

Antimikrobnim peptidima funkcionalizirane DNA nanopore s antibakterijskim učinkom

Katalinić, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:217:023984>

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
Kemijски odsjek

Petra Katalinić

**ANTIMIKROBNIM PEPTIDIMA
FUNKCIONALIZIRANE DNA NANOPORE S
ANTIBAKTERIJSKIM UČINKOM**

Diplomski rad

predložen Kemijском odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 9. listopada 2024.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za biomolekularne interakcije na Institutu Ruđer

Bošković pod mentorstvom dr. sc. Ivo Crnolatac.

Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić.

Zahvale

Prvenstveno zahvaljujem profesorici Ivi Juranović Cindrić na ukazanom povjerenju i pruženoj prilici da izradim ovaj diplomski rad. Hvala Vam što ste mi uvijek bili na raspolaganju kada bih negdje zapela. Veliko hvala mom mentoru Ivi Crnolatu na nesebičnoj pomoći i savjetima. Hvala što ste imali puno strpljenja pri izvođenju svih neuspjelih elektroforeza i objašnjavanju kako funkcionira Origin. Uz Vas sam naučila puno toga!

Hvala svim mojim prijateljima i obitelji na velikoj podršci tijekom cijelog studiranja, kao i na razumijevanju zbog propuštenih druženja tijekom ispitnih rokova. Ipak se isplatilo!

Hvala mojoj kolegici Dori na svim provedenim satima u zajedničkom učenju i na svim ohrabrujućim razgovorima. Hvala mojoj Megi što mi je stvarala stres za vrijeme rokova i suptilno me tjerala da učim jer mi ipak želi uspjeh. Hvala Ruđeru na svim podukama za uređivanje referenci. Da vas nema, sigurno bih produžila još koju godinu studiranja.

Neizmjerno sam zahvalna mom Luki koji je bio uz mene kroz sve faze studiranja – one lijepe i one malo manje lijepe. Hvala što si me uvijek trpio i bio tu uz mene. Bez tebe bih izgubila i ovo malo kose što imam 😊

Najveće hvala mojim roditeljima i bratu na razumijevanju, podršci i bezuvjetnoj ljubavi tijekom studiranja, a i kroz cijeli život. Bez vas ne bih bila tu gdje jesam!

Sadržaj

SAŽETAK.....	X
ABSTRACT	XII
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Bakterijska rezistencija	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Antimikrobni peptidi	3
2.1.1. <i>Struktura i aktivnosti antimikrobnih peptida</i>	<i>3</i>
2.1.2. <i>Značajna svojstva antimikrobnih peptida</i>	<i>4</i>
2.1.3. <i>Glavne kategorije.....</i>	<i>5</i>
2.1.4. <i>Mehanizmi djelovanja</i>	<i>6</i>
2.1.6. <i>Anoplin.....</i>	<i>8</i>
2.2. Klik reakcija bez bakra	8
2.3. Metode ispitivanja polaznih spojeva i produkata	11
2.3.1. <i>UV/VIS spektrofotometrija.....</i>	<i>11</i>
2.3.2. <i>Fluorescencijska spektroskopija</i>	<i>12</i>
2.3.3. <i>Cirkularni dikroizam.....</i>	<i>13</i>
2.3.4. <i>Elektroforeza.....</i>	<i>15</i>
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. Materijali i reakcije sinteze	17
3.1.1. <i>DBCO-modifikacija peptida.....</i>	<i>18</i>
3.1.2. <i>Priprava oligonukleotida s azidnom skupinom</i>	<i>19</i>
3.1.3. <i>Klik reakcija.....</i>	<i>20</i>
3.2. UV/Vis spektroskopija.....	20
3.3. Fluorescencijska spektroskopija.....	21
3.4. CD spektroskopija.....	21
3.5. Elektroforeza na SDS-poliakrilamidnom gelu	22
3.6. Elektroforeza na agaroznom gelu.....	23
3.7. Biološka ispitivanja	24
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1. Sinteza spojeva	25
4.2. Spektroskopska karakterizacija spojeva	27
4.2.1. <i>UV/VIS spektri.....</i>	<i>27</i>

4.2.2. CD spektri	29
4.2.3. Spektri fluorescencijske emisije	32
4.3. Elektroforeza	36
4.3.1. SDS-PAGE elektroforeza	36
4.3.2. Elektroforeza na agaroznom gelu	38
4.4. Procjena mikrobiološke aktivnosti mjerenjem zone inhibicije.....	45
§ 5. ZAKLJUČAK	47
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (PREMA POTREBI)	48
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	49
§ 8. ŽIVOTOPIS	LI



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

ANTIMIKROBNIM PEPTIDIMA FUNKCIONALIZIRANE DNA NANOPORE S ANTIBAKTERIJSKIM UČINKOM

Petra Katalinić

Bakterijska rezistencija predstavlja ozbiljan problem u suvremenoj medicini. Ona omogućuje bakterijama da se razvijaju unatoč prisutnosti antibiotika, što dovodi do povećanja troškova zdravstvene zaštite te u krajnjem slučaju, smrtnosti. Zbog nedostatka lijekova, kao alternativno rješenje, istražuju se antimikrobni peptidi koji potencijalno djeluju protiv raznih mikroorganizama. Spomenuti peptidi, anoplin i indolicidin, zbog svoje amfipatske strukture, mogu destabilizirati bakterijske membrane. Da bi se povećao terapijski učinak, istražuje se konjugacija peptida s oligonukleotidima. U ovom istraživanju fokus je stavljen na sintezu i analizu konjugata peptida i oligonukleotida pomoću klik-kemijske reakcije. Sintetizirano je 14 spojeva, uključujući konjugate peptida i oligonukleotida te komplekse različitih oligonukleoida. Spojevi su okarakterizirani UV/Vis i fluorescencijskom spektrofotometrijom te spektrometrijom cirkularnog dikroizma. Sinteza je praćena gel-elektroforezom, a završni produkti podvrgnuti su mikrobiološkom testiranju. Autentičnost produkata sinteze i završnih produkata nije potvrđena strukturnom analizom. Potrebna je analiza produkata klik sinteze i smatanja konjugata primjenom spektrometrije masa.

(50 stranica, 28 slika, 8 tablica, 29 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: anoplin, antimikrobni peptidi, bakterije, indolicidin, oligonukleotidi

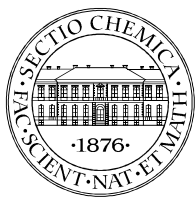
Mentor: dr. sc. Ivo Crnolatac

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

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
 2. prof. dr. sc. Ines Primožič
 3. prof. dr. sc. Biserka Prugovečki
- Zamjena: doc. dr. sc. Adriana Kendel

Datum diplomskog ispita: 9. listopada 2024.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

DNA NANOPORES FUNCTIONALIZED WITH ANTIMICROBIAL PEPTIDES

Petra Katalinić

Bacterial resistance represents a serious problem in modern medicine. It allows bacteria to prosper, despite the presence of antibiotics, leading to increased healthcare costs and, ultimately, mortality. Due to the lack of drugs, as an alternative solution, antimicrobial peptides are being explored for their potential activity against various microorganisms. These peptides, anoplin, and indolicidin, can destabilize bacterial membranes due to their amphipathic character. To enhance therapeutic efficacy and stability, our research is focusing on conjugating peptides with oligonucleotides, which provides more structural stability while allowing precise targeting. This study focuses on the synthesis and analysis of peptide-oligonucleotide conjugates using click chemistry. 14 compounds were synthesized, including conjugates of peptides and oligonucleotides and complexes of different oligonucleotides. The compounds were characterized by UV/Vis and fluorescence spectrophotometry and circular dichroism spectrometry. The synthesis was monitored by gel electrophoresis, and the final products were subjected to microbiological testing. The authenticity of the conjugates and the final products could not be confirmed with structural analysis. Therefore, the products of the click-synthesis and the annealed conjugates should be analysed by mass spectroscopy.

(50 pages, 28 figures, 8 tables, 29 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: anoplin, antimicrobial peptides, bacteria, indolicidin, oligonucleotides

Mentor: dr. sc. Ivo Crnolatac

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

Reviewers:

1. Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor
2. Dr. Ines Primožič, Professor
3. Dr. Biserka Prugovečki, Professor

Substitute: Dr. Adriana Kendel, Assistant Professor

Date of exam: October 9, 2024.

§ 1. UVOD

1.1. Bakterijska rezistencija

Bakterijska rezistencija predstavlja jedan od ključnih izazova u suvremenoj medicini. Prema izvještaju Europskog centra za prevenciju i kontrolu bolesti (*European Centre for Disease Prevention and Control*, ECDC) iz 2020. godine, primjetan je porast otpornosti na većinu antibiotika diljem Europske unije (EU).¹ Europska mreža praćenja antimikrobne rezistencije (*European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*, EARS-Net) proučava trendove bakterijske rezistencije u EU prema bakterijskim sojevima i grupama antibiotika. *Escherichia coli* je najčešći multirezistentni bakterijski soj (44,2%), slijedi *Staphylococcus aureus* (20,6%), *Klebsiella pneumoniae* (11,3%), *Enterococcus faecalis* (6,8%), *Pseudomonas aeruginosa* (5,6%), *Streptococcus pneumoniae* (5,3%), *Enterococcus faecium* (4,5%) i *Acinetobacter species* (1,7%). Navedeni sojevi poznati su kao ESKAPE patogeni. Svake godine, u EU, umre oko 33 000 ljudi od posljedica multirezistentnih bakterijskih sojeva, što premašuje smrtnost od gripe, tuberkuloze i HIV/AIDS-a zajedno. Upotreba antibiotika u EU ostaje visoka s trendom porasta u nekim zemljama. Nepravilna upotreba, samoliječenje i izloženost bolničkim infekcijama doprinose daljnjem razvoju otpornosti bakterija.²

Utjecaj bolesti povezanih s multirezistentnim bakterijskim sojem na ekonomiju i troškove zdravstvene skrbi predstavlja veliki izazov na zdravstvene sustave u EU i diljem svijeta.^{1,3} Konvencionalna antibakterijska terapija obično uključuje upotrebu antibiotika kao samostalnih lijekova ili u kombinaciji s drugima. Međutim, broj antibiotika koji su djelotvorni protiv ESKAPE patogena opada, a postoji stvarna prijetnja da ćemo se uskoro naći u situaciji bez učinkovitih sredstava protiv određenih bakterijskih sojeva. Potreba za novim vrstama antibiotika koje bi prevladale mehanizme bakterijske rezistencije dugotrajan je i složen proces.^{4,5}

Iz prethodno navedenih razloga pojavili su se pristupi koji uključuju primjenu antibiotika u kombinaciji s adjuvantima ili inhibitorima rezistencije, terapiju bakteriofagima, fotodinamsku terapiju, antibakterijska antitijela i nanočestice kao antibakterijske agense. Antimikrobni peptidi (AMP) imaju važnu ulogu u urođenom imunološkom sustavu te

predstavljaju prvu liniju obrane od patogenih bakterija kod većine organizama, uključujući ljude. Stoga su istraživanja AMP-a u svrhu antibakterijske terapije već tridesetak godina u interesnoj sferi mnogih istraživača.^{4,5}

AMP se odlikuju po učinkovitosti i raznolikosti strukture, a mogu se kategorizirati prema svojim karakteristikama. Mehanizam djelovanja AMP-a obično uključuje oštećenje membranskih struktura bakterija čime mogu nadjačati mehanizme bakterijske otpornosti. Bez obzira na različite strukture, AMP imaju sposobnost vezivanja i prodiranja u membrane bakterija, gdje stvaraju pore ili šupljine, omogućavajući uništavanje bakterija. S obzirom na značajne razlike između struktura i sastava prokariotskih i eukariotskih membrana, antimikrobni peptidi pokazuju visoku specifičnost prema bakterijskim stanicama.⁶

U ovom istraživanju fokus je stavljen na razvoj novih spojeva putem klik kemijske reakcije između AMP, anoplina i indolicidina, s odgovarajućim oligonukleotidima. Oligonukleotidi su odabrani s ciljem optimizacije strukture i poboljšanja antibakterijskih svojstava spojeva. Eksperimentalni dio uključuje karakterizaciju dobivenih spojeva pomoću različitih analitičkih tehnika, uključujući UV/VIS spektroskopiju, fluorescencijsku spektroskopiju, cirkularni dikroizam te elektroforezu. Navedene tehnike omogućuju detaljnu analizu strukture i svojstva sintetiziranih spojeva, pružajući uvid u njihovu stabilnost i interakciju s okolinom. Nadalje, provedena su antibakterijsko testiranje sintetiziranih spojeva na hranjivoj podlozi kako bi se procijenila njihova antimikrobna učinkovitost. Rezultati ovih testova dali su uvid u potencijalno kliničko značenje novih spojeva u kontroli bakterijskih infekcija.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Antimikrobni peptidi

Antimikrobni peptidi (AMP) su oligopeptidi koji sadrže od pet pa sve do više od stotinu aminokiselina. Do sada je ukupno otkriveno ili sintetizirano više od 5000 AMP-a. Prirodni AMP mogu se pronaći kod prokariota kao i kod eukariota. U životinjama, AMP se obično nalaze u tkivima i organima koji su izloženi patogenim organizmima te se smatra da oni predstavljaju prvu liniju urođene imunološke obrane protiv virusa, bakterija i gljivica. Stoga AMP imaju važnu ulogu u zaustavljanju većine infekcija prije uzrokovanja raznih simptoma.⁶

2.1.1. Struktura i aktivnosti antimikrobnih peptida

Antimikrobni peptidi najčešće imaju strukturu α -zavojnice ili β -ploče, a osim toga mogu imati produženu strukturu ili strukturu petlje. Peptidi sa strukturom α -zavojnice su najviše proučavani AMP. U strukturama α -zavojnice udaljenost između dvije susjedne aminokiseline iznosi 0,15 nm. Najpoznatiji primjeri takvih AMP-a su protegrin, magainin te ciklički i namotani indolicidin. Peptidi koji sadrže β -ploču sastoje se od najmanje dva β -lanca povezanih disulfidnim vezama. Dok većina AMP-a pripada jednoj od četiri gore navedene skupine, neki AMP ne pripadaju niti jednoj ili sadrže dvije različite strukturne komponente. Također, mnogi peptidi tvore svoju aktivnu strukturu samo u interakciji s membranama ciljnih stanica. Jedan takav primjer je indolicidin. Indolicidin posjeduje globularnu i amfipatsku konformaciju u vodenim otopinama dok je klinastog oblika u okruženjima koja oponašaju lipidni dvosloj.

Jedna vrlo važna značajka AMP-a je njihov brzi mehanizam obrane koji kod nekih AMP-a uspješno završava nakon nekoliko sekundi od početnog kontakta sa staničnom membranom. S obzirom da su AMP sastavljeni od aminokiselina, moguće je modificirati njihovu strukturu s ciljem poboljšanja stabilnosti i samog učinka AMP-a.

Unatoč mnogim prednostima AMP-a postoje razni izazovi u njihovoj primjeni koji se pokušavaju prevladati. Negativne strane uključuju njihovu potencijalnu imunogeničnost, osjetljivost na nepovoljne uvjete okoliša, nedostatak selektivnosti prema određenim sojevima, visoki troškovi proizvodnje te bakterijska rezistencija na neke AMP-e.⁶

2.1.2. Značajna svojstva antimikrobnih peptida

Sve do danas nije posve jasna povezanost između strukturnih grupa AMP-a i njihovog načina djelovanja te stupnja aktivnosti. Čak i AMP s vrlo sličnim strukturama mogu imati sasvim različite mehanizme djelovanja i spektar ciljanih stanica. Struktura AMP-a svakako je važna, dok su veličina, naboj, hidrofobnost, amfipatičnost, zavojitost i topljivost ključna fizikalno-kemijska svojstva za njihovu antimikrobnu aktivnost i specifičnost.

Veličina AMP, odnosno dužina lanca je vrlo važna za njegovu aktivnost jer je potrebno najmanje 7-8 aminokiselina da bi se formirale amfipatske strukture s hidrofobnim i hidrofilnim površinama na suprotnim stranama peptidne molekule. Također dužina AMP može utjecati i na njegovu citotoksičnost.⁷ Duži peptidi skloniji su agregiranju, a upravo je agregacija kritičan uvjet za toksičnost. Razlog tome je snažno povećavanje gustoće lokalnog naboja pri agregaciji u interakciji sa staničnim membranama.⁸

Ukupan naboj AMP-a koji je zbroj svih naboja peptida varira od negativnog do pozitivnog i glavni je faktor za početnu interakciju sa staničnim membranama, koje imaju negativni potencijal. Promjenom ukupnog naboja AMP-a mogu se promijeniti antimikrobna svojstva kako bi se postiglo selektivno djelovanje na ciljane bakterijske sojeve.

Zavojitost je manje važna za aktivnost AMP u usporedbi s drugim faktorima, no bitna je za određivanje toksičnosti prema eukariotskim stanicama. Smanjenje zavojitosti uključivanjem D-aminokiselina u primarni slijed pokazalo je smanjenje hemolitičkog učinka uz očuvanje antimikrobnog učinka.

