Istraživanje interakcija cijaninskih boja s polinukleotidima spektroskopskim i termoanalitičkim metodama

Rožman, Andrea

Doctoral thesis / Disertacija

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:721510

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Andrea Rožman

ISTRAŽIVANJE INTERAKCIJA CIJANINSKIH BOJA S POLINUKLEOTIDIMA SPEKTROSKOPSKIM I TERMOANALITIČKIM METODAMA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2018.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Andrea Rožman

STUDY OF CYANINE DYES INTERACTIONS WITH POLYNUCLEOTIDES USING SPECTROSCOPIC AND THERMOANALYTICAL METHODS OF ANALYSES

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2018.

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Andrea Rožman

ISTRAŽIVANJE INTERAKCIJA CIJANINSKIH BOJA S POLINUKLEOTIDIMA SPEKTROSKOPSKIM I TERMOANALITIČKIM METODAMA

DOKTORSKI RAD

Mentor: Dr. sc. Ivo Piantanida, znanstveni savjetnik

Zagreb, 2018.

University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Andrea Rožman

STUDY OF CYANINE DYES INTERACTIONS WITH POLYNUCLEOTIDES USING SPECTROSCOPIC AND THERMOANALYTICAL METHODS OF ANALYSES

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Dr. Ivo Piantanida, senior scientist RBI

Zagreb, 2018.

Zahvala

Željela bih se zahvaliti mentoru dr.sc. I. Piantanidi na pomoći i strpljenju. Također puno hvala Ivi .C, Marijani, Lidiji, Mariji i Filipu koji su uvijek toplom riječi i ekspertizom uskočili kada bi se desila neočekivana situacija.

Zahvaljujem Dubravki na pomoći oko HRMS karakterizacije, Ani na pomoći oko NMR i svim članovima Pretformulacija na podršci.

Želim zahvaliti obitelji bez koje ovo ne bi bilo moguće.
I na kraju, hvala svima koji su bili uz mene i nudili bezrezervnu podršku.

Sadržaj

SAŽETAK ..... **XII**
ABSTRACT ..... **XIV**
§ 1. UVOD **1**
§ 2. LITERATURNI PREGLED **4**
2.1. Nukleinske kiseline **4**
3.1. Interakcije malih molekula s polinukleotidima **10**
3.1.1. Nepovratne interakcije *11*
3.1.2. Alkilirajući agensi *11*
3.1.3. Mustardi *12*
3.1.4. Metilsulfonati *13*
3.1.5. Kompleksi platine *13*
3.1.6. Sredstva za cijepanje DNA *15*
Cijepanje DNA hidrolizom *15*
Oksidativno cijepanje *16*
3.2.1. Vezanje u utore nukleinskih kiselina *20*
3.2.2. Interkaliranje između parova baza *23*
3.2.3. Elektrostatske interakcije polikationa s negativno nabijenim fosfatima polinukleotida *25*
3.3.1. Simetrične cijaninske boje *30*
3.3.2. Nesimetrične cijaninske boje *31*
§ 4. EKSPERIMENTALNI DIO **36**
4.1. Istraživani spojevi **36**
4.2. Kemikalije **38**
4.3. Priprema otopina **39**
4.3.1. Otopine polinukleotida *39*
4.3.2. Otopine cijaninskih boja *39*
4.4. Materijali i metode **40**
4.4.1. Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije *40*
4.4.2. Masena spektrometrija *40*
4.4.3. Infracrvena spektroskopija *40*
4.4.4. Diferencijalma pretražna kalorimetrija *40*
4.4.5. Termogravimetrijska analiza *41*
4.4.6. UV/Vis spektroskopija *41*

4.4.7. UV/Vis titracije *41*
4.4.8. Određivanje temperature mekšanja *42*
4.4.9. Fluorescencijske titracije *42*
4.4.10. Izotermna tittracijska kalorimetrija *43*
4.4.11. Izračunavanje konstanti stabilnosti iz rezultata fluorimetrijskih titracija *43*
4.4.12. Izračunavanje konstanti stabilnosti simultano iz rezultata UV/Vis i fluorimetrijskih titracija *44*
4.4.13. Izračunavanje konstanti vezanja i stehiometrija dobivenih kompleksa iz rezultata ITC titracija *44*
4.4.14. Spektroskopija cirkularnog dikroizma *48*
4.4.15. Određivanje viskoznosti *48*
4.4.16. Raspodjela veličina čestica *48*
4.4.17. Određivanje zeta potencijala *49*
§ 5. REZULTATI I RASPRAVA 50
5.1. Karakterizacija 6-Cl-TOTO-1 50
5.1.1. Infracrvena spektroskopija *50*
5.1.2. Spektroskopija NMR *52*
5.1.3. Masena spektrometrija *53*
5.1.4. Diferencijalna pretražna kalorimetrija *54*
5.1.5. Termogravimetrijska analiza *55*
5.2. Fizikalno-kemijska svojstva vodenih otopina ispitivanih spojeva 56
5.3. Ispitivanje interakcija 6-Cl-TOTO-1, 6-Cl-YOYO-1, 6-Cl-TO-1 i 6-Cl-YO-1 boja s dvolančanim DNA i RNA 62
5.3.1. UV/Vis titracije *62*
5.3.2. Fluorimetrijske titracije *67*
5.3.3. Izračunavanje konstanti vezanja simultano iz rezultata fluorescencijskih i UV/Vis titracija *71*
5.3.4. Izotermna titracijska kalorimetrija *72*
5.3.5. Određivanje temperature mekšanja *80*
5.3.6. Spektroskopija cirkularnog dikroizma *85*
5.3.7. Određivanje viskoznosti *91*
5.3.8. Raspodjela veličina čestica *93*
5.3.9. Zeta potencijal *95*
§ 6. ZAKLJUČAK 98
§ 7. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ 101
§ 8. LITERATURNI IZVORI 102
§ 8. DODATAK XVII
§ 9. ŽIVOTOPIS XVIII

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

ISTRAŽIVANJE INTERAKCIJA CIJANINSKIH BOJA S POLINUKLEOTIDIMA SPEKTROSKOPSKIM I TERMOANALITIČKIM METODAMA

Andrea Rožman
Laboratorij za biomolekularne interakcije i spektroskopiju, Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, Zagreb i Pliva Hrvatska d.o.o., Istraživanje i razvoj generičkih proizvoda, Prilaz Baruna Filipovića 29, Zagreb.

Uvođenje klora kao substituenta na cijaninski kromofor dobro poznatih cijaninskih boja **TOTO** i **YOYO**, koje se koriste za bojanje i vizualizaciju DNA, rezultirao je značajnim promjenama u molekulskom prepoznavanju različitih DNA i RNA u usporedbi s ishodnim bojama, a isto tako i u odnosu na odgovarajuće monomere **6-Cl-TO-1** i **6-Cl-YO-1**.
Istraživani novi spojevi tvore nekovalentne komplekse s dvolančanim DNA/RNA, vrlo visoke stabilnosti, $K_s > 10^7$ dm^3 mol^{-1}, s malim razlikama u konstantama stabilnosti reakcije vezanja između različitih sljedova DNA/RNA. Spoj **6-Cl-YOYO-1** je pokazao specifično fluorimetrijsko prepoznavanje ds-RNA karakterističnom emisijom na 570 nm, koja se ne pojavljuje dodatkom bilo koje ds-DNA. Navedena specifična emisija (570 nm) pripisuje se svojstvu agregacije **6-Cl-YOYO-1** boje, te stoga nije prisutna kod analogne boje **6-Cl-TOTO-1**. **6-Cl-TOTO-1** je za razliku od **YO** analoga, pokazao vrpcu induciranog cirkularnog dikroizma (ICD) pri 520 nm samo prilikom vezanja na alternirajuće DNA sekvence (GC-GC i AT-AT), što nije primijećeno prilikom vezanja na homo-DNA i homo-RNA. Takav obrazac prepoznavanja pripisuje se strukturnim razlikama između polinukleotida, gdje samo alternirajuće DNA imaju tipičnu B-helikalnu strukturu. Dakle, oba klorirana analoga istraživanih boja pokazuju nova svojstva molekulskog prepoznavanja u odnosu na ishodne **TOTO** i **YOYO**, koje u kombinaciji sa zanemarivom citotoksičnošću otvaraju potencijal za razvoj novih boja za biokemijske i biomedicinske aplikacije.
(107 + 36 stranica, 123 slika, 12 tablica, 103 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: ciljana agregacija boja / cirkularni dikroizam / DNA i RNA prepoznavanje/ fluorescentni markeri

Mentor: dr. sc. Ivo Piantanida, zn. savj. u trajnom zvanju, IRB

Rad prihvaćen:07.11.2018.
Ocjenitelji:
1. prof. dr. sc. Vladislav Tomišić, PMF
2. izv.prof. dr. sc. Snežana Miljanić, PMF
3. dr.sc. Ivo Piantanida, zn.savj. u trajnom zvanju, IRB

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

STUDY OF CYANINE DYES INTERACTIONS WITH POLYNUCLEOTIDES USING SPECTROSCOPIC AND THERMOANALYTICAL METHODS OF ANALYSES

Andrea Rožman
Laboratory for Biomolecular Interactions and Spectroscopy, Ruđer Bošković Institute, Bijenička cesta 54 , Zagreb, Croatia and Pliva Croatia Ltd., Research and Development, Prilaz Baruna Filipovića 29 Zagreb, Croatia

Introduction of chloro-substituent at cyanine chromophore of well-known DNA stains **TOTO** and **YOYO** resulted in a significant difference of DNA and RNA recognition with respect to parent compounds (**TOTO**; **YOYO**), as well as in respect to corresponding monomers (**6-Cl-TO-1** and **6-Cl-YO-1**). Studied novel compounds form non-covalent complexes with ds-DNA/RNA which exhibited high stability $K_s > 10^7$ dm^3 mol^{-1}, with minor differences in binding constants between various DNA and RNA. **6-Cl-YOYO-1** revealed specific fluorimetric recognition of ds-RNA in comparison to ds-DNA by the fluorimetric response at 570 nm, which was attributed to particular aggregation property of the dye, not present in corresponding **6-Cl-TOTO-1** analogue. The **6-Cl-TOTO-1**, unlike **YO**-analogue, showed ICD band at 520 nm only upon binding to alternating DNA sequences (both, GC-GC and AT-AT), which was not observed for homo-DNA and homo-RNA. Such recognition pattern was attributed to structural differences between polynucleotides, whereby only alternating-DNAs have a typical B-helical structure in which **6-Cl-TOTO-1** molecule could insert to give particular ICD band at 520 nm. Thus, both Cl-analogues showed intriguing novel recognition properties in comparison to parent **TOTO** and **YOYO**, which combined with negligible cytotoxicity offer potential for development of novel dyes for biochemical and biomedical applications.

(107 + 36 pages, 132 figures, 12 tables, 103 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: circular dichroism / DNA and RNA recognition / fluorescent markers / target-aggregating dyes
Supervisor: Dr. Ivo Piantanida, Senior scientist, RBI
Thesis accepted: 07. November 2018.

Reviewers : Dr. Vladislav Tomišić, Professor
Dr. Snežana Miljanić, Professor
Dr. Ivo Piantanida, Senior scientist, RBI

§ 1. UVOD

Specifična detekcija sekvenci dvolančanih DNA/RNA molekulskim prepoznavanjem je postala vrlo vrijedan dijagnostički alat u molekularnoj biologiji i medicini.[1] Fluorescentne probe su jedne od najkorištenijih metoda za prepoznavanje i detekciju interakcija malih molekula s DNA i RNA.[2] Nekovalentno prepoznavanje DNA/RNA može uključivati nekoliko načina vezanja i njihovih kombinacija.[3,4]

U ovom radu je istraživano i dizajnirano nekoliko klasa malih molekula, cijaninskih boja, derivata tiazol narančaste (**TO**) i oksazol žute (**YO**) boje te njihovih homodimera (**TOTO** i **YOYO**) koje prepoznaju DNA/RNA na različite načine: kao kombinacija vezanja vodikovim vezama, agregacije boja unutar DNA/RNA veznih mjesta te promjenom načina vezanja ovisno o razlikama u DNA i RNA.[5,6,7]

Detaljne kvantnomehaničke i spektroskopske studije[8] osnovnog kromofora **TO** pokazale su da se malim promjenama u strukturi ili okruženju kromofora prilikom interakcije s DNA može snažno utjecati na fluorescencijski odziv. Ta istraživanja potaknula su interes u istraživanjima interakcija cijaninskih boja, za koje je uočeno da pokazuju neobično kinetičko prepoznavanje AT-DNA sekvenci[9] kombinirano sa specifičnom i netoksičnom akumulacijom u mitohondrijima[10] te simultano prepoznavanje jednolančanih i dvolančanih DNA/RNA.[11] Primjerice za komercijalno dostupne i istraživane homodimere cijaninskih boje **TO** i **YO**, naziva **TOTO** i **YOYO** pokazano je značajno poboljšanje bojanja DNA/RNA te se ti fluorofori vrlo često koriste za vizualizaciju DNA i RNA *in vitro* i *in vivo*.[12,13]

Cijaninske boje pokazuju i sklonost agregiranju u vodenim medijima zbog svoje polarizabilnosti i hidrofobnosti,[14] tvoreći ovisno o načinu slaganja molekula J-tip ili H-tip agregata. Za nesupstituirane cijaninske boje najpovoljnije je stvaranje H-tipa agregata zbog stvaranja maksimalnog broja van der Waalsovih veza dok se za supstituirane boje promovira stvaranje J-tipa agregata zbog steričkih ili elektrostatskih smetnji uzrokovanih supstituentima.[14]

Tijekom godina sintetizirani su mnogi derivati supstituiranih cijaninskih boja **TO** i **YO**, ili kao hetero-boje (**TO-PRO**, **BO-TO**, itd.) ili kao homodimeri koji se razlikuju po različitim

supstituentima na **TO** i **YO** kromoforima.[13] Primjerice, detaljna studija **YOYO** i njegovih bliskih analoga je otkrila da su spektroskopska svojstva (fluorescencija) ovisna o kompleksnim strukturnim svojstvima kromofora (**YO**), njegovim intermolekulskim svojstvima agregiranja te utjecajima okoline kao što je otapalo ili DNA/RNA vezna mjesta.[15]

U ovom radu su istraživani kloro supstituirani derivati komercijalno dostupnih boja **TO** i **YO** te njihovih homodimera: **6-Cl-TO-1**, **6-Cl-YO-1**, **6-Cl-TOTO-1** i **6-Cl-YOYO-**1. Odabir tih spojeva napravljen je iz sljedećih razloga: **TO** i **YO** kromofori su dovoljno različiti (oksazolni kromofor sadrži atom kisika dok tiazolni sadrži sumpor), supstitucija vodika na poziciji 6 halogenom (-Cl) unosi steričku i elektronegativnu komponentu koja može imati drastičan utjecaj na spektroskopska i termodinamička svojstva ispitivanih spojeva u usporedbi s **TO** i **YO** te **TOTO** i **YOYO**, a kako je klorov atom vrlo lako supstitucijom zamijeniti drugim supstituentima, otvara se, u slučaju zanimljivih svojstava mogućnost za sintezu niza bliskih analoga i njihovo daljnje istraživanje.

Cilj ovog rada je istražiti svojstava novih molekula (**6-Cl-TOTO-1** i **6-Cl-YOYO-1**) i njihove sposobnosti prepoznavanja/razlikovanja između najčešćih sekundarnih struktura dvolančanih DNA i RNA primjenom niza spektroskopskih metoda: UV/Vis apsorpcijskom i fluorescencijskom spektroskopijom te spektroskopijom cirkularnog dikroizma. Zbog toga je izabran niz sintetskih polinukleotida sa značajnom razlikom u primarnoj i sekundarnoj strukturi. Polinukleotid poli dAdT– poli dAdT karakterizira tipična B-helikalna struktura koja je pogodna za vezanje malih molekula, dok je poli dGdC-poli dGdC također tipična B-helikalna struktura, ali s malim utorom koji je sterički zaklonjen s alternirajućim amino skupinama gvanina. Poli rA-poli rU je karakteriziran A-helikalnom strukturom s uskim i dubokim velikim utorom, koji je prikladno vezno mjesto za vezanje malih molekula. DNA telećeg timusa (*calf thymus, ct*-DNA) je karakterizirana B-helikalnom strukturom s 48% parova baza GC i može služiti za usporedbu između AT- i GC-DNA. Nadalje, istraživani spojevi (bliski analozi **TOTO** i **YOYO** s utjecajem elektronegativnog i steričkog kloro-supstituenta) mogu interkalirati i eventualno bisinterkalirati u DNA/RNA, pa je očekivan ishod interakcije interkalacija, vezanje u mali ili veliki utor DNA/RNA i razlike u odzivima prema različitim sekundarnim strukturama DNA/RNA.

Nadalje, uz navedene **6-Cl-TOTO**-1 i **6-Cl-YOYO-1** istraživani su i njihovi monomeri (**6-Cl-TO-1** i **6-Cl-YO-1**) nizom metoda, koje uključuju ne samo konvencionalne i

široko korištene spektroskopske metode koje su esencijalne za evaluaciju mnogih biokemijskih i bioloških aplikacija (fluorescencija, cirkularni dikroizam, UV/Vis), već i morfološke metode (viskoznost, DLS). Dodatno u ovom radu je primijenjeno nekoliko termoanalitičkih metoda: uhodana temperaturna denaturacija ds-DNA/RNA s i bez ispitivanih spojeva te izotermna titracijska kalorimetrija (ITC), kojom je moguće direktno mjeriti toplinu koja se izmjenjuje prilikom interakcije malih molekula s DNA/RNA.

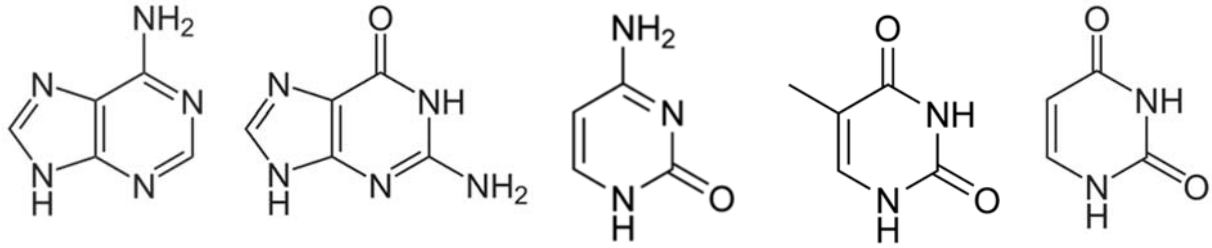
§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Nukleinske kiseline

Nukleinske kiseline su linearni polimeri sastavljeni od monomernih jedinica koje se nazivaju nukleotidi. Nukleotidi su građeni od dušične heterociklične baze, šećera pentoze te fosfatnog ostatka.[16] Ovisno o nukleotidima te šećera pentoze razlikujemo deoksiribonukleinsku i ribonukleinsku kiselinu.

Dušične baze su planarne aromatske molekule koje dijelimo na monocikličke pirimidine (citozin, timin i uracil) ili biciklične purine (adenin i gvanin). Adenin, gvanin, timin i citozin grade deoksiribonukleinsku kiselinu, a uracil uz adenin, gvanin i citozin su sastavne jedinice ribonukleinske kiseline (slika 1).

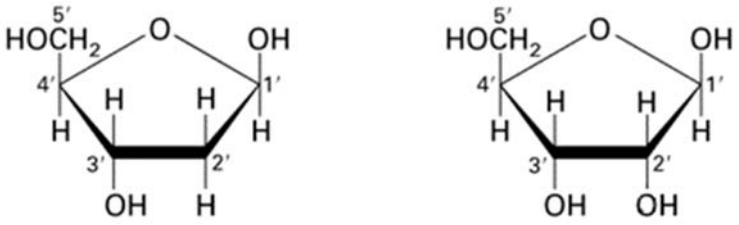
Purinske baze Pirimidinske baze



Adenin (A) Gvanin (G) Citozin (C) Timin (T) Uracil (U)

Slika 1: Molekulske strukture purinskih i pirimidinskih baza

Dušična baza vezana sa šećerom čini nukleozid, dok se nukleotid sastoji od šećera za koji su vezane fosfatna skupina i dušične baze. Šećer može biti D-riboza (kod ribonukleinske kiseline) ili D-deoksiriboza (kod deoksiribonukleinske kiseline). Fosfat je fosfoesterskom vezom spojen s 5'-ugljikom u šećeru, dok je baza vezana za 1'-ugljik. Ti nukleotidi povezani sa fosfatom čine linearni polimer, a primarna struktura određena im je rasporedom baza.[16]

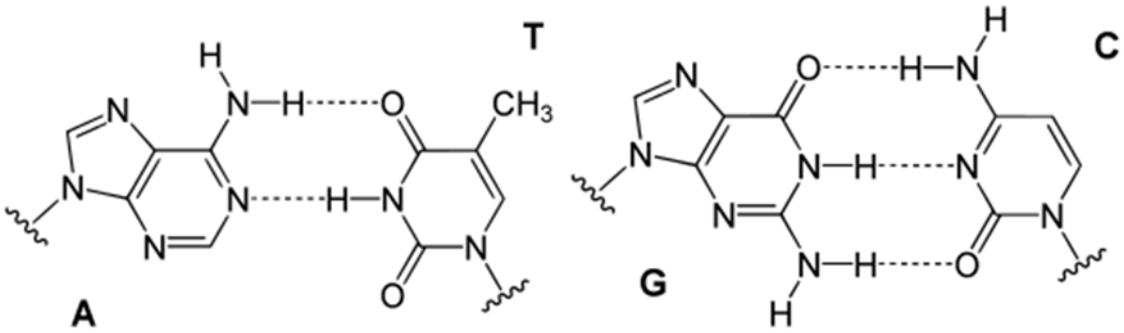


(a) (b)

Slika 2: Deoksiriboza (a) i riboza (b)

Svojstvo purinskih i pirimidinskih baza je da su one slabo bazične pa tako adenin, citozin i gvanin su u protoniranom stanju samo ako je pH manji od 4, dok su amidne NH grupe u gvaninu, timinu i uracilu deprotonirane pri pH iznad 9. Fosfati su u neutralnom pH ionizirane i postoje kao anioni, time čineći DNA ili RNA polianionskom molekulom.

Purinske i pirimidinske baze su međusobno komplementarne te mogu tvoriti parove baza povezane vodikovim vezama. Kod deoksiribonukleinske kiseline ti parovi baza su adenin-timin (AT) te gvanin-citozin (GC). Adenin-timin je međusobno povezan s dvije vodikove veze dok je gvanin-citozin povezan trima vodikovim vezama (slika 3).[17]



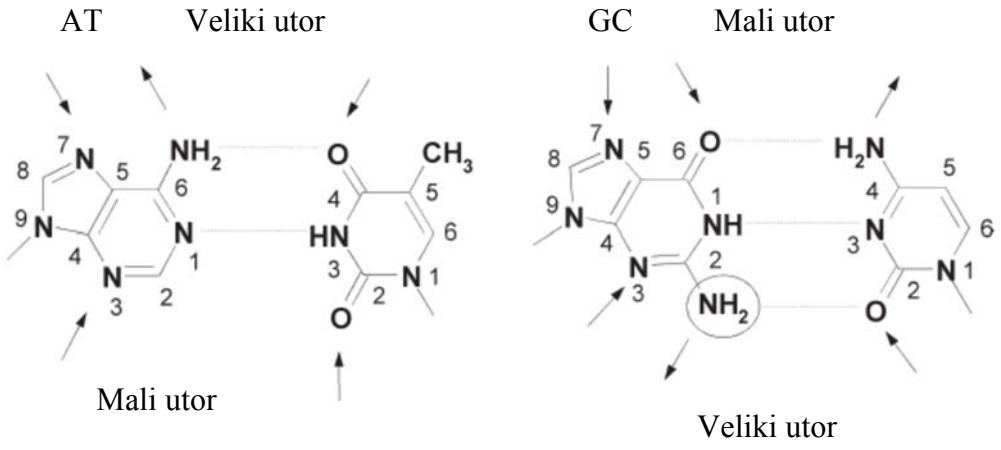
Slika 3: Prikaz AT i GC komplementarnih parova baza

Komplementarnost purinskih i pirimidinskih baza te mogućnost stvaranja međusobnih veza omogućuje uvijanje dva komplementarna polinukleotidna lanca u dvostruku uzvojnicu. Nadalje, brojnost AT i GC parova baza u DNA uzvojnici određuje stabilnost dvostrukog lanca. Generalno lanac s više GC parova baza je stabilniji od onog gdje je brojnost AT parova baza veća. To svojstvo se može direktno povezati s brojem vodikovih veza koje tvore

komplementarni parovi baza, pa tako kompleks gvanin-citozin sa svoje tri vodikove veze direktno utječe na povećanje stabilnosti dvostruke uzvojnice. [18]

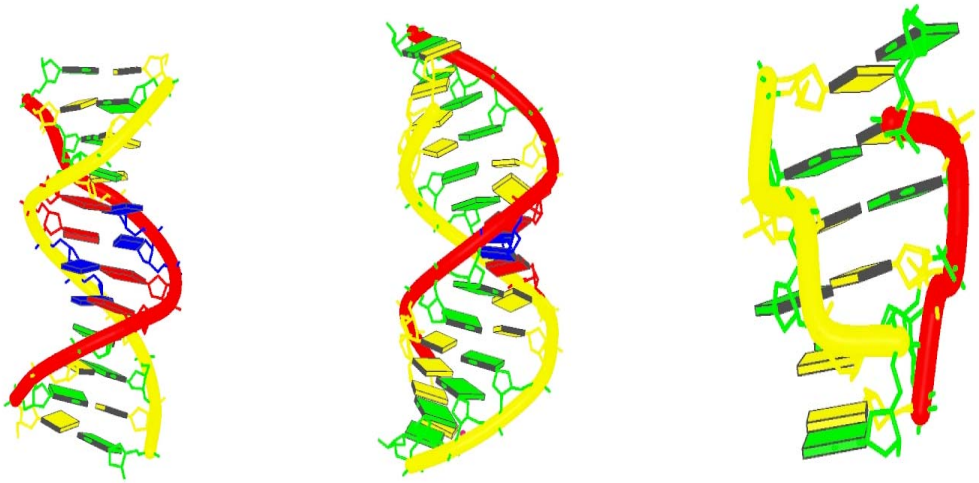
Dvostruka uzvojnica DNA se sastoji od dva antiparalelna polinukleotidna lanca koji se uvijaju jedan oko drugog i oko zajedničke osi. Fosfatna okosnica se nalazi s vanjske strane uzvojnice, zajedno sa šećerima, dok unutrašnjost čine dušične baze. Unutrašnjost dvostruke uzvojnice je nepolarna zbog dušičnih baza, dok je okosnica koju čine šećeri i fosfatne skupine polarne, izrazito negativno nabijena i izložena je okolnom vodenom mediju.

Svaku dvostruku uzvojnicu DNA karakterizira postojanje velikog i malog utora koji su posljedica uvijanja anti-paralelnih polinukleotidnih lanaca. Veliki i mali utor nisu jednakih dimenzija. U malom utoru DNA se nalazi O2 atom iz pirimidinske baze te N3 atom iz purinske baze. U velikom utoru se nalaze hetero atomi suprotne strane para te metilna skupina iz timina.[19]



Slika 4: Prikaz velikog i malog utora kojeg čine parovi baza AT i GC

Dvolančane DNA u prirodi mogu postojati u izrazito velikom broju konformacija, od kojih su najpoznatije A- i B-DNA. Rijetka, ali zanimljiva je i lijeva uzvojnica (Z-DNA). Shematski prikaz tih struktura je prikazan na slici 5.



a) b) c)

Slika 5: Strukture a) B-DNA,[20] b) A-DNA[21] i c) Z-DNA[22]

Helikalna struktura dvostruke uzvojnice direktno ovisi o prisutnosti vode i niza drugih faktora (kationi, itd). Tako na primjer, ds-DNA je pri niskoj relativnoj vlazi u A-konformaciji desne uzvojnice, koju karakterizira 11 parova baza po zavoju. Baze leže na udaljenosti 4,4 Å od osi dvostruke uzvojnice i nagnute su 20° što omogućuje slaganje (engl. *stacking)*.

Pri visokoj relativnoj vlazi (oko 95% relativne vlažnosti, RV) dvostruka uzvojnica deoksiribonukleinske kiseline se nalazi u B-formi, koju karakterizira 10 parova baza po zavoju i vrlo mala zakrenutost baza (−6°) u odnosu na os dvostruke uzvojnice. U ovoj konfiguraciji mali i veliki utor su slične dubine jer se parovi baza nalaze točno na osi uzvojnice.

Z-DNA se drastično razlikuje od A- i B-DNA. Karakterizira ju lijeva zavojnica te karakteristična cik-cak struktura fosfodiesterske okosnice. Ova konformacija DNA je vrlo rijetka i pojavljuje se samo u procesu transkripcije. Svojstva različitih DNA su navedena u tablici 1.

Tablica 1: Usporedba struktura DNA[23]

	Tip heliksa		
	A	**B**	**Z**
Općenite dimenzije	Kratka i široka	Duža i uža	Duža i uska
Rotacija heliksa	Desna	Desna	Lijeva
Pozicija osi heliksa	Veliki utor	Kroz parove baza	Mali utor
Dimenzije velikog utora	Ekstremno uzak, vrlo dubok	Širok, srednje dubine	Spljošten na površini heliksa
Dimenzije malog utora	Vrlo širok, plitak	Uzak, srednje dubine	Jako uzak, vrlo dubok

Ribonukleinska kiselina za razliku od deoksiribonukleinske kiseline u biološkim sustavima postoji kao jednolančana uzvojnica. Ribonukleinska kiselina u prirodi nema komplementarni lanac s kojim bi mogla tvoriti dvostruku uzvojnicu, no u određenim domenama, komplementarni kratki lanci mogu biti asocirani na RNA, ili kako je prikazano na slici 6, sama RNA može tvoriti domenu u kojoj tvori dvostruku uzvojnicu.

Kod RNA, parove baza mogu činiti A-U, a sposobne su tvoriti dvije vodikove veze.[24]



Slika 6: Struktura fenil-alaninske t-RNA izolirane iz kvasca[25]

Još od otkrića nukleinskih kiselina 1968. godine od strane Friedricha Mieshera[26] te opisivanja strukture nukleinskih kiselina od strane Francisa Cricka i Jamesa Watsona 1953. godine, interakcije polinukleotida s proteinima, peptidima i malim molekulama izazivaju pozornost istraživača diljem svijeta.

Otkrićem strukture DNA, koja je sastavljena od dva polinukleotidna lanca uvijena u dvostruku uzvojnicu, te njihovo odvajanje u procesu transkripcije genetičkih podataka pohranjenih u genetskom kodu tj. redoslijedu nukleotida u lancu, izazvao je daljnja istraživanja u vidu stabilnosti dvostruke uzvojnice, veza između parova baza te energije koja je potrebna kako bi se lanci odvojili. Kako su polinukleotidi dobiveni prirodnim putem vrlo heterogeni u vidu duljine polinukleotidnih lanaca, njihova karakterizacija predstavlja vrlo velik izazov. Stoga su se istraživanja okrenula prema sintetskim polinukleotidima ujednačene duljine lanaca.

Morfološka svojstva tj. dimenzije utora za izabrane sintetske polinukleotide sumirane su u tablici 2.

Tablica 2: Dimenzije malog i velikog utora[27]

	Širina utora / Å		**Dubina utora / Å**	
Struktura	**veliki**	**Mali**	**veliki**	**mali**
poli dAdT-poli dAdT	11,2	6,3	8,5	7,5
poli dA-poli dT	11,4	3,3	7,5	7,9
poli dGdC-poli dGdC	13,5	9,5	10,0	7,2
B-DNA[a]	11,7	5,7	8,5	7,5

[a] *ct*-DNA

3.1. Interakcije malih molekula s polinukleotidima

U posljednjih dvadesetak godina se intenzivno proučavaju interakcije malih molekula s DNA i RNA, upravo zbog njihove uloge u živim stanicama. Naime, poznavanje mehanizama interakcija malih molekula s DNA i RNA jest ključno kako bi se mogli objasniti uzroci nastanka bolesti, strukturne značajke DNA, ali i odgonetnuti okidač u nastanku raka te tako doći do spoznaja o mehanizmima djelovanja antitumorskih, ali i antivirusnih lijekova.

Nukleinske kiseline u živim organizmima sudjeluju u staničnim procesima kao što su dioba stanica (replikacija DNA) te sinteza proteina (transkripcija i translatacija).

Prema dostupnoj literaturi veliki broj lijekova ulazi u interakciju s DNA. Ti lijekovi pokazuju svoje biološko djelovanje inhibirajući gensku transkripciju ili inhibiraju DNA replikaciju. Primjer takvog djelovanja je aktinomicin D koji selektivno inhibira RNA sintezu. Usprkos mnoštvu kemo-terapeutika koji se trenutačno nalaze u kliničkim ispitivanjima, cilj istraživanja je pronaći lijekove koji su selektivni prema tumorskim stanicama. Iako su antitumorski lijekovi od velikog značaja za modernu medicinu, neki lijekovi iz drugih terapeutskih područja, kao što su antibiotici i antivirusni lijekovi, također ulaze u interakcije s DNA/RNA.

