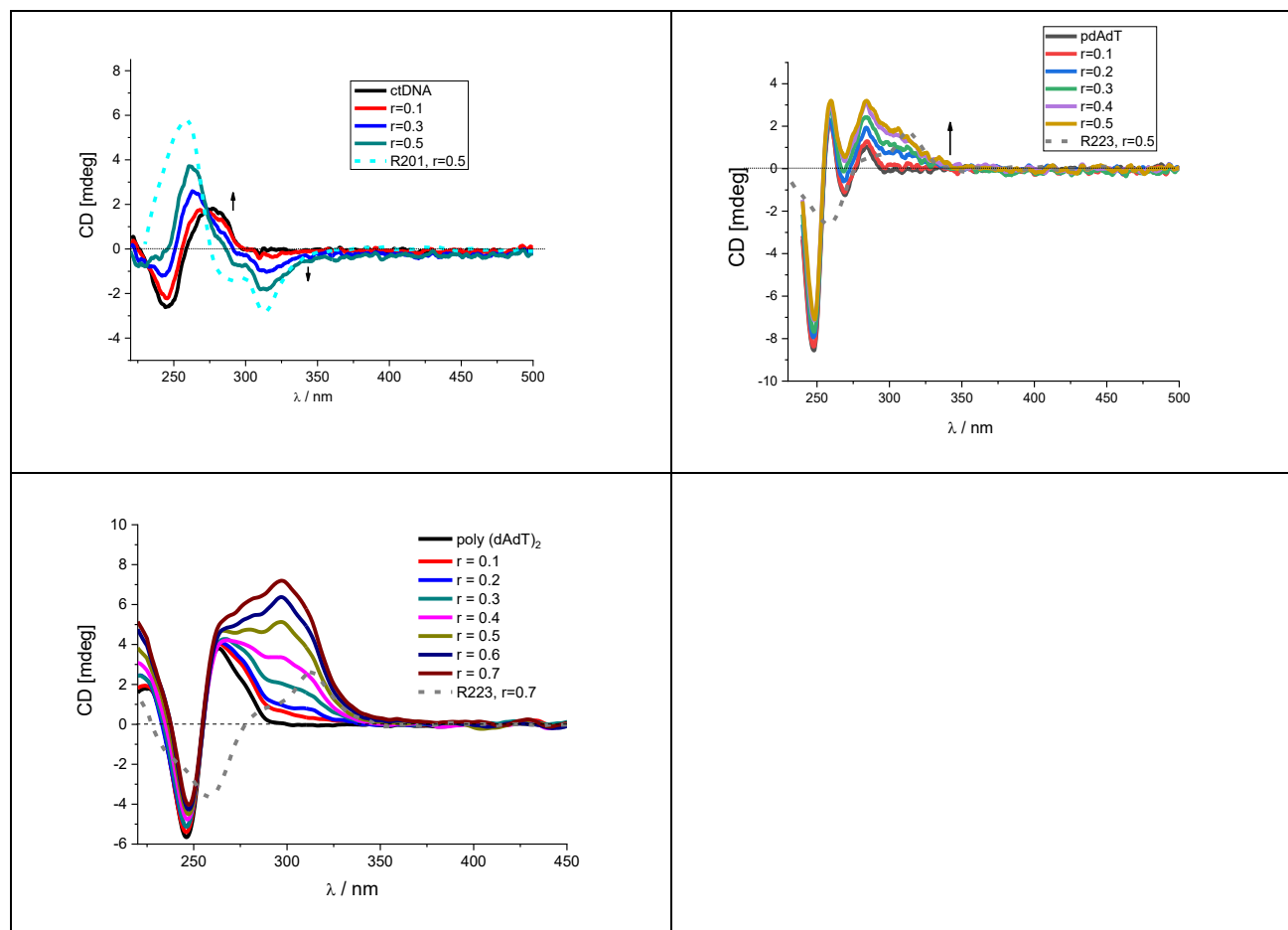


Slika D43. CD titracije spojeva **R201**, **R222** s poli(dAdT)<sub>2</sub> ( $c = 3 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>) pri različitim molarnim omjerima  $r$  [spoj] / [polinukleotid] u puferu natrijeva kakodilata ( $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>, pH 7,00).