Hidrofobnost također utječe na aktivnost i selektivnost molekula AMP-a jer djeluju u lipidnom okruženju, gdje je stabilnost i aktivna konformacija ključna za njihovu funkciju. Optimalna hidrofobnost omogućava AMP da učinkovito stupaju u interakcije s lipidnim membranama, dok vrijednosti izvan tog raspona mogu dovesti do destabilizacije ili gubitka aktivnosti.⁹

Amfipatičnost je važno svojstvo kada je riječ o interakcijama s membranama mikroorganizama. Može se čak reći da je ona važnija od hidrofobnosti za vezivanje na membranu bakterija. Amfipatski AMP stupaju u interakciju s polarnim glavama i hidrofobnim repovima lipidnih membrana. Ovaj dvostruki karakter bitan je za učinkovito ciljanje membrana koje imaju negativno nabijene i hidrofilne površine te hidrofobnu jezgru dvosloja.¹⁰ Budući da AMP djeluju u biološki relevantnom mediju, moraju biti topivi u vodenim otopinama.

Agregacija molekula AMP-a može dovesti do gubitka sposobnosti interakcije sa staničnom membranom, stoga je odgovarajuća topivost izuzetno važna.⁶

2.1.3. Glavne kategorije

Antimikrobni peptidi klasificiraju se prema cilju i načinu djelovanja, a to su: antivirusni, antibakterijski, antifugalni i antiparazitski peptidi.

Antivirusni peptidi mogu djelovati na nekoliko načina. Prvo, mogu se integrirati u virusnu ovojnica ili staničnu membranu domaćina što uzrokuje nestabilnost membrane te sprječava viruse da inficiraju stanice. Također mogu smanjiti vezanje virusa za stanice domaćina. Drugi način djelovanja je sprječavanje ulaska virusnih čestica u stanice domaćina blokiranjem specifičnih receptora na membranama stanica. Osim toga, neki antivirusni peptidi mogu proći kroz staničnu membranu i promijeniti genetski profil stanica domaćina, što pomaže obrambenom sustavu u borbi protiv virusa te blokiraju ekspresije virusnih gena.

Antibakterijski peptidi su najčešće proučavani, a većina njih su kationski peptidi koji ciljaju bakterijske stanične membrane te uzrokuju njihovo raspadanje. Ovi peptidi često imaju amfipatsku strukturu s hidrofobnim i hidrofilnim dijelovima, što im omogućuje vezanje za različite komponente membrane. Zanimljivo je da neki antibakterijski peptidi mogu ubiti bakterije čak i pri niskim koncentracijama, a da pritom ne oštećuju membranu. Umjesto toga, djeluju inhibirajući važne unutarstanične procese poput replikacije DNA i sinteze proteina. Neki antibakterijski peptidi, poput nisina i vankomicina, pokazali su sposobnost ubijanja bakterija koje su otporne na antibiotike.¹¹

Slično antibakterijskim peptidima, antifugalni peptidi bore se protiv gljivica ciljajući staničnu stijenku ili unutarstanične komponente. Međutim, bakterijska membrana i gljivična stanična stijenka sadrže različite komponente. Na primjer, hitin izgrađuje gljivične stanične stijenke, a neki antifugalni peptidi imaju sposobnost vezanja za hitin. Takva sposobnost vezanja pomaže antifugalnim peptidima efikasno ciljanje gljivičnih stanica. Iako većina antifugalnih peptida ima polarne i neutralne aminokiseline u svojoj strukturi, ne čini se da postoji jasna povezanost između strukture peptida i vrste stanica na koje ciljaju.

Antiparazitski peptidi su manja skupina u odnosu na prethodno navedene kategorije. Prvi otkriveni antiparazitski peptid je magainin koji može ubiti papučicu *Paramecium caudatum*. Iako su neki parazitski mikroorganizmi višestanični, način djelovanja antiparazitskih

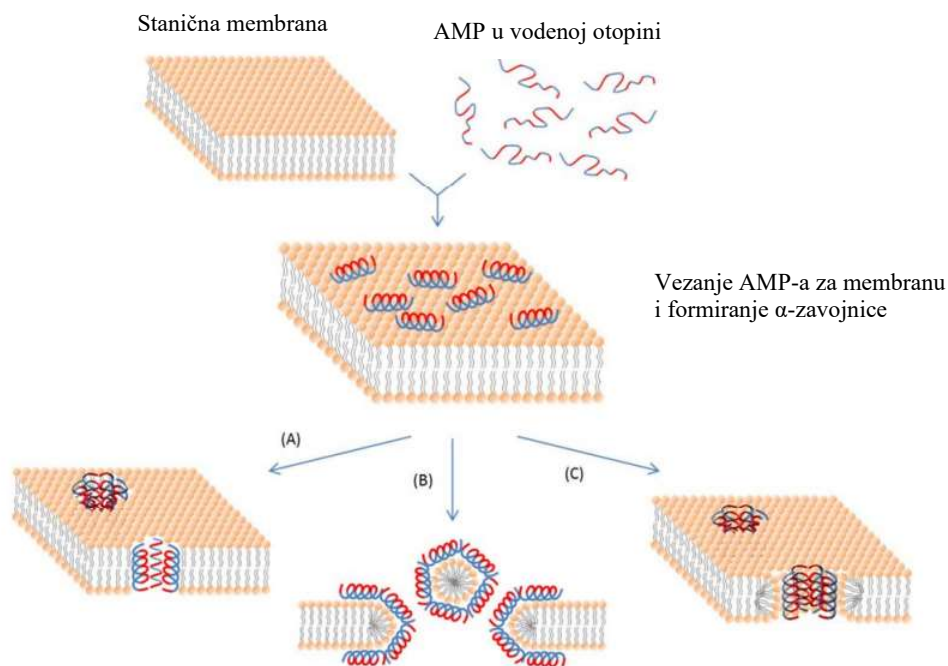
peptida je isti kao i kod drugih AMP-a. Oni djeluju na stanice direktnim interakcijama sa staničnom membranom.⁶

2.1.4. Mehanizmi djelovanja

Kao što je prethodno opisano, AMP ubijaju stanice ometanjem cjelovitosti membrane, inhibicijom proteina, ometajući sintezu DNA/RNA ili interakcijom s određenim unutarstaničnim komponentama. AMP mogu biti kationski i anionski te su u pravilu učinkoviti samo protiv jedne klase mikroorganizama (npr. protiv bakterija ili gljivica). Međutim, postoje i iznimke, kao što je indolicidin koji može ubiti bakterije, gljivice te virus humane imunodeficijencije (HIV).¹²

Čak i ako su ciljane unutarstanične komponente, za antimikrobne aktivnosti aktivnih AMP-a, potrebna je početna interakcija s membranom stanice. Većina AMP-a koji djeluju na membranu su amfipatske molekule, što znači da imaju kationske i hidrofobne površine. Ova značajka osigurava početnu elektrostatsku interakciju s negativnom naelektriziranom staničnom membranom i ulazak u unutrašnjost membrane. Djelovanje AMP-a ne zaustavlja se nakon te početne interakcije. Hidrofobni dio AMP-a pomaže u ubacivanju molekule AMP-a u staničnu membranu, stoga su uključene uglavnom ionske i hidrofobne interakcije.

Na slici 1. prikazani su neki mehanizmi djelovanja membranski aktivnih antimikrobnih peptida. U modelu bačve i štapića, prikaz (A), molekule antimikrobnih peptida umeću se okomito u membranu. Male površine membrane prekrivene su molekulama AMP-a s hidrofobnim stranama okrenutim prema unutra, ostavljajući pore u membrani vidljive su u modelu tepiha na prikazu (B). Model toroidalnih pora, prikaz (C), podsjeća na model bačve i štapića. Razlika je u tome što su AMP uvijek u kontaktu s fosfolipidnim glavama membrane. Plava boja predstavlja hidrofobne dijelove AMP, dok crvena predstavlja hidrofilne.



Slika 1. Shematski prikaz nekih mehanizama djelovanja membranski aktivnih AMP-a. (A) predstavlja model bačve i štapića, (B) model tepiha, a (C) model toroidalnih pora. (preuzeto i prilagođeno iz literaturnog izvora⁶)

U ranim istraživanjima antimikrobnih peptida smatralo se da je permeabilizacija bakterijske stanične membrane primarni mehanizam djelovanja. Pretpostavljalo se da bi AMP trebali biti korišteni u koncentracijama dovoljno visokim da bi mogli ubiti mikroorganizme narušavajući integritet membrane stvaranjem kanala i pora. Otkriće da neki AMP mogu naštetiti ciljnim stanicama bez uzrokovane permeabilizacije membrane sugerira da postoje i drugi mehanizmi aktivnosti. Tako unutarstanični aktivni AMP međudjeluju s ciljnim komponentama unutar stanice. Primjerice, indolicidin je pokazao sposobnost selektivnog vezanja za DNA s ciljanom sekvencom.¹³ Neki AMP, poput PR-39, mogu čak i inhibirati sintezu DNA i proteina. PR-39 antimikrobni je peptid iz crijeva svinja koji ubija bakterije djelujući kao proteolitički agens zaustavljajući sintezu proteina i DNA⁶.

2.1.5. Indolicidin

Indolicidin je kationski antimikrobni peptid izoliran iz citoplazmatskih goveđih neutrofilnih granulocita. Pripada skupini antimikrobnih peptida (AMP) koje proizvode eukariotske stanice

i sudjeluju u održavanju tzv. urođenog imuniteta. Sastoji se od samo 13 aminokiselina, a ima najviši udio triptofana od svih poznatih proteina. Prirodno ima amidnu skupinu na karboksilnom kraju. Ne posjeduje strukturu α -zavojnice niti β -ploče čak ni u okolini koja oponaša staničnu membranu. Indolicidin je posebno poznat po tome što pokazuje aktivnost protiv Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija, kao i gljivica. Iako ima baktericidno djelovanje i permeabilizira bakterijske membrane čime inhibira transkripciju i replikaciju, pritom ne razgrađuje bakterijske stanice. Peptidi koji ne razgrađuju stanice nazivaju se patogenezom povezani peptidi, odnosno PR peptidi (engl. *Pathogenesis-related peptides*).^{14–16}

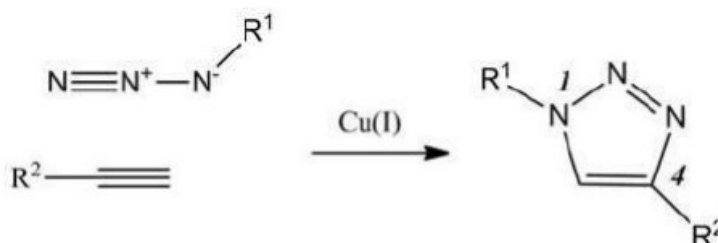
2.1.6. Anoplin

Anoplin, izoliran iz otrova solitarne ose *Anoplius samariensis* najkraći je, amfipatski, linearni antimikrobni peptid koji ima strukturu α -zavojnice. Građen je od samo 10 aminokiselina. Pokazuje širok spektar bioloških aktivnosti, uključujući antibakterijske, antitumorske i protuupalne. Anoplin izvršava svoju funkciju direktnom interakcijom s anionskim lipidnim dvoslojem i biološkim membranama poput ionskih kanala, zatim selektivnim vezanjem na bakterijsku DNA ili inhibicijom ATP sintaze. Zahvaljujući svojoj jednostavnoj strukturi i vrlo slaboj homolitičkoj aktivnosti¹⁷, anoplin pokazuje superiornost u kemijskoj manipulaciji, studijama odnosa strukture i aktivnosti, mehanizmima djelovanja i medicinskoj primjeni, što ima veliki potencijal kao nova vrsta antibiotika ili antikancerogenih lijekova.¹⁸

2.2. Klik reakcija bez bakra

Klik kemija je široko rasprostranjena zbog svoje učinkovitosti, selektivnosti i jednostavnosti. Klik je svaka reakcija koja omogućuje učinkovito povezivanje manjih jedinica s makromolekulama u postupku koji se sastoji od jednog koraka s pojednostavljenim uvjetima reakcije. Izraz klik odnosi se na reakcije koje se mogu provesti bez kromatografskog pročišćavanja u lako uklonjivim otapalima. Takvi postupci mogu uključivati širok raspon reakcija s različitim mehanizmima pod uvjetom da slijede zajednički reakcijski put. Bakrom katalizirana reakcija između azida i terminalnih alkina klasičan je primjer klik reakcije, a sama reakcija prikazana je na slici 2. Funkcijske skupine, azidi i alkini, kombiniraju se kako bi se

stvorio peteročlani prsten triazola. Navedena reakcija ima razne primjene u reakcijama sinteze i modifikacije molekula, u biokemiji, biologiji, kemiji polimera, materijala, lijekova i dr.



Slika 2. Bakrom katalizirana cikloadicija između azida i alkina (preuzeto i prilagođeno iz literaturnog izvora¹⁹)

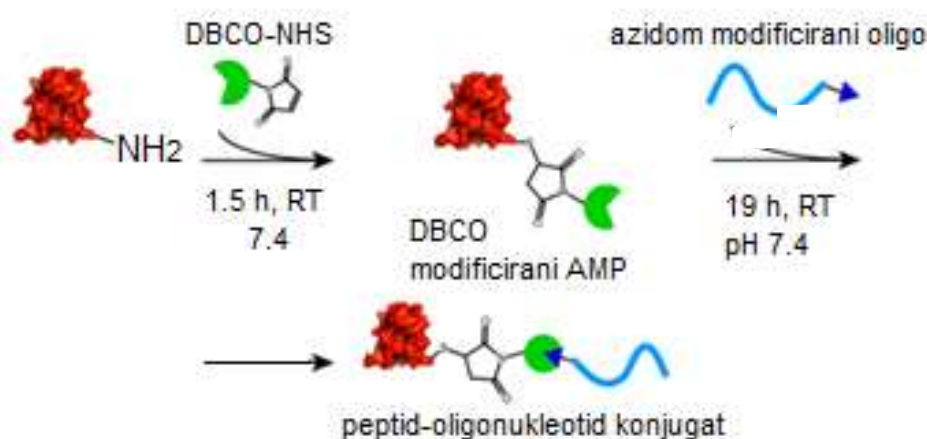
Također, bakrom potpomognuta azid-alkin adicija (*Cu assisted azide-alkyne cycloaddition*, CuAAC) daje vrlo visoke kemijske prinose, ne stvara neželjene nusprodukte, stereospecifična je i regiospecifična. Azid je široko korištena funkcijska skupina koja se može ugraditi u mnogo bioloških molekula hraneći stanice ili organizme je azid. Obilježja, lokacija i dinamika azidom označenih biomolekula mogu se pratiti nakon kemijske ligacije sa probama koje nose komplementarnu funkcionalnost. Upravo se azidi zbog svojih svojstava koriste u bakrom kataliziranim klik reakcijama.¹⁹

Cilj klik reakcija je minimizirati upotrebu otapala i reagensa, smanjiti korake pročišćavanja i korištenje zaštitnih skupina. Problem kod CuAAC reakcija je u tome što bakar (I) ima neželjenu citotoksičnost čak i pri niskim koncentracijama. Reakcija azida s napetim alkinima (*Strain promoted azide-alkyne cycloaddition*, SPAAC), poput ciklooktina, prihvatljivija je jer se triazolni produkt dobiva bez korištenja toksičnog katalizatora – bakra.^{19,20}

Dodavanje elektronegativnih atoma fluora na prvu zasićenu vezu nakon trostruke veze u molekuli ciklooktina drastično povećava brzinu njegove reakcije s azidima. Povećanje brzine reakcije može se postići i uvođenjem dva benzenska prstena čime se povećava energija napetosti. Dibenzociklooktini su stabilni, no jedan dodatan stupanj nezasićenosti u prstenu stvara enin koji je izrazito nestabilan i reaktivan. Pri dizajniranju novih funkcionalnih ciklooktina naglasak je na uspostavljanju ravnoteže između stabilnosti i reaktivnosti.¹⁹

U kontekstu ovog istraživanja, klik reakcija bez bakra koristit će se za povezivanje proteina (antimikrobnih peptida) i DNA oligonukleotida. Konjugati proteina i DNA često su korišteni u posljednje vrijeme zbog prednosti koje pružaju obje komponente. Proteini kataliziraju kemijske reakcije i ostvaruju interakcije s ligandima, dok se DNA može koristiti za

pozicioniranje molekule od interesa s nanometarskom preciznošću. Reakcija uključuje korištenje reagensa N-hidroksisukcinimid dibenzociklooktin (DBCO-NHS). NHS se veže na -NH₂ skupine peptida; postoji mogućnost da se veže bočni ogranak ili na N-kraj. Ovim postupkom se reagens DBCO-NHS vezao za peptid. U drugom koraku pripreme prije klik reakcije provodi se transfer azida na oligonukleotidima. Za ovo istraživanje osigurani su oligonukleotidi koji na 3' kraju posjeduju amino modifikaciju, odnosno alkilni lanac -C₆H₁₃NH₂. Oligonukleotidi su odabrani tako da prilikom postupka smatanja tvore nanoporu. Krajnja -NH₂ skupina oligonukleotida prevodi se u azid. Idući korak je klik reakcija između azidom modificiranog oligonukleotida i navedene skupine DBCO. Ova reakcija sprječava oštećenje ili gubitak aktivnosti proteina uzrokovanog bakrom, vidljivo na slici 3.



Slika 3. Shematski prikazan reakcijski niz povezivanja AMP s oligonukleotidima koristeći azid-dibenzociklooktin reakciju.