Mehanizam djelovanja, mjesto djelovanja, način te specifičnost prema određenim sljedovima baza je odlučujuće u dizajniranju novih lijekova.

Važno je napomenuti da uz male molekule, u interakciju s DNA/RNA mogu ući i makromolekule (polipeptidi, proteini, oligonukleotidi itd.) metali i metalni kompleksi.

Male molekule mogu ući u interakciju s DNA na sljedeće načine: kroz kontrolu transkripcije, formirajući DNA/RNA hibride ili kroz direktno vezanje malih molekula na DNA/RNA.

U kontroli transkripcije mala molekula se ne veže direktno na molekulu DNA, nego ulazi u interakciju s proteinom koji se veže na DNA molekulu te tako mijenja funkciju transkripcije.[28,29,30] U slučajevima formiranja DNA/RNA hibrida mala molekula se veže s ribonukleinskom kiselinom, nakon čega se nastali kompleks veže s DNA, te nastali hibrid DNA-RNA ometa proces transkripcije.[31,32,33] Kod direktnog vezanja na DNA, male molekule

se vežu na dvostruku uzvojnicu DNA. Interakcije mogu biti kovalentne (alkilirajući agensi, i sl.) ili nekovalentne: elektrostatske interakcije, vezanje u utore ili interkaliranje između parova baza.

3.1.1. Nepovratne interakcije

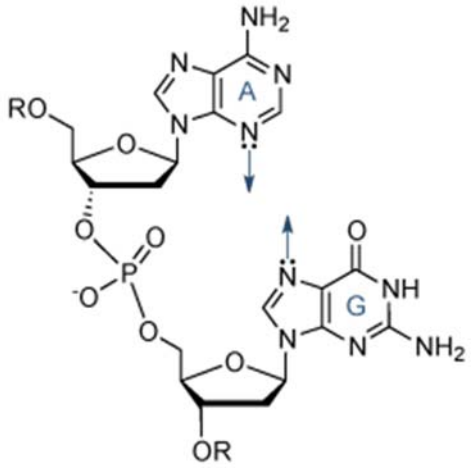
Nepovratne interakcije malih molekula s DNA/RNA, kao što im naziv govori, uzrokuju nepovratnu štetu DNA/RNA stvaranjem kovalentnih veza s polinukleotidima ili uzrokuju cijepanje polinukleotidnog lanca. U nepovratnim reakcijama sudjeluju dva osnovna tipa spojeva: alkilirajući agensi te sredstva za cijepanje DNA.[34]

3.1.2. Alkilirajući agensi

Alkilirajući agensi se mogu definirati kao reaktivna klasa spojeva koja se kovalentno veže na kemijske grupe koje se nalaze u nukleinskim kiselinama, kao što su fosfati, amino grupe, sulfohidrilne, hidroksilne i imidazolne grupe, unoseći velike promjene u DNA/RNA. Alkilirajući agensi su bili prva klasa antitumorskih lijekova, te unatoč opasnostima koje nose, lijekovi prvog izbora u liječenju tumora. To su jaki elektrofilni spojevi koji kemijski reagiraju s nukleofilnim grupama nukleinskih kiselina i tvore kovalentne veze. Nastali adukti nukleinske kiseline i alkilirajućeg agensa su nepovratni inhibitori transkripcije i translatacije.

Reakcija nukleofilne supstitucije na DNA bazama se dešava S_N1 i S_N2 mehanizmima. S_N2 mehanizam se odvija u jednom koraku, te nukleofil i supstrat sudjeluju u odvijanju reakcije te određuju brzinu reakcije. Brzina reakcije je ovisna o koncentraciji supstrata i nukleofila. S_N1 mehanizam opisuje reakciju koja se odvija u više koraka koji uključuju nukleofilnu supstituciju, a brzina reakcije je uvjetovana raspadom jedno-molekulskog sustava. Najreaktivnija mjesta u nukleinskim kiselinama su ona koja su istovremeno nukleofilna te se nalaze u utorima i izloženi su okolnom mediju. Primjerice N7 atom gvanina ili N3 atom adenina su mjesta gdje se mogu odvijati spomenute reakcije, jer su nukleofilni i nalaze se u utoru. Jednostavni nukleofili kao što su etilenamini i metilni sulfonati se vežu S_N2

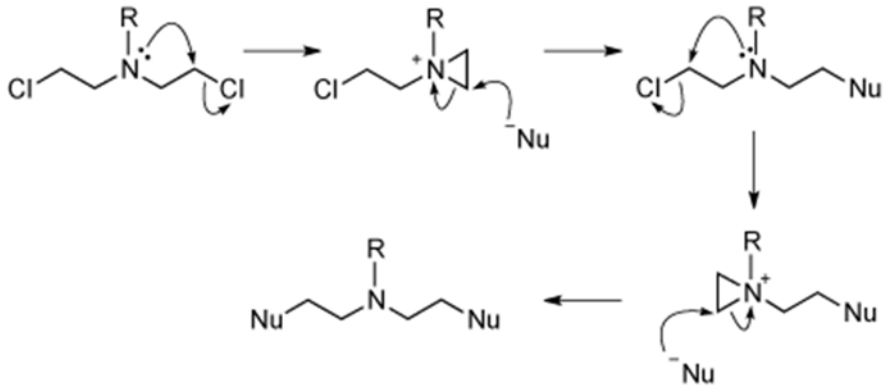
mehanizmom, dok se složeniji nukleofili kao što su dušikovi ili sumporovi mustardi vežu S_N1 mehanizmom.



Slika 7: Nukleofilnost adenina N3 atom i gvanina N7 atom koji su izloženi okolnom mediju u utorima DNA dupleksa

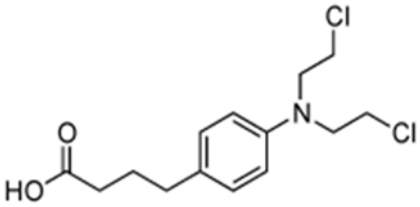
3.1.3. Mustardi

Mehanizam djelovanja mustarda počinje formiranjem elektrofilnog aziridijskog iona istiskivanjem kloridnog iona. Aziridin se tada lagano veže s nukleofilnim DNA bazama a reakcija se može odviti u još jednom koraku, te se na taj način mogu povezati dvije uzvojnice DNA. Predloženi mehanizam je prikazan na slici 8.



Slika 8: Mehanizam vezanja mustarda na nukleinske kiseline, mehanizam S_N1

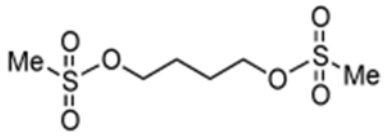
Primjer alkilirajuće molekule iz skupine dušikovih mustarda je klorambucil, koji se koristi u terapiji liječenja tumora (slika 9).



Slika 9: Struktura klorambucila

3.1.4. Metilsulfonati

Metilsulfonati alkiliraju gvanin na N7 poziciji. Oni ne čine inter lančane mostove, već rade intra lančane poveznice. Primjer metilsulfonatnog bis-funkcionalnog antitumorskog lijeka je busulfan (slika 10).



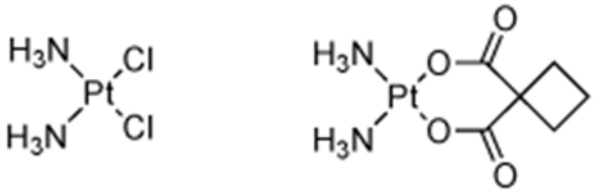
Slika 10: Struktura busulfana

3.1.5. Kompleksi platine

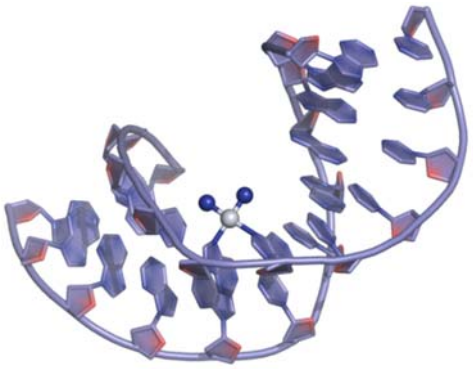
Cisplatin i karboplatin su tipični primjeri kompleksa platine koji se koriste kao antitumorski lijekovi u terapiji raka testisa i jajnika. Cisplatin i karboplatin rade čvrste veze između platine i dušika iz adeninskih i gvaninskih baza. *Cis*-konfiguracija cisplatina pogoduje stvaranju intra lančanih veze, čija je posljedica odvijanje heliksa, koje sprečava transkripciju DNA te uzrokuje staničnu smrt.

Za razliku od cisplatina, njegov stereoizomer *trans*-platin nije aktivan antitumorski lijek. Zbog svoje konfiguracije on ne može stvarati intra-lančane veze, već povezuje dvije pojedinačne uzvojnice, što stanični mehanizam lako može popraviti, te posljedično, transkripcija nije spriječena.[35]

Strukture cisplatina i karboplatina su prikazane na slici 11 dok je kompleks cisplatina s DNA prikazan na slici 12.



Slika 11: Strukture cisplatina(lijevo) i karboplatina (desno)



Slika 12: Trodimenzionalni prikaz strukture cisplatina s DNA; prikazana je kovalentna veza s N7 atomom gvanina[36]

3.1.6. Sredstva za cijepanje DNA

Cijepanje DNA se redovno dešava u biološkim sustavima. Primjerice topoizomeraza cijepa DNA lance ukoliko je došlo do pogrešnog repliciranja DNA, a transkripcija i ostale stanične transakcije se dešavaju upravo zbog mogućnosti da se DNA pocijepa.[37] Endonukleaze, primjerice, čuvaju stanice od stranih DNA kod virusnih infekcija,[38] ili kod uništavanja DNA tijekom apoptoze stanice.[39]

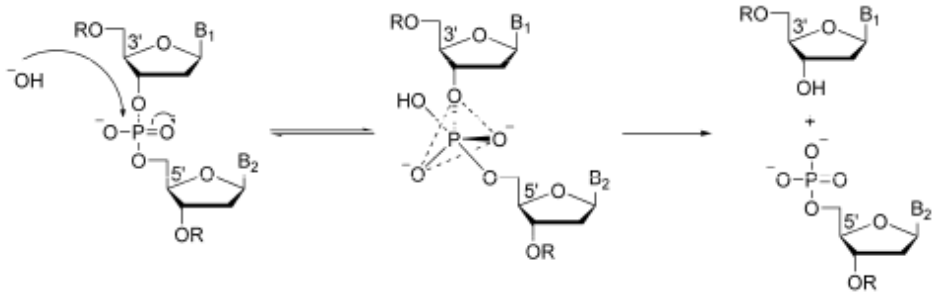
Općenito, postoje tri načina na koji se DNA cijepa:

1) cijepanje DNA hidrolizom
2) fotokemijsko cijepanje DNA
3) oksidativno cijepanje DNA

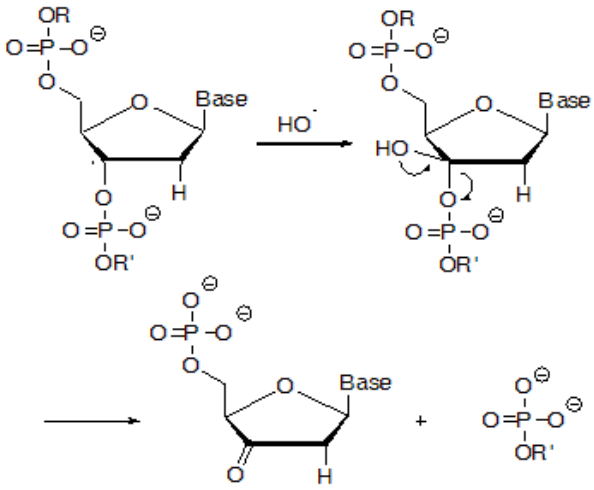
Cijepanje DNA hidrolizom

Hidrolitičko cijepanje DNA nastaje cijepanjem fosfo-diesterskih veza što generira fragmente DNA u prisutnosti vode. Hidroliza je omogućena samo u prisutnosti metalnih iona koji u ovom slučaju djeluju kao Lewisove kiseline. Metalni ioni aktiviraju fosfatne grupe čineći ih podložnima nukleofilnom napadu, aktivirajući vodu ili hidroksilne ione kao nukleofile ili povećavajući izlaznu sposobnost alkohola.

Predloženi mehanizam hidrolize DNA uključuje nukleofilni napad na fosfatni kostur kako bi se formirao intermedijer s fosforovim ionom koordinacije pet, koji se može stabilizirati katalizatorom (metalni ion). Nakon toga dolazi do cijepanja ili 3'PO (slično kao kod enzimskih reakcija) ili 5'PO veza što dovodi do odcijepljenja dijela DNA. Nakon tog nukleofilnog napada, izlazi alkoholna skupina.[40] Shematski prikaz hidrolize DNA je prikazan na slici 13, a na slici 14 reakcijski mehanizam cijepanja na nukleobazama.



Slika 13: Reakcijski mehanizam hidrolize DNA[40]



Slika 14: Reakcijski mehanizam cijepanja na nukleobazama[40]

Oksidativno cijepanje

Cijepanje DNA oksidacijom uključuje oksidaciju deoksiriboze ili oksidaciju nukleobaza. Ovaj način cijepanja DNA se dešava ukoliko su prisutni vanjski oksidansi, kao što je primjerice vodikov peroksid. Kao i kod hidrolitičkog cijepanja i oksidativno odvojeni dijelovi DNA ne mogu biti popravljeni staničnim mehanizmima.

Oksidacija na nukleobazama preferirano se dešava na gvaninu, zbog njegovog niskog oksidacijskog potencijala. Hidroksilni radikali aditivno ulaze u interakciju s DNA. Kod pirimidina adicija se dešava na C5 ili C6 dvostrukoj vezi, dok se kod purina hidroksilni ioni vežu na C4, C5 i C8 atome.[41]

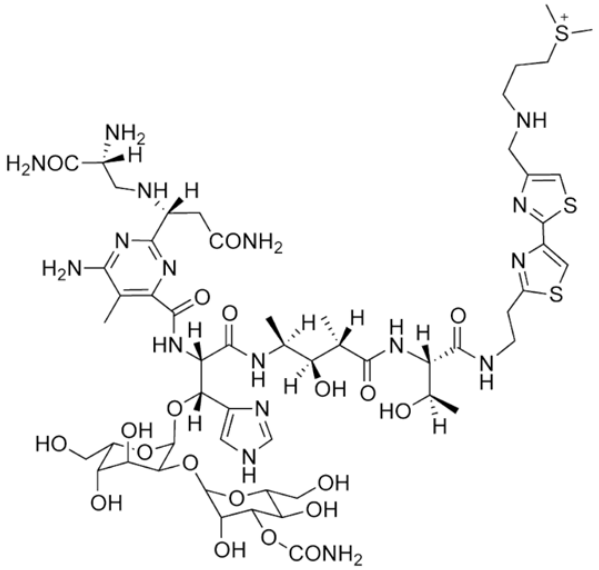
Fotokemijsko cijepanje DNA

Fotokemijsko cijepanje DNA dešava se obasjavanjem DNA elektromagnetskim zračenjem. Cijepanje se može desiti na različite načine,[42] i to odlaskom vodikovog atoma iz molekule pentoze uzrokovanim fotokemijski generiranim radikalima, [43] direktnim prijenosom elektrona s baza (gvanin),[44] proizvodnjom kisika ili nastankom adukata baza.[45]

I u ovom slučaju se vidi potencijal za razvoj lijekova koji fotokemijski mogu pocijepati DNA te na taj način inhibirati transkripciju, što dovodi do uništavanja DNA tijekom apoptoze stanice.

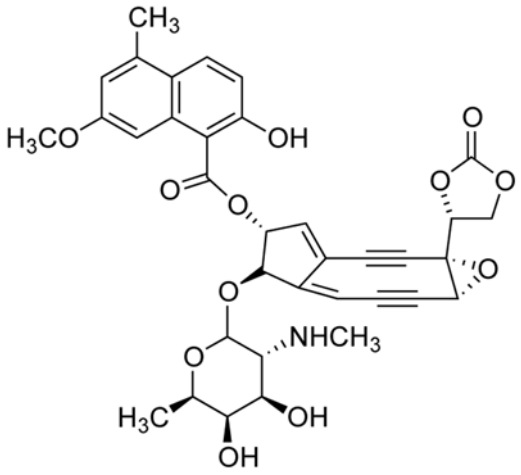
Spojevi koji uzrokuju cijepanje DNA

Postoje lijekovi iz različitih terapijskih područja koji uzrokuju cijepanje DNA. Klasični antitumorski glikopeptidni antibiotik bleomicin, koji se dobiva iz *Streptomyces verticillus* uzrokuje cijepanje DNA (slika 15). Bleomicin se čvrsto veže na gvanin u DNA, posebice u sekvencama bogatim GT i GC bazama. Kada ternarni kompleks Fe(II), bleomicina i kisika uđe u interakciju s DNA, izlučuju se atomi vodika. Rezultat toga su radikali koji stvaraju peroksidne vrste koje se raspadaju i uzrokuju cijepanje DNA lanaca.



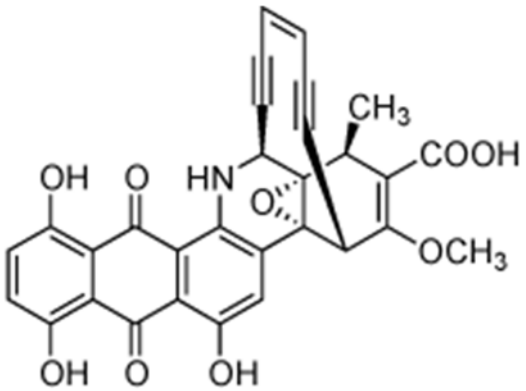
Slika 15: Struktura bleomicina

Sljedeća klasa antitumorskih lijekova su enadinski antitumorski antibiotici koji uzrokuju cijepanje DNA lanaca oksidacijom. Specifičnost struktura takvih lijekova, čiji je predstavnik neocarzinostatin (slika 16) je prisutnost makrocikličnog prstena s barem jednom dvostrukom i dvije trostruke veze. Oni ulaze u interakciju s malim utorom DNA, a tada tiol ili NADPH pokreću reakciju koja producira radikale koji uzrokuju cijepanje DNA lanaca.



Slika 16: Struktura neokarzinostatina

Mala molekula, dinemicin A (slika 17) kombinira svojstva antraciklina i enedijena. On se veže na DNA kombinacijom interkaliranja i vezanja u mali utor. Dinemicin se može aktivirati s NADPH, tiolima ili svjetlom, pa nakon što je ušao u interakciju s DNA uzrokuje cijepanje DNA.



Slika 17: Struktura dinemicina

3.2. Ravnotežne (nekovalentne) interakcije malih molekula s nukleinskim kiselinama

Kod ravnotežnih interakcija malih molekula s nukleinskim kiselinama najčešće nastaju termodinamički najstabilniji kompleksi male molekule i nukleinske kiseline. Općenito, ravnotežne nekovalentne interakcije malih molekula s DNA i RNA dijele se u tri skupine:

1) vezanje u utore DNA
2) interkaliranje između parova baza
3) elektrostatske interakcije poli kationa s negativno nabijenim fosfatima polinukleotida.[46]

Kod interakcija malih molekula s nukleinskim kiselinama ili polinukleotidima, u obzir se mora uzeti mnoštvo faktora, kao što su elektrostatska privlačenja fosfata iz DNA/RNA okosnice s malim molekulama, hidrofobni efekti, Van der Waalsove interakcije, π-π aromatske interakcije te specifična međudjelovanja supstituenata i heterocikličkih atoma interkalatora s DNA/RNA, kao što su vodikove veze, Londonova disperzijska sila, međudjelovanja itd.

Mnoge molekule se na DNA selektivno vežu ili vezanjem u utor ili interkaliranjem, no neke molekule mogu pokazivati oba načina vezanja. Način vezanja će ovisiti o najpovoljnijoj slobodnoj energiji za stvaranje kompleksa, a naposljetku će način vezanja ovisiti o DNA sekvenci i strukturi male molekule koja ulazi u interakciju.[47]

3.2.1. Vezanje u utore nukleinskih kiselina

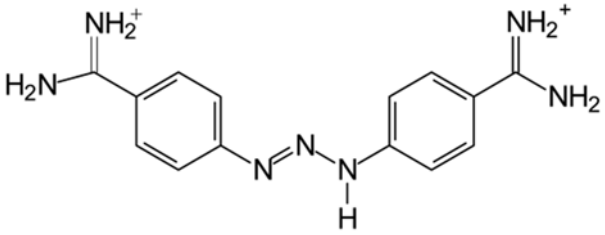
Male molekule koje se vežu u utore obično ulaze u interakcije s krajevima parova baza ili u velikom utoru (GC) ili malom utoru (AT) nukleinskih kiselina. Najčešće se male molekule vežu u mali utor.

Vezanje u mali utor ne uzrokuje velike strukturne promjene nukleinskih kiselina te se može smatrati načinom vezanja ključ-brava kakvo je opisano kod enzimskih reakcija. Spojevi koji se vežu u utor su obično građeni od serije heterocikličkih ili aromatskih prstena, koji čine zakrivljen središnji dio molekule koji posjeduju sposobnost rotacije, te pozitivno nabijene skupine i donore vodika na konveksnom kraju. Ta sposobnost rotacije je odlučujući faktor, jer da bi se mala molekula mogla vezati u mali utor nukleinskih kiselina, mora posjedovati konveksni oblik molekule[48] kako bi pristajala u konkavni oblik malog utora. Također u strukturi moraju postojati pozitivni naboji u pogodnom rasporedu kako bi oni mogli ući u reakciju s negativno nabijenim fosfatima polinukleotida.

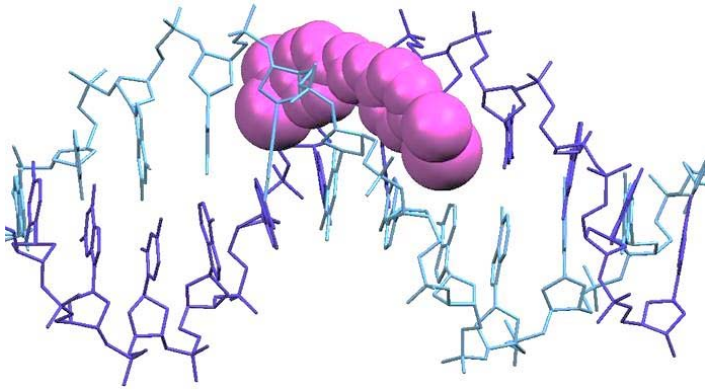
Kod vezanja u utore mala molekula identificira specifične sekvence DNA koje su u rasponu 16−18 parova baza koje su pogodne za stvaranje nekovalentne interakcije. Mala molekula tada ulazi u interakciju s krajevima parova baza u malom ili velikom utoru. Kako bi došlo do interakcije, voda koja se nalazi u utoru mora biti zamijenjena molekulom koja se veže u utor.

U literaturi je pokazano da u velikom broju slučajeva molekule koje se vežu u utore preferiraju mali utor DNA, za razliku od RNA gdje preferiraju veliki utor.[49] Ta činjenica se može jednostavno objasniti dimenzijama malog utora RNA koji je puno širi i plići od onog DNA te svojim oblikom ne odgovara ovim spojevima. Nadalje, većina malih molekula koje se vežu u mali utor pokazuju izrazitu selektivnost prema A-T bogatim sljedovima baza DNA, što se objašnjava nepovoljnim steričkim utjecajem amino skupina u G-C sljedovima DNA. Kod nekih spojeva se stvaraju vodikove veze s adeninskim bazama polinukleotida.

Primjeri molekula koje se vežu u utore su berenil, distamicin, netropsin ili Hoechst 33258. Molekulska struktura berenila i njegov kompleks DNA su prikazani na slici 18 i slici 19.

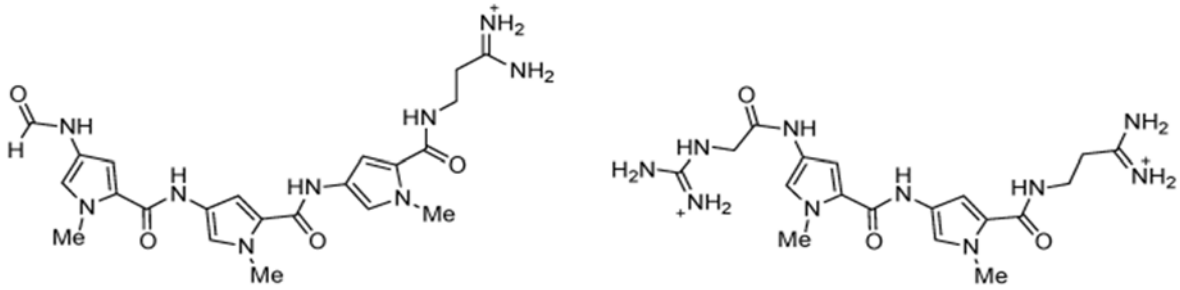


Slika 18: Molekulska struktura berenila



Slika 19: Vezanje molekule berenila u mali utor DNA[50]

Distamicin i netropsin su prirodni produkti čije strukture uključuju amido grupe te tri (distamicin) i dva (netropsin) N-metil pirolna prstena (slika 20).



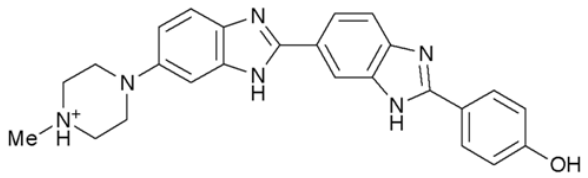
Slika 20: Strukture distamicina (lijevo) i netropsina (desno)

Distamicin i netropsin ulaze u interakciju s AT bogatim sljedovima DNA u malom utoru stvarajući vodikove veze te hidrofobnim interakcijama. Terminalna amidinska grupa

molekule je bazična (protonirana pri fiziološkom pH) pa pomoću nje molekule distamicina i netropsina intereagiraju s negativno nabijenim fosfodiesterskim kosturom DNA. Amino grupa na gvaninu sterički ometa vezanje distamicina u mali utor DNA, pa distamicin pokazuje selektivnost prema sljedovima AT.[51]

Molekula distamicina se može vezati u manji utor nukleinske kiseline samostalno ako se u slijedu DNA nalaze do 4 uzastopna para baza AT, no ukoliko je u nizu pet parova baza AT ili četiri para baza AT i jedan par baza GC, dvije molekule distamicina s nabijenim skupinama na suprotnim stranama smjestit će se u isti utor i tako tvoriti dimer. Molekula netropsina zbog elektrostatskih odbijanja pozitivno nabijenih krajeva molekule ne može stvarati dimer.[52]

Molekula Hoechst 33258 (slika 21) se također veže u mali utor DNA, a stehiometrija kompleksa je kao i kod netropsina ovisna o slijedu parova baza i može biti monomerna ili dimerna, ali se vezanje molekula ostvaruje na drugačiji način nego u slučaju distamicina.[53]



Slika 21: Molekulska struktura Hoechsta 33258[51]

3.2.2. Interkaliranje između parova baza

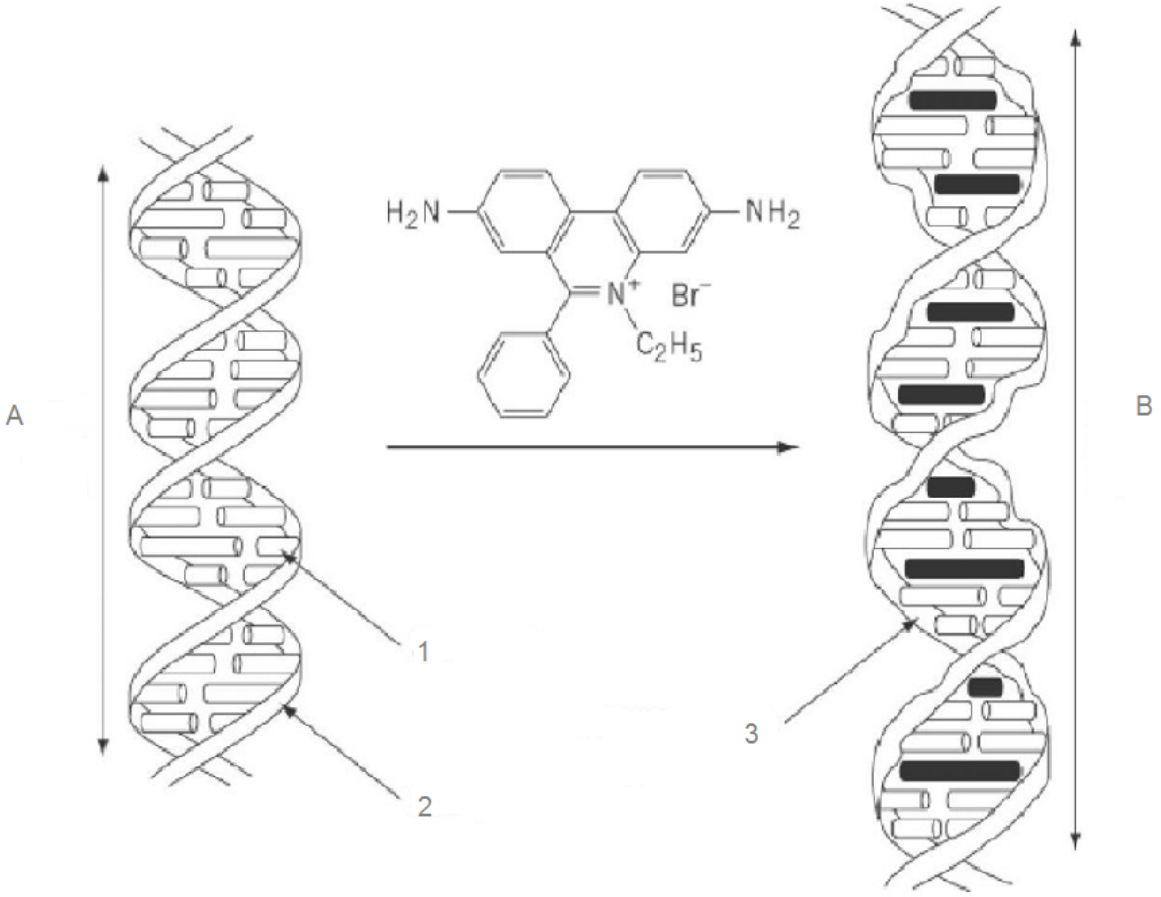
Dvolančani polinukleotidi, ali i neki jednolančani polinukleotidi u vodenim medijima tvore uređene helikalne strukture zahvaljujući π-π interakcijama između parova baza. No te molekule nisu rigidne u toj mjeri da se parovi baza ne bi mogli razmicati. Ukoliko se u mediju uz nukleinsku kiselinu nalazi i aromatska molekula planarne strukture, ona se može umetnuti između parova baza. Taj proces umetanja molekule između parova baza se naziva interkaliranje.[46]

Interkaliranje kao nekovalentno vezanje malih molekula na DNA je prvi otkrio L. Lerman 1961. godine istražujući derivate akridina.[54] Interkalatori su molekule malih molekulskih masa koje sadrže policikličke strukture, najčešće aromatske, a kako bi molekula mogla biti interkalator ona mora biti planarna. Dodatno, interkalator, odnosno van der Waalsovi promjeri atoma moraju biti dovoljno mali kako bi se mogli smjestiti između parova baza. Uobičajeno, dulja os aromatske molekule interkalatora je paralelna s duljom osi parova baza između kojih je aromat interkaliran, na taj način ostvarujući maksimalni kontakt aromatskih interakcija.

Primjeri molekula koje djeluju kao interkalatori su berberin, etidijev bromid, proflavin, daunomicin, doksorubicin, talidomid, karteusin i mnoštvo drugih.

Prilikom vezanja interkalatori uzrokuju drastične promjene u strukturi nukleinskih kiselina, kao što je stabilizacija i ukrućivanje, odvijanje i deformacije DNA lanaca. Npr., odvijanje lanaca uzrokuje produljenje DNA uzvojnice za otprilike 3,4 Å, te posljedično promjenu kiralnih svojstava DNA.

Interkalacija se dešava po principu ″isključivanja susjeda″ (engl. *Neighbour exclusion principle*)[55,56] što u praksi znači da ukoliko je došlo do interkalacije između određenog para baza, interkaliranje između prvog susjednog para baza je zabranjeno (slika 22).



Slika 22: **Shematski prikaz A) DNA lanac prije vezanja interkalatora te B) nakon vezanja etidijevog bromida. Prije vezanja etidijevog bromida DNA je očekivane duljine a nakon vezanja etidijevog bromida lanac je produžen, odvijen te deformiran. 1) označava nukleotid, 2) fosfatnu okosnicu, 3) interkalirani etidijev bromid (crno obojen).[57]**

Predloženi mehanizam interkaliranjauključuje niz kompleksnih događaja.[55,58,59] Kako su molekule interkalatora najčešće pozitivno nabijene, dolazi do elektrostatskog privlačenja od strane fosfata te smještanja molekule u blizinu nukleinske kiseline.