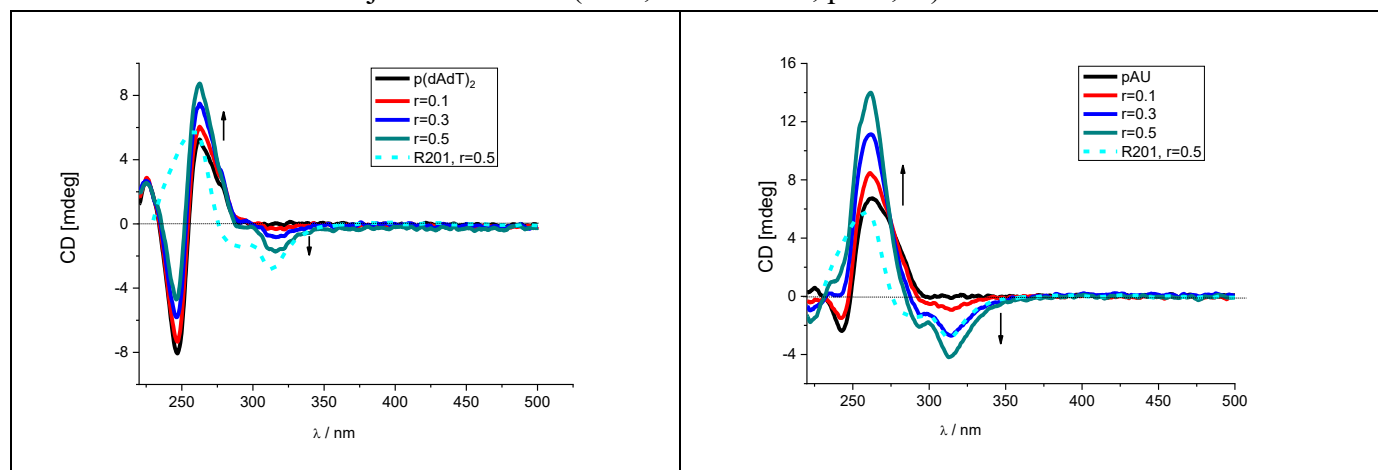


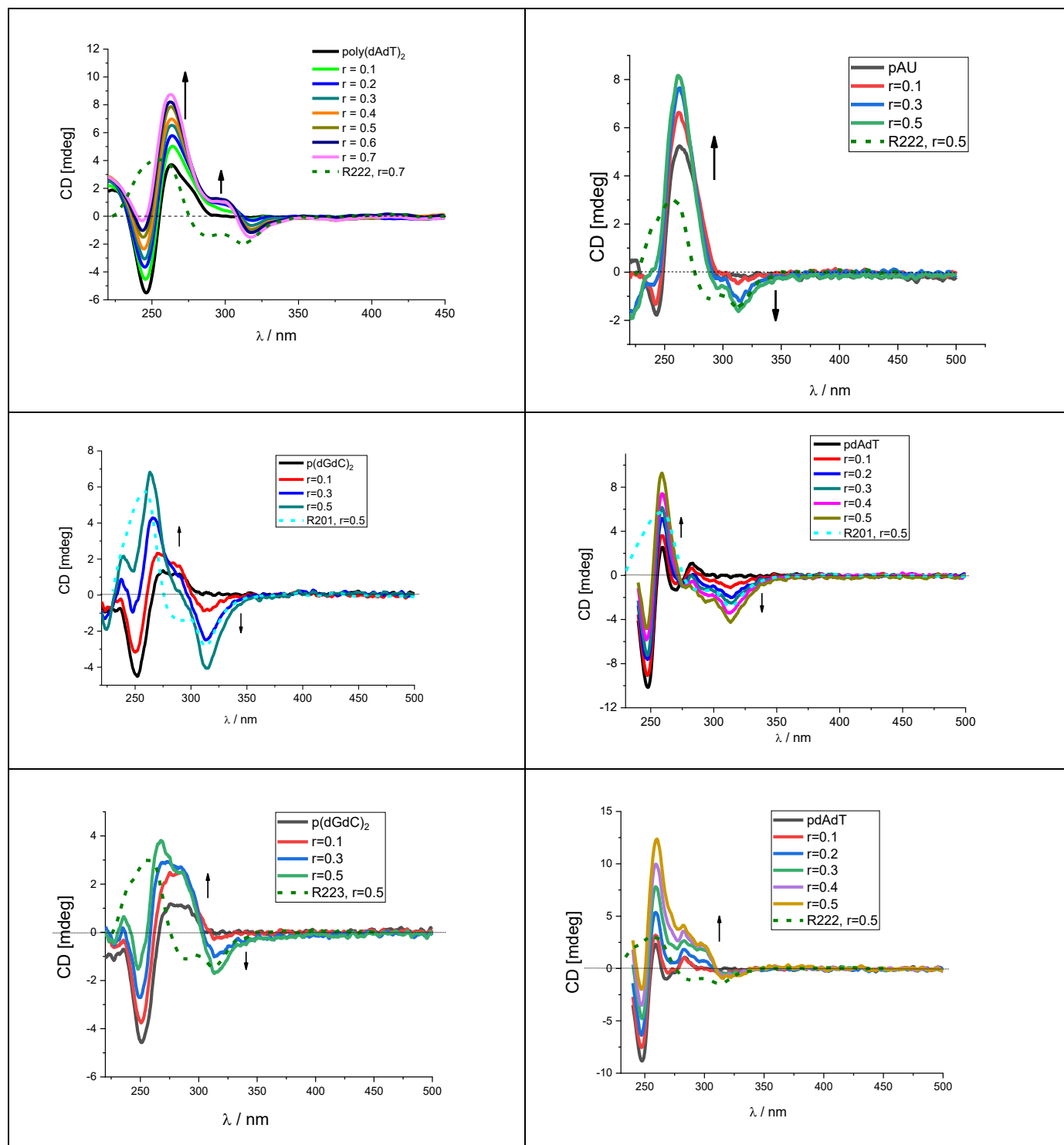


Slika D44. CD titracije spojeva **R201**, **R222** i **R223** s poli dA – poli dT, poli(dGdC)<sub>2</sub> i poli A – poli U ( $c = 3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri različitim molarnim omjerima  $r$  [spoj] / [polinukleotid] u puferu natrijeva kakodilata ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,00).