Istovremeno, klik kemija osigurava visoku učinkovitost sprežanja oligonukleotida s proteinom i dobru kontrolu stehiometrije kroz biokompatibilnost. S obzirom na dostupnost oligonukleotida s azidnim modifikacijama na 5' i 3' krajevima, kao i na unutarnjim pozicijama, navedena metoda otvara mogućnost povezivanja proteina na bilo koju poziciju na DNA oligonukleotidima.²¹

2.3. Metode ispitivanja polaznih spojeva i produkata

2.3.1. UV/VIS spektrofotometrija

Ultraljubičasto (UV) i vidljivo zračenje (VIS) dijelovi su elektromagnetskog spektra koji uključuje i druge oblike zračenja poput radio, infracrvenog ili rendgenskog. Energija izražena u džulima (J), povezana s elektromagnetskim zračenjem definirana je kao:

$$E = h \cdot \nu \quad (1)$$

gdje je ν frekvencija izražena u recipročnim sekundama (s^{-1}), a h Planckova konstanta koja iznosi $6,62 \times 10^{-34}$ Js.

Spektroskopija omogućuje proučavanje kako određena tvar apsorbira, emitira elektromagnetsko zračenje ili međudjeluje s istim.²²

UV/VIS spektrofotometrija temelji se na apsorpciji ultraljubičastog (200-380 nm) i vidljivog (380-800 nm) zračenja. Kada UV ili Vis zračenje prolazi kroz uzorak dolazi do prijelaza elektrona između elektronskih stanja u molekuli, što rezultira apsorpcijom određene količine zračenja. Ovaj proces omogućuje registriranje apsorpcijskih spektara koji nam omogućuju analizu različitih tvari poput organskih, anorganskih i biokemijskih spojeva. Kromofor je funkcijska skupina odgovorna za apsorpciju zračenja. Najčešći kromofori uključuju dvostruke i trostruke veze, konjugirane sustave te aromatske prstenove. Apsorpcija se opisuje apsorpcijom, A , koja je obrnuto proporcionalna s transmitancijom, T i može se izraziti:

$$A = -\log T \quad (2)$$

Apsorpcija zračenja slijedi Beer-Lambertov zakon:

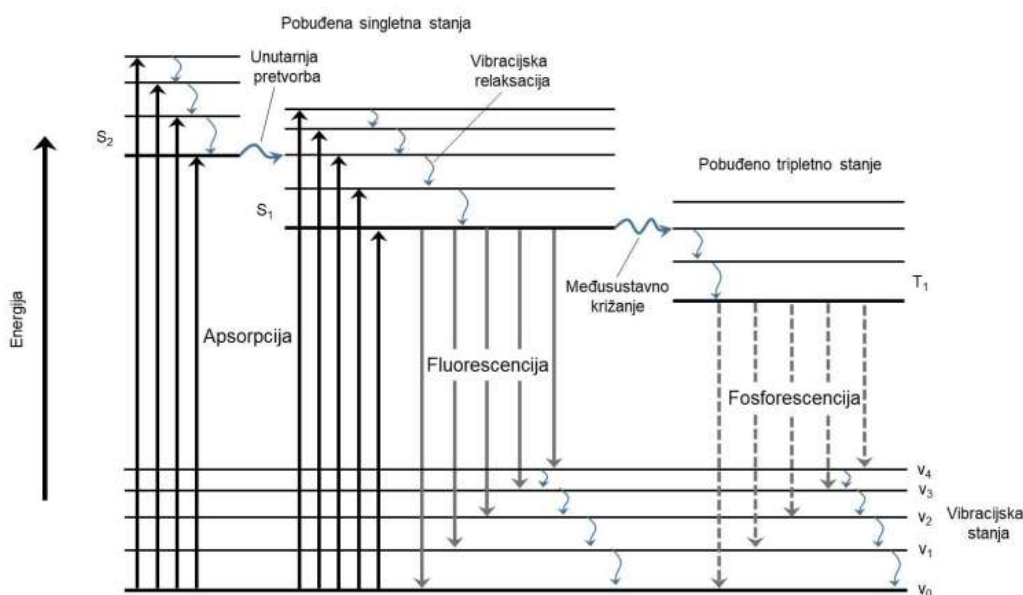
$$A = a \cdot b \cdot c \quad (3)$$

gdje a predstavlja apsorpcijski koeficijent, b odgovara duljini puta zračenja, a c koncentraciju tvari. Osjetljivost ove metode omogućuje detekciju tvari u niskim koncentracijama (10^{-6} mol L^{-1}), ali preklapanje apsorpcijskih maksimuma može otežati analizu sastojaka smjese. Međutim, korištenjem odvojenih apsorpcijskih maksimuma za pojedine molekule i svojstva aditivnosti, moguće je istovremeno odrediti količinu više sastojaka u smjesi.

Tipični spektrofotometri opremljeni su optičkim sustavom s dva snopa zračenja koji prolazi kroz uzorak i slijepu probu. Izvori UV i VIS zračenja su deuterijska ili volframska žarulja, a propušteno zračenje sakuplja se i detektira fotomultiplikatorom. Kivete korištene za mjerenje UV/VIS apsorpcijskih spektara najčešće su napravljene od kvarca (propusne za UV i VIS zračenje) i stakla ili plastike (propusne samo za VIS zračenje).²³

2.3.2. Fluorescencijska spektroskopija

Fluorescencijska spektroskopija je tehnika molekulske spektroskopije koja se bazira na emisiji zračenja. Kada se molekula pobudi UV ili VIS zračenjem te prijeđe u više elektronsko stanje, slijede procesi otpuštanja energije koji vraćaju molekulu u osnovno elektronsko stanje. Većina molekula može proći kroz vibracijsku relaksaciju i unutarnju pretvorbu, gdje energiju gubi bez emisije zračenja. Energijski prijelazi i razine prikazani su na dijagramu Jablonskog, Slika 4.



Slika 4. Dijagram Jablonski (preuzeto i prilagođeno iz literaturnog izvora²³)

Kada molekula emitira zračenje pri prijelazu između stanja istog multipliciteta, taj proces se naziva fluorescencijom. Fluorescencija se javlja samo pri određenoj valnoj duljini, obično iz prvog pobuđenog elektronskog stanja, što fluorescencijsku spektroskopiju čini selektivnom metodom. Intenzitet fluorescencije ovisi o koncentraciji, duljini svjetlosnog puta,

strukturnim obilježjima analita, lokalnom okruženju fluorofora te intenzitetu pobudnog zračenja. Budući da je selektivna, fluorescencijska spektroskopija je i vrlo osjetljiva metoda koja omogućuje detekciju analita pri niskim koncentracijama (10^{-8} mol L⁻¹).

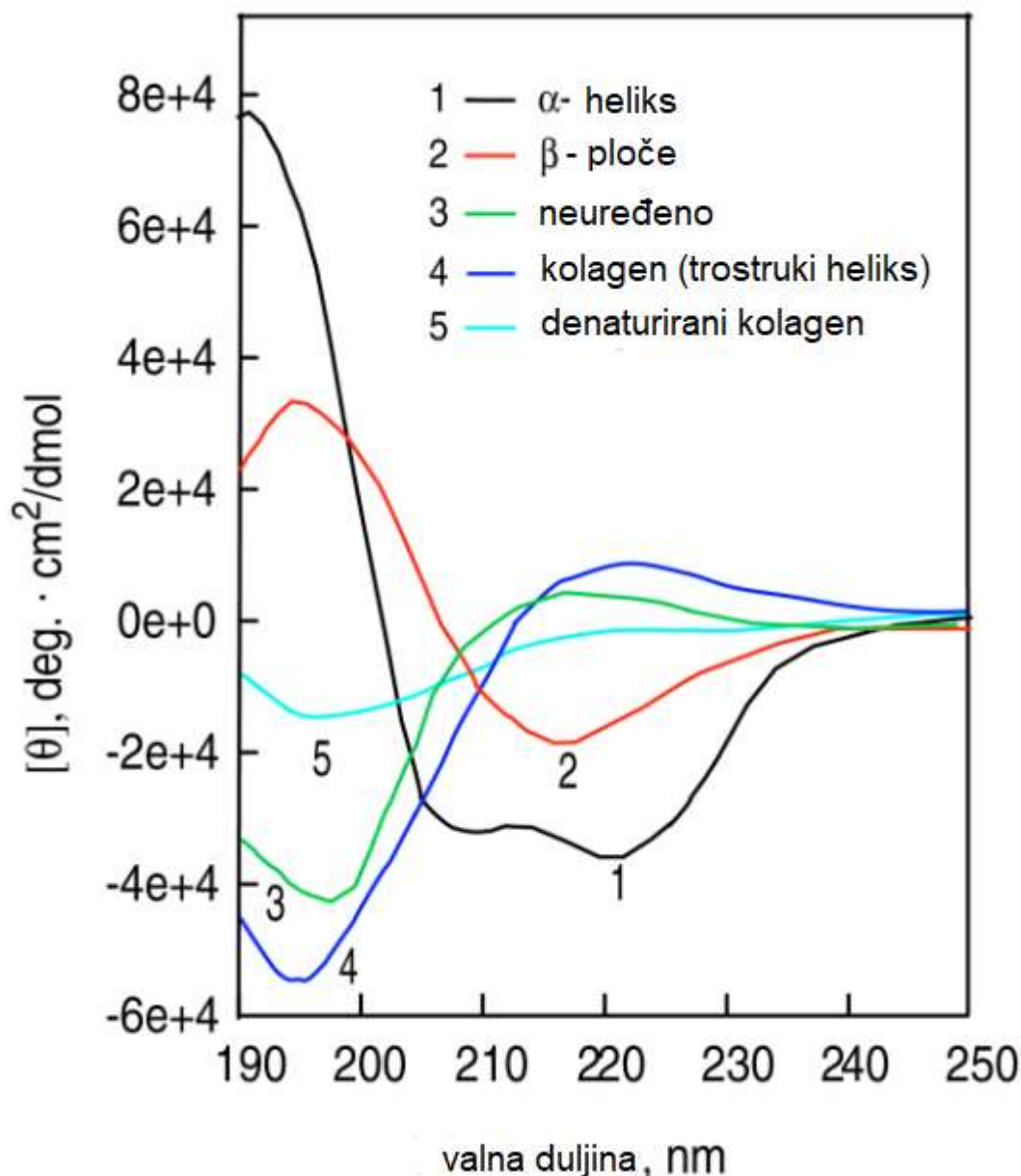
Spektrofluorimetri omogućavaju snimanje fluorescencijskih pobudnih i emisijskih spektara, a obično sadrže dva monokromatora. Uzorak emitira zračenje u svim smjerovima, a ono koje emitira pod pravim kutem razlaže se sekundarnim monokromatorom te detektira fotomultiplikatorom. Kako bi se smanjile fluktuacije snage zračenja izvora, često se koriste dvosnopni spektrofluorimetri gdje se snaga referentnog zračenja prigušivačem smanjuje na vrijednost snage fluorescencijskog zračenja. Za mjerenje se koriste kivete od kvarca, stakla ili plastike, ovisno o valnim duljinama pobudnog i emitiranog zračenja.²³

2.3.3. Cirkularni dikroizam

Spektroskopija cirkularnog dikroizma (CD) kiralna je varijanta apsorpcijske spektroskopije. Za razliku od osnovnih nekiralnih spektroskopija koje koriste nepolarizirano elektromagnetsko zračenje, CD spektroskopija značajno proširuje informacije dobivene konvencionalnim spektroskopskim tehnikama uvođenjem primjenjivosti na kiralan uzorak.

Kiralne molekule su one molekule koje apsorbiraju lijevo i desno cirkularno polarizirano svjetlo različitim intenzitetima. CD spektroskopija upravo mjeri razliku između apsorpcija za lijevo i desno cirkularno polarizirano svjetlo. Međutim, CD signal je 3 do 5 redova veličine slabiji od apsorpcijskog signala u osnovnoj apsorpciji. Iz tog razloga, CD spektri ne mogu se dobiti izravno mjerenjem dva spektra naizmjenice lijevom i desnom cirkularnom polarizacijom upadnog svjetla i samo uzimanjem njihove razlike, već su potrebni specijalizirani instrumenti. Do sada su komercijalno dostupni CD instrumenti samo za dvije spektralne regije, ultraljubičasto-vidljivi (UV/VIS) i infracrveni (IR). CD izmjeren u UV/VIS području naziva se elektronski CD jer su uključeni samo elektronski prijelazi, dok se CD izmjeren u IR području naziva vibracijski CD jer se odnosi na vibracijske tranzicije. Prednosti i nedostaci specifični za osnovne spektroskopije također vrijede i za CD spektroskopiju.²⁴

S obzirom da su sve aminokiseline osim glicina kiralne, CD je vrlo korisna metoda pri određivanju sekundarne strukture proteina. U CD spektru proteina izoliranog iz soje može se uočiti pozitivan pik na otprilike 195 nm koji označava prisutnost β -ploče te negativan pik na 208 nm koji označava prisutnost α -zavojnice (slika 5.).



Slika 5. CD spektri sekundarnih struktura proteina²⁵(preuzeto i prilagođeno iz literaturnog izvora²⁶).

U kontekstu nukleinskih kiselina, CD spektroskopija također se koristi za proučavanje njihove strukture, uključujući uzvojnice DNA i RNA. DNA ima pozitivan pik na oko 275 nm i negativan pik na oko 245 nm, dok RNA može pokazivati različite karakteristične signale ovisno o konformaciji. CD spektroskopija također je korisna u proučavanju interakcija protein-DNA i

protein-RNA, što je važno za razumijevanje bioloških procesa poput transkripcije, translacije i regulacije gena.²⁶

2.3.4. Elektroforeza

Elektroforeza označava gibanje čestica kroz otapalo pod utjecajem električnog polja. S obzirom da je većina bioloških makromolekula nabijena, one će se gibati u električnom polju. Makromolekule se mogu okarakterizirati pomoću svoje brzine kretanja u električnom polju, odnosno može im se odrediti molekulska masa, detektirati promjena nabijenog u nenabijeni aminokiselinski ostatak ili obrnuto te se mogu čak i kvantitativno odijeliti različite makromolekule. Ako se čestica s nabojem q nalazi u izolacijskom mediju pod električnim poljem jakosti E , ona će se kretati stalnom brzinom v , gdje postoji ravnoteža između električne sile Eq i sile trenja fv :

$$Eq = fv \quad (4)$$

Koeficijent trenja f određuje otpor koji otopina pruža kretanju nabijene molekule i ovisi o njezinom obliku, veličini, solvataciji te viskoznosti otopine.

Elektrostatska pokretljivost nabijene molekule μ definirana je kao brzina pod utjecajem jediničnog polja, kao što je opisano u jednadžbi:

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{q}{f} \quad (5)$$

Iako pokretljivost ovisi o koeficijentu trenja koji je povezan s fizičkim svojstvima molekule, vrijednost μ u praksi često ne pruža potpune informacije o veličini i obliku molekule zbog složenih interakcija u elektrolitu koji sadrži ione. Nabijena čestica u elektrolitu privlači male ione okružujući se istima, s ciljem zaštite od vanjskog električnog polja. Međutim, taj sloj iona djelomično se razara djelovanjem polja i kretanjem čestice kroz medij.

Vrsta elektroforeze koja se najčešće koristi je elektroforeza na gelu. Gel ima ulogu potpornog medija kako bi se smanjila mehanička oštećenja uzrokovana promjenom temperature i velikim gustoćama makromolekula. Na gel, odnosno želatinozni medij, nanosi se mala količina uzorka, zatim, primjenom električnog polja, molekule putuju kroz gel ili po njegovoj površini. Danas se primjenjuju gelovi od škroba, poliakrilamida, agaroze i agaroze/poliakrilamida. U ovom istraživanju koristit će se dvije vrste elektroforeze, elektroforeza na SDS-poliakrilamidnom gelu te elektroforeza na agaroznom gelu.

Elektroforeza na SDS-poliakrilamidnom gelu se temelji na činjenici da svi proteini koji se odvajaju imaju jednak oblik te jednak omjer mase i naboja. Razlog tome je što poliakrilamidni gel sadrži površinski aktivnu tvar natrijev dodecilsulfat (SDS), a količina vezanog SDS-a po jedinici mase proteina je konstantna. Naboj kompleksa protein-SDS ovisi isključivo o naboju SDS-a s obzirom da on prekriva naboj bočnih ogranaka proteina. Važno je napomenuti da usporedna pokretljivost različitih polipeptida ovisi isključivo o njihovoj molekularnoj masi. Kada se niz proteina poznate molekularne mase podvrgne elektroforezi u SDS-poliakrilamidnom gelu, može se konstruirati graf prijedene udaljenosti u odnosu na logaritam molekularne mase koji imaju linearnu ovisnost. Na ovaj način, ako se protein čija je molekularna masa nepoznata podvrgne elektroforezi zajedno s dvama proteina poznate molekularne mase, moguće je procijeniti njegovu molekularnu masu s točnošću od 5-10%.