Dodatno dolazi do hidrofobnih interakcija između aromatskih molekula interkalatora koje dodatno stabiliziraju nastali elektrostatski kompleks. Visoka koncentracija molekula interkalatora u blizini nukleotida pogoduje umetanju planarnog dijela molekule između parova baza. Taj proces je termodinamički preferiran zbog pozitivnog doprinosa entropije uzrokovanog micanjem vode koja se nalazi okolo molekula liganda.[60] Kako bi se ligand mogao umetnuti između parova baza DNA mora proći konformacijsku promjenu, djelomično

se odviti te povećati vertikalni prostor između susjednih parova baza.[61] Kada je ligand umetnut između parova baza on je stabiliziran mnoštvom nekovalentnih interakcija, kao što su vodikove veze, Londonove sile, van der Waals i π-π interakcije između aromatskih skupina interkalatora i susjednih baza, smanjenjem odbojnih sila između fosfata koja je posljedica produljenja polinukleotida itd. [46,62]

Kako bi se povećala efikasnost vezanja interkalirajućih spojeva, dizajnirani su bifunkcionalni spojevi koji se zovu bisinterkalatori.[63] Bisinterkalatori sadrže dvije jedinice koje mogu interkalirati, a odvojene su poveznicom tj. lancem koji mora biti dovoljno dugačak kako bi se mogla desiti bisinterkalacija, a da se poštuje pravilo isključenja susjeda.

Kao i kod interkalatora, stabilnost nastalog kompleksa se povećava ukoliko je interkalator pozitivno nabijen. Interkalatori odnosno bisinterkalatori ne pokazuju specifičnu selektivnost prema određenim sljedovima parova baza kao što to pokazuju spojevi koji se vežu u mali utor.

3.2.3. Elektrostatske interakcije polikationa s negativno nabijenim fosfatima polinukleotida

Postoji mnogo klasa malih molekula koje mogu stupiti u interakciju s DNA/RNA. U biološkim sustavima, molekule su odgovorne za pojavu raka, ali i upalnih procesa najčešće su poliamini po kemijskom sastavu.[64] To su molekule male molekulske mase i u biološkim sustavima se nalaze najčešće u obliku pozitivno nabijenih kationa.[65,66]

Poliamini, poput putrescina, spermidina i spermina sudjeluju u proliferaciji i diferencijaciji stanica, replikaciji DNA, sintezi proteina, stabilizaciji membrane te u aktivaciji enzima kao što su kinaze i topoizomeraze. Egzogeni poliamini i njihovi analozi se s lakoćom transportiraju u stanice, a primjećena je njihova povećana koncentracija kod pojave bolesti kao što su karcinomi, psorijaza te srpasta anemija.[67]

U fiziološkim uvjetima, poliamini se vežu na proteine, ali i nukleinske kiseline. Kako su u fiziološkim uvjetima poliamini pozitivno nabijeni oni ulaze u prvenstveno elektrostatske interakcije s organskim anionima, kao što su nabijene fosfatne skupine u DNA/RNA. Sama

priroda vezanja, a i mnoštvo negativno nabijenih skupina u fiziološkim uvjetima, implicira malu ili nikakvu selektivnost poliamina prema određenom slijedu polinukleotida.

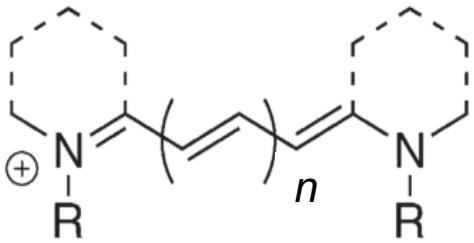
Do danas, točan opis interakcija poliamina s DNA/RNA nije objavljen, pogotovo mjesta vezanja, geometrija vezanja niti utjecaj vezanih poliamina na supstrat, u ovom slučaju DNA. Prema dostupnoj literaturi poliamini stabiliziraju DNA prilikom alkalne ili termičke denaturacije, pucanja lanaca kod primijenjene sile smicanja, pod utjecajem zračenja te sprečavaju interkalaciju organskih molekula, itd. Također, pokazano je da poliamini i njihovi acetilirani derivati stabiliziraju Z-DNA, pa samim time mogu stabilizirati konformaciju B-DNA te RNA.[68]

3.3. Cijaninske boje

Cijaninske boje spadaju u jedne od najstarijih sintetskih boja čije ime potječe od prve sintetizirane boje iz te klase, od strane Williamsa, 1856. godine.[69] Sintetizirana boja je bila plava. Kroz sljedeće stoljeće i pol sintetizirane su stotine cijaninskih boja zbog široke primjene u industriji, pogotovo tekstilnoj. Kasnije se zbog vrlo široke palete, primjena cijaninskih boja preselila i na fotografiju jer su omogućavale izradu fotografija vrlo živih boja.[70] Najnovija primjena cijaninskih boja leži u biotehnološkom sektoru, gdje njihova primjena počiva na svojstvu cijaninskih boja da mogu emitirati svjetlo tj. fluorescirati. Štoviše njihova primjena je vrlo raširena u području fluorescentnog obilježavanja i senzora za detekciju i obilježavanje bioloških materijala. Mnoga od tih svojstava se baziraju na interakciji cijaninskih boja s DNA i RNA, što je i predmet ovog istraživanja.

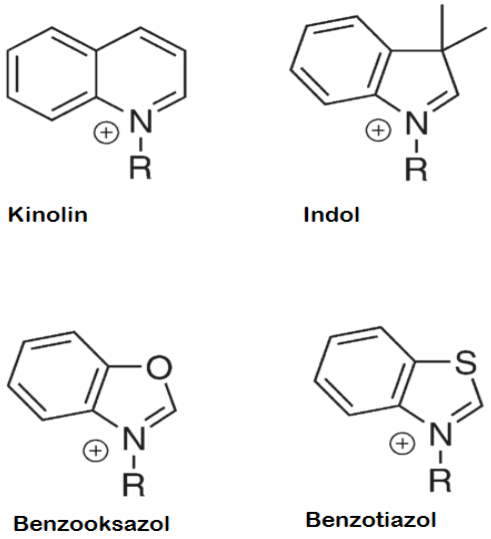
Cijaninske boje su kationske molekule u kojima su dvije terminalne heterocikličke dušikove podjedinice povezane polimetinskim lancem koji sadrži neparan broj C atoma. Upravo zbog poveznice- polimetinskog lanca, cijaninske boje se još nazivaju i polimetinske boje.

Cijaninske boje se mogu prikazati i općenitom strukturom kako je pokazano na sljedećoj slici (slika 23).



Slika 23: Opća struktura cijaninskih boja *n* = 1, 3, 5,.., a R = H ili supstituenti.

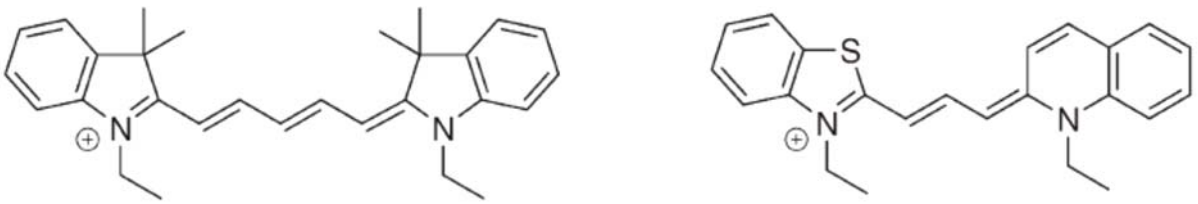
U praksi dušikovi atomi su najčešće dio heterocikličke aromatske grupe i alkilirani su. Najčešće heterocikličke podjedinice cijaninskih boja su indol, kinolin, benzoksazol te benzotiazol (slika 24).



Slika 24: Strukture najčešćih heterocikličkih aromatskih grupa

Struktura cijaninskih boja sastavljena od dvije heterocikličke podjedinice povezane polimetinskim mostom omogućuje delokalizaciju pozitivnog naboja između dva dušika. Varijacijom duljine polimetinskog lanca te identiteta heterocikličke strukture moguće je utjecati na apsorpciju i emisiju elektromagnetskog zračenja u rasponu od vidljivog prema infracrvenom dijelu spektra, što omogućava sintezu spojeva očekivanih i traženih svojstava. Mijenjanjem duljine polimetinskog lanca, supstituenata na dušiku ili heterocikličke strukture tijekom godina sintetizirano je mnoštvo cijaninskih boja s vrlo različitim svojstvima. Neke od tih boja su komercijalno dostupne.

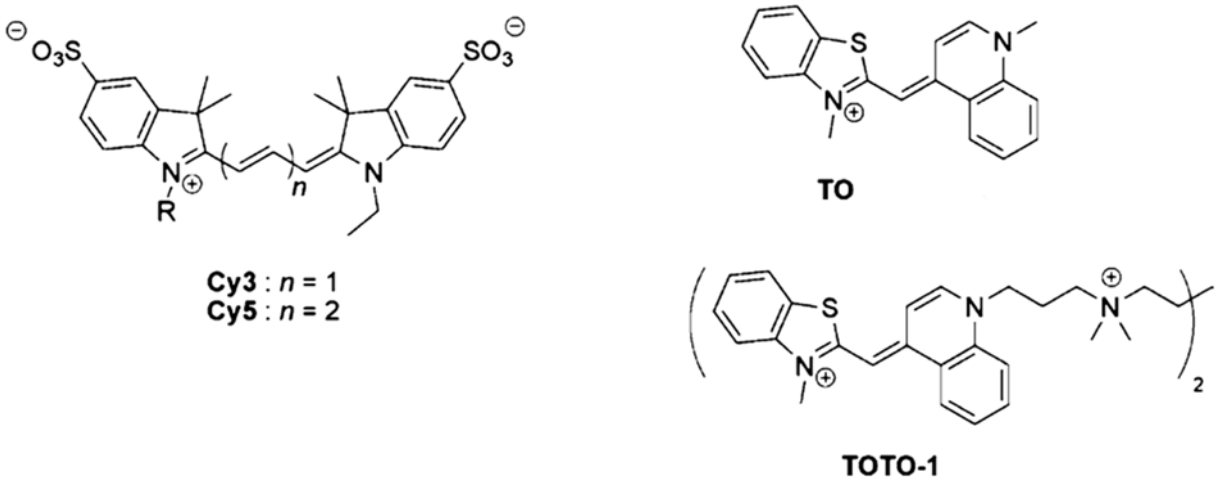
Cijaninske boje se mogu prema strukturi kromofora podijeliti na simetrične i nesimetrične. Primjeri simetričnih i nesimetričnih cijaninskih boja prikazani su na slici 25.



(a) (b)

Slika 25: Strukture cijaninskih boja (a) simetrične i (b) nesimetrične

Primjeri komercijalno dostupnih simetričnih boja kao što su **Cy3** i **Cy5** te nesimetričnih boja kao što je *thiazol orange* (**TO**) ili njegov dimer **TOTO-1** prikazani su na slici 26.



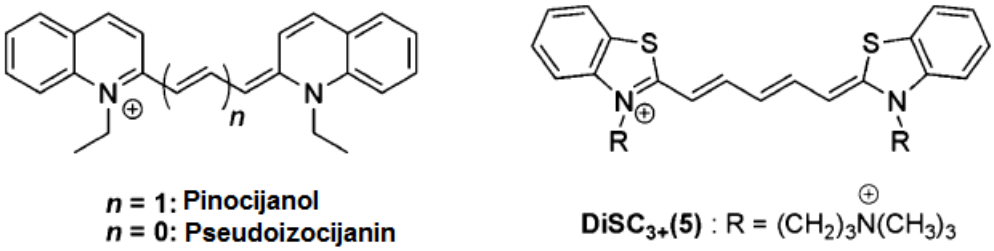
Slika 26: Primjeri komercijalno dostupnih simetričnih (a) i nesimetričnih (b) cijaninskih boja

Općenito cijaninske boje s polinukleotidima ulaze u interakciju na dva načina: vezanjem u mali utor ili interkaliranjem (bisinterkaliranjem).[14] Planarne heterocikličke strukture koje se nalaze na krajevima molekula s DNA ulaze u interakciju kao interkalatori, dok je polimetinski lanac dovoljno fleksibilan da se može saviti u oblik pogodan za vezanje u utore. Promjena u duljini polimetinskog lanca, supstituenata ili čak i u slijedu polinukleotida u lancu nukleinskih kiselina, kao posljedicu može imati različit način vezanja.

Interakcije cijaninskih boja s polinukleotidima se mogu razlikovati obzirom na simetriju molekula. Često se načini vezanja simetričnih cijaninskih boja razlikuje od vezanja nesimetričnih cijaninskih boja.

3.3.1. Simetrične cijaninske boje

Simetrične cijaninske boje se mogu na polinukleotide vezati nekovalentnim interakcijama kao što je pokazano za pinacijanol,[71] koji se na DNA veže u utor, ili intekaliranjem kako je u literaturi pokazano za pseudoizocijanin.[72] Oni se također mogu vezati i mješovitim načinom kao interkalatori i vezanjem u mali utor, kako je pokazano za trikationsku cijaninsku boju **DiSC$_{3+}$(5)**.[73]



Slika 27: Molekulske strukture simetričnih cijaninskih boja[14]

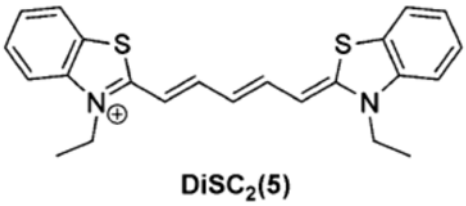
Novije simetrične cijaninske boje, pogotovo analozi **DiSC** s modificiranim polimetinskim mostom su pokazale višestruko pojačanje fluorescencije prilikom vezanja na polinukleotide, koji je primjerice za **DiSC1(3)** 4,6 puta veći nego za slobodnu boju, dok je za **Cyan2**, u kojem je metilna skupina vezana na polimetinski lanac, to povećanje fluorescencije 178 puta.[14] Molekulska strukture analoga **DiSC** je prikazan na slici 28.



Slika 28: Molekulske strukture analoga simetričnih cijaninskih boja DiSC[14]

Tako drastična razlika u povećanju fluorescencije pripisuje se drugačijoj stereokemiji trimetinskog lanca zbog supstituenta R, koji je u slučaju **Cyan2** metilna skupina (slika 28). Sintezom se **Cyan2** dobiva u *cis*-obliku koji je nefluorescentan, dok prilikom vezanja na DNA dominira *trans*-oblik, koji je fluorescentan. Simetrične cijaninske boje pokazuju

sklonost stvaranju agregata, a primjer boje koja u prisutnosti hibridne ds-DNA radi helikalne strukture je **DiSC$_2$(5).**



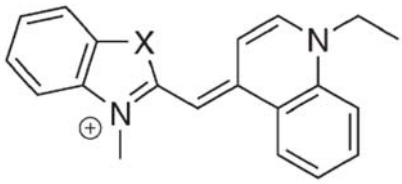
Slika 29: Molekulska struktura DISC$_2$(5) [14]

3.3.2. Nesimetrične cijaninske boje

Nesimetrične cijaninske boje se sastoje od dva različita aromatska prstena povezana vezom koja je dio konjugiranog sustava.[74]

Postoji mnoštvo sintetiziranih nesimetričnih cijaninskih boja koje su i komercijalno dostupne. Fluorescencijska svojstva nesimetričnih cijaninskih boja su razlog brojnim istraživanjima. Naime, nesimetrične cijaninske boje su intrinzično ne fluorescentne ili pokazuju vrlo malu fluorescenciju. Razlog tome je što se inicijalno pobuđeno stanje relaksira ne emitirajući svjetlo, kroz torzijsku relaksaciju koja je omogućena zbog polimetinskog mosta koji povezuje dva kromofora.[75] Ta konformacijska mobilnost je značajno smanjena uslijed vezanja na DNA, pogotovo ako se radi o interkaliranjui između dva para baza, pa se za nesimetrične cijaninske boje redovito dobiva pojačana emisija zračenja, koja je vrlo često reda veličine 1000x ili veća.

Thiazol orange (**TO**) i *Oxazol yellow* (**YO**) su primjeri nesimetričnih cijaninskih boja čija se struktura bazira na benzotiazolnim, benzooksazolnim i kinolinskim heterociklima (slika 30). Fluorescencijska svojstva tiazol narančaste i oksazol žute boje su dovela do brojnih istraživanja njihovih svojstava, ali i sinteza mnoštva derivata tih boja. Mnoge od tih boja su komercijalno dostupne, a redovno se koriste kao probe za detekciju DNA te čak kao probe za detekciju strukture nukleosoma.



Slika 30: Struktura nesimetrične cijaninske boje, tiazol narančasto (TO) X = S, oksazol žuto (YO) X = O

Tiazol narančasto (**TO**) se veže na dvostruku uzvojnicu DNA sa stehiometrijom karakterističnom za interkalatore, tj. jednom molekulom boje na dva para baza.[76] Za spoj **TO** su rađena mnoštva ispitivanja, a viskozimetrijska ispitivanja su pokazala da se uslijed vezanja **TO** na DNA viskoznost povećava u odnosu na čistu DNA, što je dokaz interkalativnog vezanja.[77] Analogno tome, i **YO** pokazuje dominantno interkalacijsko vezanje.

Spektroskopska svojstva tiazol narančaste boje (**TO**) su ispitana UV/Vis i fluorescencijskim mjerenjima od strane Nygrena, Svanvika i Kubiste (1998).[74] Rezultati njihovih ispitivanja pokazuju da **TO** agregira u vodenom medijiu. Monomer boje je moguće dobiti samo pri vrlo niskim koncentracijama ili pri visokim temperaturama. Nadalje, autori su proveli ispitivanja interakcija **TO** s polinukleotidima i to *ct*-DNA, poli dAdT-poli dAdT, poli dGdC-poli dGdC, poli dA, poli dG, poli dC i poli dT.

Rezultati tih ispitivanja su sumirani u tablici 3. Rezultati pokazuju da se uslijed vezanja **TO** na polinukleotide dramatično povećava fluorescencija. Isto tako, pokazano je da se **TO** veže na polinukleotide AT i GC s istom konstantom, dakle ne pokazujući posebnu specifičnost prema određenom slijedu polinukleotida.[74]

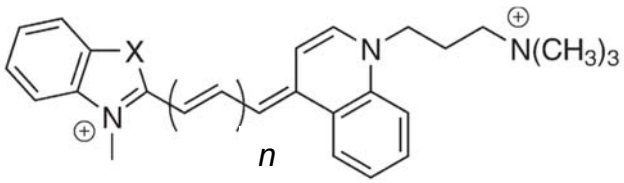
Tablica 3: Sumarni rezultati ispitivanja interakcija TO s polinukleotidima[74]

Kompleks	Kvantni prinos fluorescencije (25 °C)	log K_s
TO	0,0002	-
TO-*ct*-DNA	0,11	5,5
TO- poli dAdT-poli dAdT	0,07	5,5
TO- poli dGdC-poli dGdC	0,11	5,5
TO-poli(dA)	0,09	4,8
TO-poli(dG)	0,39	4,8
TO-poli(dC)	0,06	3,4
TO-poli(dT)	0,01	2,3

Interakcije cijaninske boje oksazol žuto (**YO**) i njegovog homo dimera **YOYO** s DNA istraživane su pomoću optičkih pinceta (engl. *Optical Tweezers*) te fluorescencijskom mikroskopijom, a pokazano je da konstante ravnoteže reakcije vezanja na DNA rastu kao funkcija sile. Određena je konstanta ravnoteže reakcije vezanja **YO** i **YOYO** na DNA pri sili jednakoj nuli i ona za **YO** iznosi $5{,}78 \times 10^5$ mol^{-1} dm^3 (log $K_s = 5{,}76$) dok za **YOYO** iznosi 3.875×10^6 mol^{-1} dm^3 (log $K_s = 6{,}6$).[78] Određena vrijednost Konstante ravnoteže reakcije vezanja**YOYO** na DNA je puno manja od objavljene teorijske konstante ravnoteže reakcije vezanja koja iznosi 10^{10} mol^{-1} dm^3–10^{12} mol^{-1} dm^3.[79]

Tijekom godina, sintetizirani su i karakterizirani mnogi derivati boja **TO** i **YO**, a neki primjeri kao što su **TO-PRO-1**, **TO-PRO-3** ili **YO-PRO-1** u ovisnosti o duljini polimetinskog lanca pokazuju razliku u odnosu na **TO** i **YO**.

Strukture tih spojeva su prikazane na slici 31.

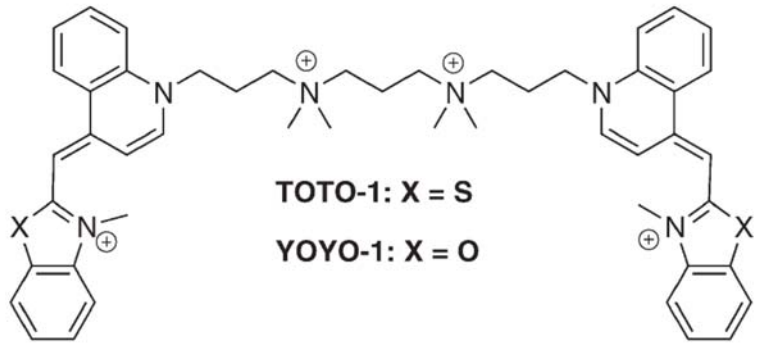


TO-PRO-1: X = S, *n* = 1
TO-PRO-3: X = S, *n* = 1
YO-PRO-1: X = O, *n* = 1

Slika 31: Struktura derivata TO i YO

Za dikationski spoj **YO-PRO-1**, analoga oksazol žute boje je pokazano da se također veže s DNA kao interkalator, dok se za **TO-PRO-3** u odnosu na **TO-PRO-1** utvrdilo da pokazuje mješovite načine vezanja. Produljenjem lanca, ti derivati uz interkalativan način vezanja na DNA, pokazuju i vezanje koje je karakteristično za spojeve koji se vežu u utor.

Homo dimeri **TO** i **YO**, **TOTO-1** i **YOYO-1** čija je struktura prikazana na slici 32 u interakciju s DNA ulaze kao bis interkalatori.



Slika 32: Struktura homodimera TO i YO, TOTO-1 i YOYO-1

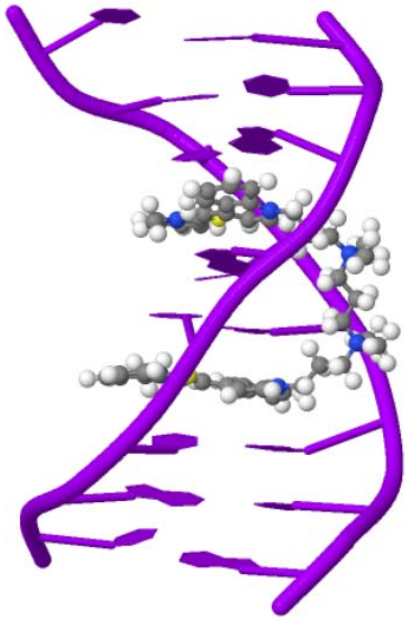
Struktura kompleksa **YOYO-1**[80] i **TOTO-1**[81] s A- i B- ds-DNA određena je spektroskopijom NMR, a autori su pokazali da se policiklički dijelovi molekule bis-interkaliraju između parova baza, dok se polimetinski lanac nalazi u malom utoru DNA. Kod kompleksa **TOTO-1** s B- ili A- ds-DNA dolazi do distorzije strukture DNA, te njenog produljenja. Uzvojnica se uslijed interkaliranja odvija za 60°, te tada sadrži 12 parova baza po zavoju. Uslijed vezanja također dolazi i do promjene stereokemije benzotiazolnog prstena koji se savija prema kinolinskom prstenu, za razliku od slobodnog **TOTO**.

TOTO-1 je pokazao značajnu selektivnost prema CTAG-CTAG domenama, što autori objašnjavaju njegovom sposobnosti da se prilagodi osnovnom paru baza dvolančane DNA kako bi se optimizirala molekulska slaganja i hidrofobna interakcija između timidinske metilne skupine i benzotiazolnog prstena.[81]

Za **TOTO-1** je nađeno da se fluorescencija povećava za 3000 puta uslijed vezanja na dvolančanu DNA. To je omogućeno ukrućivanjem strukture, koja se kod slobodnog **TOTO-1** može slobodno rotirati oko metinskih veza te se relaksacija iz pobuđenog stanja dešava bez

emisije elektromagnetskog zračenja. Kad je **TOTO-1** vezan na DNA, njegovi benzotiazolni i kinolinski prsteni su fiksirani nukleobazama što onemogućava rotaciju oko te veze, pa se apsorbirana energija kromofora otpušta emisijom zračenja.

Vizualizacija sekundarne strukture B-DNA uslijed vezanja **TOTO-1** kao bis-interkalatora prikazana je na sljedećem trodimenzionalnom prikazu (slika 33).



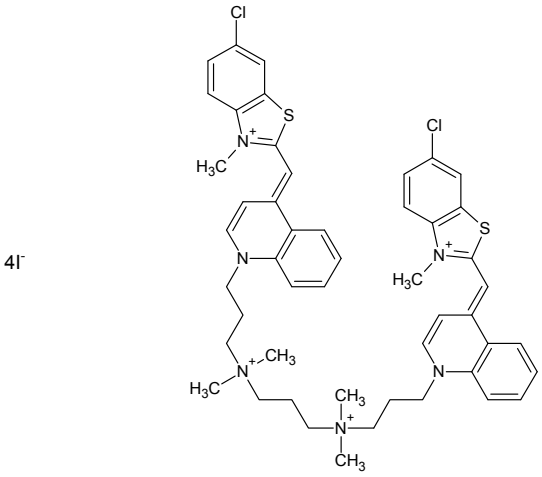
Slika 33: Prikaz bisinterkalativnog vezanja TOTO-1 na B-DNA, PDB 108D[81]

§ 4. EKSPERIMENTALNI DIO

4.1. Istraživani spojevi

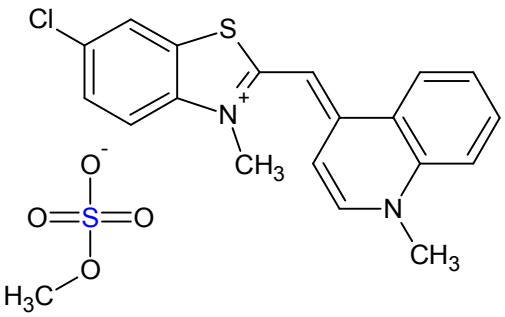
U izradi rada korišteni su modificirani dimeri i monomeri komercijalno dostupnih cijaninskih boja *Thiazol orange* (**TO**, **TOTO-1**) i *Oxazol Yellow* (**YO**, **YOYO-1**), sintetizirani u laboratoriju izv. prof. T. Deligeorgieva, Kemijskog fakulteta u Sofiji, Bugarska.[15] Navedeni spojevi su dobiveni supstitucijom vodika na položaju C6 tiazolnog odnosno oksazolnog prstena. Dobiveni spojevi su korišteni bez dodatnog pročišćavanja.

6-Cl-TOTO-1



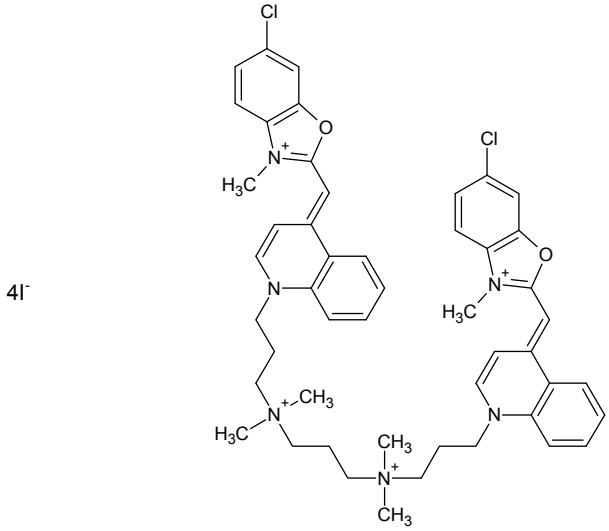
1,1'-(4,4,7,7-Tetrametil-4,7-diazaundekametilen)-bis-4-(3-metil-2,3-dihidro-(6-kloro-benzo-1,3-tiazol)-2-metiliden)-kinolin tetra jodid

6-Cl-TO-1



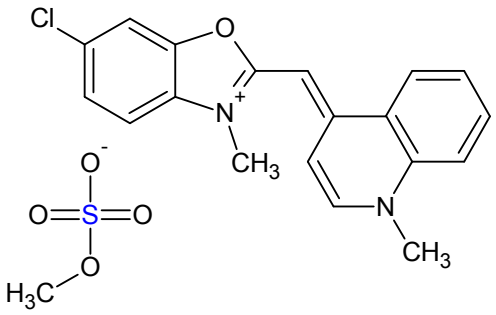
1,1-metill-4-[-(3-metil-2,3-dihidro-(6-kloro-benzo-1,3-tiazol)metil]kinolin tosilat

6-Cl-YOYO-1



1,1'-(4,4,7,7-Tetrametil-4,7-diazaundekametilen)-bis-4-(3-metil-2,3-dihidro-(6-kloro- benzo-1,3-oksazol)-2-metiliden)-kinolin tetra jodid

6-Cl-YO-1



1,1-metill-4-[-(3-metil-2,3-dihidro-(6-kloro-benzo-1,3-oksazol)metil]kinolin tosilat

4.2. Kemikalije

Natrijev kakodilat, p. a., Sigma

Calf thymus DNA (*ct*-DNA), p.a., Aldrich

poli dA-poli dT, p.a., Sigma

poli dAdT-poli dAdT, p.a., Sigma

poli dG-poli dC, p.a., Sigma

poli dGdC-poli dGdC, p.a., Sigma

poli rA-poli rU, p.a., Sigma

DMSO-d6, čistoća za NMR analizu, Sigma

4.3. Priprema otopina

4.3.1. Otopine polinukleotida

Otopine polinukleotida poli dA-poli dT, poli dAdT- poli dAdT, poli dG-poli dC, poli dGdC-poli dGdC, poli rA-poli rU te *ct*-DNA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) pripremljene su otapanjem u puferu natrijevog kakodilata, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3}, pri 25 °C. Otopina *ct*-DNA je dodatno sonificirana te profiltrirana kroz filtar s veličinom pora od 0,45 μm kako bi se ujednačila duljina lanaca.[82] Koncentracija ishodnih otopina određena je spektrofotometrijski kao koncentracija fosfata.[83]

4.3.2. Otopine cijaninskih boja

Mala količina 0,5−1 mg cijaninskih boja odvagano je na analitičkoj vagi u odmjernu tikvicu volumena 2,00 mL te nadopunjeno do oznake demineraliziranom vodom (za pokuse određivanja molarnih apsorpcijskih koeficijenata) ili u kakodilatnom puferu pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3}.

4.4. Materijali i metode

4.4.1. Spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije

Spektri nuklearne magnetske rezonancije (NMR) snimljeni su na instrumentu Bruker DRX 500, 5 mm PABBI proba na 25 °C. Uzorci su otopljeni u deuteriranom dimetilsulfoksidu (DMSO-d6). Korištena je koncentracija uzorka od 12 mg/mL. Kao unutrašnji standard korišten je tetrametilsilan (TMS), prema kojem su pomaci izraženi u ppm, a konstante homonuklearne skalarne sprege (*J*) u Hz. Signali su označeni kao s (singlet), d (dublet), t (triplet), q (kvartet) i m (multiplet).

4.4.2. Masena spektrometrija

Analiza masene spektrometrije visoke razlučivosti (*HRMS*) elektroraspršenjem s analizatorom vremena leta MS (*ESI-TOF*) uzorka je proveden na instrumentu Synapt G2-Si (Waters), metodom direktnog ubrizgavanja uzorka. Korištena je ishodna otopina uzorka **6-Cl-TOTO-1** u DMSO, koncentracije 12 mg/mL.

4.4.3. Infracrvena spektroskopija

FT-IR spektar uzorka **6-Cl-TOTO-1** sniman je na instrumentu Nicolet 6700 koristeći prigušenu totalnu refleksiju (ATR) s kristalom dijamanta. Spektar je sniman u području valnih brojeva 4000-400 cm^{-1}, uz razlučivanje 2 cm^{-1}. Spektar je dobiven usrednjavanjem 32 snimaka. Za ATR tehniku, nije potrebna priprema uzorka, mala količina uzorka je direktno stavljena na kristal. Kao pozadina snimljen je spektar zraka.

4.4.4. Diferencijalma pretražna kalorimetrija

Termogram diferencijalne pretražne kalorimetrije (DSC) uzorka **6-Cl-TOTO-1** je snimljen na instrumentu DSCQ2000 (TA Instruments) u temperaturnom području 20−300 °C, u standardnoj aluminijskoj posudici, s brzinom zagrijavanja 10 °C/min. Kao plin za ispiranje korišten je dušik brzine protoka 50 mL/min.

4.4.5. Termogravimetrijska analiza

Termogravimetrijska analiza uzorka **6-Cl-TOTO-1** je provedena na instrumentu TGAQ5000 (TA Instruments). Analize su provedene u temperaturnom području od 25 °C do 500 °C, u otvorenoj platinskoj posudici, s brzinom zagrijavanja 10 °C/min. Kao plin za ispiranje korišten je dušik brzine protoka 25 mL/min.