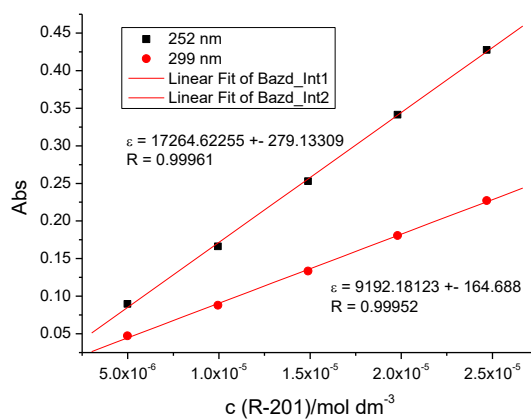
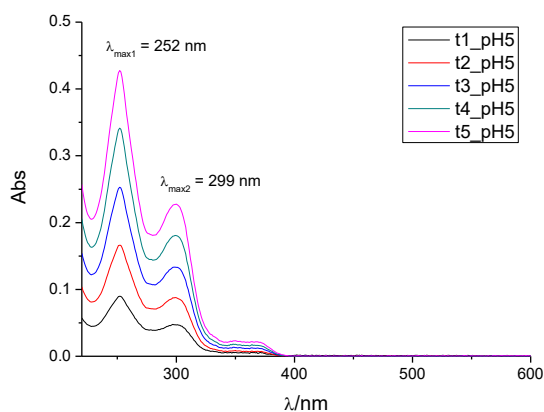


Slika D45. CD titracije spojeva **R201** s ctDNA i **R223** s poli dA – poli dT, poli(dAdT)<sub>2</sub> ( $c = 3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri različitim molarnim omjerima  $r$  [spoj] / [polinukleotid] u puferu natrijeva kakodilata ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 5,00).