Pri određivanju većih molekula, poput oligonukleotida, DNA i RNA potreban je gel s velikim porama. U tu svrhu se koriste agarozni gelovi. Agaroz je polimer linearnog oblika koji se sastoji od ostataka D-galaktoze i 3,6-anhidro-L-galaktoze. Za pripremu gela, čvrsta agaroz otapa se u puferu i zagrijava do vrenja. Kada se polimerne molekule ohlade, one tvore vodikove veze što rezultira formiranjem gela. Stoga je proces stvaranja gela reverzibilan kod agaroze, gel koji nastane može se ponovno otopiti zagrijavanjem. Kontrola veličine pora, koja određuje raspon molekularnih masa koje se mogu uspješno odijeliti, postiže se promjenom koncentracije agaroze u gelu. U elektroforezi na agaroznom gelu učinak molekularnog sita je ključan čimbenik jer je omjer mase i naboja gotovo jednak za sve oligonukleotide. Dakle, manje molekule se gibaju brže od većih.²⁷ Za razliku od poliakrilamidnog gela koji je najčešće u kadici za elektroforezu smješten u vertikalnom položaju, agarozni gel se uglavnom smješta horizontalno prilikom provedbe elektroforeze.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali i reakcije sinteze

U Tablici 1. navedene su kemikalije korištene u istraživanju, njihova molarna masa, čistoća te proizvođač.

Tablica 1. Popis kemikalija korištenih u istraživanju.

KEMIKALIJA	MOLARNA MASA / g mol ⁻¹	ČISTOĆA	PROIZVOĐAČ
Natrijev klorid	58,44	p.a.	Kemika
Kalijev klorid	74,55	p.a.	Kemika
Natrijev hidrogenfosfat	141,96	p.a.	Fluka
Kalijev dihidrogenfosfat	136,09	p.a.	Fluka
Dibenzociklooktin-N- hidroksisukcinilimidil (DBCO-NHS)	402,40		Lumiprobe
Dimetil-sulfoksid (DMSO)	78,13	p.a.	Kemika
Trisaminometan (Tris)	121,14	p.a.	Sigma – aldrich
Klorovodična kiselina (HCl)	36,46		Kemika
Natrijev hidrogenkarbonat	84,01	p.a.	Fluka
Bakrov sulfat	159,61	p.a.	Kemika
Imidazol-1-sulfonil- azid-hidroklorid (ISA- HCl)	209,62		

Metanol	32,04	p.a.	
Indolicidin	1906,28		Genscript
Anoplin	1153,5		Genscript
Akrilamid	71,08		Bio - Rad
Natrijev dodecilsulfat (SDS)	288,38	p.a.	Kemika
Amonijev persulfat	228,18	p.a.	
Tetrametiletilendiamin	116,21	p.a.	Bio-Rad
Marker Precision Plus Protein Dual Xtra			Bio - Rad
Izopropanol	60,01	p.a.	
Boja Coumassie blue			Bio - Rad
Octena kiselina	60,05		
Agaroz	74,56		
Tris-acetatni pufer (TAE)	473,43		
Marker Wide-Range DNA Ladder			Bio - Rad

3.1.1. DBCO-modifikacija peptida

Otapanjem 0,8 g natrijevog klorida, 0,02 g kalijevog klorida, 0,144 g natrijevog hidrogenfosfata i 0,024 g kalijevog dihidrogenfosfata u 100 mL klorovodične kiseline masenog udjela 20% dobiva se PBS pufer kojemu pH iznosi 7,4. Peptidi, indolicidin i anoplin, otope se u 100 mmol/dm³ PBS pufera. Prije upotrebe, ester dibenzociklooktin-N-hidroksisukcinimidil (dalje DBCO-NHS), otopi se u 5 mmol/dm³ dimetil-sulfoksida (DMSO). Otopina će se koristiti za modifikaciju peptida. Dvadeset ekvivalenata estera DBCO-NHS doda se u 60 µL uzorka peptida, koncentracije 1 mmol/dm³. Reakcija se inkubira na sobnoj temperaturi 1,5 sat uz protresanje. Za to vrijeme pripravi se tris(hidroksimetil)aminometan pufer (Tris-HCl) otapanjem 12,11 g Tris-a u 20 mL 20%-tne klorovodične kiseline i 80 mL destilirane vode, pH tako dobivene otopine iznosi 8. Tris-HCl pufer koristi se za gašenje navedene reakcije. U otopinu peptida dodaje se Tris-HCl do konačne koncentracije Tris-a od 75 mmol/dm³ tijekom

pet minuta. Konačna otopina postavi se na dijalizu preko membrane s *cut-off* veličinom pora 1 kDa i ostavi se stajati 2 dana kako bi se uklonili nereagirani reagensi.

3.1.2. Priprava oligonukleotida s azidnom skupinom

U ovom istraživanju korišteno je šest oligonukleotida proizvođača Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, SAD s navedenim nukleotidnim sljedovima:

Oligonukleotid 1 (P1):

(50%)5' AGCGAACGTGGATTTTGTCCGACATCGGCAAGCTCCCTTTTTCGACTATT3'
;(C6Amin)

Oligonukleotid 2 (P2):

(50%)5' CCGATGTCGGACTTTTACACGATCTTCGCCTGCTGGGTTTTGGGAGCTTG3'
;(C6Amin)

Oligonukleotid 3 (P3):

(50%)5' CGAAGATCGTGTTTTTCCACAGTTGATTGCCCTTCACTTTTCCCAGCAGG3'
;(C6Amin)

Oligonukleotid 4 (P4):

(50%)5' AATCAACTGTGGTTTTTCTCACTGGTGATTAGAATGCTTTTGTGAAGGGC3'
;(C6Amin)

Oligonukleotid 5 (P5):

(50%)5' TCACCAGTGAGATTTTTGTCGTACCAGGTGCATGGATTTTGCATTCTAA3'
;(C6Amin)

Oligonukleotid 6 (P6):

(50%)5' CCTGGTACGACATTTTTCCACGTTTCGCTAATAGTCGATTTTATCCATGCA3'
;(C6Amin).

Sljedećim postupkom se na 3' kraju oligonukleotida koji je izmijenjen vezanjem $C_6H_{13}NH_2$ provodi transfer azida. Pufer natrijevog hidrogenkarbonata ($NaHCO_3$ pufer) pripremi se otapanjem natrijevog hidrogenkarbonata u otapalu koji se sastoji od 37,5 mL vode i 12,5 mL metanola. pH pufera iznosi 8,5, a koncentracija je 50 mmol/dm^3 . 140 μL svakog oligonukleotida se odvojeno otopi u 260 μL $NaHCO_3$ pufera te se doda 4 μL 100 mmol/dm^3 otopine bakrovog sulfata. Reagens otopina imidazol-1-sulfonil-azid-hidroklorida (ISA-HCl) pripremi se otapanjem 25 mg ISA-HCl u 1 mL otopine metanola masenog udjela 50% te se

doda otopini oligonukleotida. Reakcijska smjesa zagrijava se 3 sata na 60 °C nakon čega se otopina stavi na dijalizu preko noći uz PBS pufer (pH = 7,4) preko membrane *cut-off* veličine pora 3 kDa.

3.1.3. Klik reakcija

U 50 µL otopine DBCO-modificiranog peptida indolicidina ($c = 0,126 \text{ mmol/dm}^3$) i anoplina ($c = 0,0157 \text{ mmol/dm}^3$) doda se 7,9 µL odgovarajućeg oligonukleotida s azidnom skupinom P1-P6 ($c = 0,8 \text{ mmol/dm}^3$). Otopina je inkubirana u smjesi PBS pufera i 5 mmol/dm^3 etilendiamintetraoctene kiseline, 19 sat na sobnoj temperaturi. Pripravljene su konjugati anoplin-P1, anoplin-P2, anoplin-P3, anoplin-P4, anoplin-P5, anoplin-P6, indolicidin-P1, indolicidin-P2, indolicidin-P3, indolicidin-P4, indolicidin-P5, indolicidin-P6, konjugat kompleksa P1-P6 i indolicidina te konjugat kompleksa P1-P6 i anoplina.

3.2. UV/Vis spektroskopija

UV/Vis spektri spojeva dobiveni su korištenjem Cary 100 UV-Vis spektrofotometra i programa Cary WinUV, modul Scan, u kvarcnoj kivetu s optičkim putem 1,00 cm. Spektri za peptid indolicidin snimani su u rasponu valnih duljina od 250 do 450 nm s maksimumom apsorpcije na 280 nm. Sva mjerenja izvedena su pri temperaturi od 25 °C i pH=7, pri brzini snimanja od 600 nm/min, s korekcijom bazne linije.

Prvo je u kivetu dodano 1 mL PBS pufera te je snimljena bazna linija, koju se dalje programski oduzima od dobivenih spektara. Potom je u pufer dodano 10 µL otopine spoja ($c = 1 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$), čime je konačna koncentracija spoja u otopini iznosila $9,9 \times 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$. Postupak dodavanja 10 µL indolicidina ponovio se još 7 puta, čime je ukupan volumen indolicidina iznosio 80 µL, a koncentracija spoja bila je $9,259 \times 10^{-4} \text{ mol/dm}^3$.

Osim UV-VIS spektrofotometra, za određivanje koncentracije spojeva na temelju apsorbanije koristio se i spektrofotometar *NanoDrop ND-1000* tvrtke *Thermo Scientific*. On omogućuje precizne analize uzoraka malog volumena (1-2 µl). Patentirani sustav zadržavanja uzorka eliminira potrebu za kivetama i kapilarama što skraćuje vrijeme mjerenja. Osim toga, veliki dinamički raspon mjernog područja eliminira potrebu za razrjeđivanjem. Spojen je s računalom na kojem se očitavaju vrijednosti koncentracija uzoraka. Uređaj funkcionira tako da

se na mjernu površinu uređaja stavi 1-2 μL otopine čija se koncentracija određuje te se zatim poklopi dijelom uređaja na kojem se nalazi optičko zrcalo. Ispod mjerne površine se nalazi izvor zračenja i detektor (fotomultiplikator). Zraka iz izvora prolazi kroz optički kabel, optičku rešetku, otvor, kap uzorka te se nakon odbijanja od zrcala vraća na detektor. Mjerna površina je pomična pa se provodi kalibracija promjenom duljine puta zračenja. Kada završi mjerenje, mjesto nanošenja uzorka se ispere vodom i obriše komadićem celulozne vate.

3.3. Fluorescencijska spektroskopija

Spektri fluorescencijske emisije spojeva zabilježeni su koristeći Agilent Cary Eclipse Fluorescencijski spektrofotometar unutar programskog paketa Cary Eclipse, koristeći modul Scan, s kivetom koja ima optički put od 1 cm. Spektri su snimani samo za peptid indolicidin (jer je bogat aromatskim aminokiselinama triptofana) u rasponu valnih duljina od 350 do 750 nm s valnom duljinom pobude na 280 nm. Valna duljina maksimalne apsorpcije iznosila je 358 nm. Širina pobudne i emisijske pukotine za oba spoja iznosila je 10 nm. Sva mjerenja provedena su pri temperaturi od 25 °C i pH=7. Emisija indolicidina praćena je od 300 do 450 nm.

U fluorimetrijsku kivetu dodano je 3 μL indolicidina u 3 mL vode s konačnom koncentracijom indolicidina od $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol/dm}^3$. Dobiveni podaci obrađeni su u programu Origin 7.

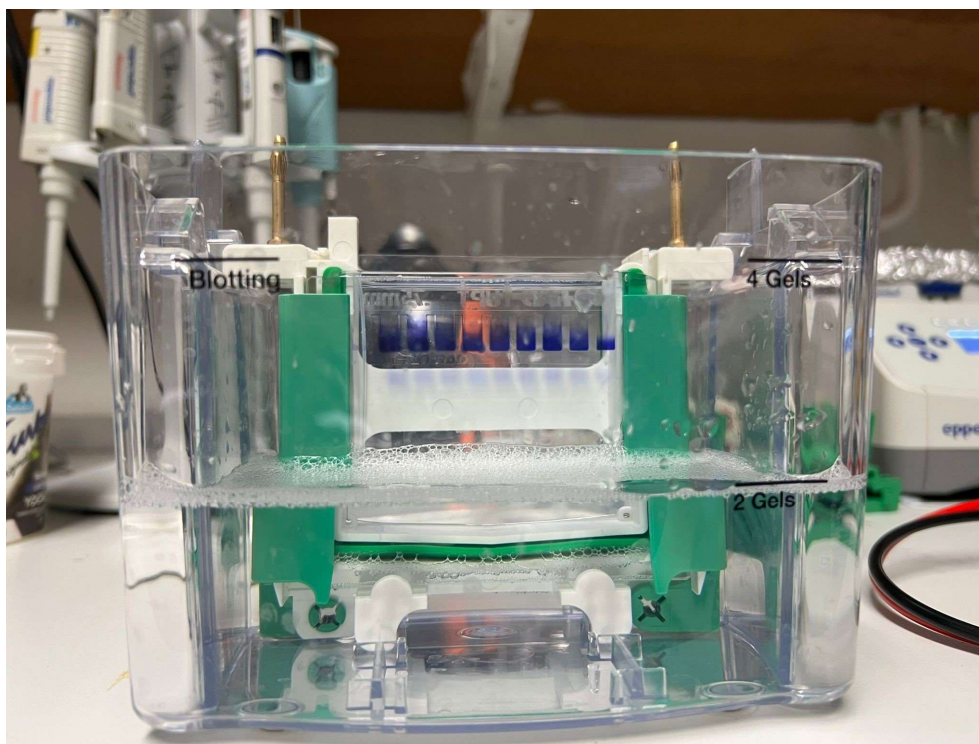
3.4. CD spektroskopija

CD spektri spoja zabilježeni su koristeći spektrometar Jasco J-815 CD, upravljani programom Spectra Manager, modulom Spectrum Measurement, u kiveti optičkog puta 0.01 cm. Konačni spektar predstavlja prosjek od dva snimanja. Sva mjerenja izvedena su na temperaturi od 25 °C i pH=7, pri brzini snimanja od 200 nm/min.

Snimani su spektri peptida anoplina i indolicidna. Indolicidin je otopljen u DMSO puferu koji apsorbira zračenje u području CD signala indolicidina, stoga se za navedeni peptid nije mogao dobiti ispravan spektar. Kada je sniman spektar anoplina, u kivetu je dodano 2 mL kakodilatnog pufera te je snimljena bazna linija. Bazna linija je naknadno oduzeta od svakog snimljenog spektra. Puferu je dodan alikvot vodene otopine anoplina, tako da je konačna koncentracija anoplina u otopini iznosila $0,05 \text{ mol/dm}^3$. Dobiveni podaci obrađeni su u programu Origin 7.

3.5. Elektroforeza na SDS-poliakrilamidnom gelu

SDS-PAGE elektroforezom prati se uspješnost reakcija sinteze. Koristi se aparatura za vertikalnu elektroforezu *Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad™)* prikazan na slici 6. Kako bi se provela elektroforeza na SDS-poliakrilamidnom gelu, prvo je potrebno pripremiti gel za sabijanje uzoraka pa nakon njega i gel za razdvajanje. Izradi se gel ukupnog volumena 15 mL tako da se pomiješa 3,4 mL destilirane vode, 7,5 mL 30%-tnog akrilamida, 3,8 mL Tris pufera ($c = 1,5 \text{ mol/dm}^3$, $\text{pH} = 0,8$), 0,15 mL 10%-tnog SDS-a, 0,15 mL 10%-tnog amonijevog persulfata te 0,006 mL tetrametiletilendiamina. Pripremljeni gel ulijeva se pipetom, izravna se pomoću izopropanola te se u njega se stavi češalj za jažice i ostavi 30 minuta da se formira gel. Nakon što se gel učvrstio ukloni se češalj iz jažica te je spreman za korištenje. Za pripremu uzoraka, 10 μL analita (koncentracije 1 mmol/dm^3) se stavi u tubu eppendorf i pomiješa s 3,3 μL pufera Tris-HCl ($c = 0,2 \text{ mol/dm}^3$, $\text{pH} = 6,7$). Plava boja pufera omogućuje praćenje tijekom elektroforeze. Uzorci se kuhaju 15 minuta na $95 \text{ }^\circ\text{C}$. Nakon kuhanja, uzorci se centrifugiraju 7-8 sekundi brzinom od 5000 rpm. Prije stavljanja uzoraka u jažice, unutarnji prostor kadice za elektroforezu mora biti do vrha napunjen puferom s dodatkom natrijevog dodecil sulfata (SDS). U prvu jažicu stavi se 3 μL proteinske ljestvice (*Precision Plus Protein Dual Xtra*), a ostale jažice pune se redom uzorcima, tako da se u svaku jažicu pipetom stavi 10 μL prethodno pripremljenog uzorka. Napon se podesi na početku na 120 V, kasnije se poveća na 180 V, a sam proces traje oko 60 minuta nakon čega se uređaj isključuje. Gel se izvadi iz nosača, nakon čega slijedi bojanje. Otopina s bojom priprema se otapanjem 1 tablete Coumassie blue boje (CBB) ($\gamma = 3 \text{ g/L}$) u 120 mL etanola i 80 mL vode. Gel se stavi u posudu u kojoj se nalazi CBB otopina. U posudi treba biti dovoljno CBB otopine da prekrije gel. Uzorak stoji u posudi s bojom 24h. Nakon odlijevanja CBB otopine, na gel se stavlja pufer za odbojavanje (ispiranje suviška boje). Pufer za odbojavanje priprema se miješanjem 100 mL konc. octene kiseline, 100 mL izopropanola i 800 mL destilirane vode. Uzorak tako stoji 24h, odnosno dok gel ne postaje bezbojan, a ostanu samo plavom bojom označene mrlje gdje ima proteina.