4.4.6. UV/Vis spektroskopija

UV/Vis spektri su snimani na spektrofotometrima Varian Cary 50 i Varian Cary 100 Bio. Svi uzorci su tijekom snimanja termostatirani t = (25 °C ± 0,1) °C, koristeći kvarcne kivete optičkog puta 1 cm.

UV/Vis spektri su snimljeni tako da je u kvarcnu kivetu, duljine puta 1 cm, pipetirano 1,00 mL redestilirane vode, kojoj je snimljena bazna linija. U tu kivetu su dodavani alikvoti ishodne otopine cijaninske boje tako da su dobivene otopine u koncentracijskom rasponu od 7 × 10^{-7} mol dm^{-3} do 2 × 10^{-5} mol dm^{-3}.

4.4.7. UV/Vis titracije

UV/Vis titracije su provedene tako da je u otopinu cijaninske boje u malim alikvotima dodavana ishodna otopina polinukleotida.
Mjerenja su napravljena u rasponu valnih duljina od 220 nm do 750 nm.

U sklopu UV/Vis pokusa provedeni su i eksperimenti termičke stabilnosti otopina cijaninskih boja, tako da je u termostatiranom bloku pri (25 ± 0,1) ºC, pa postupnim zagrijavanjem sve do 90 ºC u intervalima od 10 ºC sniman spektar. Nakon toga je ponovno snimljen spektar ispitivane boje na 25 ºC. UV/Vis spektri su snimani na spektrofotometru Varian Cary 100 Bio.

4.4.8. Određivanje temperature mekšanja

Mekšanje polinukleotida odnosno disocijacija dvostruke zavojnice DNA i RNA (poli dA-poli dT, poli dAdT-poli dAdT, poli rA-poli rU, *ct*-DNA) i njihovih kompleksa s cijaninskim bojama određena je spektrofotometrijski koristeći UV/VIS spektrofotometar Cary 100 Bio (Varian) prema ranije opisanim metodama prateći promjene apsorbancije pri 260 nm kao funkciju temperature.[84] Analize su provedene u temperaturnom području od 25 °C do 98 °C u koracima od 0,5 °C koristeći kvarcne kivete optičkog puta 1 cm. Temperature mekšanja, t_m, su određene u točki infleksije krivulje ovisnosti promjene apsorbancije o promjeni temperature derivacijom te provjerom dobivenih vrijednosti metodom tangente.[1,85] Vrijednosti Δt_m su izračunate oduzimanjem vrijednosti t_m slobodne nukleinske kiseline od vrijednosti t_m kompleksa nukleinske kiseline s ispitivanim bojama. Izražene vrijednosti Δt_m (s greškom instrumenta ± 0,5 °C) su srednje vrijednosti najmanje dva paralelna mjerenja.

4.4.9. Fluorescencijske titracije

Fluorescencijski spektri su snimani na spektrofotometru Perkin Elmer LS55, koristeći kvarcne kivete optičkog puta 1 cm. Svi uzorci su tijekom snimanja termostatirani na *(*25 ± 0,1) °C, a spektri su pohranjeni kao datoteke ASCII.

Sve otopine su pripremljene u kakodilatnom puferu pH = 7 ionske jakosti I = 0,05 mol dm^{-3}. Fluorimetrijske titracije su provedene tako da je u otopinu cijaninske boje u malim alikvotima dodavana ishodna otopina polinukleotida.

Koncentracije cijaninskih boja u kiveti bile su:

a) **6-Cl-TOTO-1** (c = 2,79 × 10^{-8} mol dm^{-3} (poli dA-poli dT), c = 8,4 × 10^{-8} mol dm^{-3} (poli dAdT-poli dAdT, poli A–poli U), c = 2,79 × 10^{-8} mol dm^{-3} (poli dGdC-poli dGdC), c = 1,67× 10^{-7} mol dm^{-3} (poli dG-poli dC)),

b) **6-Cl-YOYO-1** (c = 7,69 × 10^{-8} mol dm^{-3} (poli dA-poli dT, poli dAdT-poli dAdT, poli dGdC-poli dGdC), c = 1,53 × 10^{-7} mol dm^{-3} (poli dG-poli dC)),

c) **6-Cl-TO-1**(c = 5,47 × 10^{-7} mol dm^{-3}) te

d) **6-Cl-YO-1** (c = 1,15 × 10^{-7} mol dm^{-3} (poli dA-poli dT, poli dAdT-poli dAdT, poli dGdC-poli dGdC , poli dG-poli dC), c = 2,32 × 10^{-7} mol dm^{-3} (poli A–poli U)).

Za sva mjerenja korištene su kvarcne kivete volumena 3,00 mL. Nakon svakog dodatka alikvota polinukleotida otopina je inkubirana 3 minute u mraku kako bi se omogućilo vezanje boje u polinukleotid. Za pobudu su korištene valne duljine (λ_{exc} = 483 nm (**6-Cl-TOTO-1**, **6-Cl-TO-1**) i λ_{exc} = 440 nm (**6-Cl-YOYO-1**, **6-Cl-YO-1**). Valne duljine pobude odabrane su tijekom razvoja metode. U svim eksperimentima korištena je širina ekscitacijskih i emisijskih pukotina 10 nm.

4.4.10. Izotermna tittracijska kalorimetrija

Kalorimetrijska mjerenja su provedena na instrumentu MicroCal VP-ITC (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Švedska) s otopinom polinukleotida u ćeliji i otopinom cijaninske boje u štrcaljki, pri 25 °C. Sve otopine su pripremljene u kakodilatnom puferu pH = 7, ionske jakosti I = 0,05 mol dm^{-3}.

4.4.11. Izračunavanje konstanti stabilnosti iz rezultata fluorimetrijskih titracija

Konstante ravnoteže reakcije vezanja (K_s) dobivene su nelinearnom regresijom podataka iz rezultata fluorimetrijskih titracija prema Scatchardovoj jednadžbi.[91] Za sve navedene rezultate korelacijski faktor između eksperimentalnih i izračunanih vrijednosti bio je veći od 0,99.
Rezultati titracija analizirani su pomoću Scatchardove jednadžbe postupkom nelinearne regresije prema jednadzbi (1):

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

pri čemu je

c - koncentracija ispitivanog spoja u otopini
c_s - koncentracija polinukleotida
n – recipročna vrijednost broja nukleotida koji tvore vezno mjesto
I_0 - relativni intenzitet fluorescencije čistog spoja
I - relativni intenzitet fluorescencije reakcijske smjese nakon dodatka polinukleotida

I_{lim} - relativni intenzitet fluorescencije kompleksa kad više nema slobodnog spoja u otopini (u slučaju spektroskopski neaktivnog kompleksa, I_{lim} je nula)

K_s - konstanta ravnoteže reakcije kompleksiranja.

Prilikom računanja n i konstante ravnoteže reakcije vezanja K_s nisu uzete u obzir razlike između kooperativnog, ne-kooperativnog i anti-kooperativnog vezanja molekule interkalatora. No, pretpostavljeno je da je kod dvolančanih polinukleotida nemoguće vezanje aromatske molekule između dva susjedna para baza.[58,86]

4.4.12. Izračunavanje konstanti stabilnosti simultano iz rezultata UV/Vis i fluorimetrijskih titracija

Konstante ravnoteže reakcije vezanja (log K_s) izračunate su simultano iz fluorimetrijskih i UV/Vis titracija prema Scatchardovoj jednadžbi uz konstantnu vrijednost parametra n od 0,2 i to za komplekse spojeva **6-Cl-TOTO-1**, **6-Cl-YOYO-1**, **6-Cl-TO-1 i 6-Cl-YO-1** s dvolančanim polinukleotidima. Postupak regresijske analize proveden je pomoću računalnog programa *GlobalFit*[87] napisanog u programskom jeziku Wolfram Mathematica.

4.4.13. Izračunavanje konstanti vezanja i stehiometrija dobivenih kompleksa iz rezultata ITC titracija

Iz rezultata ITC titracija izračunane su konstante ravnoteže reakcije vezanja (K_s) pomoću programa *Origin* 7.0, uz korištenje modela koji opisuju vezanje liganda na jednu vrstu veznih mjesta (*One set of site*s) ili na makromolekulu s dvije vrste veznih mjesta (*Two set of sites*).

Početna koncentracija polinukleotida (M) u ćeliji je M^0_t (mol dm^{-3}). Volumen reakcijske ćelije kalorimetra je V_0, volumen i-tog dodatka titransa je ΔV_i a ukupni volumen titransa koji je dodan tijekom eksperimenta, ΔV, jednak je sumi svih individualnih dodataka.

Model vezanja na jednu vrstu veznog mjesta

Jednadžba kemijske reakcija koje uključuje jednu vrstu veznih mjesta na makromolekuli može se napisati na sljedeći način:

$$M^* + X \rightleftarrows M^*X$$

Gdje M^*označava vezno mjesto na makromolekuli koji sadrži više nukleotida.

Konstanta ravnoteže reakcije vezanja liganda X na polinukleotid definirana je jednadžbom:

$$K_S = \frac{\alpha}{(1-\alpha)[X]} \quad (1)$$

Analitička koncentracija veznih mjesta M_t^* definirana je kao:

$$M_t^* = nM_t \quad (2)$$

Iz bilance mase za ligand X slijedi izraz za analitičku koncentraciju liganda X_t:

$$X_t = [X] + \alpha n M_t \quad (3)$$

gdje izraz nM_toznačava koncentraciju veznih mjesta na nukleotidu.

Kombinacija jednadžbi (1) i (3) daje:

$$\alpha^2 - \alpha\left[1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nKM_t}\right] + \frac{X_t}{nM_t} = 0 \quad (4)$$

Gdje su :

K_s - konstanta ravnoteže reakcije vezanja

n - recipročni broj nukleotida koji tvore vezno mjesto

V_0 -volumen reakcijske ćelije kalorimetra

M_t - analitička koncentracija nukleotida u ćeliji kalorimetra

[M]- ravnotežna koncentracija slobodnog polinukleotida u ćeliji kalorimetra

X_t - analitička koncentracija liganda u ćeliji kalorimetra

[X] - ravnotežna koncentracija slobodnog liganda u ćeliji kalorimetra

α - udio popunjenih veznih mjesta odnosno stupanj nastanka kompleksa

Jednadžba za kumulativni toplinski efekt uslijed reakcije vezanja liganda na nukleotid u ovisnosti o stupnju nastanka kompleksa je:

$$Q = \alpha n M_t \Delta_r H V_0 \quad (5)$$

gdje je $\Delta_r H$ reakcijska entalpija vezanja liganda. Rješavanjem jednadžbe (4) za α i uvrštavanjem u jednadžbu (5) daje izraz:

$$Q(\mathrm{i}) = \frac{n\, M_t \Delta H V_0}{2}\left[1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nKM_t} - \sqrt{\left(1 + \frac{X_t}{nM_t} + \frac{1}{nKM_t}\right)^2 - \frac{4X_t}{nM_t}}\right] \quad (6)$$

Toplina oslobođena nakon i-tog dodatka titransa, $Q(i, i\text{-}1)$, je:

$$Q(i, i-1) = Q(\mathrm{i}) + \frac{dV_i}{V_0}\left[\frac{Q(i)+Q(i-1)}{2}\right] - Q(i-1) \quad (7)$$

Model vezanja na dvije vrste veznih mjesta

Jednadžbe kemijskih reakcija koje uključuju dvije vrste veznih mjesta na makromolekuli mogu se napisati na sljedeći način:

$$\mathrm{M}^{1*} + \mathrm{X} \rightleftarrows \mathrm{M}^{1*}\mathrm{X}$$

$$\mathrm{M}^{2*} + \mathrm{X} \rightleftarrows \mathrm{M}^{2*}\mathrm{X}$$

gdje M^{1*}označava vezno mjesto prve vrste na makromolekuli , a M^{2*}označava vezno mjesto druge vrste na makromolekuli M.

Izrazi za konstante ravnoteže vezanja liganda na polinukleotud na prvu vrstu veznog mjesta K_{s1} i na drugu vrstu veznog mjesta K_{s2} glase:

$$K_{s1} = \frac{\alpha_1}{(1-\alpha_1)[\boldsymbol{X}]} \quad (8)$$

$$K_{s2} = \frac{\alpha_2}{(1-\alpha_2)[\boldsymbol{X}]} \quad (9)$$

Analitičke koncentracije veznih mjesta M_t^{1*} i M_t^{2*}definirane su kao:

$$M_t^{1*} = n_1 M_t \quad (10)$$

$$M_t^{2*} = n_2 M_t \quad (11)$$

Iz bilance mase za ligand X slijedi analitička koncentracija liganda X_t:

$$X_t = [X] + M_t(n_1\alpha_1 + n_2\alpha_2) \quad (12)$$

Gdje su:

n_1 – recipročni broj nukleotida koji tvore prvu vrstu veznog mjesta

n_2 – recipročni broj nukleotida koji tvore drugu vrstu veznog mjesta

K_{s1} – konstanta reakcije vezanja liganda na polinukleotid na prvu vrstu veznog mjesta

K_{s2} – konstanta reakcije vezanja liganda na polinukleotid na drugu vrstu veznog mjesta

α_1 – udio popunjenih veznih mjesta prve vrste

α_2 – udio popunjenih veznih mjesta druge vrste

Rješavanjem jednadžbi (8) za α_1 i (9) za α_2 i uvrštavanjem u jednadžbu (12) daje

$$X_t = [X] + \frac{n_1 M_t [X] K_{s1}}{1+[X]K_{s1}} + \frac{n_2 M_t [X] K_{s2}}{1+[X]K_{s2}} \quad (13)$$

Rješavanjem jednadžbe (13) dolazi se do kubne jednadžbe u formi:

$$[X]^3 + p[X]^2 + q[X] + r = 0 \quad (14)$$

Gdje su:

$$p = \frac{1}{K_{s1}} + \frac{1}{K_{s2}} + (n_1 + n_2)M_t - X_t$$

$$q = \left(\frac{n_1}{K_{s2}} + \frac{n_2}{K_{s1}}\right) M_t - \left(\frac{1}{K_{s1}} + \frac{1}{K_{s2}}\right) X_t + \frac{1}{K_{s1}K_{s2}}$$

$$r = \frac{-X_t}{K_{s1}K_{s2}}$$

4.4.14. Spektroskopija cirkularnog dikroizma

Spektri cirkularnog dikroizma snimljeni su na spektropolarimetru J-815 (Jasco), pri 25 °C u kvarcnim kivetama optičkog puta 1 cm. Sve otopine su pripremljene u kakodilatnom puferu pH = 7, ionske jakosti I = 0,05 mol dm^{-3}. Mjerenja su provedena na način da je u otopinu polinukleotida ($c = 1 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3}) dodavana ishodna otopina cijaninske boje minimalno u rasponu molarnih omjera $\boldsymbol{r}_{[\text{spoj}]/[\textit{polinukleotid}]} = 0{,}05–0{,}3$. Mjerenja su izvedena u rasponu valnih duljina od 220 nm do 750 nm, usrednjavanjem tri mjerenja po spektru.

4.4.15. Određivanje viskoznosti

Određivanje viskoznosti otopina pufera, *ct*-DNA i kompleksa cijaninskih boja **6-Cl-TOTO-1**, **6-Cl-YOYO-1**, **6-Cl TO-1** i **6-Cl-YO-1** s *ct*-DNA provedeno je na instrumentu *Rolling ball* Lovis 2000 M/ME (Anton Paar) koristeći kapilaru 400 s čeličnom kuglicom pri nagibu 42°. Analize su napravljene pri dvije temperature 20 °C i 25 °C. Svaki uzorak je sniman pet puta. Instrumentom su određena vremena prolaska kuglice kroz kapilaru. Iz pet mjerenja je izračunana srednja vrijednost koja je korištena za određivanje L/L_o. Sve otopine su pripremljene u kakodilatnom puferu pH = 7, ionske jakosti I = 0,05 mol dm^{-3}. Kompleksi cijaninskih boja s *ct*-DNA su pripremljene u rasponu molarnih omjera $\boldsymbol{r}_{[\text{spoj}]\ /\ [\textit{ct}\text{- DNA}]} = 0{,}05–0{,}2$.

4.4.16. Raspodjela veličina čestica

Raspodjela veličine čestica *ct*-DNA i kompleksa cijaninskih boja **6-Cl-TOTO-1**, **6-Cl-YOYO-1**, **6-Cl TO-1** i **6-Cl-YO-1** s *ct*-DNA mjerena je na instrumentu Zetasizer Nano ZS (Malvern UK). Analize su napravljene pri 25 °C koristeći jednokratne plastične kivete optičkog puta 1 cm. Mjerenja su napravljena pri kutu od 173° (engl. *backscatter*) s automatskim odabirom atenuatora i duljine mjerenja. Za računanje raspodjele veličine čestica korišteni su indeks loma koji odgovara većini peptida/proteina R.I. = 1,450 i apsorpcija 0,001. Svaki uzorak je pripremljen i analiziran u triplikatu te je izračunata srednja vrijednost. Sve otopine su pripremljene u kakodilatnom puferu pH = 7, ionske jakosti I = 0,05 mol dm^{-3}.

Kompleksi cijaninskih boja s *ct*-DNA su pripremljene u molarnom omjeru $\boldsymbol{r}_{[\text{spoj}]/[ct\text{- DNA}]} = 0{,}2$. Zbog izražene polidisperznosti *ct*-DNA, a time i velike varijabilnosti rezultata, svi uzorci su filtrirani kroz membranski filtar za šprice s veličinom pora od 100 nm direktno u kivetu. Nakon filtracije, svi uzorci su ostavljeni pet minuta kako bi se eliminirao mehanički stres kojem je DNA podvrgnuta tijekom filtracije te kako bi se DNA vratila u nativno stanje.

4.4.17. Određivanje zeta potencijala

Zeta-potencijal (ζ) *ct*-DNA i kompleksa cijaninskih boja **6-Cl-TOTO-1**, **6-Cl-YOYO-1**, **6-Cl TO-1** i **6-Cl-YO-1** s *ct*-DNA mjeren je na instrumentu Zetasizer Nano ZS (Malvern UK). Analize su napravljene pri 25 °C koristeći jednokratne savijene plastične kivete namijenjene za određivanje zeta potencijala, s ugrađenim bakrenim elektrodama. Mjerenja su provedena pri kutu od 13° s automatskim odabirom atenuatora i napona. Svaki uzorak je pripremljen i analiziran u triplikatu te je izračunata srednja vrijednost. Sve otopine su pripremljene u kakodilatnom puferu, pH = 7, ionske jakosti $I = 0{,}05$ mol dm^{-3}.

Kompleksi cijaninskih boja s *ct*-DNA su pripremljeni u molarnom omjeru $\boldsymbol{r}_{[\text{spoj}]/[ct\text{- DNA}]} = 0{,}2$. Zbog izražene polidisperznosti *ct*-DNA a time i velike varijabilnosti rezultata svi uzorci su filtrirani kroz membranski filtar za šprice s veličinom pora od 100 nm direktno u kivetu. Nakon filtracije, svi uzorci su ostavljeni pet minuta kako bi se eliminirao mehanički stres kojem je DNA podvrgnuta tijekom filtracije te kako bi se DNA vratila u nativno stanje.

§ 5. REZULTATI I RASPRAVA

5.1. Karakterizacija 6-Cl-TOTO-1

Istraživane boje **6-Cl-TO-1**, **6-Cl-YO-1** i **6-Cl-YOYO-1** pripremljene su prema prethodno objavljenoj proceduri i njihove karakteristike su publicirane.[15] Spoj **6-Cl-TOTO-1** je pripremljen prema istoj proceduri. Kako bi se potvrdila struktura i čistoća spoja, spoj **6-Cl-TOTO-1** je karakteriziran tehnikom HRMS te nuklearnom magnetskom rezonancijom (NMR) i infracrvenom spektroskopijom. Taljenje je određeno razlikovnom pretražnom kalorimetrijom (DSC).

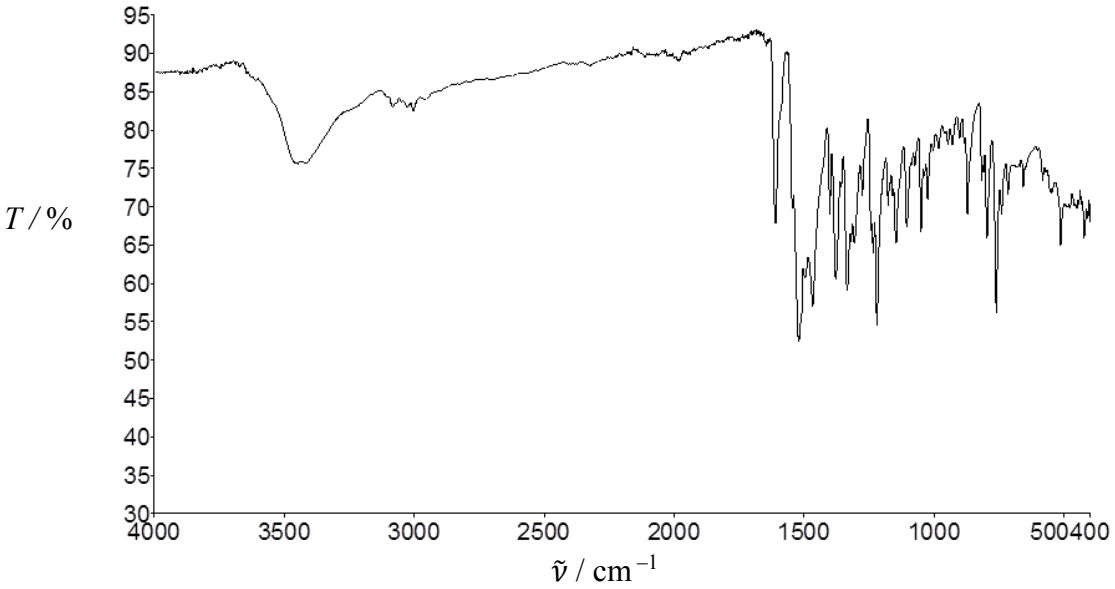
5.1.1. Infracrvena spektroskopija

Infracrvena spektroskopija je jedna od primarnih tehnika koja se redovno koristi za analizu i potvrdu struktura. Može se koristiti za kvalitativna i kvantitativna istraživanja. Uzorci se mogu snimati na različite načine: kao pastile u alkalijskom halogenidu (KBr ili KCl) koje nemaju karakterističan spektar u infracrvenom području, kao disperzija u mineralnom ulju, kao otopina u pogodnom otapalu itd., ili direktno tehnikom prigušene totalne refleksije (ATR), što je korišteno u ovom slučaju.

Kod IR spektroskopije energija upadnog infracrvenog zračenja mora odgovarati razlici energije između dva vibracijska stanja da bi molekula apsorbirala fotone i prešla iz osnovnog u više vibracijsko stanje. Nakon prolaska zračenja kroz uzorak detektira se smanjenje intenziteta upadnog zračenja. Faktori koji određuju apsorpcijski položaj vrpce su jačina veze i masa atoma u vezi (uz istu jakost veze), a jačinu veze određuje energija disocijacije promatrane molekule.

Analizom uzorka **6-Cl-TOTO-1** ATR spektroskopijom dobiven je IR spektar prikazan na slici 34. Vibracijske vrpce su asignirane prema predloženoj strukturi te teoretskim podacima o vibracijama u dostupnoj literaturi.[88,89] Karakteristične frekvencije funkcionalnih grupa su sumirane u tablici 4.

Analizom dobivenog IR spektra pronađene su i asignirane glavne funkcionalne skupine uzorka **6-Cl-TOTO-1**, potvrđujući strukturu spoja.



Slika 34: FT-IR spektar uzorka 6-Cl-TOTO-1.

Tablica 4: Vibracijske vrpce u IR spektru uzorka 6-Cl-TOTO-1

Valni broj / cm^{-1}	**Vibracija**
3448, 3414	N–H istezanje
3084, 3026, 3004	=C–H istezanje
2965	$-CH_2-$ istezanje
1609, 1590	C=C istezanje poli nuklearnog aromatskog kompleksa
1544	C=N istezanje
1521, 1517	–C=C–istezanje benzotiazolnog prstena
1466	–C=C–i =C–H istezanje Ar
1400	$N–CH_3$ istezanje
1105	Ar–Cl istezanje
901, 882	=C–H deformacija izvan ravnine
759,739, 715	$-CH_2-$ njihanje

5.1.2. Spektroskopija NMR

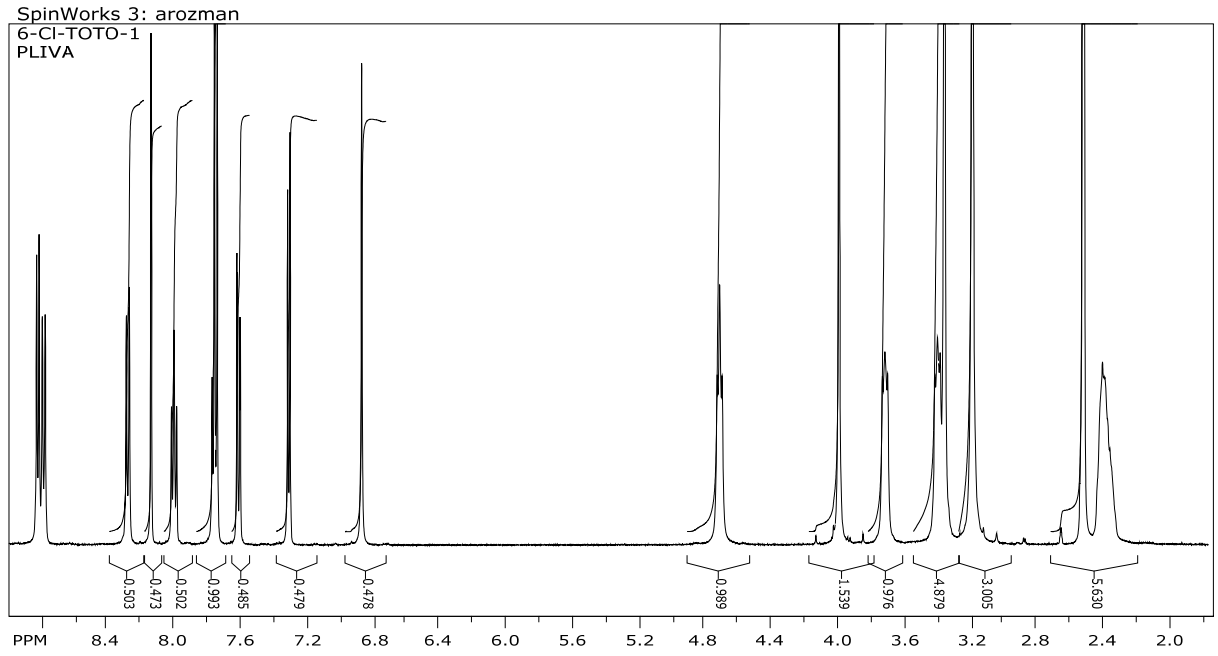
^{1}HNMR i ^{13}CNMR spektri otopina boja su snimljeni u deuteriranom DMSO. Također snimljeni su i dvo-dimenzijski spektri, HSQCM i COSY.

Dobiveni signali iz ^{1}HNMR i ^{13}CNMR spektara su asignirani. Rezultati su prikazani na slikama 35 i 36. Asignacija NMR spektara provedena je iz ^{13}C i ^{1}H NMR spektara, te dvo-dimenzijskih spektara uzorka **6-Cl-TOTO-1**. Rezultati NMR analize su:

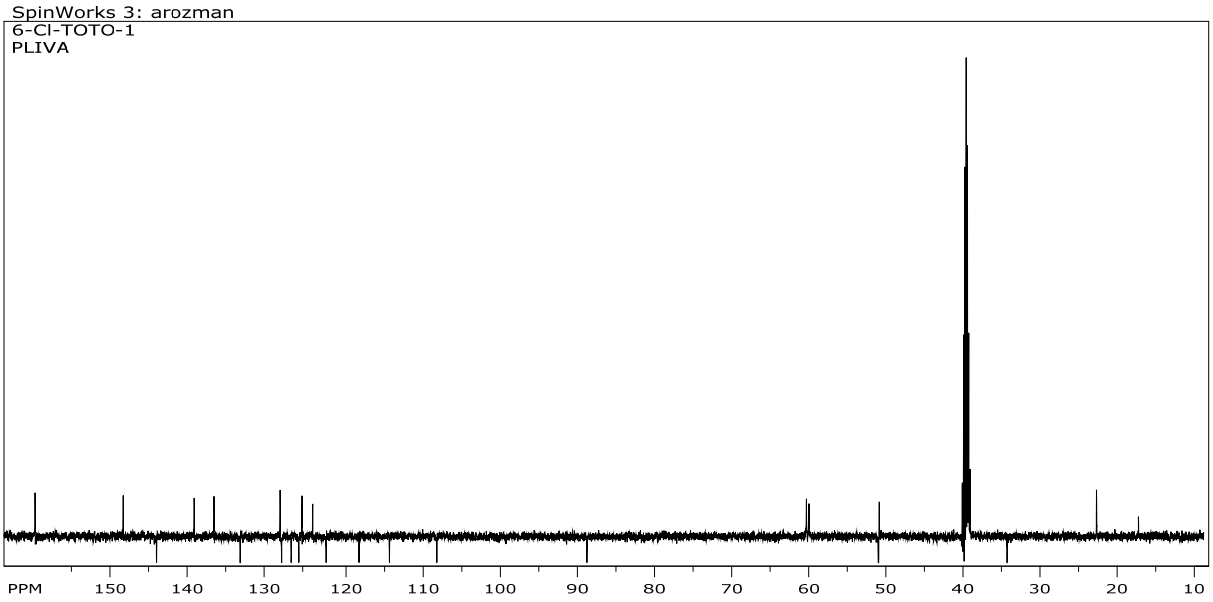
^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-d$_6$): δ = 2,38 (br m, 6H, CH_2), 3,19 (s, 12H, N^+CH_3), 3,71 (t, 8H, $^3J_{HH}$ = 7.9, N^+CH_2), 3,91 (s, 6H, N^+CH_3), 4,71 (t, 4H, $^3J_{HH}$= 7.3, N^+CH_2), 6,88 (s, 2H, CH), 7,57-8,90 (m, 18H, Ar).

^{13}C-NMR (125 MHz,DMSO-d$_6$): δ = 17,2 (CH_2), 22,6 (CH_2), 34,2 (NCH_3), 50,7 (N^+CH_2), 50,8 (N^+CH_3),59,9 (N^+CH_2), 60,2 (N^+CH_2), 88,6 (CH), 108,2 (CH), 114,2 (CH), 118,2 (CH), 122,4(CH), 124,1 (C_q), 125,1 (CH), 125.6 (CH), 126,9 (CH), 128,2 (C_q), 128,4 (C_q), 133,5 (CH), 136,9 (C_q), 139,5 (CH), 144,4 (C_q), 148,7 (C_q), 160,1 (C_q).

Ovom analizom je potvrđena predložena struktura spoja **6-Cl-TOTO-1**.



Slika 35: ^{1}HNMR spektar uzorka 6-Cl-TOTO-1



Slika 36: ^{13}C NMR spektar 6-Cl-TOTO-1

5.1.3. Masena spektrometrija

Masena spektrometrija spoja **6-Cl-TOTO-1** potvrdila je da molekulske mase fragmenata $C_{49}H_{56}N_6S_2Cl_2I_3^+$ i $C_{49}H_{55}N_6S_2Cl_2I_2^+$ odgovaraju teoretski računatim vrijednostima.
Rezultati su prikazani u tablici 5.

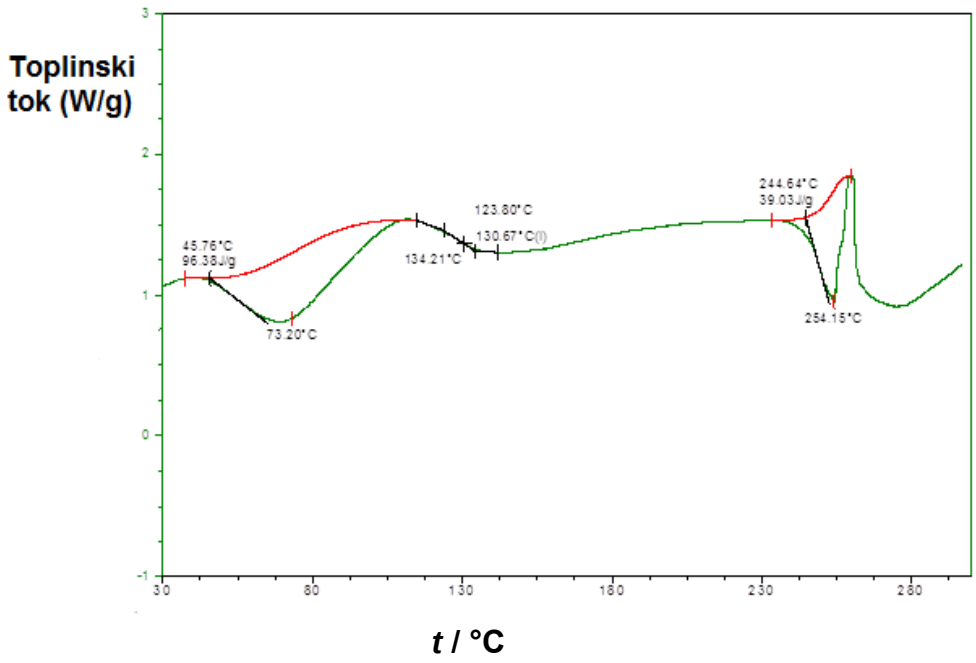
Tablica 5: Rezultati MS (ESI-TOF) za fragmente spoja 6-Cl-TOTO-1

Fragment	Teoretska vrijednost M_r	Određena vrijednost M_r	Greška
$C_{49}H_{56}N_6S_2Cl_2I_3^+$	1243,0519	1243,0492	–2,2 ppm
$C_{49}H_{55}N_6S_2Cl_2I_2^+$	1115,1396	1115,1368	–2,5 ppm

Prikazani rezultati određivanja M_r za dva fragmenta uzorka **6-Cl-TOTO-1** pokazuju izvrsno slaganje s teoretskim vrijednostima za predloženu strukturu.