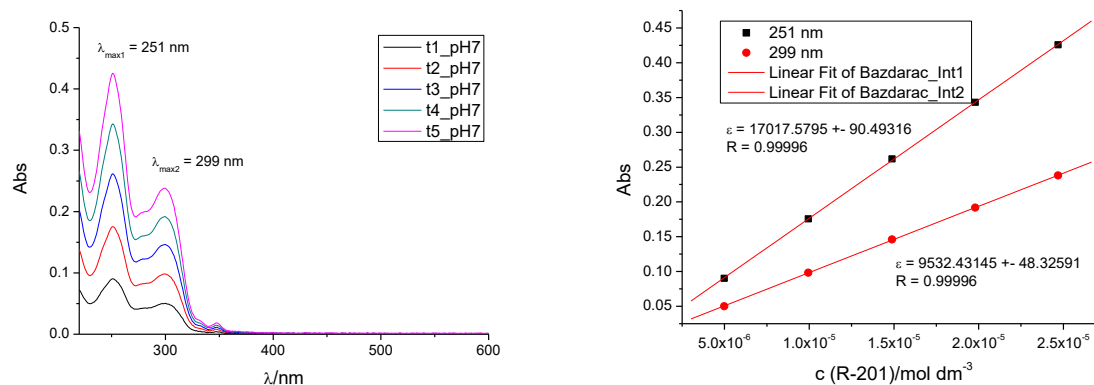


Slika D46. CD titracije spojeva **R201** i **R222** s poli dA – poli dT, poli(dAdT)<sub>2</sub>, poli(dGdC)<sub>2</sub> i poli A – poli U ( $c = 3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri različitim molarnim omjerima  $r$  [spoj] / [polinukleotid] u puferu natrijeva kakodilata ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 5,00).



Slika D47. a) Koncentracijska ovisnost UV/VIS spektara spoja **R201** pri različitim koncentracijama ( $c = 1 \times 10^{-6}$ -  $6 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup>), pH = 5,00, pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05$  M b) ovisnost apsorbancije o koncentraciji spoja **R201** pri valnim duljinama maksimuma apsorpcije  $\lambda = 252$  nm i 299 nm.





Slika D48. a) Koncentracijska ovisnost UV/VIS spektara spoja **R201** pri različitim koncentracijama ( $c = 1 \times 10^{-6}$ -  $6 \times 10^{-6}$   $\text{mol dm}^{-3}$ ), pH = 7,00, pufer natrijev kakodilat,  $I = 0,05$  M b) ovisnost apsorbancije o koncentraciji spoja **R201** pri valnim duljinama maksimuma apsorpcije  $\lambda = 251$  nm, 299 nm.

## § 9. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Ivona Jurić

Datum rođenja: 31. kolovoza 1999.

Mjesto rođenja: Vinkovci

### Obrazovanje

2006. – 2014. Osnovna škola Stjepana Antolovića, Privlaka

2014. – 2018. Gimnazija Matije Antuna Reljkovića, Vinkovci

2018. – 2021. Preddiplomski studij kemija na Odjelu za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

2021. Diplomski studij kemije, Sveučilišta u Zagrebu, Prirodoslovno – matematički fakultet, smjer: istraživački, grane: Analitička i organska kemija

### Publikacije

1. I. Jurić, *Teoretske metode za racionalan odabir tvari za sintezu kokristala lijekova*, Završni rad, Odjel za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 2021.