Slika 6. Aparatura za vertikalnu elektroforezu *Mini-PROTEAN Tetra* (Bio-Rad™)

3.6. Elektroforeza na agaroznom gelu

Gel se priprema otapanjem 0,5 g agaroze u 50 mL 1 x Tris-acetatnog pufera (TAE) čime je dobiven 1%-tni agarozni gel. Korišteni pufer prethodno je pripremljen te mu je sastav dan u Tablici 3. S obzirom da agaroz nije topiva u puferu, otopina se zagrijava do vrenja u mikrovalnoj pećnici tako da se otvor tikvice u kojem se nalazi otopina poklopi petrijevom zdjelicom kako otopina ne bi značajnije izgubila na volumenu. Otopina se ohladi na približno 40 °C. Nakon hlađenja, otopina se ulije u kadicu za elektroforezu koja je formirana tako da oblikuje gel u željenom obliku. U kadicu s gelom stavi se češalj za jažice te se ostavi stajati 30 minuta, odnosno dok gel ne očvrсне (dok ne polimerizira). Nakon toga ukloni se češalj iz jažica te se agarozni gel s kadicom stavi u uređaj za elektroforezu. U uređaj se do oznake (tako da prekrije gel) ulije 50x TAE pufer koji se sastoji od Tris baze (2 mol/dm^3) octene kiseline (1 mol/dm^3) i 50 mM EDTA. Nakon toga se pripreme uzorci, tako da se 5 μL uzorka unaprijed određene koncentracije pomiješa s 1 μL pufera za bojanje. U prvu jažicu unosi se 3 μL Wide-Range DNA Ladder markera, a u ostale 6 μL pojedinog uzorka. Nakon nanošenja uzoraka, uređaj se spoji na protok struje Bio-Rad pri 130 V, u trajanju od 60 do 180 min (ovisno o

uzorcima). Jažice s uzorcima su na strani anode kako bi se negativno nabijene molekule gibale prema katodi. Pojavom mjehurića u puferskoj otopini, može se provjeriti da li je elektroforeza krenula. Pri završetku elektroforeze, isključi se izvor struje te se gel oprezno izvadi iz kadice te stavi u posudu u kojoj će se detektirati. Gel se oboja s nekoliko kapi etidij-bromida, ostavi se stajati 20 minuta, nakon čega slijedi detekcija. Detekcija se odvija u digitalnom uređaju za snimanje koji ima ugrađenu kameru. Etidij-bromid je interkalator, veže se s visokim afinitetom između parova baza DNA, a daje fluorescentni odgovor pod utjecajem UV zračenja, gel se slika pod UV svjetlom. Pojava emisije u gelu označava prisutnost DNA odnosno etidij-bromida vezanog na DNA molekule.

Tablica 2. Sastav pripremljenog pufera za pripremu agarozne gel-elektroforeze

Komponenta	$c / \text{mmol dm}^{-3}$
Tris	40
octena kiselina	20
EDTA	1

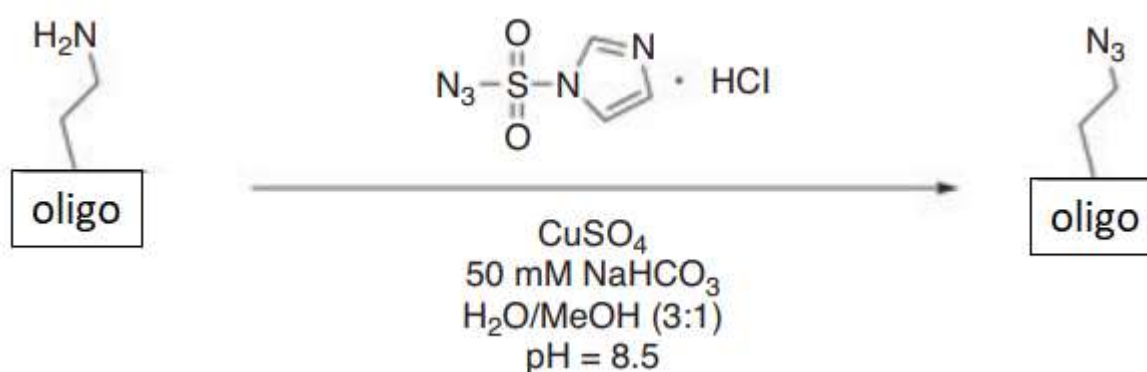
3.7. Biološka ispitivanja

Kako bi se provelo mikrobiološko ispitivanje, odnosno mjerenje zone inhibicije, prvo je potrebno u petrijevu zdjelicu uliti Luria Broth (LB, 10 g triptona, 5 g of kvašćevog ekstrakta, 10 g NaCl, u 1 L destilirane vode, pH 7,0 podešava se 1 M NaOH) tekući medij s dodatkom agaroze. Važno je napomenuti da se cijeli postupak provodi u steriliziranom digestoru kako ne bi došlo do kontaminacije. Pojedini pribor koji se upotrebljava sterilizira se alkoholom a zatim zagrijavanjem na šuštećem plamenu. Pipetom se 50 mL suspenzije prethodno uzgojene bakterije *E. Coli* nanese na prethodno pripremljeni medij te se ravnomjerno raspodjeli. Na medij se stave sitno izrezani filter papir na koji se nanese uzorci. Uzorci se ostave stajati 24 sata na 37 °C. Oko filter papirića na kojima je antibakterijski aktivan uzorak stvara se zona inhibicije rasta bakterija, dok je ostatak petrijeve zdjelice prekriven tankim slojem bakterijske kulture.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Sinteza spojeva

U ovom istraživanju sintetizirani su konjugati peptida, indolicidina i anoplina, te određenih oligonukleotida (sekvence navedene u 3.1.2.). Prvi korak u sintezi je modifikacija oligonukleotida. Amino skupina na oligonukleotidu ($-\text{CH}_2\text{NH}_2$) se pomoću reagensa prikazanih na slici 7. prevodi u azidnu ($-\text{N}_3$) skupinu.



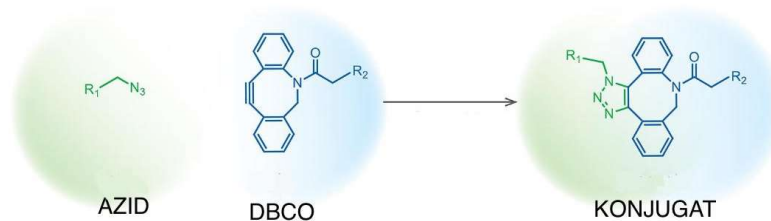
Slika 7. Priprema azid-oligonukleotida

Navedena reakcija odvija se neposredno prije klik reakcije zbog izrazite reaktivnosti azidne skupine. Terminalna azidna skupina omogućuje odvijanje klik reakcije s cikličkim alkinom dibenzociklooktinskog prstena (DBCO), bez upotrebe katalizatora. DBCO funkcijska skupina uvodi se na primarni amin peptida. Primarni amini nalaze se na N-kraju polipeptidnog lanca te su zbog svoje nukleofilnosti pogodni za konjugaciju s reaktivnim skupinama, u ovom slučaju s N-hidroksi-sukcinimidnim esterom (NHS) koji je dio bifunkcionalnog DBCO-NHS reagensa.

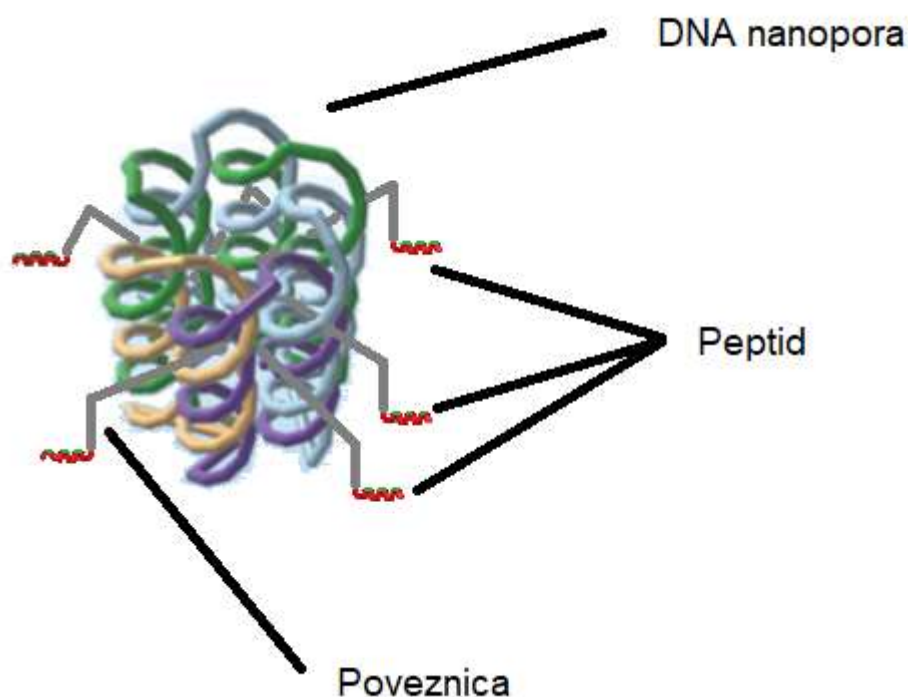


Slika 8. Nukleofilni napad $-\text{NH}_2$ skupine primarnog amina na DBCO-NHS reagens (preuzeto i prilagođeno iz literaturnog izvora²⁸)

Naposljetku se odvija klik reakcija u jednom koraku između azidom modificiranog oligonukleotida i DBCO skupine koja se nalazi na peptidu (Slika 9.). Oligonukleotidi se smotaju u nanoporu te se dobiva konačni produkt, ciljani konjugat, čija je struktura prikazana na slici 10.



Slika 9. Klik reakcija između azid i DBCO skupine (preuzeto i prilagođeno iz literaturnog izvora²⁹⁾)

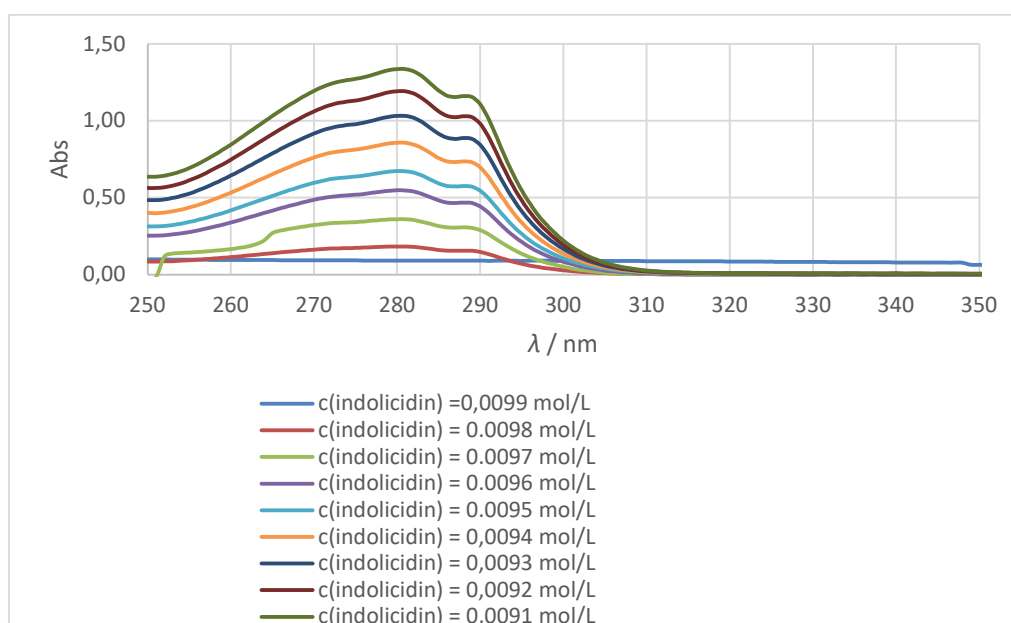


Slika 10. DNA nanopora funkcionalizirana peptidima

4.2. Spektroskopska karakterizacija spojeva

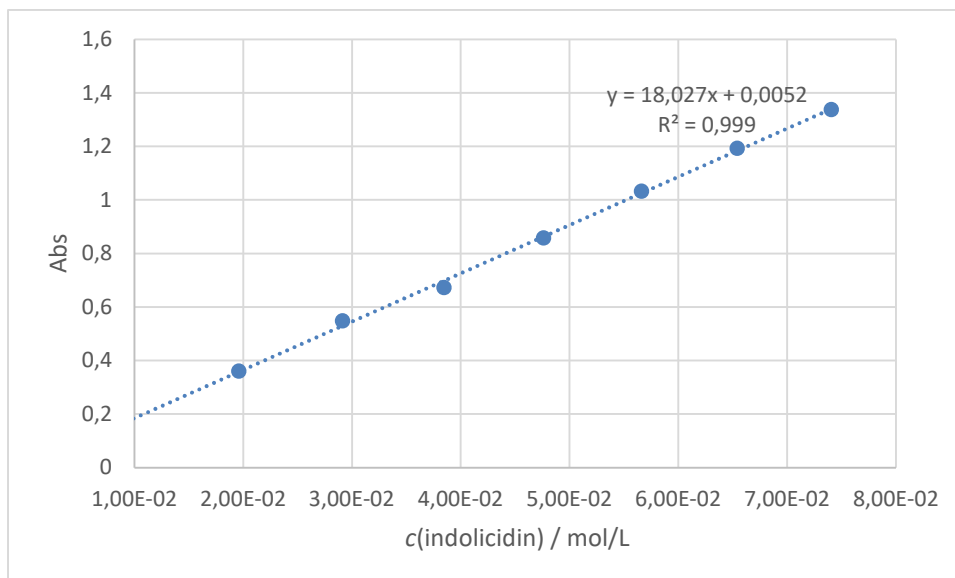
4.2.1. UV/VIS spektri

Pripremi se DMSO otopina indolicidina koncentracije 1 mol/dm^3 te se potom snimi UV/VIS spektar pri $\text{pH} = 7$. Uočeno je da se porastom koncentracije spoja povećava i vrijednost apsorpcije što je u skladu s Beer-Lambertovim zakonom. Na slici 11. prikazani su UV/VIS spektri pri različitim koncentracijama indolicidina kao ovisnost apsorpcije o valnoj duljini.



Slika 11. UV/VIS spektar indolicidina pri različitim koncentracijama spoja

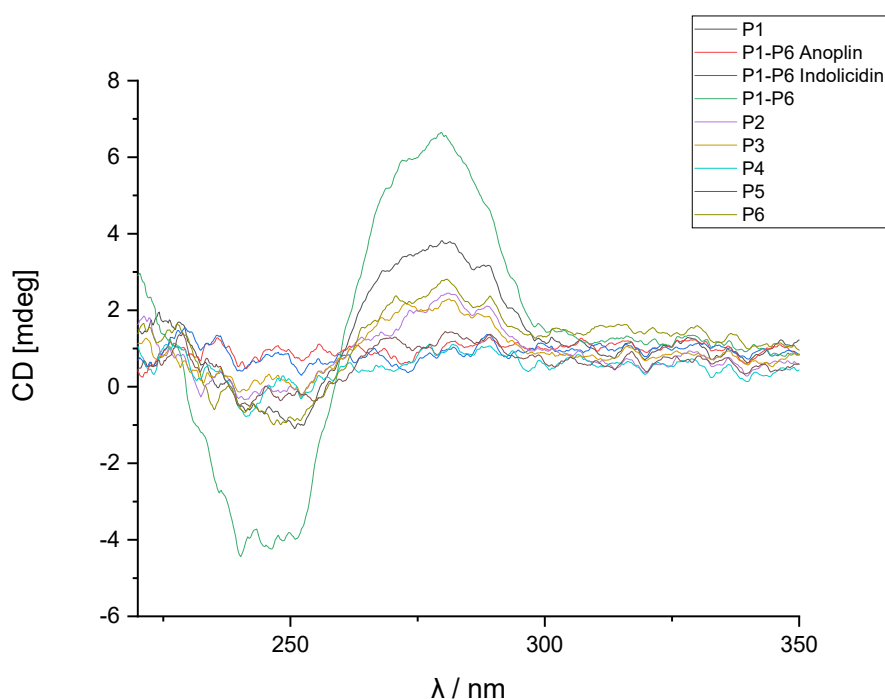
Slika 12. prikazuje kalibracijsku krivulju indolicidina pri različitim koncentracijama spoja te je provedena regresijska analiza. Pomoću kalibracijske krivulje, odnosno dobivene jednadžbe pravca, moguće je odrediti koncentraciju nepoznatog uzorka očitavanjem apsorpcije pri valnoj duljini maksimuma apsorpcije.



Slika 12. Kalibracijska krivulja indolicidina

4.2.2. CD spektri

CD metoda od velike je važnosti u praćenju sintetskog puta u ovom radu, s obzirom da se pomoću navedene metode mogu odrediti udjeli različitih sekundarnih motiva u kontekstu proteina te uočiti elemente uzvojnica kod nukleinskih kiselina. Pomoću CD-a prati se povezivanje oligonukleotida u nanoporu, kao i međusobno vezanje peptida i oligonukleotida.