5.1.4. Diferencijalna pretražna kalorimetrija

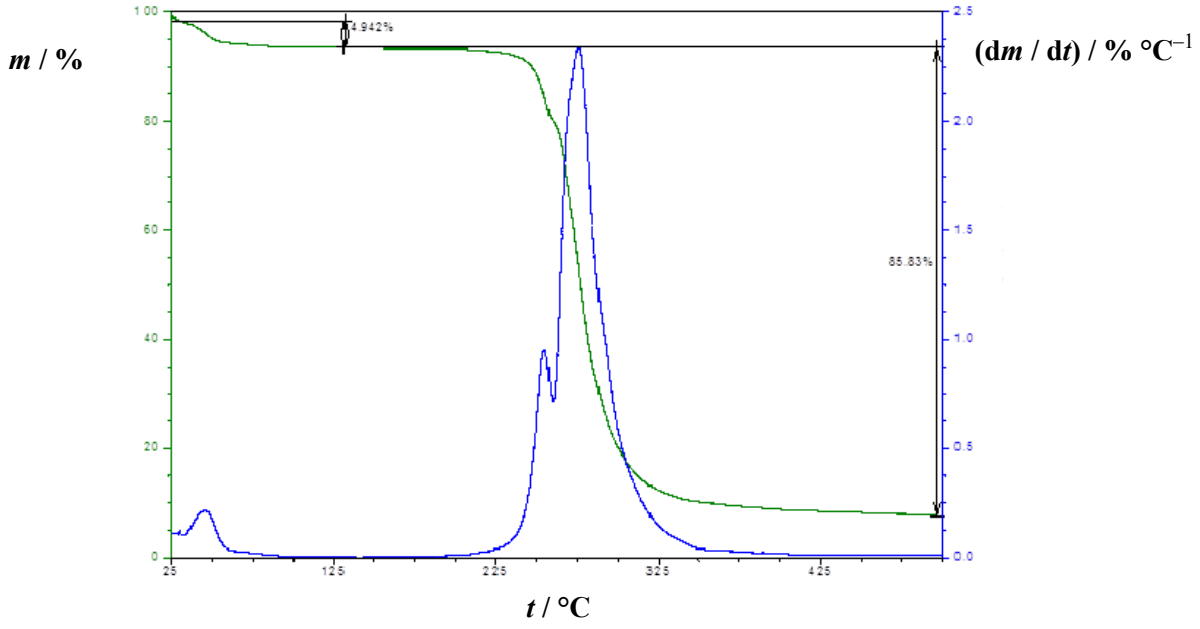
DSC krivulja spoja **6-Cl-TOTO-1** pokazuje više uzastopnih endotermnih događaja. Prvi široki endoterm koji se opaža na krivulji u temperaturnom području 45–120 °C odgovara izlasku vode. Kako voda izlazi pri relativno niskim temperaturama, od sobne temperature pa do 100 °C, okarakterizirana je kao adsorbirana voda. Daljnjim zagrijavanjem se na termogramu može opaziti staklište amorfnog dijela spoja, s očitanom temperaturom u točki infleksije na 131 °C. Daljnjim zagrijavanjem opaža se endoterm taljenja kristalne strukture koje počinje pri temperaturi 245 °C te raspad molekule daljnjim zagrijavanjem (slika 37). Rezultati DSC analize su u skladu s termogravimetrijskom analizom.



Slika 37: DSC krivulja uzorka 6-Cl-TOTO-1.

5.1.5. Termogravimetrijska analiza

Termogravimetrijska analiza spoja **6-Cl-TOTO-1** pokazuje da uzorak gubi na masi u dva glavna koraka. Prvi gubitak mase dešava se u temperaturnom području od sobne temperature do 125 °C a može se pripisati izlasku adsorbiranih molekula vode (4,9 %). Daljnjim zagrijavanjem do 200 °C uzorak više ne gubi na masi. Zbog toga je fazni prijelaz u DSC analizi karakteriziran kao staklište. Drugi gubitak na masi uslijed zagrijavanja dešava se na temperaturi iznad 225 °C, a odgovara raspadu spoja (slika 38).

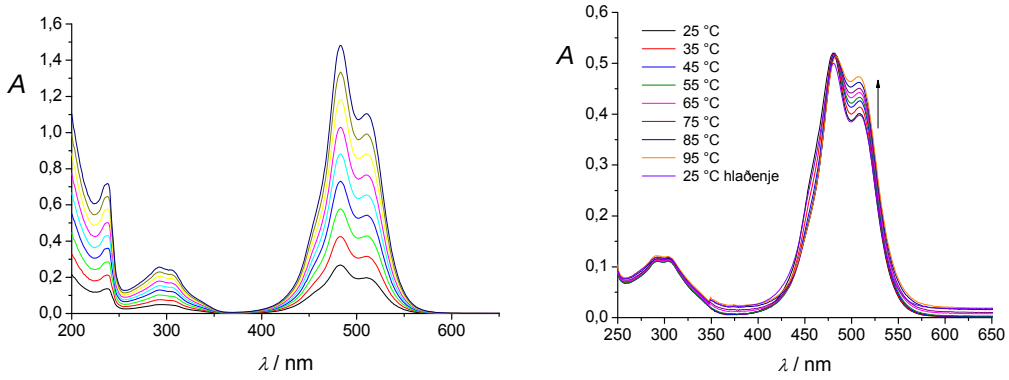


Slika 38: TGA krivulja uzorka 6-Cl-TOTO-1.

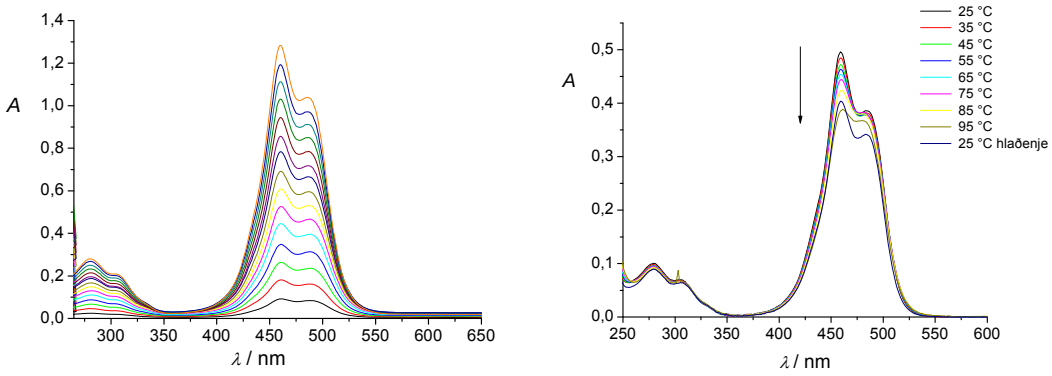
5.2. Fizikalno-kemijska svojstva vodenih otopina ispitivanih spojeva

Svi ispitivani spojevi djelomično su topljivi u redestiliranoj vodi (iznad 1×10^{-4} mol dm^{-3}). Sve vodene otopine ispitivanih spojeva stabilne su unutar dva mjeseca ako se čuvaju pri temperaturi 2°C−8°C.

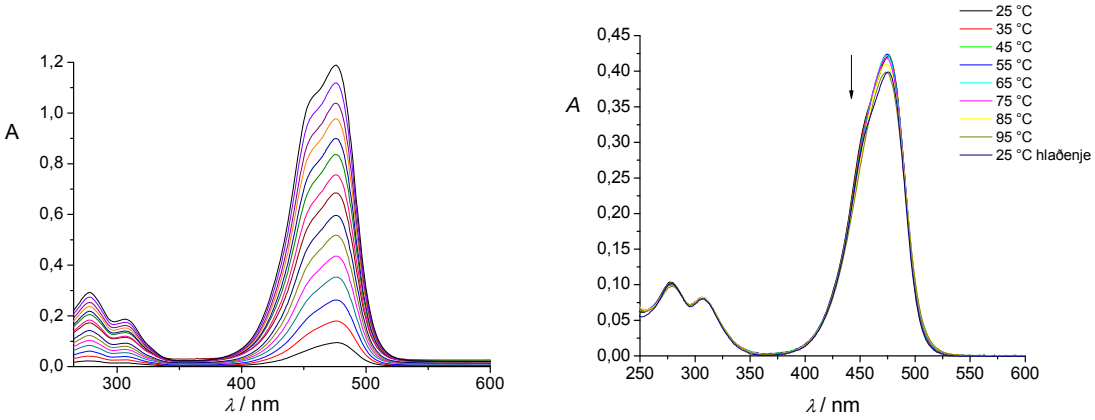
Apsorbancije vodenih otopina **6-Cl-TOTO-1, 6-Cl-YOYO-1** i **6-Cl-YO-1** su proporcionalne njihovim koncentracijama u koncentracijskom području c = 7,1 × 10^{-7} mol dm^{-3}–4,6 × 10^{-5} mol dm^{-3} što potvrđuje da u otopinama nema značajnog molekulskog slaganja što bi u protivnom vodilo do hipokromnih efekata. Termička stabilnost **6-Cl-TOTO-1, 6-Cl-YOYO-1** i **6-Cl-YO-1** je također ispitana, zagrijavanjem vodenih otopina ispitivanih spojeva. Iz dobivenih rezultata može se vidjeti da nema značajne razlike u UV/Vis spektrima boja snimanih pri 25 °C u odnosu na više temperature što potvrđuje stabilnost uzoraka i njihovu prikladnost za daljnja ispitivanja, posebice temperature mekšanja. Rezultati su prikazani na slikama 39 do 41.



Slika 39: **UV/Vis spektri otopine 6-Cl-TOTO-1, u vodi u koncentracijskom području 1,66 × 10^{-6} mol dm^{-3} – 1,64 × 10^{-5} mol dm^{-3} kao funkcija koncentracije (lijevo) pri 25 °C, te promjene u UV/Vis spektrima kao funkcija temperature (desno).**



Slika 40: **UV/Vis spektri otopine 6-Cl-YOYO-1, u vodi u koncentracijskom području : 7,1 × 10^{-7} mol dm^{-3} – 1,04 × 10^{-5} mol dm^{-3} kao funkcija koncentracije (lijevo) pri 25 °C, te promjene u UV/Vis spektrima kao funkcija temperature (desno).**



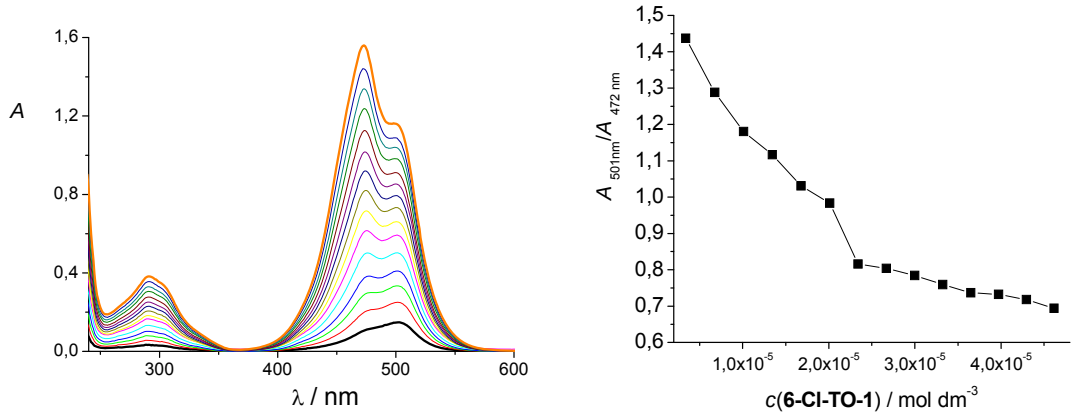
Slika 41: **UV/Vis spektri otopine 6-Cl-YO-1, u vodi u koncentracijskom području: 1,4 × 10^{-6} mol dm^{-3} – 2,0 × 10^{-5} mol dm^{-3} kao funkcija koncentracije (lijevo) pri 25 °C, te promjene u UV/Vis spektrima kao funkcija temperature (desno)**

UV/VIS spektri cijaninske boje **6-Cl-TO-1** pri $c > 1{,}3 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3} pokazali su nelinearnu ovisnost apsorbancije o koncentraciji spoja (slika 42). Iz literature je poznato da mnoge cijaninske boje pokazuju tendenciju stvaranja agregata u vodenim medijima zbog njihove hidrofobnosti i polarizabilnosti.[14] U literaturi se spominju dva tipa agregata: H-tip i J-tip, koji se međusobno razlikuju u načinu na koji se molekule cijaninskih boja slažu u prostoru. Za nesupstituirane cijaninske boje karakteristično je stvaranje H-tipa agregata koje je energetski najpovoljnije zbog ostvarivanja maksimalnog broja Van Der Waals-ovih veza, koje u velikom obimu sprečavaju približavanje molekule otapala, u ovom slučaju molekula

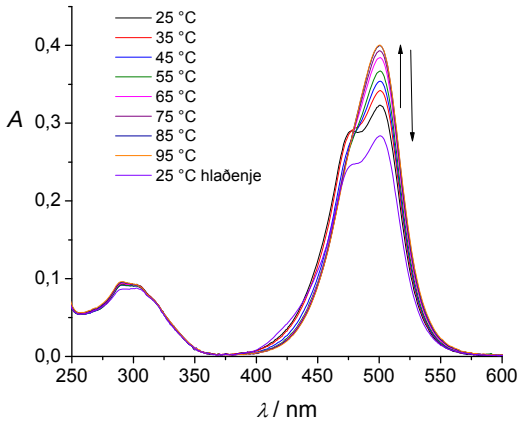
vode, molekulama boje. Kod supstituiranih cijaninskih boja dominantno je stvaranje J-tipa agregata, kod kojih se molekule boja samo-asociraju u lančaste strukture, koje je povoljno zbog steričkih i elektrostatskih smetnji uzrokovanih atomima supstituenata.

U apsorpcijskom spektru cijaninske boje **6-Cl-TO-1** može se opaziti promjena izgleda spektra povećavanjem koncentracije spoja u otopini posebice u promjeni intenziteta maksimuma apsorpcije na 472 i 501 nm. Pri nižim koncentracijama **6-Cl-TO-1** maksimum na 501 nm je dominantan. Taj maksimum najvjerojatnije pripada monomeru boje. Povećanjem koncentracije opaža se hipsokromni pomak (–29 nm) i dominantan je maksimum na 472 nm, koji najvjerojatnije potječe od stvaranja agregata boje pri višim koncentracijama.

Omjer vrijednosti apsorbancija za maksimum na 501 nm i 472 nm se također značajno smanjuje porastom koncentracije, od početne vrijednosti 1,4 za koncentraciju 5×10^{-6} mol dm^{-3} pa do vrijednosti 0,7 za koncentraciju 4×10^{-5} mol dm^{-3} (slika 42). Ta činjenica implicira da se molekule samo asociraju porastom koncentracije spoja u otopini. Činjenica da se pri višim koncentracijama ispitivanog spoja pojavljuje maksimum pri nižim valnim duljinama upućuje na stvaranje H-tipa agregata, što je već ranije publicirano za cijaninske[14] ili za merocijaninske[90] boje.



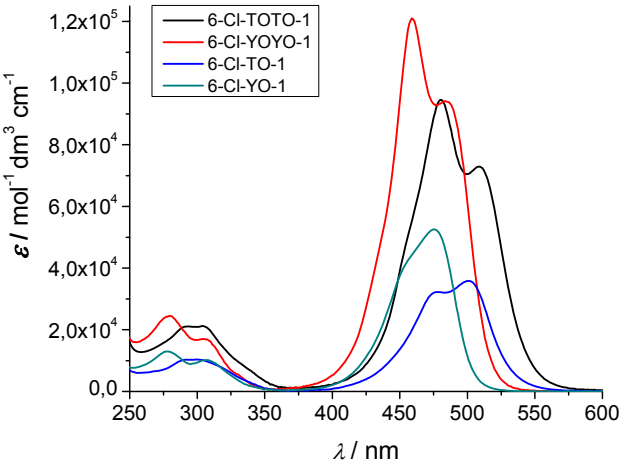
Slika 42: **UV/Vis spektri otopine 6-Cl-TO-1, u vodi u mikromolarnim koncentracijama (lijevo) i omjer $A_{501\ nm}/A_{472\ nm}$ kao funkcija koncentracije (desno) pri 25 °C.**



Slika 43: UV/Vis spektri u ovisnosti o temperaturi 6-Cl-TO-1, $c = 1 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3}.

Dodatno, za **6-Cl-TO-1** se u pokusima ispitivanja termičke stabilnosti vodene otopine uočava i promjena u UV/Vis spektrima uslijed zagrijavanja (slika 43). Pri temperaturama većim od 35 °C uočava se nestanak maksimuma na 472 nm dok se pojavljuje maksimum na 501 nm. Izgled UV/Vis spektra **6-Cl-TO-1** je sličan proporcionalno pomnoženom spektru pri koncentraciji 3×10^{-6} mol dm^{-3}. Dakle, pri koncentraciji $c > 1 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3} spoj **6-Cl-TO-1** formira agregate.

Određene su molarni apsorpcijski koeficijenti ispitivanih spojeva u vodenom mediju (tablica 6). Usporedba spektara ispitivanih spojeva prikazana je na slici 44.

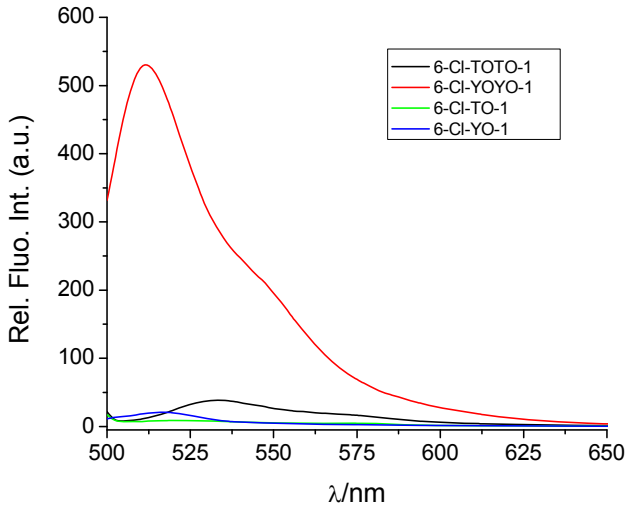


Slika 44: **UV/Vis spektri uzoraka 6-Cl-TOTO-1, 6-Cl-YOYO-1, 6-Cl-TO-1 i 6-Cl-YO-1, u vodenom mediju..**

Tablica 6: **Molarni apsorpcijski koeficijenti uzoraka 6-Cl-TOTO-1, 6-Cl-YOYO-1, 6-Cl-TO-1 i 6-Cl-YO-1.**

	λ_{max} / nm	ε / mol^{-1} dm^3 cm^{-1}
6-Cl-TOTO-1	483	94935 ± 193
	510	69366 ± 91
6-Cl-YOYO-1	461	122505 ± 356
	486	97873 ± 1079
6-Cl-TO-1	472	35140 ± 640
	501	35139 ± 639
6-Cl-YO-1	476	53169 ± 280

UV/Vis spektri boja u kakodilatnom puferu (I = 0,05 mol dm^{-3}, pH = 7) su vrlo slični UV/Vis spektrima boja u vodi. Vodene otopine uzoraka **6-Cl-TOTO-1**, **6-Cl-TO-1** i **6-Cl-YO-1** koncentracije $c = 1 \times 10^{-7}$ mol dm^{-3} pokazuju zanemarivu fluorescenciju nakon pobude na njihovim maksimumima apsorpcije. Za razliku od njih uzorak **6-Cl-YOYO-1** pokazuje značajnu fluorescenciju (slika 45), najvjerojatnije zbog izraženijeg svojstva aromatskog slaganja molekula u agregate, što onemogućava ne emisijski način relaksacije nakon pobude na 440 nm.



Slika 45: **Spektri fluorescencije 6-Cl-TOTO-1 (c = 8,2 × 10^{-8} mol dm^{-3}, λ_{exc} = 483 nm), 6-Cl-YOYO-1 (c = 7,69 × 10^{-8} mol dm^{-3}, λ_{exc} = 440 nm), 6-Cl-TO-1 (c = 5,47 × 10^{-7} mol dm^{-3}, λ_{exc} = 483 nm) i 6-Cl-YO-1(c = 2,32 × 10^{-7} mol dm^{-3}, λ_{exc} = 440 nm), u vodi.**

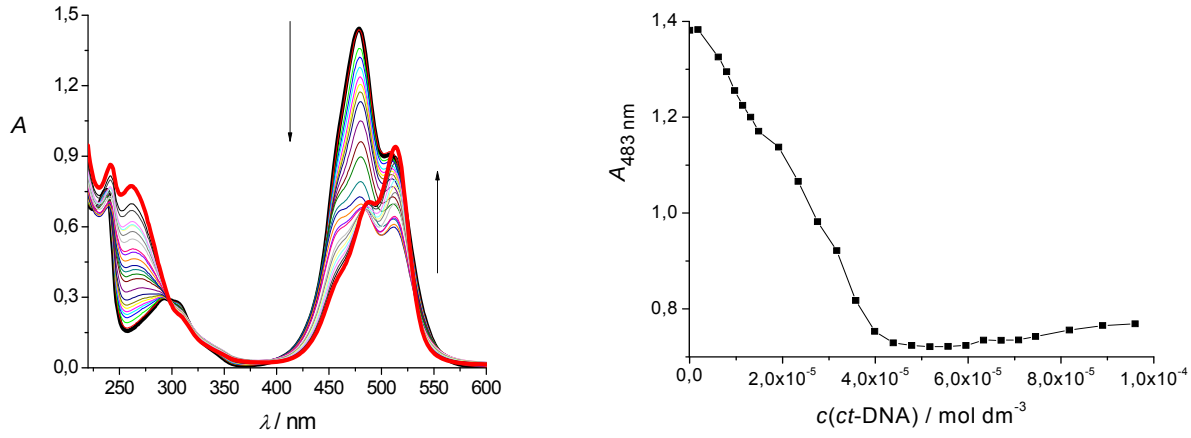
5.3. Ispitivanje interakcija 6-Cl-TOTO-1, 6-Cl-YOYO-1, 6-Cl-TO-1 i 6-Cl-YO-1 boja s dvolančanim DNA i RNA

5.3.1. UV/Vis titracije

Dodatak dvolančanih polinukleotida (DNA i RNA) u otopine boje rezultira značajnim hipokromnim efektima i umjerenim batokromnim pomacima (4−6 nm) u UV/Vis spektrima **6-Cl-TOTO-1, 6-Cl-YOYO-1, 6-Cl-TO-1** i **6-Cl-YO-1** spojeva. No, iz UV/Vis titracija nije bilo moguće izračunati konstante stabilnosti kompleksa, a ni stehiometriju nastalih kompleksa jer su uočene promjene u UV/Vis spektrima posljedica mješovitog načina vezanja koje je bilo nadjačano agregacijom ispitivanih spojeva u vodenim medijima.

Naime kod dotičnih spojeva pokazano je da su te boje dominantno u monomernom obliku samo kod koncentracija nižim od 1×10^{-6} mol dm^{-3}. U suvišku boje u otopini, pri $r_{[spoj]/[polinukleotid]} > 0{,}2$ promjene u UV/Vis spektrima mogu se pripisati agregaciji molekula boja koje ne mogu pronaći slobodno vezno mjesto na polinukleotidu. Dakle kod molarnog omjera $r_{[spoj]/[polinukleotid]} > 0{,}2$ dominantni načini vezanja su agregacija i mješoviti način vezanja. Pri uvjetima koji pogoduje samo jednom dominantnom načinu vezanja boje ($r_{[spoj]/[polinukleotid]} < 0{,}1$) (interkalacija i/ili bisinterkalacija) nije bilo moguće skupiti dovoljno eksperimentalnih podataka.

Posljedično to je onemogućilo obradu dobivenih podataka iz UV/Vis titracija jednadžbom po Scatchardu.[91] Primjer tipičnih UV/Vis titracija **6-Cl-TOTO-1** prikazan je na slici 46.



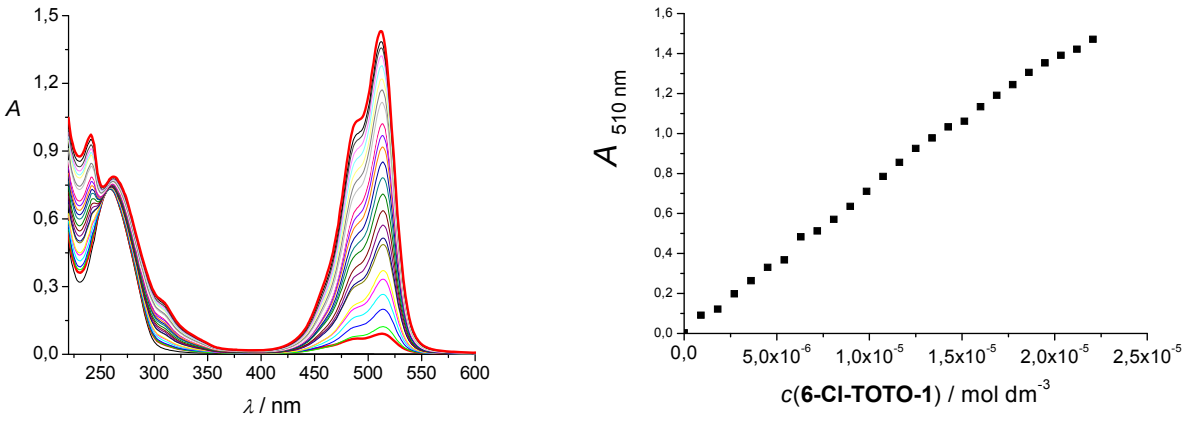
a) b)

Slika 46: **a) UV/Vis titracija 6-Cl-TOTO-1 (c = 1,4 × 10^{-5} mol dm^{-3}) s *ct*-DNA; b) Promjene u UV/Vis spektru 6-Cl-TOTO-1 na λ_{max} = 483 nm kao posljedica titracije s *ct*-DNA, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3} pri 25 °C.**

Rezultati UV/Vis titracije **6-Cl-TOTO-1** s *ct*-DNA pokazuju da je u suvišku boja agregirana, čineći pretežno H-tip agregata s dominantnom vrpcom na 483 nm. Dodatkom *ct*-DNA te posljedično vezanjem dijela boje u kompleks s polinukleotidom, maksimum na 501 nm postaje dominantan, što upućuje na činjenicu da se boja djelomično de-agregira te vrpca monomera postaje dominantna. Ta činjenica implicira da se na DNA prvenstveno vežu monomeri boje.

Dodatan dokaz vezanja monomera **6-Cl-TOTO-1** može se vidjeti iz ″obrnute″ titracije (slika 47) gdje je vidljivo da dodatak malih količina ispitivane boje u otopinu DNA rezultira dominantnim UV/Vis spektrom monomera. Ta titracija rezultirala je gotovo linearnim porastom intenziteta apsorpcije na 510 nm i 483 nm. Ako se spektri dobiveni ″obrnutom″ titracijom usporede s UV/Vis spektrima **6-Cl-TOTO-1** iz pokusa određivanja molarnog apsorpcijskog koeficijenta (slika 39) ili sa spektrima snimljenim prilikom titracije **6-Cl-TOTO-1** s *ct*-DNA (slika 46) gdje je intenzitet apsorpcije na λ = 510 nm rastao dok je intentitet apsorpcije na λ = 483 nm smanjivao, može se zaključiti da se u slučaju suviška boje simultano dešava vezanje boje na polinukleotid i de-agregacija boje, dok je u obrnutoj

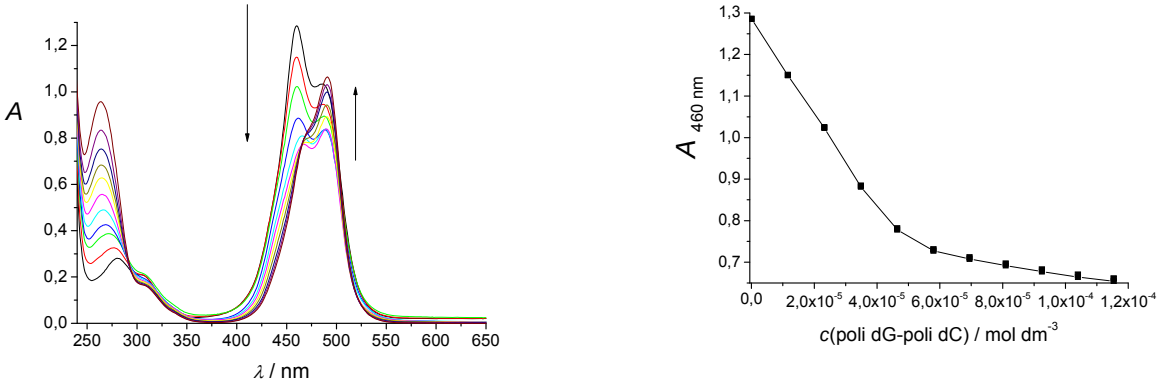
titraciji, prilikom suviška veznih mjesta agregacija onemogućena i može se opaziti samo linearan porast maksimuma koji odgovara monomeru.



a) b)

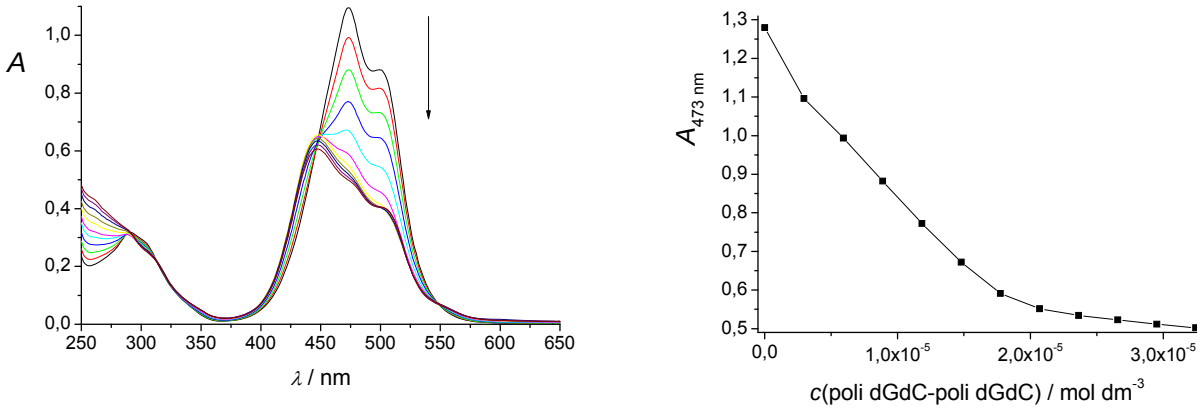
Slika 47: **a) UV/Vis titracija *ct*-DNA (c = 1,07 × 10^{-4} mol dm^{-3}) s 6-Cl-TOTO-1 (c = 8,4 × 10^{-4} mol dm^{-3}); b) Promjene u UV/Vis spektru *ct*-DNA i 6-Cl-TOTO-1 na λ_{max} = 510 nm kao posljedica titracije s 6-Cl-TOTO-1, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3} pri 25 °C.**

Tipične UV/Vis titracije spojevima **6-Cl-YOYO-1** (slika 48**), 6-Cl-TO-1** (slika 49) i **6-Cl-YO-1** (slika 50) polinukleotidima ukazuju na snažne interakcije s DNA/RNA, ali je zbog kompleksnosti dobivenih spektara, određenog stupnja agregacije boja u puferu i/ili prilikom vezanja na DNA/RNA vrlo teško odrediti način i stehiometriju vezanja. Intrinzično svojstvo cijaninskih boja da značajno povećaju fluorescencijsku emisiju pri vezanju na DNA/RNA omogućilo je provedbu titracija pri vrlo niskim koncentracijama boje, kod kojih su cijanini većinom u monomernom obliku.