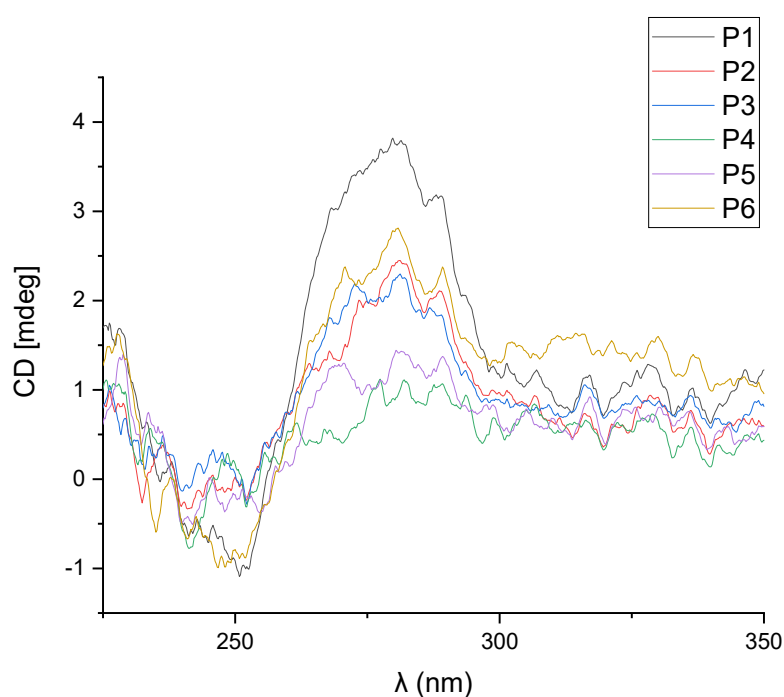


Slika 13. CD spektri pojedinačnih oligonukleotida, kompleksa oligonukleotida te konjugata oligonukleotida i peptida.

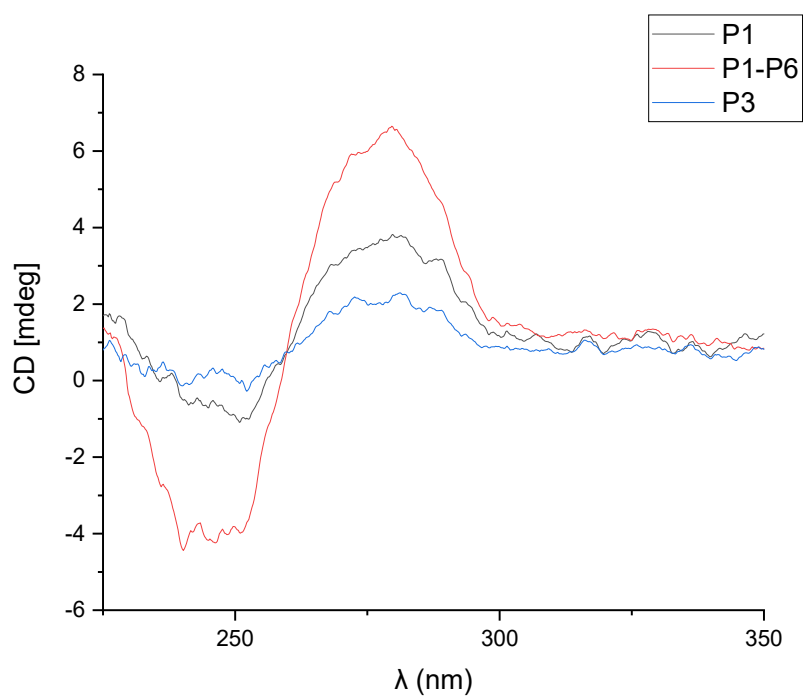
Na slici 13. prikazan je spektar oligonukleotida P1, P2, P3, P4, P5, P6, zatim kompleksa oligonukleotida P1-P6 te konjugata oligonukleotida P1-P6 i indolicidina/anoplina. Očekuju se jači signali kompleksa P1-P6 u usporedbi sa signalima pojedinačnih oligonukleotida. Također, intenzivniji signali očekuju se kod konjugata oligonukleotida i peptida zbog pretpostavke da su se konjugati smotali u nanoporu. Očekivani signal nije vidljiv, a razlog tome je pogreška u sintetskom putu.

Na slici 14. prikazani su spektri pojedinačnih oligonukleotida. Očekivano je da će oligonukleotidi pokazivati slične vrijednosti signala koji nemaju visoke vrijednosti. Može se uočiti da se oligonukleotid P1 ističe po jačini signala, odnosno daje veću vrijednost od očekivane a razlog tome može biti onečišćenje uzorka ili pogreška pri mjerenju. Slika 15. prikazuje usporedbu jačine signala pojedinačnih oligonukleotida P1 i P3 te kompleksa P1-P6. Kompleks P1-P6 zbog povezivanja oligonukleotida daje jači signal.

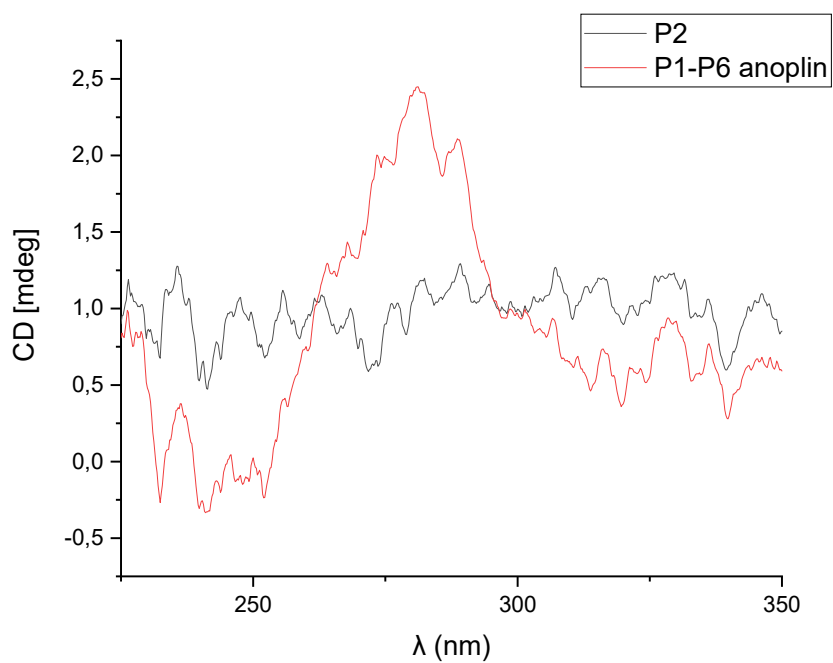
U konačnici, usporedbom oligonukleotida P2 te konjugata oligonukleotida i peptida anoplina na slici 16. vidljivo je da konjugat pokazuje jaču vrijednost signala od oligonukleotida P2 no očekivana vrijednost signala bi trebala biti veća.



Slika 14. CD spektri pojedinačnih oligonukleotida.



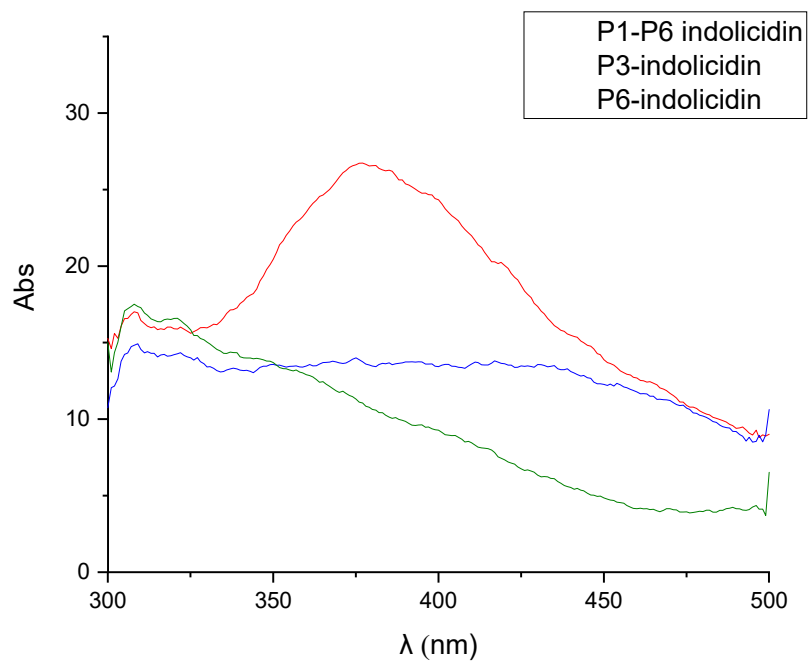
Slika 15. CD spektri oligonukleotida P1, P3 te kompleksa P1-P6.



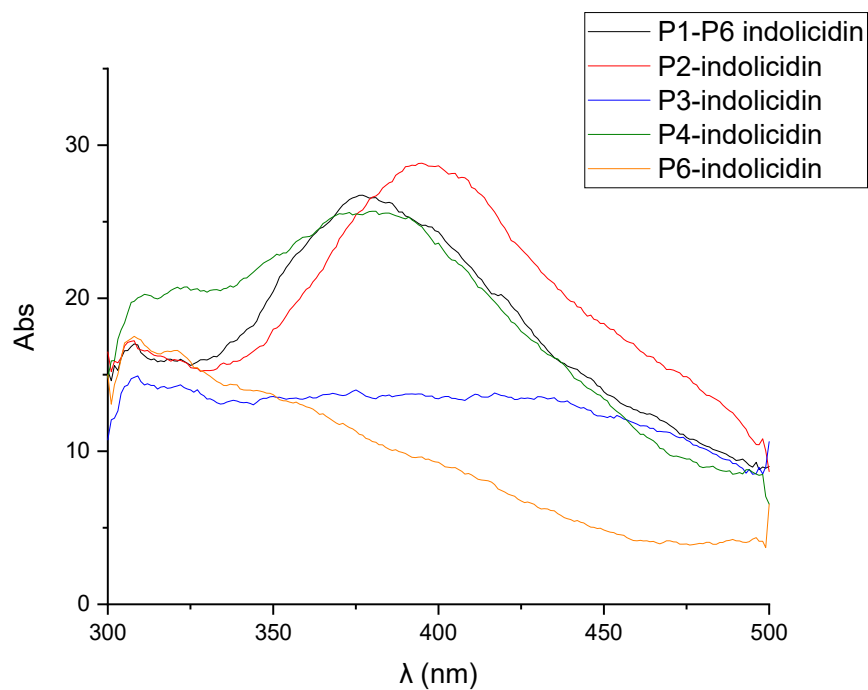
Slika 16. CD spektar oligonukleotida P2 te konjugata oligonukleotida i anoplin.

4.2.3. Spektri fluorescencijske emisije

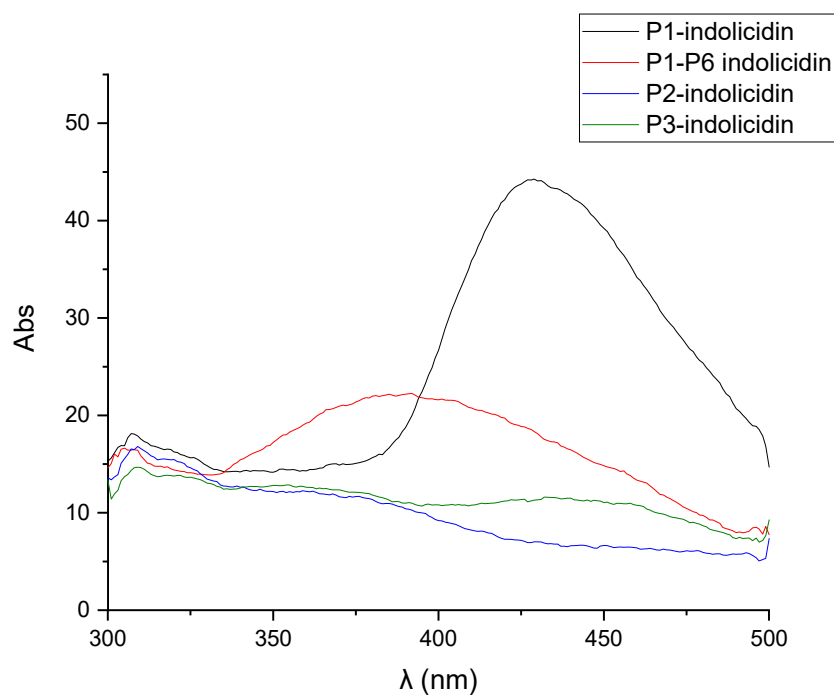
Zbog prisutnosti aromatske aminokiseline triptofana, indolicidin je pogodan peptid za proučavanje metodama fluorescencijske spektroskopije. Fluorescencija triptofana može se koristiti za praćenje interakcija između indolicidina i oligonukleotida. U fluorescencijskim spektrima mogu se očekivati promjene u položaju emisijskog maksimuma ili intenzitetu emisije. Vezanje indolicidina za oligonukleotide može uzrokovati konformacijske promjene koje utječu na fluorescenciju. Gašenje fluorescencije može se pojaviti kao rezultat snažnih interakcija između peptida i oligonukleotida. Suprotno tome, povećanje intenziteta fluorescencije može nastati ako kompleksiranje oligonukleotida sprječava gašenje izazvano molekulama u neposrednoj blizini fluorofora (triptofana). Na Slikama 17., 18. i 19. vidljivi su fluorescencijski spektri kompleksa oligonukleotida s indolicidinom. Ne uočava se značajan pomak emisijskog maksimuma triptofana (350 nm). Na slici 17. i slici 18. može se uočiti da kompleks P1-P6 s indolicidinom pokazuje najveći intenzitet fluorescencije u usporedbi s ostalim kompleksima (P2, P3, P4, P6-indolicidin), što sugerira da je triptofan u kompleksu P1-P6 s indolicidinom manje izložen gašenju. Ostali kompleksi imaju značajno smanjen intenzitet, što ukazuje na jače interakcije s okolinom koje dovode do gašenja fluorescencije. Primjerice, konjugat P6-indolicidin pokazuje najmanji intenzitet jer može imati konformaciju gdje je triptofan bliže bazama oligonukleotida ili u polarnijem okruženju, što uzrokuje veće gašenje. Na opisanim slikama konjugati pojedinačnih oligonukleotida s indolicidinom pokazuju slabiji intenzitet u odnosu na kompleks P1-P6 s indolicidinom. Na slici 19. može se uočiti jači intenzitet kompleksa P1-indolicidin u odnosu na kompleks P1-P6 s indolicidinom. P1-P6 kompleks s indolicidinom predstavlja kompleks s više različitih oligonukleotida, što može rezultirati jačim vezanjem ili kompleksiranjem, a time i većim gašenjem fluorescencije. Kombinacija više oligonukleotida može uzrokovati konformacijske promjene koje mogu dovesti do toga da triptofan bude sklon gašenju fluorescencije.



Slika 17. Fluorescencijski spektar kompleksa oligonukleotida i peptida.

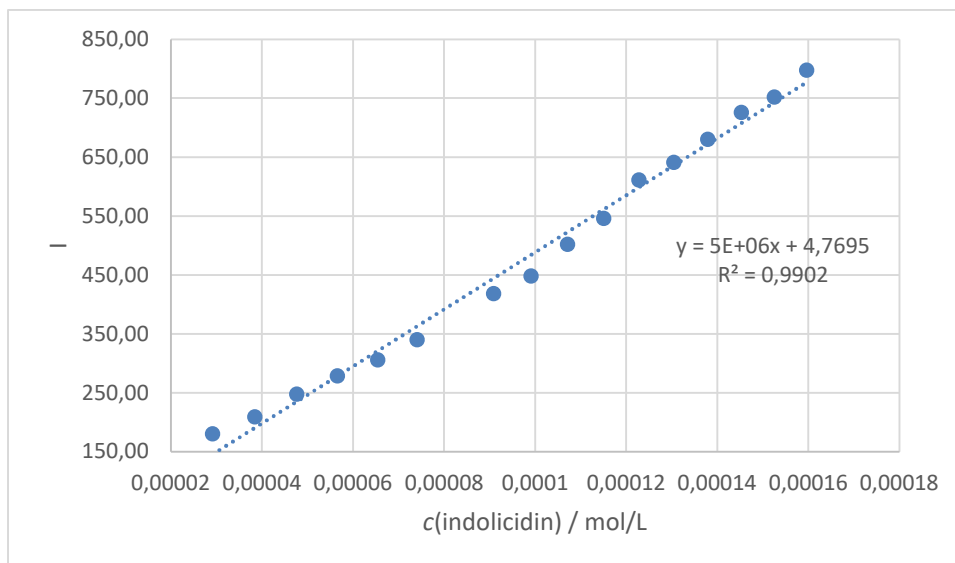


Slika 18. Fluorescencijski spektar kompleksa oligonukleotida i peptida.



Slika 19. Fluorescencijski spektar kompleksa oligonukleotida i peptida.

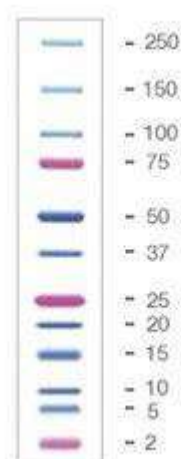
Slika 20. prikazuje kalibracijsku krivulju indolicidina pri različitim koncentracijama spoja te je provedena regresijska analiza. Pomoću kalibracijske krivulje, odnosno dobivene jednadžbe pravca, moguće je odrediti koncentraciju nepoznatog uzorka očitavanjem intenziteta fluorescencije pri valnoj duljini maksimuma emisije.



Slika 20. Kalibracijska krivulja indolicidina

4.3. Elektroforeza

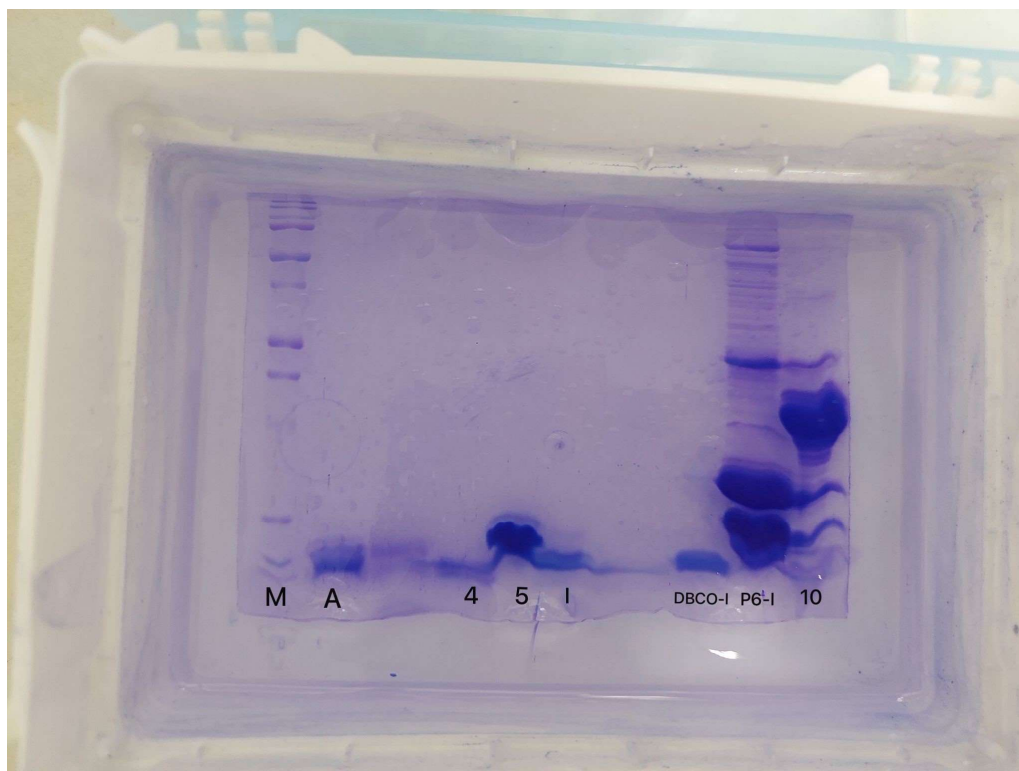
4.3.1. SDS-PAGE elektroforeza



Slika 21. Markeri molekularnih masa *Precision Plus Protein Dual Xtra, Unstained* na gradijentnom gelu s 4 do 20 % poliakrilamida

Tablica 3. Uzorci za pročišćavanje elektroforezom na poliakrilamidnom gelu u prisutnosti SDS-a te broj njihove jažice na gelu

UZORAK	KRATICA	BROJ JAŽICE
Marker molekularnih masa	M	1
Anoplin ($c = 1 \text{ mmol/dm}^3$)	A	2
Nepoznati uzorak	4	4
Nepoznati uzorak	5	5
Indolicidin ($c = 1 \text{ mmol/dm}^3$)	I	6
DBCO-modificirani indolicidin	DBCO-I	8
Indolicidin vezan za P6 oligonukleotid	P6-I	9
Nepoznati uzorak	10	10

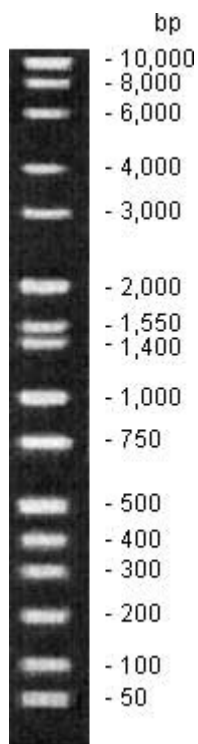


Slika 22. Gel dobiven SDS-PAGE elektroforezom

Gel kojim se prati uspješnost kemijskih reakcija prikazan je na slici 22. U prvoj se jažici nalaze markeri molekularnih masa zadanih na slici. U drugoj jažici nalazi se peptid anoplin ($c = 1 \text{ mmol/dm}^3$) čija vrpca se nalazi malo ispod vrpce koja odgovara veličini od 2 kDa. Masa nije određena s preciznošću s obzirom da u laboratoriju nije dostupan marker s manjim veličinama. U četvrtoj jažici nalazi se nanočestica zlata vezana za anoplin, a u petoj nanočestica srebra vezana za anoplin. Koncentracija anoplina za koji je vezana čestica zlata je veća od koncentracije anoplina za koji je vezana čestica srebra stoga je ta vrpca jačeg intenziteta. U šestoj jažici nalazi se peptid indolicidin čija vrpca odgovara masi od 2 kDa što odgovara njegovoj stvarnoj masi. U osmoj jažici nalazi se DBCO- modificirana molekula indolicidina čija vrpca također odgovara masi od 2 kDa što je također u skladu sa stvarnim vrijednostima. U posljednje dvije jažice (9 i 10) uočava se nekoliko vrpca jačeg intenziteta. Navedena pojava može se pripisati većim koncentracijama spojeva. Uočeno je da vrpca konjugata indolicidna i oligonukleotida P6 odgovara većoj masi od vrpce samog indolicidina što je u skladu s očekivanim rezultatima.

4.3.2. Elektroforeza na agaroznom gelu

Elektroforezom na 1%-tnom agaroznom gelu prati se tijekom elektroforeze i analiziraju se rezultati sinteze. Na slici 23. prikazan je marker koji se koristi.

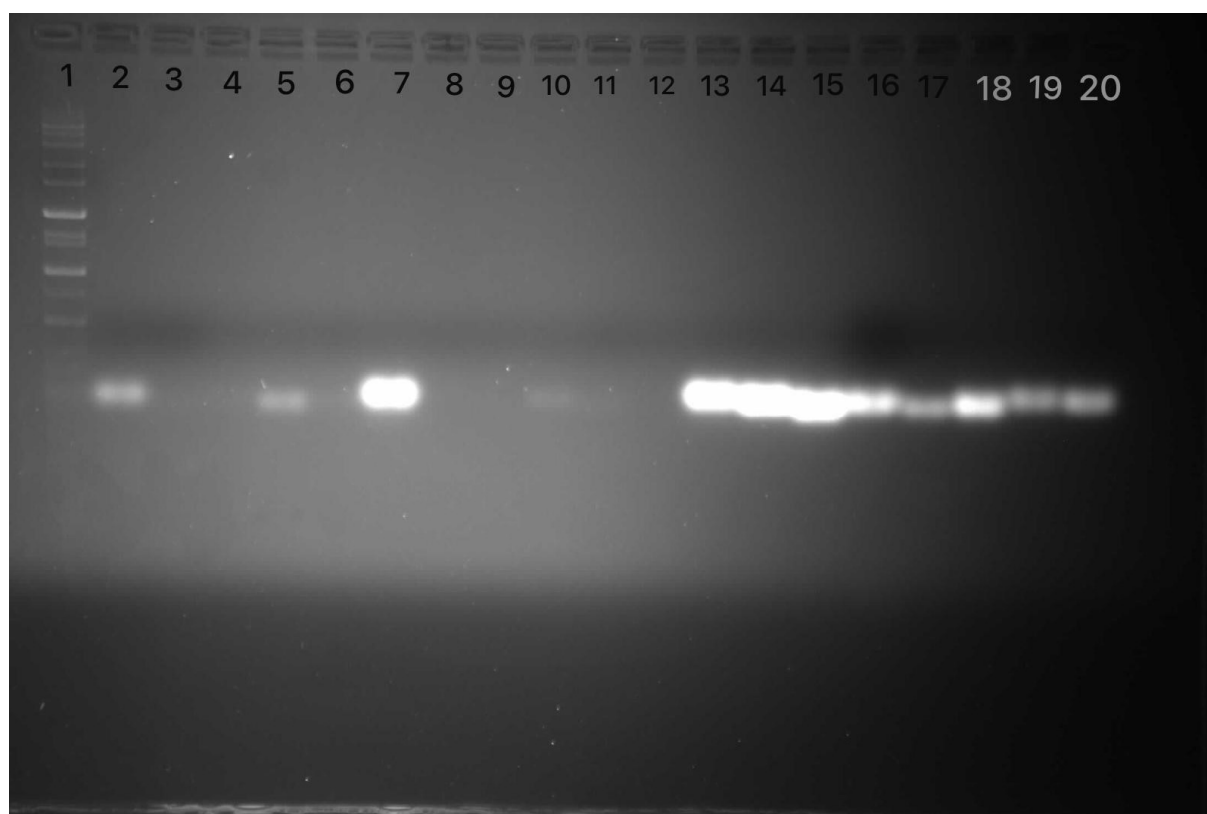


Slika 23. Marker molekulskih masa za agaroznu elektroforezu *Wide-Range DNA Ladder* (Thermo Scientific)

Tablica 4. Uzorci za pročišćavanje elektroforezom na agaroznom gelu (Slika 24.) te broj njihove jažice na gelu

UZORAK	BROJ JAŽICE I OZNAKA NA GELU
Marker molekulskih masa	1
Konjugat anoplina i P1 azida	2
Konjugat anoplina i P2 azida	3
Konjugat anoplina i P3 azida	4
Konjugat anoplina i P4 azida	5
Konjugat anoplina i P5 azida	6
Konjugat anoplina i P6 azida	7

Konjugat indolicidina i P1 azida	8
Konjugat indolicidina i P2 azida	9
Konjugat indolicidina i P3 azida	10
Konjugat indolicidina i P4 azida	11
Konjugat indolicidina i P5 azida	12
Konjugat indolicidina i P6 azida	13
P1 azid	14
P2 azid	15
P3 azid	16
P4 azid	17
P5 azid	18
P6 azid	19
P1 amin	20

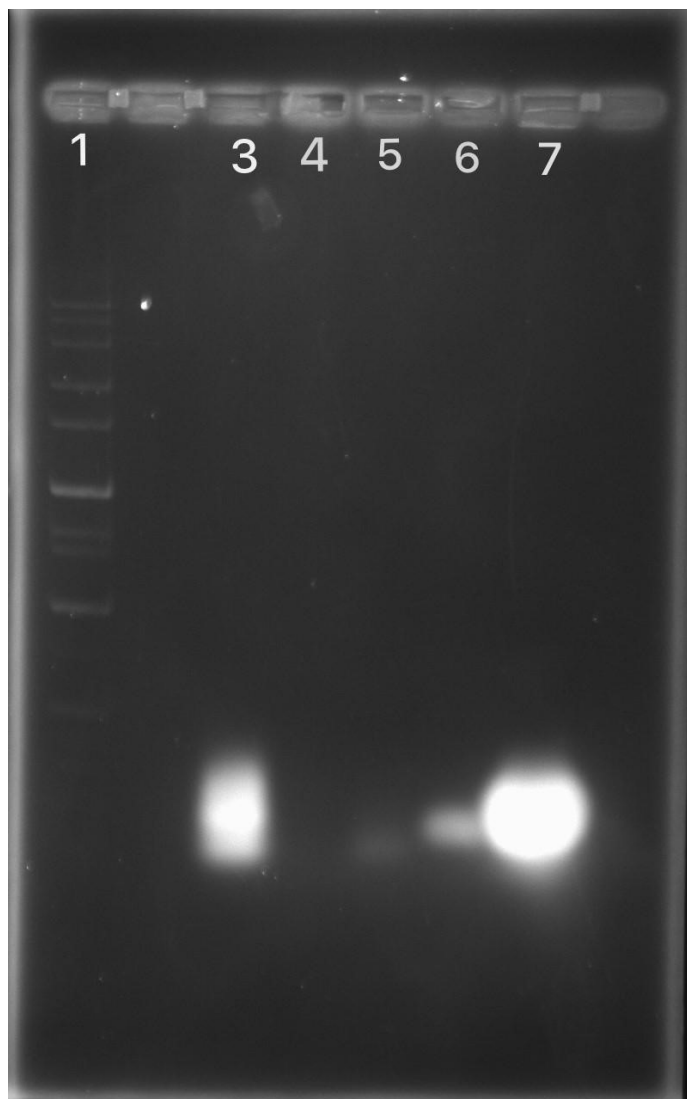


Slika 24. Gel dobiven elektroforezom na agaroznom gelu.

Na slici 24. može se uočiti da su vrpce čiste, bez mnogo zamućenja što ukazuje na uspješno odjeljivanje. Također se ne uočava više vrpce kod pojedinih uzoraka. Vrpce markera odgovaraju veličinama od 10 000 do 60 baznih parova (bp), što omogućuje usporedbu s vrpcama uzoraka. U jažicama 2-13 nalaze se konjugati peptida i oligonukleotida. Uzorci u jažicama 3, 4, 6, 8, 9, 11 i 12 slabije su vidljivi, što se može pripisati niskoj početnoj koncentraciji proteina ili DNA. Osim toga, moguće je da je došlo do gubitka materijala ili da reakcija konjugacije između peptida i DNA nije bila potpuna, što dovodi do manje količine konačnih produkata i samim time slabijeg intenziteta vrpce. Varijacije u kvaliteti agaroznog gela te fluktuacije u naponu tijekom elektroforeze mogu uzrokovati slabiju vidljivost vrpce. Također, veliku ulogu ima ljudski faktor, stoga nepravilno pipetiranje i nejednako miješanje uzoraka mogu rezultirati neujednačenim nanosom uzorka u jažice što u konačnici utječe na rezultat. Uzorci u jažicama 2-13 (konjugati peptida i oligonukleotida) pokazuju vrpce, koje usporedbom s markerom odgovaraju vrijednostima između 1000 i 2000 bp, što je u skladu s očekivanom vrijednostima. Kod uzoraka u jažicama 14-20 mogu se primijetiti vrpce koje su nešto niže od vrpca u jažicama 2-13. Njihove vrpce odgovaraju vrijednostima između 500 i 1000 bp te odgovaraju oligonukleotidima u azid formi te jednom oligonukleotidu koji nije u azid formi. Vrpce uzoraka u jažicama 14-20 odgovaraju veličinama duplo manjim od onih u jažicama 2-13, što je također u skladu s očekivanim vrijednostima.

Tablica 5. Uzorci za pročišćavanje elektroforezom na agaroznom gelu (Slika 13.) te broj njihove jažice na gelu.

UZORAK	BROJ JAŽICE I OZNAKA NA GELU
Marker molekulskih masa	1
Kompleks P1-P6	3
Konjugat indolicidna i oligonukleotida P1-P6	4
Mješavina P1-P6 oligonukleotida (bez smatanja)	5
Konjugat indolicidina i P5 azida	6
P5 azid	7



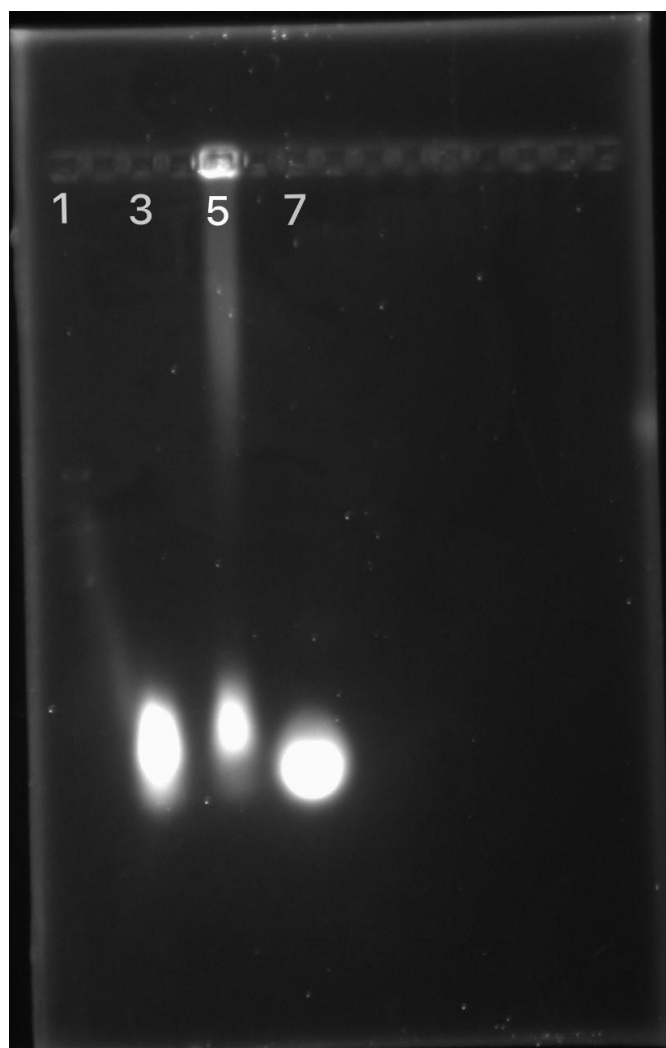
Slika 25. Gel dobiven elektroforezom na agaroznom gelu

Na slici 25. mogu se uočiti vrpce jačeg i vrpce slabijeg intenziteta. Koristi se marker *Wide-Range DNA Ladder* čiji raspon odgovara veličinama od 10 000 do 60 bp. Uzorci u jažicama 4 i 5 slabije su vidljivi, a razlog tome može biti neuspjela sinteza ili ljudska pogreška, poput nepravilnog nanošenja uzorka. Također se može uočiti da niže vrpce markera nisu dobro vidljive, što se može dogoditi zbog problema s nanošenjem markera na gel, prekratkog vremena elektroforeze ili veće gustoće agaroznog gela od potrebnog. Vrpce uzorka u jažicama 3 i 7 jačeg su intenziteta od ostalih, što je moguće zbog veće koncentracije uzorka od potrebne. Veličine uzorka ne mogu se s preciznošću odrediti zbog slabijeg intenziteta markera, no može se uočiti da vrpca uzorka u jažici 7 odgovara manjoj vrijednosti od vrpce uzorka u jažicama 3

i 6. Navedeno opažanje u skladu je s očekivanim rezultatima, s obzirom da se u jažici 7 nalazi samo oligonukleotid u obliku azida, a u jažicama 3 i 6 nalaze se nalaze kompleksniji spojevi.