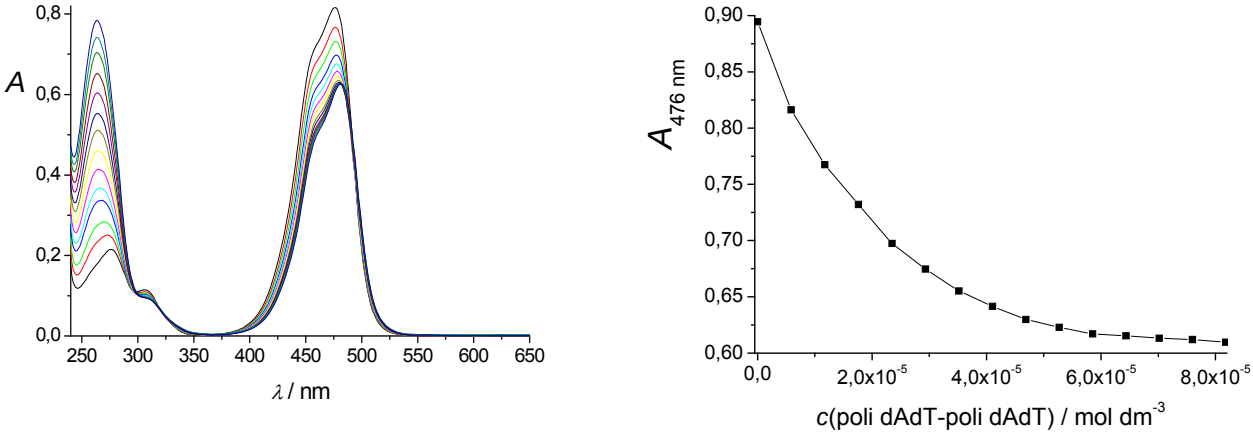
a) b)

Slika 48: **a) UV/Vis titracija 6-Cl-YOYO-1 (c = 1,4 × 10^{-5} mol dm^{-3}) s poli dG-poli dC; b) Promjene u UV/Vis spektru 6-Cl-YOYO-1 na λ_{max} = 460 nm kao posljedica titracije s poli poli dG-poli dC, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3} pri 25 °C.**



a) b)

Slika 49: **a) UV/Vis titracija 6-Cl-TO-1 (c = 3,7 × 10^{-5} mol dm^{-3}) s poli dGdC-poli dGdC; b) Promjene u UV/Vis spektru 6-Cl-TO-1 na λ_{max} = 473 nm kao posljedica titracije s poli dGdC-poli dGdC, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3} pri 25 °C.**



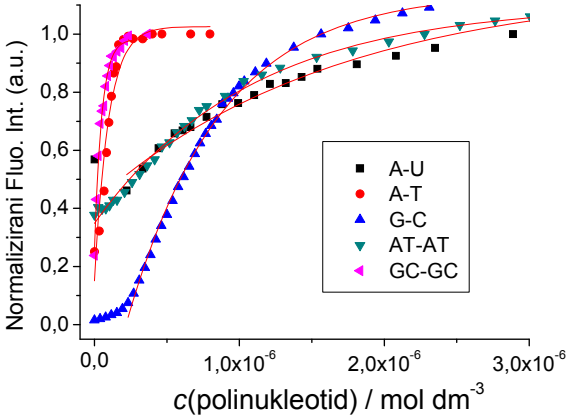
a) b)

Slika 50: **a) UV/Vis titracija 6-Cl-YO-1 (c = 1,4 × 10^{-5} mol dm^{-3}) s poli dAdT-poli dAdT; b) Promjene u UV/Vis spektru 6-Cl-YO-1 at λ_{max} = 476 nm kao posljedica titracije s poli dAdT-poli dAdT, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3} pri 25 °C.**

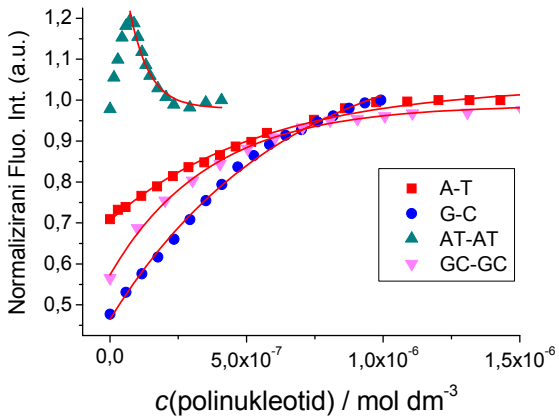
5.3.2. Fluorimetrijske titracije

Intrinzično nefluorescentne, odnosno slabo fluorescentne boje **6-Cl-TOTO-1, 6-Cl-TO-1, 6-Cl-YO-1** su dodatkom DNA/RNA pokazale snažni porast intenziteta fluorescencije, što je u skladu s općepoznatim mehanizmom vezanja cijaninskih boja na polinukleotide. Intrinzična fluorescencija cijaninske boje **6-Cl-YOYO-1** je dodatkom polinukleotida također pokazala porast intenziteta emisije. Opažene promjene su omogućile fluorimetrijske titracije u vrlo niskim koncentracijama cijaninskih boja (kod kojih su one uglavnom neagregirane) te dodatno u uvjetima značajnog suviška polinukleotida u odnosu na cijaninske boje. Kako je pri tim uvjetima ($r_{[spoj]/[polinukleotid]} < 0,1$) dominantan samo jedan način vezanja, bilo je moguće analizirati dobivene podatke Scatchardovom jednadžbom te odrediti konstante ravnoteže reakcije vezanja. [91,92]

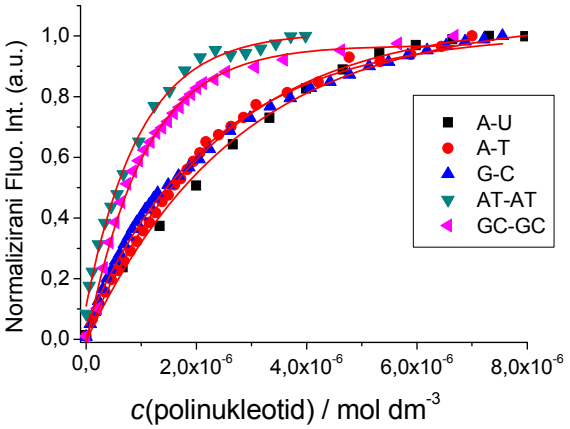
Fluorescencijske titracije su napravljene na način da su optimizirane za izračun konstanti vezanja, gdje je većina točaka između 20−80 % formiranog kompleksa, pri $r_{[spoj]/[polinukleotid]} < 0,1$. Kako bi se vizualno mogao procijeniti afinitet određene boje prema polinukleotidima, napravljen je grafički prikaz ovisnosti intenziteta fluorescencije normaliziran na najviši intenzitet emisije (zadnja točka titracije). Rezultati su prikazani na slici 51.



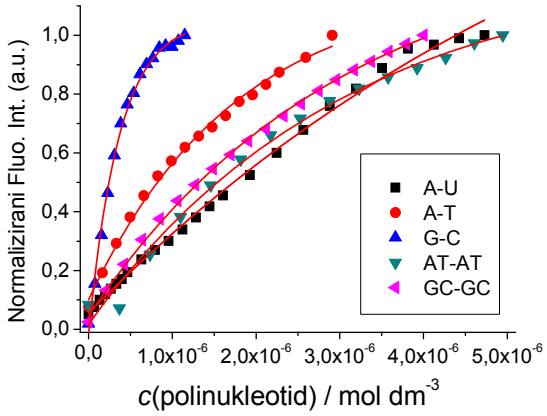
a)



b)



c)

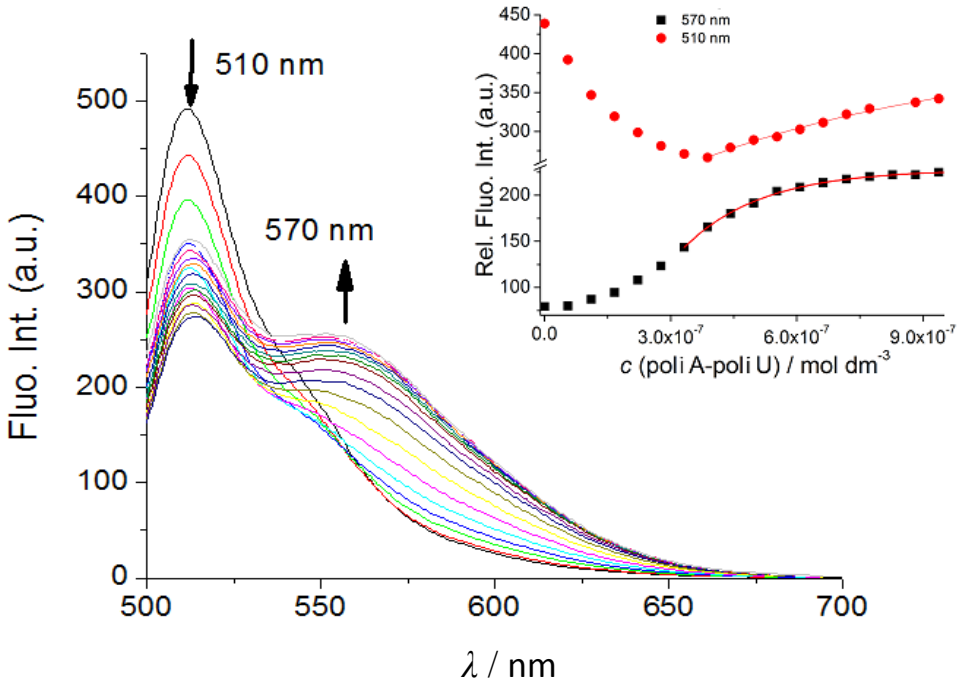


d)

Slika 51: **Promjene intenziteta fluorescencije normalizirane na najviši intenzitet emisije u titraciji za a) 6-Cl-TOTO-1 (c_0 = 2,79 × 10^{-8} mol dm^{-3} (titracija s poli dA–poli dT, poli dGdC-poli dGdC), c_0 = 8,4 × 10^{-8} mol dm^{-3} (titracija s poli dAdT-poli dAdT, poli A–poli U), c_0 = 1,67 × 10^{-7} mol dm^{-3} (titracija s poli dG–poli dC) λ_{exc} = 483 nm), b) 6-Cl-YOYO-1 ((c_0 = 7,69 × 10^{-8} mol dm^{-3} (titracija s poli dA–poli dT, poli dAdT-poli dAdT, poli dGdC-poli dGdC), c_0 = 1,53 × 10^{-7} mol dm^{-3} (titracija s poli dG–poli dC) , λ_{exc} = 440 nm)), c) 6-Cl-TO-1 (c_0 = 5,47 × 10^{-7} mol dm^{-3}, λ_{exc} = 483 nm), te d) 6-Cl-YO-1 (c_0 = 1,15 × 10^{-7} mol dm^{-3} (titracija s poli dA–poli dT, poli dAdT-poli dAdT, poli dGdC-poli dGdC, poli dG–poli dC), (c_0 = 2,32 × 10^{-7} mol dm^{-3} (titracija s poli A–poli U), λ_{exc} = 440 nm), kao posljedica titracije s polinukleotidima u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3} pri 25 °C.**

Podatci prikazani na slici 51 jasno pokazuju kako **6-Cl-TOTO-1** tvori stabilniji kompleks s poli dA–poli dT i poli dGdC-poli dGdC u usporedbi s ostalim DNA/RNA, dok njegov monomer **6-Cl-TO-1** ne pokazuje selektivnost u vezanju na polinukleotide.

Mala promjene u strukturi spojeva tj. zamjena **TO** s **YO** kromoforom je uzrokovala bitnu razliku u vezanju i mnogo kompleksnije rezultate. **6-Cl-YOYO-1** ne pokazuje selektivnost koju pokazuje **6-Cl-TOTO-1** prema poli dA–poli dT i poli dGdC-poli dGdC, a umjesto toga pokazuje visoku selektivnost i mješovit način vezanja s poli dAdT-poli dAdT (Slika 51b).



Slika 52: **Fluorescencijska titracija 6-Cl-YOYO-1 (c = 1,53 × 10^{-7} mol dm^{-3}) s poli A–poli U, λ_{exc} = 440 nm, kakodilatni pufer, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3}, pri 25 °C . Umetak: Promjene u intezitetu fluorescencije 6-Cl-YOYO-1 na λ_{max} = 570 nm (crno) i λ_{max} = 510 nm (crveno).**

Još zanimljivije ponašanje pokazuje fluorimetrijska titracija **6-Cl-YOYO-1** s RNA. Fluorescencijska titracija spoja **6-Cl-YOYO-1** nakon dodatka poliA-poliU pokazala je smanjenje intenziteta fluorescencije na maksimumu λ = 510 nm te povećanje intenziteta i pojava novog maksimuma fluorescencije na λ = 570 nm, što nije opaženo za ostale spojeve i polinukleotide, već je specifično za RNA (slika 52). Sustavna devijacija od izosbestičke točke

te sigmoidalni oblik titracijske krivulje upućuju na postojanje barem triju fluorofornih spojeva. Kako je struktura RNA specifična u odnosu na DNA, te je karakterizira duboki i uski veliki utor,[93] vezno mjesto u velikom utoru RNA može primiti molekulu boje i dimer boje. Kako monomer boje i dimer boje u ovom slučaju imaju drugačiju emisiju, predloženi način vezanja se može detektirati fluorescencijskim titracijama. Emisijski maksimum na 570 nm je specifičan za kompleks **6-Cl-YOYO-1**/RNA i nastaje pri velikom suvišku RNA u odnosu na boju, te se može pripisati intramolekulskom slaganju monomera boje unutar RNA veznog mjesta. Takav način intramolekulskog slaganja **6-Cl-YOYO-1** unutar veznog mjesta RNA je dodatno podržan u potpunosti drugačijim emisijskim odgovorom **6-Cl-YO-1** prilikom vezanja na RNA, koji je pokazao samo povećanje emisije na 506 nm.

Podatci fluorimetrijskih titracija obrađeni su nelinearnom regresijom prema Scatchardovoj jednadžbi i izračunane su konstante ravnoteže reakcije vezanja K_s te parametar n.[91,92]
Rezultati dobiveni obradom za n su bili u rasponu 0,1 do 0,4. Koeficijenti korelacije su za sve titracije bili u rasponu 0,988−0,999.

5.3.3. Izračunavanje konstanti vezanja simultano iz rezultata fluorescencijskih i UV/Vis titracija

Kako bi se dobio cjeloviti uvid u interakcije ispitivanih spojeva s nizom polinukleotida, napravljen je izračun konstanti ravnoteže reakcije vezanja simultano iz UV/Vis i fluorescencijskih titracija. Račun je napravljen nelinearnom regresijom procedurom GlobalFit prema Scatchardovoj jednadžbi koristeći Wolfram Mathematica softver.

U prvom koraku su izračunate K_s, sa slobodnim omjerom stehiometrije vezanja n. Kako su tako dobiveni podatci dali širok raspon za n od 0,1 do 0,4, ti podatci se ne mogu međusobno uspoređivati. Zato je u sljedećoj iteraciji proveden račun s fiksnim omjerom n = 0,2 (Tablica 7).

Tablica 7 Konstante ravnoteže reakcije vezanja log K_s određene simultano iz fluorescencijskih i UV/Vis titracija za 6-Cl-TOTO-1, 6-Cl-YOYO-1, 6-Cl-TO-1 i 6-Cl-YO-1 s polinukleotidima (kakodilatni pufer, pH = 7,0; I = 0,05 mol dm^{-3}).

	poli dA-poli dT	poli dAdT-poli dAdT	poli dG-poli dC	poli dGdC-poli dGdC	poli A-poli U
6-Cl-TOTO-1	8,7	6,8	7,5	9,3	6,0
6-Cl-YOYO-1	7,4	5,6	7,8	7,9	7,3
6-Cl-TO-1	5,5	7,3	7,0	8,1	7,0
6-Cl-YO-1	6,6	6,2	8,4	6,2	5,6

Rezultati ukazuju na vrlo velik afinitet istraživanih boja prema polinukleotidima, s log K_s vrijednostima u rasponu od 5 pa sve do 9. Rezultati također ukazuju na snažniji afinitet dimera **6-Cl-TOTO-1** te **6-Cl-YOYO-1** prema polinukleotidima nego monomera **6-Cl-TO-1** i **6-Cl-YO-1**.

Vizualnom analizom podataka dobivenih fluorimetrijskim titracijama za spoj **6-Cl-TOTO-1** (slika 51) može se opaziti značajno oštriji nagib titracijskih krivulja te istovremeno relativno viši afinitet vezanja (log K_s, tablica 7) što upućuje da se **6-Cl-TOTO-1** veže na homo polinukleotide (poli dA–poli dT, poli dG–poli dC) skoro 2 reda veličine jačim afinitetom nego na alternirajuće ds-DNA ili RNA polinukleotide. Monomer **6-Cl-TO-1** pokazuje skoro

jednaki afinitet prema sipitivanim DNA/RNA polinukleotidima. Ta činjenica potvrđuje selektivnost dimera **6-Cl-TOTO-1** prema polinukleotidima u odnosu na **6-Cl-TO-1**.

Podatci ukazuju i na zanimljivu činjenicu da za spoj **6-Cl-YOYO-1** (log K_s, tablica 7) selektivnost nije toliko izražena u usporedbi s analognim spojem **6-Cl-TOTO-1**, najvjerojatnije zbog veće sklonosti agregacije. Daljnja analiza parametara vezanja dovodi do zaključka da dimeri ispitivanih boja (**6-Cl-TOTO-1** i **6-Cl-YOYO-1**) ne pokazuju proporcionalno jače vezanje na polinukleotide u usporedbi s monomerima, što upućuje da interkalativni način vezanja nije promoviran u bisinterkalaciju dimera koji bi prema dostupnoj literaturi pokazao barem tri reda veličine jači afinitet prema polinukleotidima.3 Navedeno upućuje da dimeri ulaze u interakciju na dva moguća načina:

a) mono-interkalacija i dodatna interakcija pozitivno nabijenog lanca s fosfatnom okosnicom te pozicioniranje neinterkaliranog cijanina unutar DNA/RNA utora, ili
b) agregacija dimera boje unutar DNA/RNA utora usporedno s interakcijom pozitivno nabijenog lanca s fosfatnom okosnicom.

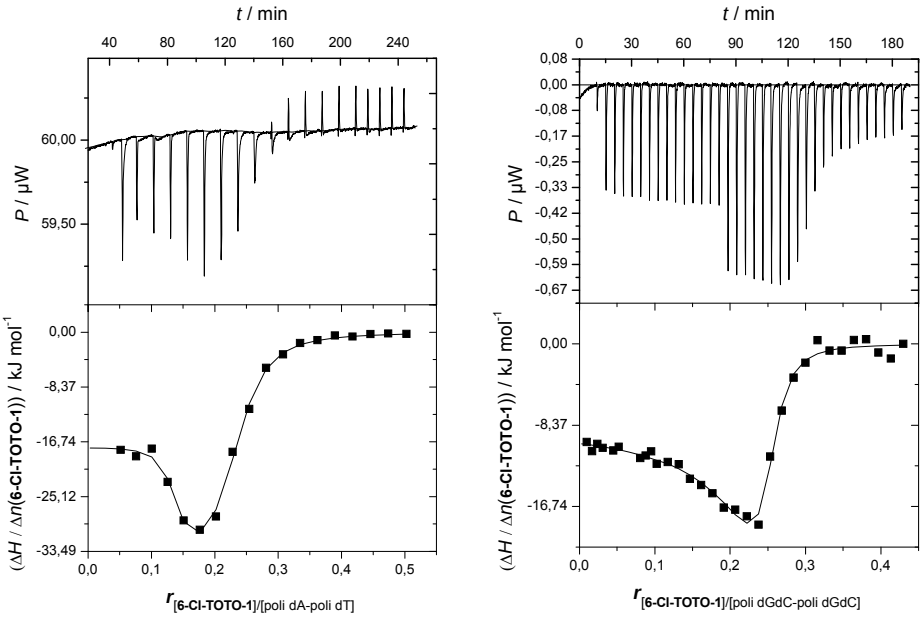
5.3.4. Izotermna titracijska kalorimetrija

Izotermna titracijska kalorimetrija (ITC) je tehnika koja omogućava direktno mjerenje oslobođene ili apsorbirane topline kod interakcija molekula. Parametri koji se mogu odrediti iz ITC eksperimenta su konstanta ravnoteže reakcije vezanja K_s, parametar n, reakcijska entalpija $\Delta_r H$ i reakcijska entropija $\Delta_r S$ pri određenoj temperaturi. Nekovalentna interakcija dviju molekula se dešava samo kada je odgovarajuća reakcijska Gibbsova energija $\Delta_r G$ negativna, pri čemu je $\Delta_r G = \Delta_r H - T\Delta_r S$.[94,95,96]

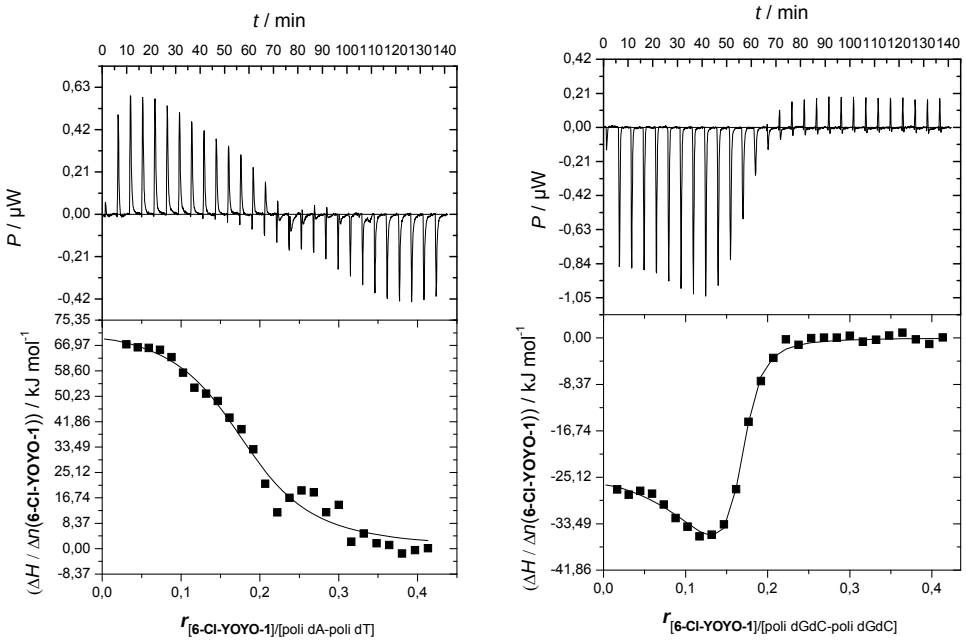
Provedena je titracija sintetskih polinukleotida: poli dAdT-poli dAdT, poli dA-poli dT, poli dG-poli dC, poli dGdC-poli dGdC i poli A-poli U s cijaninskim bojama **6-Cl-TOTO-1**, **6-Cl-YOYO-1**, **6-Cl-TO-1** te **6-Cl-YO-1.**

Većina titracijskih eksperimenata je rezultirala negativnim promjenama entalpije sugerirajući da su procesi vezanja egzotermni.

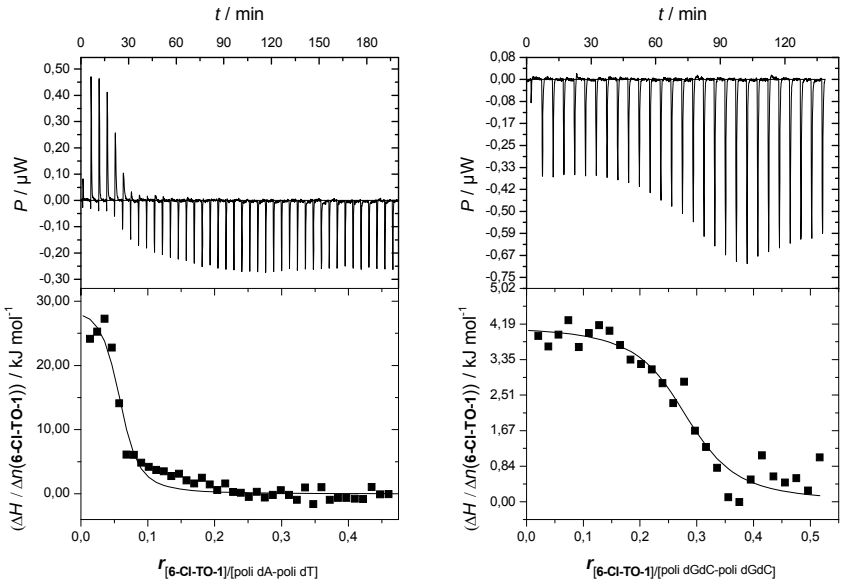
Rezultati su jasno razlikovali vezanje cijaninske boje na polinukleotid pri molarnom omjeru $r_{[spoj]/[polinukleotid]} < 0{,}1$ koji je karakteriziran interakcijom pojedinačne molekule cijaninske boje s izoliranim veznim mjestom na polinukleotidu od vezanja cijaninske boje na polinukleotid pri molarnom omjeru $r_{[spoj]/[polinukleotid]} > 0{,}1$ koji je karakteriziran suviškom boje u odnosu na vezna mjesta polinukleotida i gdje se daljnja vezanja vrše na kooperacijski način (slike 53–56).



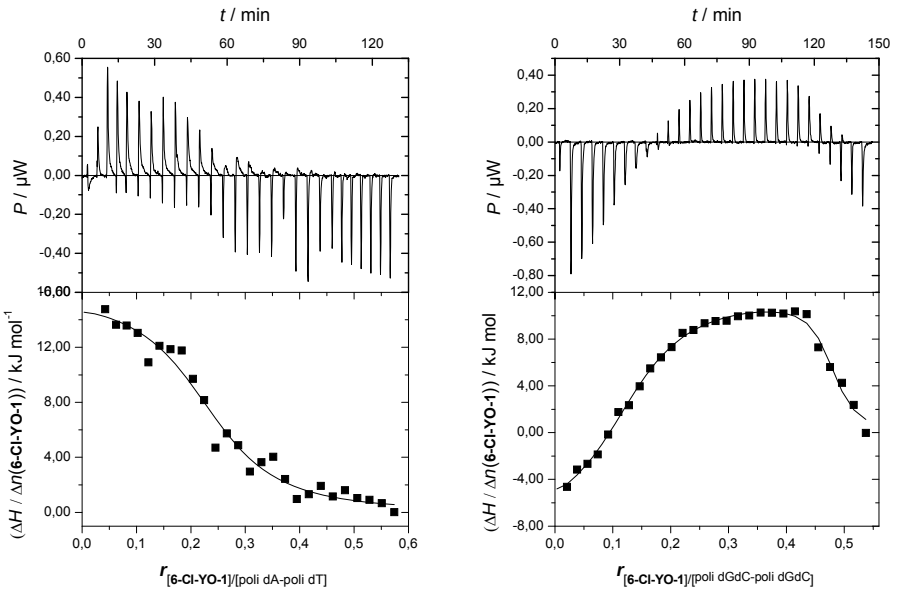
Slika 53: **ITC titracije poli dA- poli dT (lijevo) i poli dGdC-poli dGdC (desno) s 6-Cl-TOTO-1; Gore: sirovi podatci dodatka 6-Cl-TOTO-1 u otopinu polinukleotida. Dolje: eksperimentalno dobiveni podaci (■) i sukladnost podataka s modelom "*two set of sites*" (—).**



Slika 54: **ITC titracija poli dA-poli dT (lijevo) i poli dGdC-poli dGdC s 6-Cl-YOYO-1; Gore: sirovi podatci dodatka 6-Cl-YOYO-1 u otopinu polinukleotida. Dolje: eksperimentalno dobiveni podatci (■) i sukladnost podataka s modelom "*two set of sites*" (—).**



Slika 55: **ITC titracija poli dA-poli dT (lijevo) i poli dGdC-poli dGdC s 6-Cl-TO-1; Gore: sirovi podatci dodatka 6-Cl-TO-1 u otopinu polinukleotida. Dolje: eksperimentalno dobiveni podatci (■) i sukladnost podataka s modelom"*one set of sites*" (—).**



Slika 56: **ITC titracija poli dA-poli dT (lijevo) i poli dGdC-poli dGdC(desno) s 6-Cl-YO-1; Gore: sirovi podatci dodatka 6-Cl-YO-1 u otopinu polinukleotida. Dolje: eksperimentalno dobiveni podatci (■) i sukladnost podataka s modelom "*one set of sites*" (—).**

Parametri dobiveni nelinearnom regresijom podataka dobivenih iz ITC titracija poli A-poli U, poli dG-poli dC, poli dGdC-poli dGdC, poli dAdT-poli dAdT i poli dA-poli dT s **6-Cl-YOYO-1**, **6-Cl-TOTO-1**, **6-Cl-TO-1** te **6-Cl-YO-1** su prikazani u tablici 7.

Tablica 7: Parametri dobiveni nelinearnom regresijom podataka dobivenih iz ITC titracija poli A-poli U, poli dG-poli dC, poli dGdC-poli dGdC, poli dAdT-poli dAdT i poli dA-poli dT s 6-Cl-YOYO-1, 6-Cl-TOTO-1, 6-Cl-TO-1 te 6-Cl-YO-1.

Spoj	Polinukleotid	*n*	log K_s	$\Delta_r H$/ kJ mol^{-1}	$\Delta_r S$/ JK^{-1} mol^{-1}	$T\Delta_r S$/ kJ mol^{-1}	$\Delta_r G$/ kJ mol^{-1}
6-Cl-TOTO-1	poli A -poli U*	0,11	6,3	-40,3	-14,8	-4,4	-36,0
		0,24	8,5	-26,1	75,0	22,4	-48,5
	poli dG -poli dC	0,21	6,3	-28,3	28,0	8,3	-36,0
	poli dA -poli dT*	0,13	8,4	-17,5	103,0	30,7	-47,9
		0,09	6,5	-37,5	-0,5	-0,1	-37,1
	poli dGdC-poli dGdC*	0,08	7,1	-27,5	43,5	13,0	-40,5
		0,18	8,0	-10,2	119,3	35,6	-45,7
	poli dAdT-poli dAdT *	0,11	8,3	-15,2	107,6	32,1	-47,4
		0,26	6,1	-29,4	18,4	5,5	-34,8
6-Cl-YOYO-1	poli A -poli U*	0,05	6,4	-79,8	-145,0	-43,2	-36,5
		0,22	7,4	-21,3	70,5	21,0	-42,2
	poli dG -poli dC	0,18	6,4	-42,5	-19,1	-5,7	-36,5
	poli dA -poli dT	0,18	6,4	73,7	370,0	110,3	-36,5
	poli dGdC-poli dGdC*	0,04	7,0	-69,1	-97,1	-29,0	-40,0
		0,12	7,6	-22,5	69,9	20,8	-43,4
	poli dAdT-poli dAdT *	0,09	7,2	-50,2	-30,2	-9,0	-41,1
		0,11	8,6	-13,7	118,1	35,2	-49,1
6-Cl-TO-1	poli A -poli U	0,02	6,7	13,6	174,0	51,9	-38,2
	poli dG -poli dC	0,1	6,2	-4,2	104,6	31,2	-35,7
	poli dA -poli dT	0,06	6,2	37,1	243,0	72,5	-35,4
	poli dGdC-poli dGdC	0,3	6,1	4,1	131,4	39,2	-34,8
	poli dAdT-poli dAdT	0,2	7,0	6,9	157,0	46,8	-40,0
6-Cl-YO-1	poli A -poli U	0,03	6,7	9,3	159,0	47,4	-38,2
	poli dG -poli dC*	0,1	7,2	-45,4	-13,6	-4,1	-41,1
		0,3	6,7	11,2	166,7	49,7	-38,2
	poli dA -poli dT	0,25	5,8	15,8	163,0	48,6	-33,1
	poli dGdC-poli dGdC	0,13	8,1	-8,4	126,0	37,6	-46,2
		0,34	6,9	11,9	172,9	51,6	-39,4
	poli dAdT-poli dAdT	0,4	6,4	4,6	138,2	41,2	-36,5

* Parametri dobiveni nelinearnom regresijom podataka s modelom *"two set of sites"*

Iz rezultata se može vidjeti da dimeri boja u većini slučajeva uslijed vezanja s polinukleotidima pokazuju vezanje u dva stupnja. Prvi događaj se događa pri $r_{[spoj]/[polinukleotid]} < 0,1$ koji se može povezati s interkalacijom boje u polinukleotid. Drugi događaj, pri

molarnom omjeru $r_{[spoj]/[polinukleotid]} > 0,1$ se može povezati s mješovitim načinom vezanja koji uključuje interkalaciju, neselektivno vezanje boja u utore polinukleotida te agregaciju boja.

Kako su u ITC eksperimentima bile korištene visoke koncentracije polinukleotida i boje, procesi mješovitog načina vezanja su dominantni. Dobivene Konstante ravnoteže reakcije vezanja dimera boja su u dobroj korelaciji s rezultatima dobivenim fluorimetrijskim metodama za $r_{[spoj]/[polinukleotid]} > 0,1$.