Tablica 6. Uzorci za pročišćavanje elektroforezom na agaroznom gelu (Slika 14.) te broj njihove jažice na gelu.

UZORAK	BROJ JAŽICE I OZNAKA NA GELU
Marker molekulskih masa	1
Kompleks P1-P6	3
Konjugat indolicidna i oligonukleotida P1-P6	5
Konjugat anoplina i oligonukleotida P1-P6	7



Slika 26. Gel dobiven elektroforezom na agaroznom gelu

Na gelu koji je vidljiv na slici 26. može se uočiti jako slaba vidljivost markera. Razlog tome može biti kao kod gela prikazanog na slici 25. vrpce uzoraka koje se nalaze u jažicama velikog su intenziteta što se pripisuje većoj koncentraciji spojeva od potrebne. Vidljivo je i da se uzorak 5 djelomično zadržao u jažici, što je moguće zbog nepravilnog postavljanja napona, problema s puferom ili prevelike koncentracije uzorka. S obzirom da marker nije jasno razlučen i vidljiv, veličine spojeva ne mogu se precizno odrediti. Ono što se može uočiti jest položaj vrpce povezane s jažicom 5, koja pokazuje veću vrijednost od vrpce koja odgovara jažici 7. Navedeno opažanje u skladu je s očekivanjima, s obzirom da se u jažici 5 nalazi konjugat indolicidna i oligonukleotida P1-P6 te u jažici 7 konjugat anoplina i oligonukleotida P1-P6, a indolicidin ima gotovo dvostruko veću masu od anoplina. U jažici 3 nalazi se kompleks sastavljen od oligonukleotida P1, P2, P3, P4, P5 i P6 te je očekivano da će vrpca tog uzorka imati najnižu vrijednost, što nije slučaj na ovom gelu. Do odstupanja od stvarne vrijednosti moglo je doći zbog korištenja manjeg napona od potrebnog ili prekratkog vremena trajanja elektroforeze.

Tablica 7. Uzorci za pročišćavanje elektroforezom na agaroznom gelu (Slika 15.) te broj njihove jažice na gelu.

UZORAK	BROJ JAŽICE I OZNAKA NA GELU
Marker molekulskih masa	1
P1 azid	2
P2 azid	3
P3 azid	4
P4 azid	5
P5 azid	6
P6 azid	7
Konjugat indolicidina i P6 azida	8
Konjugat anoplina i P6 azida	9
Kompleks P1-P6	10
Konjugat indolicidna i oligonukleotida P1-P6	11
Konjugat anoplina i oligonukleotida P1-P6	12



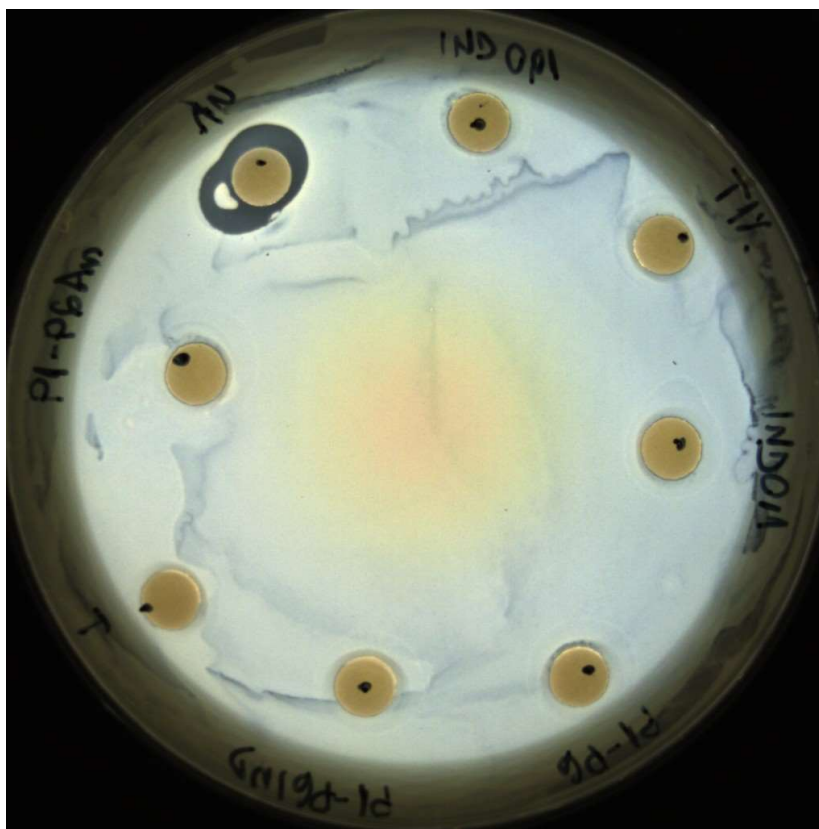
Slika 27. Gel dobiven elektroforezom na agaroznom gelu

Gel prikazan na slici 27. jest posljednji gel koji obuhvaća reaktante korištene u reakcijama sinteze, kao i sve produkte dobivene klik reakcijom. Uzorci u jažicama 2-7 odgovaraju azidima oligonukleotida koji imaju približno jednako duge sekvence, te je očekivano da će njihove vrpce odgovarati istim vrijednostima. Na gelu se može uočiti odstupanje od očekivanih rezultata, budući da vrpce P5 i P6 azida imaju veće vrijednosti od ostalih. Faktori koji utječu na položaj vrpce mogu biti sekundarna struktura oligonukleotida, kontaminacije u uzorcima te varijacije u pH ili debljini gela. Veličine uzoraka u jažicama 8 i 9 je veća od prethodnih uzoraka zbog dodatka peptida. Vrpca uzorka iz jažice 8 slabog intenziteta, što se može pripisati manjoj koncentraciji spoja od potrebne. Uzorak u jažici 10 sadrži smjesu različitih oligonukleotida, što može rezultirati pojavom više vrpce. Može se uočiti da vrpce konjugata peptida i oligonukleotida pokazuju veću vrijednost od kompleksa koji se sastoji od oligonukleotida P1, P2, P3, P4, P5 i P6, kao i od azida oligonukleotida. Navedeno opažanje u skladu je s očekivanim rezultatima.

4.4. Procjena mikrobiološke aktivnosti mjerenjem zone inhibicije

Tablica 8. Uzorci koji su se koristili u procjeni mikrobiološke aktivnosti mjerenjem zone inhibicije.

UZORAK	OZNAKA NA MEDIJU
Anoplin	AN
Indolicidin (c = 0,01 mmol/dm ³)	IND 0,01
	T 1%
Indolicidin (c = 0,1 mmol/dm ³)	IND 0,1
Kompleks P1-P6	P1-P6
Konjugat indolicidna i oligonukleotida P1-P6	P1-P6 IND
Kontrolni uzorak	T
Konjugat anoplina i oligonukleotida P1-P6	P1-P6 AN



Slika 28. Prikaz procjene mikrobiološke aktivnosti mjerenjem zone inhibicije

Zone inhibicije predstavljaju jasne regije oko diskova gdje rast mikroorganizama nije prisutan, što ukazuje na antimikrobnu aktivnost tvari. Usporedbom regija oko uzoraka uočava se najveća zona inhibicije oko peptida anoplina. Nešto manja zona inhibicije vidljiva je kod indolicidina te konjugata proteina i DNA. Teoretski, očekivano je da konjugati imaju pojačanu ili promijenjenu antimikrobnu aktivnost u odnosu na peptide same po sebi s obzirom da oligonukleotidi pomažu u stabilizaciji peptida, promjeni njihovog spektra djelovanja ili povećanju selektivnosti prema određenim mikroorganizmima. Prema rezultatima na slici 28. ne može se zaključiti da je to slučaj. U obzir svakako treba uzeti ograničenost na samo jedan bakterijski medij jer se pretpostavlja da će se konjugati različito ponašati u prisutnosti drugih mikroba.

§ 5. ZAKLJUČAK

U sklopu ovog diplomskog rada sintetizirano je i spektroskopski okarakterizirano 12 konjugata antimikrobnih peptida, indolicidina i anoplina, te oligonukleotida (anoplin-P1, anoplin-P2, anoplin-P3, anoplin-P4, anoplin-P5, anoplin-P6, indolicidin-P1, indolicidin-P2, indolicidin-P3, indolicidin-P4, indolicidin-P5 te indolicidin-P6) i 2 kompleksa koji se sastoje od oligonukleotida P1, P2, P3, P4, P5, P6 (kompleks P1-P6) vezanih za anoplin ili indolicidin (P1-P6-Anoplin, P1-P6-Indolicidin). Uspješnost sinteze provjeravana je elektroforezom te se na posljetku provelo mikrobiološko testiranje mjerenjem zone inhibicije. Elektroforezom je potvrđeno da konjugati peptida i oligonukleotida imaju veće mase u odnosu na pojedinačne komponente, što ukazuje na uspješnu sintezu. Međutim, analiza zone inhibicije pokazuje da anoplin, kada se koristi samostalno, ima znatno veću zonu inhibicije rasta bakterija nego kompleksi P1-P6-Anoplin i P1-P6-Indolicidin, što može biti rezultat utjecaja sinteze na biološku aktivnost peptida, promjena u njegovoj strukturi i funkciji. Pitanje učinkovitosti konjugata ukazuje na potrebu optimizacije metode sinteze i prilagodbe omjera peptida i oligonukleotida kako bi se poboljšala njihova antimikrobna svojstva. Također je važno istražiti moguće načine za očuvanje ili poboljšanje aktivnosti peptida nakon sinteze.

Daljnja istraživanja trebala bi se usmjeriti na detaljno ispitivanje utjecaja konjugacije na aktivnost peptida i razvoj novih strategija za optimizaciju sinteze i analize konjugata. Prioritet bi bio na razvoju analitičkih metoda za praćenje sinteze koja uključuju i potvrdu autentičnosti dobivenih produkata. S obzirom na količine uzoraka spektrometrija masa predstavlja najbolju metodu izbora.

Ovo istraživanje pruža osnovu za buduće radove usmjerene na poboljšanje terapijskog potencijala DNA nanopora funkcionaliziranih antimikrobnim peptidima u borbi protiv bakterijskih infekcija, a rezultati mogu imati važan utjecaj na razvoj novih pristupa u rješavanju problema bakterijske rezistencije.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

AIDS – eng. *Acquired Immunodeficiency Syndrome*, stečeni sindrom imunodeficijencije

AMP – antimikrobni peptidi

ATP – adenzin trifosfat

CBB – eng. *Coomassie Brilliant Blue*

CD – cirkularni dikroizam

DBCO – dibenzociklooktin

DMSO – dimetil-sulfoksid

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

HIV – eng. *human immunodeficiency virus*, virus humane imunodeficijencije

ISA-HCl – imidazol-1-sulfonil-azid-hidroklorid

LB – Luria Broth

NHS – N-hidroksisukcinimid

PBS – eng. *phosphate buffer saline*, fosfatni pufer

PR – eng. *pathogenesis-related*, patogenezom povezani

RNA – ribonukleinska kiselina

SDS – natrijev dodecil sulfat

TAE – tris-acetatni pufer

Tris - trisaminometan

UV/VIS – ultraljubičasto/vidljivo

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. *Antimicrobial consumption in the EU/EEA – Annual report*, Europski centar za prevenciju i kontrolu bolesti, Solna, Švedska, 2022.
2. *Antimicrobial resistance global report on surveillance: 2014 summary*, Svjetska zdravstvena organizacija, Geneva, Švicarska 2014.
3. R.C. Founou, L.L. Founou, S.Y. Essack, *PLoS One* **12** (2017).
4. A. Yonezawa, J. Kuwahara, N. Fujii, Y. Sugiura, *Biochemistry* **31** (1992). 2998–3004.
5. T. Ganz, *Nat Rev Immunol* **3** (2003) 710–720.
6. A.A. Bahar, D. Ren, *Pharmaceuticals* **6** (2013) 1543–1575.
7. S. V. Guryanova, T. V. Ovchinnikova, *Int J Mol Sci* **23** (2022) 2499-2524.
8. E.R. Silva, E. Listik, S.W. Han, W.A. Alves, B.M. Soares, M. Reza, J. Ruokolainen, I.W. Hamley, *Biophys Chem* **233** (2018) 1–12.
9. G.D. Rose, R. Wolfenden, *Annu. Rev. Biophys.* **22** (1993) 381–415.
10. A. Hollmann, M. Martínez, M.E. Noguera, M.T. Augusto, A. Disalvo, N.C. Santos, L. Semorile, P.C. Maffia, *Colloids Surf B Biointerfaces* **141** (2016) 528–536.
11. W. Brumfitt, M.R.J. Salton, J.M.T. Hamilton-Miller, *J. Antimicrob. Chemother* **50** (2002) 731–734.
12. M.E. Selsted, M.J. Novotny, W.L. Morris, Y.Q. Tang, W. Smith, J.S. Cullor, *Journal of Biological Chemistry* **267** (1992) 4292–4295.
13. C.H. Hsu, C. Chen, M.L. Jou, A.Y.L. Lee, Y.C. Lin, Y.P. Yu, W.T. Huang, S.H. Wu, *Nucleic Acids Res* **33** (2005) 4053–4064.
14. T.J. Falla, D.N. Karunaratne, R.E.W. Hancock, *J. Biol. Chem.* **271** (1996) 19298–19303.
15. C. Subbalakshmi, N. Sitaram, *FEMS Microbiology Letters* **160** (1998) 91–96.
16. P. Staubitz, A. Peschel, W.F. Nieuwenhuizen, M. Otto, F. Götz, G. Jung, R.W. Jack, *Journal of Peptide Science* **7** (2001) 552–564.
17. K. Konno, M. Hisada, R. Fontana, C.C.B. Lorenzi, H. Naoki, Y. Itagaki, A. Miwa, N. Kawai, Y. Nakata, T. Yasuhara, J. R. Neto, W. F. de Azevedo Jr., M. S. Palma, T. Nakajima, *Biochim. Biophys. Acta* **1550** (2001) 70–80.

18. Y. Wu, R. Huang, J.M. Jin, L.J. Zhang, H. Zhang, H.Z. Chen, L.L. Chen, X. Luan, *Front Chem* **8** (2020).
19. J.C. Jewett, E.M. Sletten, C.R. Bertozzi, *J Am Chem Soc* **132** (2010) 3688–3690.
20. S. Yakubu, E.E. Etim, *Journal of Chemical Reactivity and Synthesis*, **13** (2023) 129–151.
21. A. Mukhortava, M. Schlierf, *Bioconjug Chem* **27** (2016) 1559–1563.
22. *The Basics of UV-Vis Spectrophotometry: a primer*, Agilent Technologies, Inc., USA, 2021.
23. S. Miljanić, N. Galić, *Viši praktikum analitičke kemije I*, Sveučilište u Zagrebu, 2018.
24. C.A. Schalley, *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*, Wiley-VCH, 2007.
25. X. Zhao, Y. Wang, D. Zhao, *Advanced Spectroscopic Methods to Study Biomolecular Structure and Dynamics*, Elsevier, 2022, str. 77–103.
26. N.J. Greenfield, *Nat Protoc* **1** (2007) 2876–2890.
27. I.G. Sovulj, B. Lenhard, J.Rokov Plavec, I. Landeka Jurčević, M. Močibob, *Praktikum iz biokemije*, Sveučilište u Zagrebu, 2022.
28. C. Moser, *Modular DNA Constructs for Oligovalent Bio-Enhancement and Functional Screening*, Doktorski rad, nstitut za biokemiju i biologiju, Sveučilište u Potsdamu, 2021, str. 55
29. www.blog.papyrusbio.com/azide-bioconjugation (datum pristupa: 30. rujna 2024.)

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Petra Katalinić

Datum rođenja: 14. srpnja 1999.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2006.–2014. Osnovna škola Antuna Mihanovića, Zagreb

2014.–2018. III. Gimnazija, zagreb

2018.–2022. Preddiplomski studij kemije, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2022. - Diplomski studij kemije, smjer: istraživački; Analitička kemija i biokemija, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Nagrade i priznanja

2021. Rektorova nagrada

Kategorija: Nagrada za društveno koristan rad u akademskoj i široj zajednici – Prirodne znanosti

Rad: Online Znanstvene čarolije

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2020.-2024. Članica volonterskog projekta znanstvene čarolije

2018.-2019. Otvoreni dan kemije (Dan i noć na PMF-u)

2021.-2024. Otvoreni dan kemije (Dan i noć na PMF-u)