ITC titracijama za **6-Cl-TOTO-1** dobivene konstante stabilnosti reakcije nastajanja kompleksa najveće su za polinukleotode poli A-poli U, poli dA-poli dT, poli dGdC-poli dGdC i poli dAdT-poli dAdT (tablica 7). Rezultati za poli dA-poli dT i poli dGdC-poli dGdC su u skladu s fluorescencijskim titracijama, dok su za poli A-poli U, i poli dAdT-poli dAdT dobivene konstante ravnoteže najvjerojatnije posljedica mješovitog načina vezanja. Za navedene polinukleotide se morala napraviti nelinearna regresija koja podrazumijeva vezanje na dva vezna mjesta. Konstante nastajanja su iznimno visoke, unatoč nepovoljnom koncentracijskom području u kojem su ispitivanja napravljena, pa se unatoč mješovitom načinu vezanja redovno očitavaju log K_s vrijednosti iznad 6.

I spoj **6-Cl-YOYO-1** je pokazao jaki afinitet prema ispitivanim polinukleotidima, no njegove su log K_s vrijednosti ipak niže u odnosu na **6-Cl-TOTO-1**, i u rasponu su 6–8,6. Najjaču tendenciju vezanja ovaj spoj je pokazao s poli dAdT-poli dAdT , što je u skladu s podatcima dobivenim fluorimetrijskim titracijama.

Za monomerni oblik cijaninskih boja uočava se vezanje u jednom koraku, gdje je računom dobiveni stehiometrijski parametar u rasponu 0,02–0,4. Konstante ravnoteže reakcije te boje su nešto niži u odnosu na dimere i u rasponu su log K_s = 5,2–8,1.
Nadalje, iz navedenih pokusa može se zaključiti da boja **6-Cl-TO-1** ovom tehnikom ne pokazuje posebnu selektivnost prema određenom polinukleotidu, dok **6-Cl-YO-1** pokazuje selektivnost prema poli dGdC-poli dGdC, s log K_s 8,1 pri n = 0,1.

Inicijalno je planirano da se konstante log K_s izračunaju simultano iz UV/Vis, fluorescencijskih i ITC titracija. No, zbog kompleksnosti ITC podataka, te koncentracijskog

područja u kojem se vrlo teško mogu opisati interakcije pojedinačne molekule cijaninske boje s izoliranim veznim mjestom na polinukleotidu, od tog cilja se odustalo.

Usporedba konstanti vezanja log K_S izračunanih GlobalFit procedurom (GF) prema Scatchardovoj jednadžbi simultano iz fluorimetrijskih i UV/Vis titracija te vrijednosti log K_S (prve konstante koja odgovara vezanju pojedinačne molekule cijaninske boje s izoliranim veznim mjestom na polinukleotidu) dobiveni nelinearnom regresijom podataka dobivenih iz ITC titracija prikazani su u Tablici 8.

Tablica 8: Konstante ravnoteže reakcije vezanja (log K_s), pri fiksnom omjeru n = 0,2 za spojeve 6-Cl-TOTO-1, 6-Cl-YOYO-1, 6-Cl-TO-1 i 6-Cl-YO-1 s dvolančanim- polinukleotidima izračunatim procedurom GlobalFit (GF)[a] prema Scatchardovoj jednadžbi simultano iz fluorimetrijskih i UV/Vis titracija i izračunatih iz ITC[b,c] titracija (kakodilatni pufer, pH = 7,0, I = 0,05 mol dm^{-3}).

	6-Cl-TOTO-1	6-Cl-YOYO-1	6-Cl-TO-1	6-Cl-YO-1
	GF [a] / ITC [b,c]	GF [a] / ITC [b,c]	GF [a] / ITC [b,c]	GF [a] / ITC [b,c]
poli dA-poli dT	8,7[a] / 8,4 [b,c]	7,4[a] / 6,4 [b]	5,5[a] / 6,2 [b]	6,6[a] / 5,8 [b]
poli dAdT-poli dAdT	6,8[a] / 8,3 [b,c]	5,6[a] / 7,2 [b,c]	7,3[a] /7,0 [b]	6,2[a] /6,4 [b]
poli dG-poli dC	7,5[a] / 6,3 [b]	7,8[a] /6,4 [b]	7,0[a] /6,2 [b]	8,4[a] /7,2 [b]
poli dGdC-poli dGdC	9,3[a] / 7,1 [b,c]	7,9[a] / 7,0 [b,c]	8,1[a] /6,1 [b]	6,2[a] /8,1 [b]
poli A -poli U	6,0[a] /6,3 [b,c]	7,3[a] / 6,4 [b,c]	7,0 [a] / 6,7 [b]	5,6 [a] / 6,7 [b]

[a] Podatci dobiveni titracijama su procesirani procedurom GlobalFit prema Scatchardovoj jednadžbi koristeći program Wolfram Mathematica simultano iz fluorimetrijskih i UV/Vis titracija. Koeficijenti korelacije su bili u rasponu 0,988−0,999 za sve izračunane K_S.

[b] Konstante ravnoteže reakcije vezanja(log K_S) dobivene nelinearnom regresijom podataka dobivenih iz ITC titracija prema modelu *"one set of sites"* Dobivena stehiometrija iz ITC titracija je u rasponu n = 0,02−0,4.

[c] Konstante ravnoteže reakcije vezanja(log Ks) dobivene nelinearnom regresijom podataka dobivenih iz ITC titracija prema modelu *"two set of sites"*. Prikazane vrijednosti (log K_S) odgovaraju prvom procesu vezanja pri $r_{[spoj]/[polinukleotid]} \leq 0,1$ karakterizirajući interakciju pojedinačne molekule cijaninske boje s izoliranim veznim mjestom na polinukleotidu DNA/RNA. Dobivena stehiometrija iz ITC titracija je u rasponu n = 0,04–0,13.

Usporedbom rezultata dobivenih procedurom GlobalFit simultano iz UV/Vis i fluorescencijskih titracija s podatcima dobivenim ITC titracijama uočava se dobro slaganje kod kompleksa poli dA-poli dT i poli dAdT-poli dAdT i ispitivanih spojeva. Za te sustave su dobivene log K_s vrijednosti unutar reda veličine, dok su za poli dG-poli dC i poli dGdC-poli dGdC vrijednosti log K_s dobivene iz ITC titracija niže od onih dobivenih spektroskopskim metodama.

Razlog za razlike opažene u log K_s dobivenih Global Fit procedurom i iz ITC titracija može biti posljedica razlike u osjetljivosti upotrijebljenih analitičkih tehnika. Primjerice, odziv u UV/Vis i fluorescenciji je direktno ovisan o kromoforu, tj. njegovoj interakciji s polinukleotidima, dok se koristeći mikrokalorimetriju detektiraju sve interakcije koje kao posljedicu imaju izmjenu topline. Tako se mikrokalorimetrijom, za razliku od spektroskopskih metoda mogu detektirati i interakcije u kojima kromofor ne sudjeluje.

5.3.5. Određivanje temperature mekšanja

Kidanje vodikovih veza između parova baza se naziva denaturacija nukleinskih kiselina, a za posljedicu ima odvajanje lanaca. Temperatura mekšanja (t_m) deoksiribonukleinske kiseline ili ribonukleinske kiseline označava temperaturu pri kojoj je 50 % DNA/RNA denaturirana. Opće je poznato da se pod utjecajem topline dvostruke uzvojnice polinukleotida kidaju u dva lanca pri određenoj temperaturi t_m. Nekovalentno vezanje malih molekula na dvostruku uzvojnicu polinukleotida obično ima utjecaja na termičku stabilnost heliksa, te se za takve sustave očekuje razlika u temperaturi mekšanja u odnosu na čisti polinukleotid. Razlika između temperature mekšanja slobodnog polinukleotida i njegovog kompleksa s malom molekulom (Δt_m) je vrlo važan faktor u karakterizaciji interakcija malih molekula s polinukleotidima pogotovo ako se u obzir uzmu i dobivene konstante vezanja.[84]

Pozitivna vrijednost Δt_m ukazuje na značajni stabilizacijski efekt male molekule na dvolančani polinukleotid, zbog snažnih interakcija između male molekule i polinukleotida primjerice kod interkalacije, bisinterkalacije ili vezanja u mali utor polinukleotida. Stabilizacija se ostvaruje kroz postojanje više dostupnih vodikovih veza koje mogu stabilizirati kostur polinukleotida.

Kod Δt_m vrijednosti koje su bliske nuli, upućuju da molekula nije ušla u snažnu interakciju s DNA/RNA, već je najvjerojatnije došlo do samo-agregacije boje u hidrofobnim utorima DNA/RNA što nema utjecaja na termičku stabilnost polinukleotida. Isto tako, konstanta vezanja dobivena za takve sustave je posljedica samo-agregacije boja.

Negativna vrijednost Δt_m ukazuje na to da se mala molekula preferencijalno veže na jedan polinukleotid, a ne između parova baza. S takvim vezanjem, smanjuje se broj vodikovih

veza koje stabiliziraju dvostruku uzvojnicu, pa je takav kompleks termički nestabilniji od nativne DNA.

U sklopu ovog rada ispitan je utjecaj interakcija četiri istraživane boje **6-Cl-TOTO-1**, **6-Cl-YOYO-1**, **6-Cl-TO-1** i **6-Cl-YO-1** s tri DNA polinukleotida (*ct*-DNA, poli dAdT-poli dAdT i poli dAdT) te s RNA poli A-poli U. DNA polinukleotidi bogati parovima baza GC nisu istraživani zbog točke mekšanja koja se dešava pri vrlo visokim temperaturama (iznad 80 °C). Kako se kod interakcija s istraživanim bojama očekuje stabilizacija DNA s značajnom promjenom t_m, eksperimenti s GC polinukleotidima nisu provedeni, jer su očekivane t_m izvan mjernog područja instrumenta.

Dimeri boja **6-Cl-TOTO-1** i **6-Cl-YOYO-1** stabiliziraju polinukleotide DNA i RNA u mnogo većoj mjeri nego njihovi monomeri **6-Cl-TO-1** i **6-Cl-YO-1** (tablica 9). Stabilizacija polinukleotida može se opaziti već pri molarnom omjeru $\boldsymbol{r}_{[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]} = 0{,}05$. Izražena je značajna stabilizacija dvostrukih uzvojnica pri omjeru 0,1 koja iznosi 10 °C za poli dA-dT te više od 20 °C za ostale polinukleotide. U slučaju boje **6-Cl-YOYO-1**, pri molarnom omjeru 0,1 opaža se značajna stabilizacija DNA ($\Delta t_m > 30$ °C) dok je za RNA $\Delta t_m = 5$ °C.

Tablica 9: Ovisnost vrijednosti Δt_m / °C analiziranih dvolančanih polinukleotida uslijed dodatka cijaninskih boja (kakodilatni pufer, pH = 7; I = 0,05 mol dm^{-3}).

Spoj	Polinukleotid	[a]Δt_m / °C		
		[b]r = 0,05	[b]r = 0,1	[b]r = 0,2
6-Cl-TOTO-1	*ct*-DNA		>20 [d]	>20 [d]
	poli dAdT-poli dAdT		37	37
	poli dA-poli dT	2	10	
	poli A-poli U	3	6; 28 [c]	
6-Cl-YOYO-1	*ct*-DNA		>30 [d]	>30 [d]
	poli dAdT-poli dAdT	5	>30[d]	>30 [d]
	poli dA-poli dT	<1	>30 [d]	>30 [d]
	poli A-poli U		5	34
6-Cl-TO-1	*ct*-DNA		<1	<1
	poli dAdT-poli dAdT		<1	<1
	poli dA-poli dT		8	10
	poli A-poli U		2	<1; 25[c]
6-Cl-YO-1	*ct*-DNA		6	8
	poli dAdT-poli dAdT		9	11
	poli dA-poli dT		13	29
	poliA-poli U		13; 42[c]	>40[d]

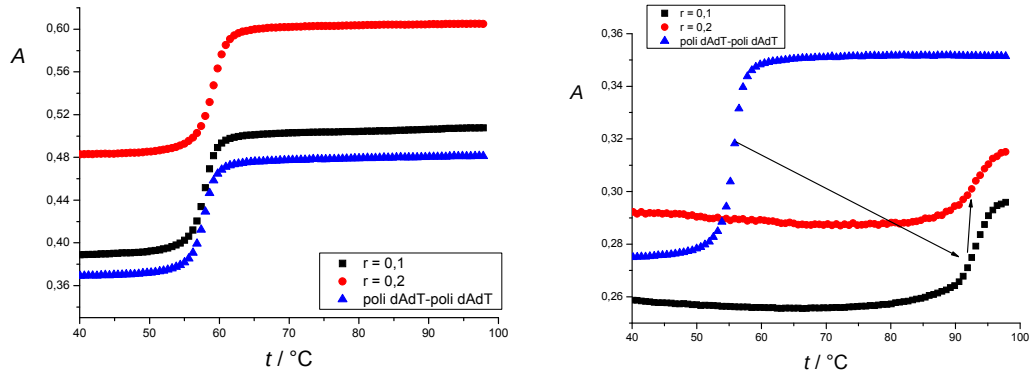
[a] Instrumentalna pogreška u Δt_m = ± 0,5 °C

[b]molarni omjer r [spoj] / [polinukleotid]

[c]krivulja s dva prijelaza

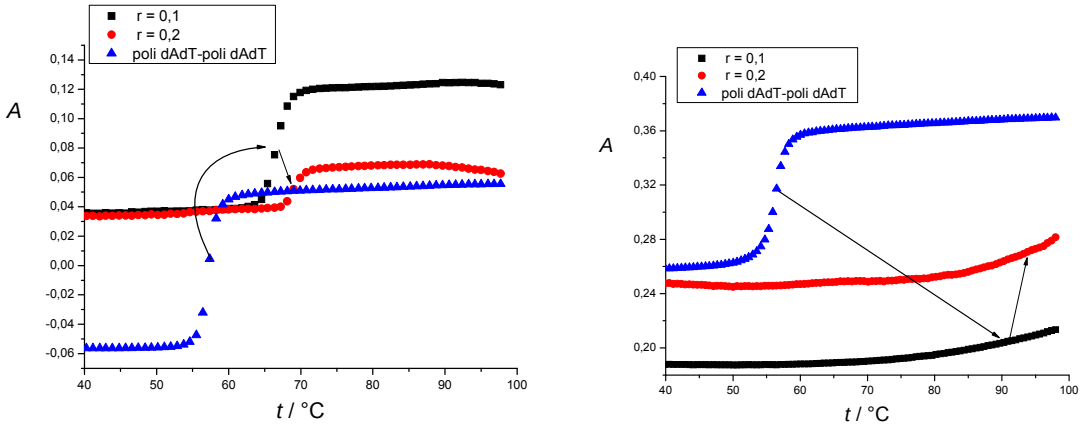
[d]t_m je izvan mjernog područja instrumenta

Slika 57 pokazuje usporedbu krivulja termičke denaturacije poli dAdT-poli dAdT uslijed dodatka spojeva **6-Cl-TO-1** i njegovog dimera **6-Cl-TOTO 1**, dok slika 58 pokazuje krivulje termičke denaturacije poli dAdT-poli dAdT uslijed dodatka spojeva **6-Cl-YO-1** i njegovog dimera **6-Cl-YOYO-1**.



(a) (b)

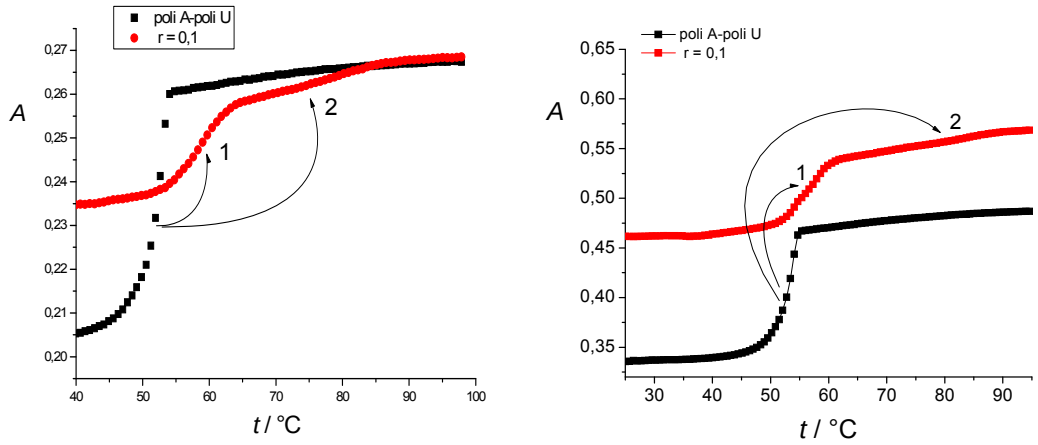
Slika 57: **Krivulje termičke denaturacije poli dAdT-poli dAdT uslijed dodatka 6-Cl-TO-1 (a) i 6-Cl-TOTO-1 (b) pri različitim omjerima $r_{[spoj]/[polinukleotid]}$, kakodilatni pufer, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3}.**



(a) (b)

Slika 58: **Krivulje termičke denaturacije poli dAdT-poli dAdT uslijed dodatka 6-Cl-YO-1 (a) i 6-Cl-YOYO-1 (b) pri različitim omjerima $r_{[spoj]/[polinukleotid]}$, kakodilatni pufer, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3}.**

Kod istraživanja interakcija boja **6-Cl-TOTO-1, 6-Cl-YOYO-1** (slika 59) i **6-Cl-YO-1** s RNA opažene su krivulje denaturacije s dva prijelaza. Ta dva prijelaza upućuju na dva različita načina vezanja ispitivanih spojeva na RNA.



(a) (b)

Slika 59: Krivulje termičke denaturacije poli A-poli U uslijed dodatka 6-Cl-TOTO-1 (a) i 6-Cl-YOYO-1 (b) pri omjeru $r_{[spoj]/[polinukleotid]}$ = 0,1, kakodilatni pufer, pH = 7; I = 0,05 mol dm^{-3}.

Kod monomera boja **6-Cl-TO-1** i **6-Cl-YO-1** vidljiva je slaba stabilizacija ispitivanih DNA polinukleotida. Prema literaturi, te prema pokusima titracija na UV, ITC i CD ispitivane boje **6-Cl-TO-1** i **6-Cl-YO-1** nisu ušle u snažnu interakciju s DNA, već je najvjerojatnije došlo do samoagregacije boje u hidrofobnim utorima DNA što nema utjecaja na termičku stabilnost polinukleotida. Za razliku od DNA, kod RNA polinukleotida je boja **6-Cl-TO-1** stabilizirala uzvojnicu za 2 °C pri $r_{[spoj]/[polinukleotid]}$ = 0,1 dok stabilizacija pri omjeru $r_{[spoj]/[polinukleotid]}$ = 0,2 iznosi 25 °C. **6-Cl-YO-1** je već pri omjeru $r_{[spoj]/[polinukleotid]}$ = 0,1 stabilizirao RNA za 13 °C odnosno 42 °C (dvofazna krivulja).

5.3.6. Spektroskopija cirkularnog dikroizma

Cirkularni dikroizam se definira kao nejednaka apsorpcija lijevo i desno kružno polarizirane svjetlosti, a nastaje u slučaju kada analizirana molekula sadrži jedan ili više kiralnih kromofora.

Spektroskopija cirkularnog dikroizma (CD) je spektroskopska tehnika u kojoj se CD signal mjeri u rasponu različitih valnih duljina. Koristi se za istraživanje svojstava različitih molekula no najveću primjenu ima u istraživanju bioloških molekula. Primarna svrha cirkularnog dikroizma je istraživanje sekundarne strukture ili konformacije makromolekula, posebice proteina, peptida i nukleinskih kiselina.

Važnost primjene i praktična primjena se bazira na kemiji makromolekula čija sekundarna struktura direktno ovisi o okruženju u kojem se nalazi, primjerice o temperaturi ili pH, pa se CD spektroskopija koristi u svrhu istraživanja promjene konformacije makromolekula podvrgnutih promjenama uvjeta ili prilikom proučavanja interakcija s drugim molekulama.

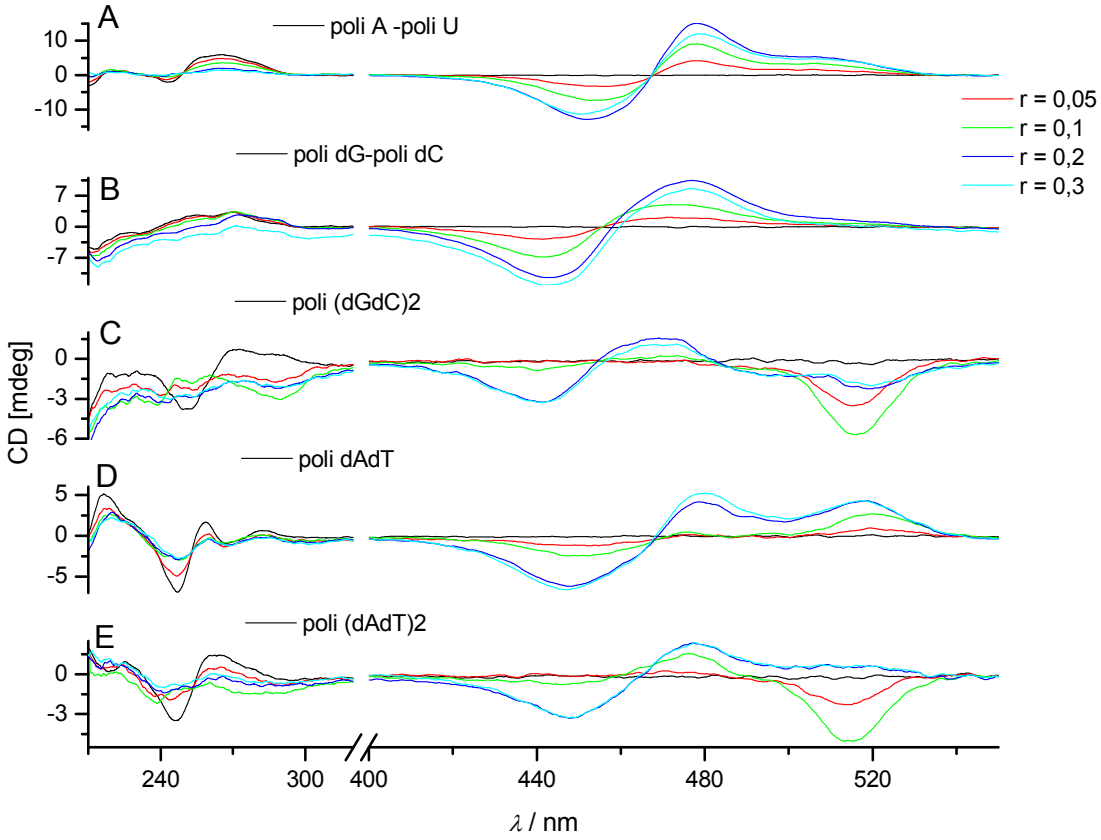
Iz spektra cirkularnog dikroizma mogu se dobiti vrijedne informacije o strukturnim, termodinamičkim i kinetičkim svojstvima makromolekule. Kako bi se dobio uvid u konformacijske promjene polinukleotida uslijed interakcije s istraživanim bojama, odabrana je spektroskopija cirkularnog dikroizma kao tehnika koja je visoko osjetljiva na promjene u sekundarnoj strukturi polinukleotida.[97]

Nadalje akiralne molekule, kojima pripadaju i ispitivani spojevi mogu uslijed vezanja pokazati inducirani cirkularni dikroizam (ICD), koji isto tako može dati vrijedne informacije o načinu vezanja istih na polinukleotid.[98,99]

Dodatak **6-Cl-TOTO-1** i **6-Cl-YOYO-1** dimernih boja je uzrokovao drastične promjene CD vrpci poli dA-poli dT i poli dAdT-poli dAdT (230–290 nm) što upućuje na značajne strukturne deformacije dvostrukih uzvojnica (slike 60 i 61). Monomeri ispitivanih boja **6-Cl-TO-1** i **6-Cl-YO-1** uslijed vezanja na poli dA-poli dT i poli dAdT-poli dAdT nisu uzrokovale značajne promjene u CD spektrima (slike 62 i 63).

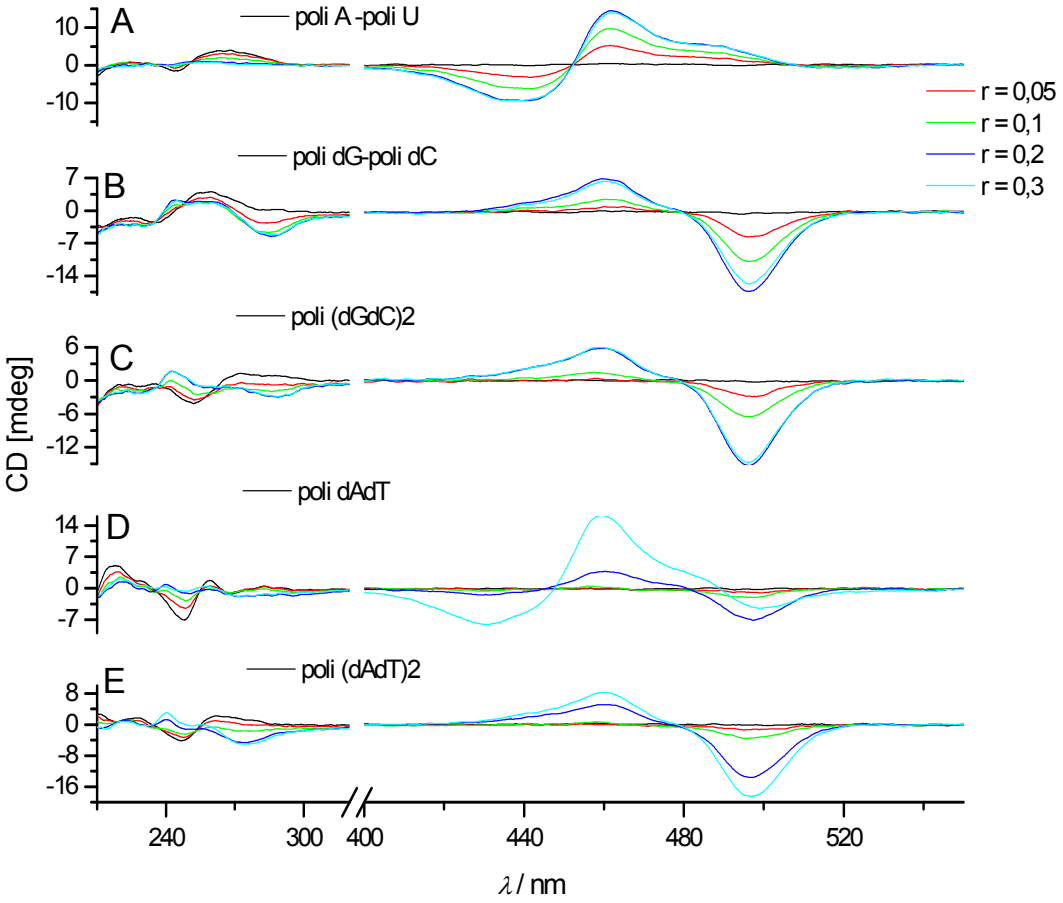
Ono što se može opaziti iz prikazanih rezultata za sve boje je pojava vrpci induciranog cirkularnog dikroizma u području valnih duljina 400–500 nm. Vrpce induciranog cirkularnog dikroizma su snažne za dimerne boje **6-Cl-TOTO-1** i **6-Cl-YOYO-1** dok monomerne boje **6-Cl-TO-1** i **6-Cl-YO-1** pokazuju vrpce slabijeg intenziteta. Oblik krivulja ICD kod svih ispitivanih spojeva ovisi o molarnom omjeru $\boldsymbol{r}_{[\text{spoj}]\,/\,[\text{polinukleotid}]}$.

Titracija poli dAdT polinukleotida s **6-Cl-TOTO-1** uzrokuje pojavu bisignatne ICD vrpce već pri $r_{[spoj]/[polinukleotid]}$ = 0,05 i $r_{[spoj]/[polinukleotid]}$ = 0,1 s negativnim maksimumom pri 450 nm i pozitivnim maksimumom pri 520 nm. Opaža se i pojava izoeliptične točke pri 468 nm što je indikacija da je u uzorcima formirana jedna vrsta specije, najvjerojatnije dimera. Pri molarnim omjerima $r_{[spoj]/[polinukleotid]}$ = 0,2 i višim, opaža se pojava trećeg, pozitivnog maksimuma, pri 480 nm što ukazuje na stvaranje viših agregata.



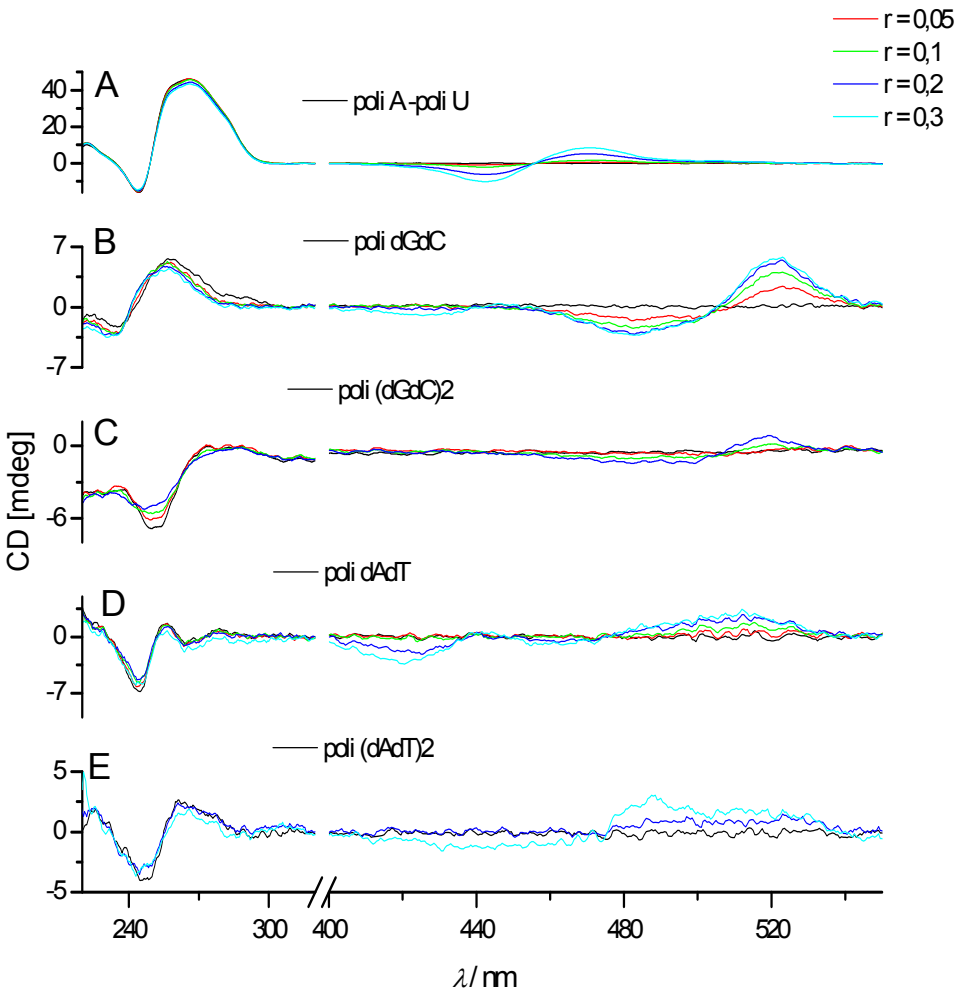
Slika 60: **CD titracija poli A-poli U (A) poli dG-poli dC (B) poli dGdC-poli dGdC (C) poli dA-poli dT (D) poli dAdT-poli dAdT (E) s 6-Cl-TOTO-1 pri molarnim omjerima $r_{[spoj]/[polinukleotid]}$ = 0,05–0,3. Koncentracija polinukleotida je $c = 1 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3}, kakodilatni pufer, pH= 7, I = 0,05 mol dm^{-3} pri 25 °C.**

Titracija poli dA-poli dT polinukleotida s **6-Cl-YOYO-1** pri omjeru $r_{[spoj]/[polinukleotid]}$ = 0,05 uzrokuje pojavu jednog negativnog ICD maksimuma pri 500 nm. Jedan ICD maksimum je karakterističan za interkalacijski način vezanja. Pri $r_{[spoj]/[polinukleotid]}$ = 0,1 opaža se drugi pozitivni maksimum pri 460 nm, dok se pri $r_{[spoj]/[polinukleotid]} \geq 0{,}2$ pojavljuje treća ICD vrpca pri 430 nm.

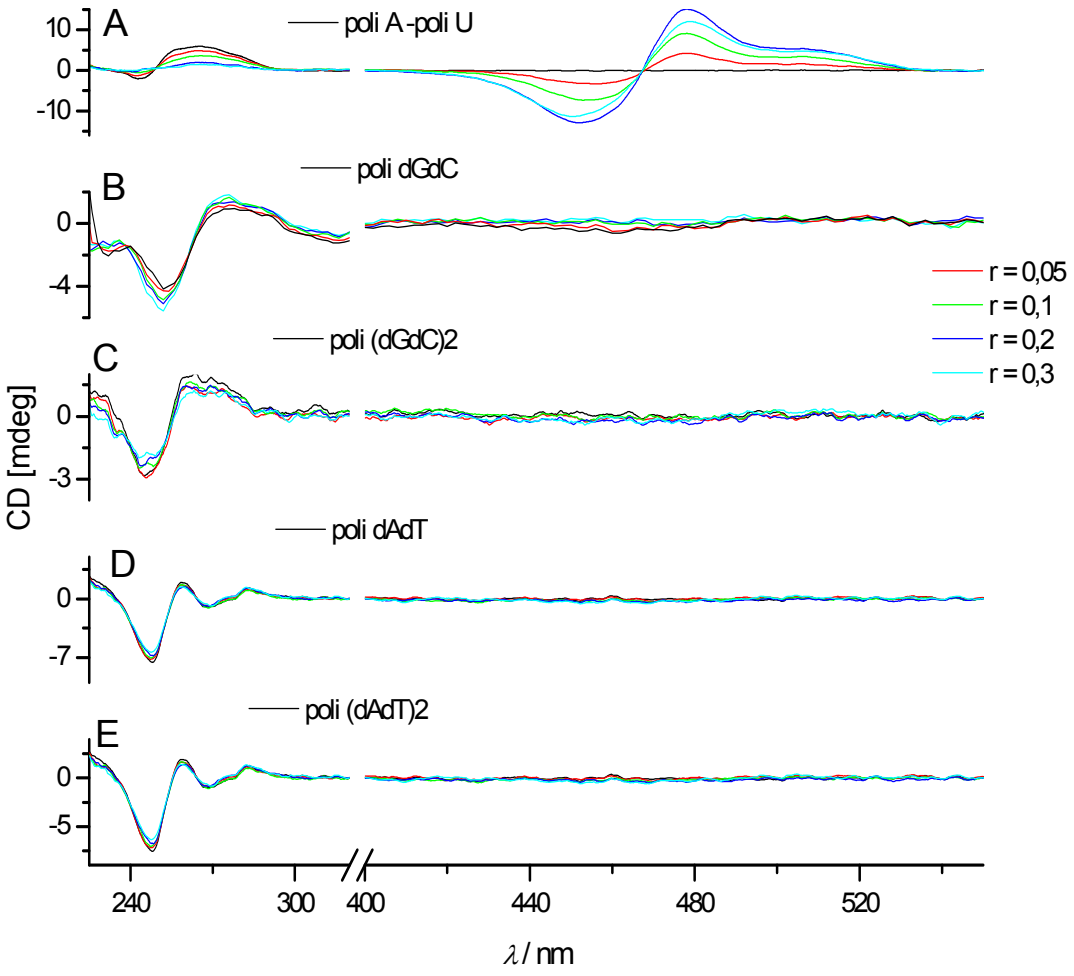


Slika 61: **CD titracija poli A-poli U (A) poli dG-poli dC (B) poli dGdC-poli dGdC (C) poli dA-poli dT (D) poli dAdT-poli dAdT (E) s 6-Cl-YOYO-1 pri molarnim omjerima $r_{[spoj]/[polinukleotid]}$ = 0,05–0,3. Koncentracija polinukleotida je $c = 1 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3}, kakodilatni pufer, pH= 7, I = 0,05 mol dm^{-3} pri 25 °C.**

6-Cl-TO-1 i **6-Cl-YO-1** također pokazuju pojavu ICD, ali pri $r_{[spoj]/[polinukleotid]} > 0{,}1$ za **6-Cl-TO-1** te $r_{[spoj]/[polinukleotid]} > 0{,}3$ za **6-Cl-YO-1**.



Slika 62: **CD titracija poli A-poli U (A) poli dG-poli dC (B) poli dGdC-poli dGdC (C) poli dA-poli dT (D) poli dAdT-poli dAdT (E) s 6-Cl-TO-1 pri molarnim omjerima $r_{[spoj]/[polinukleotid]}$ = 0,05–0,3. Koncentracija polinukleotida je $c = 1 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3}, kakodilatni pufer, pH= 7, I = 0,05 mol dm^{-3} pri 25 °C.**



Slika 63: **CD titracija poli A-poli U (A) poli dG-poli dC (B) poli dGdC-poli dGdC (C) poli dA-poli dT (D) poli dAdT-poli dAdT (E) s 6-Cl-YO-1 pri molarnim omjerima $r_{[spoj]/[polinukleotid]}$ = 0,05–0,3. Koncentracija polinukleotida je $c = 1 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3}, kakodilatni pufer, pH= 7, I = 0,05 mol dm^{-3} pri 25 °C.**

U slučaju titracija poli dAdT - poli dAdT bisignatne ICD vrpce se opažaju pri $r_{[spoj]/[polinukleotid]} \geq 0{,}2$ za spojeve **6-Cl-YOYO-1**, **6-Cl-TO-1** te **6-Cl-YO-1**. Vezanje **6-Cl-TOTO-1** na poli dAdT - poli dAdT je uzrokovala nestanak/promjenu predznaka trećeg opaženog ICD maksimuma (512 nm) iz negativnog u pozitivan za $r_{[6\text{-Cl-TOTO-1}]/[polinukleotid]} > 0{,}2$.

Ispitivane boje **6-Cl-TOTO-1** te **6-Cl-YOYO-1** su uzrokovale još izraženije strukturne promjene dvostruke uzvojnice uslijed vezanja na GC-DNA u odnosu na AT-DNA. Polinukleotidi poli dGdC- poli dGdC te poli dGdC su uslijed vezanja **6-Cl-TOTO-1** i **6-Cl-YOYO-1** pokazale slična svojstva, snažne promjene u području valnih duljina 220–310 nm, dok njihovi monomeri nisu uzrokovali promjene u strukturi ispitivanih DNA. Kao što je bilo opaženo i kod AT-DNA, i u slučaju vezanja ispitivanih boja na GC-DNA pojavljuju se spektri induciranog cirkularnog dikroizma, za **6-Cl-TOTO-1, 6-Cl-YOYO-1** te **6-Cl-TO-1** pri $r_{[spoj]/[polinukleotid]} > 0{,}05$ dok za **6-Cl-YO-1** pri $r_{[spoj]/[polinukleotid]} \geq 0{,}2$.

Vezanje ispitivanih boja na RNA nije uzrokovalo strukturne promjene dvostruke uzvojnice za niti jedan ispitivani omjer. Inducirani CD spektri su opaženi za sve ispitivane spojeve i u svim ispitivanim omjerima $r_{[spoj]/[polinukleotid]}$. Svi uzorci pokazuju bisignatne vrpce koje su sličnog oblika, karakteriziran s dva maksimuma; negativni maksimum pri 420–460 nm i pozitivnog maksimuma iznad 440 nm, te izoeliptične točke u području 430–470 nm ovisno o ligandu. Takve bisignatne ICD vrpce se uobičajeno mogu pripisati formaciji dimera boja unutar malog utora DNA/RNA, dok izoeliptična točka ukazuje na formaciju samo jednog tipa agregata, najvjerojatnije dimera. Pojava viših agregata bi uzrokovala pomake u položaju maksimuma i promjene izgleda bisignatnih vrpca.[100]

Dobiveni rezultati potvrđuju da se ispitivane boje vežu na polinukleotide miješanim načinom, posebno kao interkalatori te vezanjem u mali utor DNA. Pri velikom suvišku dostupnih veznih mjesta boje se kao monomeri vežu na DNA dok se već pri omjeru $r_{[spoj]/[polinukleotid]} > 0{,}1$ stvaraju dimeri boja. Nadalje, pri molarnim omjerima $r_{[spoj]/[polinukleotid]}$ iznad 0,2 uočeno je stvaranje viših agregata boja. Rezultati CD spektroskopije su u skladu s rezultatima ITC titracija i fluorescencijskih titracija.

5.3.7. Određivanje viskoznosti

Određivanje viskoznosti je jedna od najčešće korištenih metoda u istraživanju interakcija malih molekula s polinukleotidima. Poznato je da male molekule mogu ući u interakciju s polinukleotidima na nekoliko načina, među kojima su najinteresantniji interkalacija te vezanje u mali utor. Prilikom vezanja male molekule na DNA/RNA kroz interkalativni način vezanja, a u velikom broju slučaja i kroz vezanje u mali utor dolazi do značajnog porasta viskoznosti DNA.[101,102] Razlog tome je što se prilikom vezanja male molekule na štapićasti fragment polinukleotida duljina lanca produljuje. Općenito se utjecaj ispitivanog spoja na produljenje polinukleotidnih lanaca prati kao funkcija različitih omjera $\boldsymbol{r}_{[spoj]/[polinukleotid]}$.

Pokazalo se da pri spomenutim uvjetima viskoznost otopine ovisi o produljenju uzvojnice uzrokovanom vezanjem spoja po jednadžbi:

$$L / L_0 = 1 + m\,\boldsymbol{r}$$

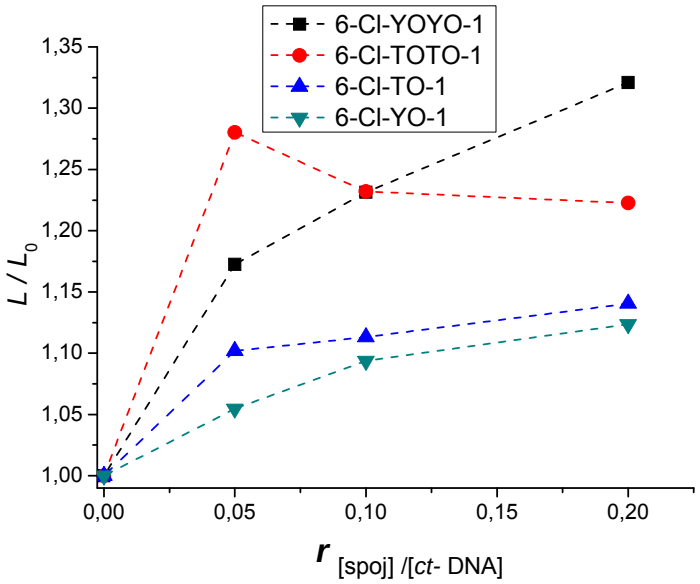
gdje je L/L_0 relativno produljenje, omjer $\boldsymbol{r}_{[spoj]/[polinukleotid]}$, a m nagib pravca ovisnosti L/L_0 o $\boldsymbol{r}$.[101,46]

Kako bi se dobio detaljniji uvid u mehanizam interakcija ispitivanih spojeva s DNA napravljen je niz mjerenja viskoznosti svih ispitivanih boja s *ct*-DNA kao modelnim polinukleotidom, pri različitim omjerima $\boldsymbol{r}_{[spoj]/[polinukleotid]}$ koristeći metodu kapilarne viskozimetrije. Mjerenja su napravljena pri dvije temperature 20 °C i 25 °C.

Rezultati analiza su prikazani u tablici 10 i na slici 64.

Tablica 10: Sumarna tablica viskoznosti

$\boldsymbol{r}_{[spoj]/[polinukleotid]}$	$\boldsymbol{L/L_0}$							
	6-Cl-YOYO-1		**6-Cl-TOTO-1**		**6-Cl-TO-1**		**6-Cl-YO-1**	
	20 °C	25 °C	20 °C	25 °C	20 °C	25 °C	20 °C	25 °C
0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
0,05	1,17	1,17	1,28	1,28	1,10	1,09	1,05	1,05
0,1	1,23	1,22	1,23	1,23	1,11	1,11	1,09	1,09
0,2	1,32	1,32	1,22	1,22	1,14	1,13	1,12	1,12



Slika 64: Ovisnost promjene viskoznosti *ct*-DNA uslijed vezanja cijaninskih boja pri omjerima $r_{[spoj]/[polinukleotid]}$=0,05–0,2. Mjerenja su napravljena u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3} pri 20 °C i 25 °C.

Iz grafičkog prikaza može se vidjeti kako su rezultati vrlo slični za obje ispitivane temperature. Nadalje, rezultati pokazuju da prilikom dodatka ispitivane boje viskoznost *ct*-DNA značajno raste. Isto tako, može se primijetiti kako porast viskoznosti nije linearan, pa nije bilo moguće izračunati nagib pravca.

Dimeri ispitivanih spojeva, **6-Cl-TOTO-1** i **6-Cl-YOYO-1** pokazuju puno veće promjene viskoznosti pri svim ispitivanim omjerima $r_{[spoj]/[polinukleotid]}$, posebice pri $r_{[spoj]/[polinukleotid]}$ = 0,05 u odnosu na monomere **6-Cl-TO-1** i **6-Cl-YO-1**, što upućuje na bisinterkalaciju. Najviša viskoznost izmjerena je za **6-Cl-YOYO-1**, pri omjeru $r_{[spoj]/[polinukleotid]}$ = 0,2.

Promjena viskoznosti *ct*-DNA uslijed stvaranja kompleksa sa **6-Cl-TOTO-1** pokazuje drugačiji profil. Posebno kod tog spoja, u usporedbi s ostalim ispitivanim spojevima opaženo je da kod omjera $r_{[spoj]/[polinukleotid]}$ = 0,05 dolazi do najjačeg porasta viskoznosti. Danjim povećavanjem omjera $r_{[spoj]/[polinukleotid]}$ = 0,1–0,2 opaža se opadanje viskoznosti.

Ti podatci su u korelaciji s podatcima dobivenim eksperimentima cirkularnog dikroizma gdje je pokazano da se interkalacija ispitanih spojeva u polinukleotide događa u

nižim molarnim omjerima, dok se za vrijednosti $r_{[spoj]/[polinukleotid]} > 0,1$ opaža miješani način vezanja te agregacija molekula boja u H-tip agregata te u malom utoru.[103] Ta boja se najvjerojatnije veže na fosfatnu okosnicu te uzrokuje kondenzaciju dvostruke uzvojnice DNA, te posljedično pad viskoznosti.

5.3.8. Raspodjela veličina čestica

Raspodjela veličine čestica napravljena je tehnikom dinamičkog raspršenja svjetlosti (engl. *Dynamic Light Scattering,* DLS). Dinamičko raspršenja svjetlosti (DLS) je tehnika za mjerenje veličine čestica u submikronskom području. Teorija ove tehnike se zasniva na Brownovom gibanju čestica u otapalu, a dešava se zbog sudara čestica s molekulama otapala koje ga okružuju. Logika nalaže da će se male čestice brže gibati u odnosu na velike čestice. No, kod mjerenja veličine čestica vrlo su bitni uvjeti temperature pri kojima se mjerenje vrši, obzirom da temperatura utječe na viskoznost medija u kojem se mjerenje vrši.

Kod nekovalentnih interakcija malih molekula s DNA, kao što su interkalacija ili vezanje u mali utor, dolazi do promjene u dimenzijama DNA. Interkalativno djelovanje male molekule uzrokuje produljivanje lanca DNA, dok se kod vezanja u mali utor može očekivati ili produljenje lanca ili skraćivanje lanaca zbog hidrofobnih interakcija. U nekim slučajevima ne dolazi do nikakvih promjena u dimenzijama DNA. Isto tako, vezanje molekule na fosfatni kostur također može imati utjecaj na veličinu lanaca. Veličina čestica koja se mjeri tehnikom DLS izražava se kroz promjer sfere koja difundira jednakom brzinom kao i mjerena čestica.

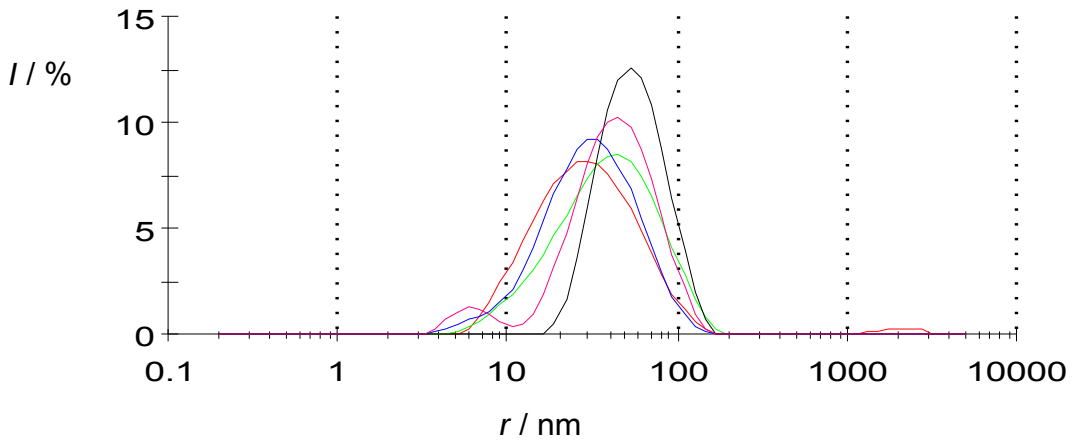
DLS tehnika je korištena kako bi se izmjerila raspodjela veličina čestica *ct*-DNA prije i nakon interakcije s istraživanim bojama. Dobiveni rezultati, prikazani u tablici 11 i na slici 65 ukazuju na povećanje veličine čestica, tj. srednjeg polumjera sfere koja difundira jednakom brzinom kao i mjerena čestica. Povećanje veličine čestica tj. srednjeg hidrodinamičkog radijusa DNA je u skladu s mjerenjima viskoznosti. Značajna promjena u srednjem hidrodinamičkom radijusu je opažena kod monomernih boja **6-Cl-TO-1** i **6-Cl-YO-1**, za razliku od njihovih dimernih oblika gdje je ta promjena diskretna.

Nadalje, DLS rezultati pokazuju da vezanjem monomera na *ct*-DNA nije došlo do tolikog produljenja lanaca da bi se opazile značajne promjene u viskoznosti, nego najvjerojatnije dolazi do mješovitog načina vezanja, te najvjerojatnije i do agregacije boja u utoru DNA i

boja međusobno, te mogućim hidrofobnim interakcijama, što kao posljedicu ima i veliku promjenu srednjeg hidrodinamičkog radijusa kod **6-Cl-TO-1** i **6-Cl-YO-1.**

Tablica 11: Raspodjela veličina čestica *ct*-DNA te njenih kompleksa s 6-Cl-TOTO-1, 6-Cl-YOYO-1, 6-Cl-TO-1 i 6-Cl-YO-1 pri omjerima $r_{[spoj]/[polinukleotid]}$ = 0,2. Analize su napravljene u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3} pri 25 °C.

Uzorak	Srednji hidrodinamički radijus r /nm	Indeks Polidisperznosti
ct –DNA	22,54	0,372
6-Cl-TOTO-1 + *ct*-DNA	28,66	0,385
6-Cl-YOYO-1 + *ct*-DNA	25,01	0,269
6-Cl-TO-1 + *ct*-DNA	32,13	0,308
6-Cl-YO-1 + *ct*-DNA	43,10	0,260



Slika 65: Raspodjela veličina čestica uzoraka *ct*-DNA (crveno) te njenih kompleksa s 6-Cl-TOTO-1 (zeleno), 6-Cl-YOYO-1 (plavo), 6-Cl-TO-1 (ljubičasto) te 6-Cl-YO-1 (crno) pri omjerima $r_{[spoj]/[ct\text{-}DNA]}$ = 0,2. Analize su napravljene u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3} pri 25 °C.

5.3.9. Zeta potencijal

Zeta potencijal (elektrokinetički potencijal, ζ) je potencijal na plohi klizanja koloidne čestice koja se kreće pod utjecajem električnog polja. Električni potencijal površine je rad koji je potreban kako bi se jedinica pozitivnog naboja u mirovanju privukla od beskonačnosti do površine koloidne čestice. Zeta potencijal (ZP) odražava potencijalnu razliku između EDL (električni dvosloj) čestica koji se elektroforetski kreću i sloja disperzijskog sredstva oko njih na plohi klizanja.[104]

Kako je DNA negativno nabijeni poli-elektrolit, dodatak pozitivno nabijenih boja u teoriji bi mjerenje zeta potencijala čiste DNA i njezinih kompleksa trebalo dati vrijedne informacije o načinu vezanja. Literaturno dostupni podaci o zeta potencijalu *ct*-DNA ukazuju da iznos zeta potencijala drastično ovisi o pH, a vrijednosti dobivene za čistu DNA su u rasponu od –20 mV do –80 mV.

Razlike u zeta potencijalu, odnosno distribucije zeta potencijala čiste DNA i kompleksa DNA s malim molekulama, može upućivati na razlike u načinu i mjestu vezanja male molekule. Očekuje se da molekule koje ulaze u interakciju interkalacije ili vezanja u utor neće značajno promijeniti iznos zeta potencijala, dok molekule koje se neselektivno vežu na fosfate u kosturu DNA, agregiraju ili ulaze u hidrofobne interakcije mogu imati značajni utjecaj na zeta potencijal. Molekule koje se vežu na fosfate mogu lokalno promijeniti naboj na čestici DNA.

Kako dimeri ispitivanih boja posjeduju četiri pozitivna naboja, u slučaju njihove agregacije ili neselektivnog vezanja na fosfate za njih se može očekivati promjena zeta potencijala. Ukoliko je dominantno njihovo vezanje kao interkalatora (što je dokazano u prethodnim pokusima fluorescencije, viskoznosti, CD, temperature mekšanja) promjene u zeta potencijalu neće biti značajne.

Za razliku od dimera, za monomere je pokazano intrinzično svojstvo samo-agregacije u puferima, u CD eksperimentima je pokazano da njihova interakcija s DNA/RNA ne uzrokuje promjene u strukturi DNA, pa se usprkos samo jednom dostupnom pozitivnom naboju očekuju veće promjene u zeta potencijalu.

Kako bi se ispitala svojstva površine DNA prije i nakon interakcije s istraživanim spojevima, pripremljene su otopine *ct*-DNA te njezinih kompleksa s istraživanim bojama pri $r_{[spoj]/[polinukleotid]} = 0{,}2$. Svi uzorci su analizirani pri istim parametrima metode.

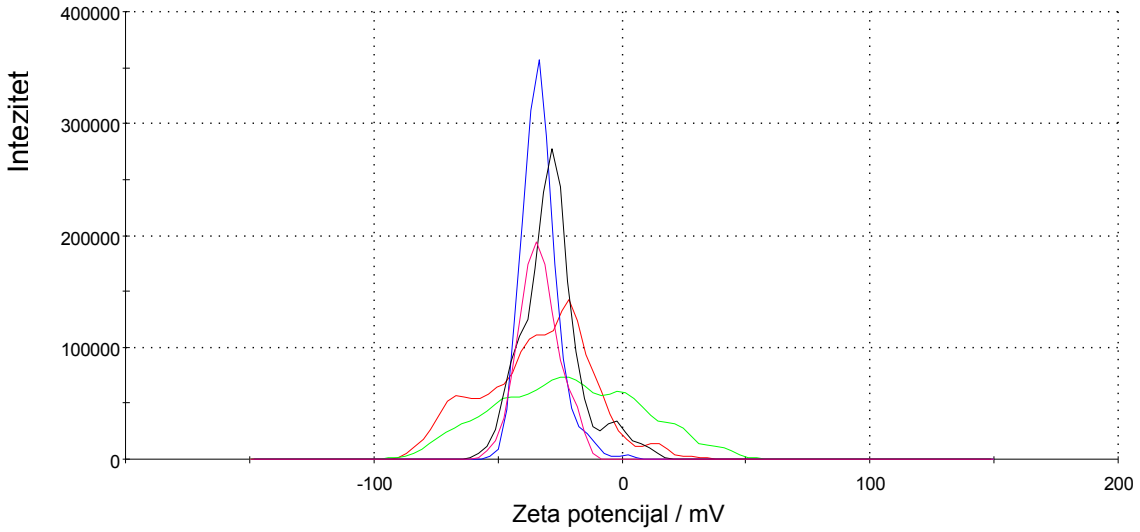
Dobiveni rezultati ZP su prikazani u tablici 12, dok je distribucija zeta potencijala prikazana na slici 66. Rezultati pokazuju da čista DNA ima zeta potencijal –34 mV, što je u skladu s negativno nabijenom površinom. Isto tako vrijednost –34 mV ukazuje na stabilnost pripremljene otopine DNA u odabranom puferskom sustavu.

Kao što je i očekivano, usprkos četiri pozitivna naboja dimera boja **6-Cl-TOTO-1** i **6-Cl-YOYO-1** nije došlo do drastične promjene zeta potencijala u odnosu na čistu DNA. I monomer boje **6-Cl-TO-1** je pokazao slični zeta potencijal onome određenom za *ct*-DNA.

Za razliku od navedenog, uzorak **6-Cl-YO-1** pokazuje značajnu razliku u zeta potencijalu u odnosu na čistu DNA, –21 mV. Rezultati upućuju na agregaciju boje i izloženost mnoštva pozitivnih naboja okolnom disperzantu. Isto tako, određeni zeta potencijal upućuje na smanjenu stabilnost kompleksa u odnosu na čistu DNA, te mogućnost agregacije. Ti rezultati zeta potencijala su u skladu s rezultatima raspodjele veličina čestica, gdje je upravo kompleks **6-Cl-YO-1** s DNA pokazivao najveći srednji hidrodinamički radijus.

Tablica 12: Zeta potencijal, pokretljivost i provodljivost za uzorke *ct*-DNA te njezine komplekse s 6-Cl-TOTO-1, 6-Cl-YOYO-1, 6-Cl-TO-1 i 6-Cl-YO-1, pri omjeru $r_{[spoj]\,/\,[ct\text{-}DNA]} = 0{,}2$. Analize su napravljene u kakodilatnom puferu, pH = 7, $I = 0{,}05$ mol dm^{-3} pri 25 °C.

Uzorak	Zeta potencijal (ζ) / mV	Pokretljivost / $m^2\,V^{-1}s^{-1}$	Provodnost / mS cm^{-1}
ct-DNA	–33,6	$-2{,}636 \times 10^{-8}$	4,65
ct-DNA + **6-Cl-YO-1**	–20,7	$-1{,}625 \times 10^{-8}$	4,45
ct-DNA + **6-Cl-TO-1**	–33,1	$-2{,}592 \times 10^{-8}$	3,73
ct-DNA + **6-Cl-YOYO-1**	–28,2	$-2{,}209 \times 10^{-8}$	3,46
ct-DNA + **6-Cl-TOTO-1**	–33,2	$-2{,}601 \times 10^{-8}$	3,13



Slika 66: **Distribucija Zeta potencijala uzoraka *ct*-DNA (crveno) te njenih kompleksa s 6-Cl-TOTO-1 (rozo), 6-Cl-YOYO-1 (crno), 6-Cl-TO-1 (plavo) te 6-Cl-YO-1 (zeleno) pri omjerima $r_{[\text{spoj}]/[ct\text{-DNA}]}$ = 0,2. Analize su napravljene u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3} pri 25 °C.**

Ako se pažljivo analizira grafički prikaz distribucije zeta potencijala, uočava se da najširu distribuciju zeta potencijala pokazuje upravo kompleks *ct*-DNA s **6-Cl-YO-1**, dok su za ostale komplekse distribucije uže. Ta činjenica isto upućuje na nehomogeno i neselektivno vezanje navedenog spoja s DNA.

§ 6. ZAKLJUČAK

Ispitivane cijaninske boje **6-Cl-TOTO-1**, **6-Cl-YOYO-1**, **6-Cl-TO-1** i **6-Cl-YO-1** su djelomično topljive u vodi i već pri mikromolarnim koncentracijama počinju stvarati H-tip agregata. Zbog toga su svi spektroskopski eksperimenti provedeni u uvjetima u kojima je agregacija zanemariva ili u slučaju **6-Cl-YOYO-1** dobro definirana.

Boje **6-Cl-TOTO-1**, **6-Cl-TO-1** i **6-Cl-YO-1** u mikromolarnom području ne fluoresciraju i dominantno su u monomernom stanju, dok **6-Cl-YOYO-1** pokazuje fluorescenciju.

Svi rezultati konzistentno ukazuju da se **6-Cl-TOTO-1**, **6-Cl-YOYO-1**, **6-Cl-TO-1** i **6-Cl-YO-1** snažno vežu na dvolančane DNA i RNA s odgovarajućim konstantama ravnoteže $K_s > 10^7$ dm^3 mol^{-1}. Način vezanja je interkalacija u slučaju suviška DNA/RNA u odnosu na boje. Dimeri ispitivanih boja pokazuju umjereni porast afiniteta i termičku stabilizaciju dvolančanih polinukleotida u odnosu na monomere. No, unatoč tome što prema strukturi postoji mogućnost bis-interkalacije homodimera ispitivanih boja, rezultati analiza to ne potvrđuju, iako se bis-interkalacija ne može isključiti.

Nadalje, homodimeri ispitivanih boja **6-Cl-TOTO-1** i **6-Cl-YOYO-1** pokazuju određenu selektivnost prema određenim polinukleotidima, pokazujući sinergistički efekt dva cijaninska kromofora povezana kovalentno preko oligoaminskog mosta. Monomeri **6-Cl-TO-1** i **6-Cl-YO-1** nisu pokazali selektivnost prema određenim polinukleotidima.

Pri suvišku boje u odnosu na DNA/RNA, $r_{[spoj]/[polinukleotid]} > 0{,}1$ za sve ispitivane spojeve, opažena je agregacija boje uz polinukleotid, a u nekim slučajevima opaženo je da boja prepoznaje određene slijedove polinukleotida.

6-Cl-TOTO-1 pokazuje umjerenu selektivnost prema poli dA-poli dT i poli(dGdC)$_2$ u usporedbi s ostalim ispitivanim polinukleotidima, ali dostupni rezultati ne nude očito objašnjenje za opaženo. Pri uvjetima u kojima boja agregira $r_{[spoj]/[polinukleotid]} > 0{,}1$ **6-Cl-TOTO-1** je u CD spektrima pokazao negativnu ICD vrpcu pri 520 nm samo prilikom vezanja na alternirajuće DNA sekvence (GC-GC i AT-AT) što nije slučaj za homo-DNA ili homo-RNA. Takvo molekulsko prepoznavanje se može pripisati strukturnim razlikama između

polinukleotida, gdje samo alternirajuća DNA pokazuje tipičnu B-heliks strukturu koja diktira način agregacije sa selektivnom ICD vrpcom.

Zamjena **TO** sa **YO** kromoforom kao posljedicu ima dramatične efekte na svojstva boja i na interakcije s DNA/RNA. Primjerice, boja **6-Cl-YOYO-1** je pokazala višu sklonost samo-agregaciji u odnosu na **6-Cl-TOTO-1** analog te su interakcije s polinukleotidima kontrolirane agregacijom. Boja **6-Cl-YOYO-1** pokazuje vrlo zanimljiv i specifičan odziv fluorescencije na 570 nm prilikom vezanja na RNA. Ta specifičnost je pokazana i u CD spektroskopskim titracijama gdje se pri sličnim uvjetima pojavljuje specifična vrpca induciranog cirkrkularnog dikroizma na 430 nm. Niti jedan od navedenih signala nije opažen prilikom interakcija **6-Cl-YOYO-1** s ostalim DNA polinukleotidima, a isto tako analog **6-Cl-TOTO-1** nije pokazao selektivnost prema RNA. Dakle, takva selektivnost se može pripisati međudjelovanju agregacijskih svojstava ispitivane boje **6-Cl-YOYO-1** (koje su puno naglašenije u odnosu na **6-Cl-TOTO-1**) i specifičnih strukturnih svojstava RNA. Dubok i uzak veliki utor DNA je u slučaju **6-Cl-YOYO-1** dozvolio svojstvenu agregaciju boje što je uzrokovalo pojavu specifičnih vrpci ICD (430 nm) i fluorescencije (570 nm).

Rezultati izotermne titracijske kalorimetrije pokazuju da je većina istraživanih reakcija egzotermna. Rezultati su jasno diferencirani za procese vezanja u suvišku DNA ($r_{[spoj]/[polinukleotid]} < 0,1$) koja je karakterizirana interakcijom jedne molekule boje na izolirano vezno mjesto u DNA/RNA te događaje u kojima je $r_{[spoj]/[polinukleotid]} > 0,1$ gdje je boja u suvišku u odnosu na DNA/RNA vezna mjesta. Za reakcije spojeva **6-Cl-TOTO-1** i **6-Cl-YOYO-1** s polinukleotidima oba događaja su egzotermna, a induvidualna vezna mjesta kompleksa najvjerojatnije kooperativno utječu jedno na drugo. Pri visokim koncentracijama boje, samoagregacija boja u malom utoru se događa uz interkalativno vezanje na DNA/RNA.

Rezultati ITC titracija su u skladu s rezultatima CD eksperimenata, koji su za **6-Cl-TOTO-1** i **6-Cl-YOYO-1** pokazali da se pri malim koncentracijama boja ($r_{[spoj]/[polinukleotid]} < 0,1$) događa interkalacija, drastično mijenjajući strukturu heliksa DNA što se vidi iz promjena u izgledu CD vrpci u području 230−300 nm. Povećanjem koncentracije boje ($r_{[spoj]/[polinukleotid]} > 0,1$) su se za sve boje pojavile bisignatne vrpce induciranog cirkularnog dikroizma što je potvrdilo da se ispitivani spojevi agregiraju u malom utoru DNA/RNA. Za monomere boja **6-Cl-TO-1** i **6-Cl-YO-1** nisu opažene drastične promjene strukture DNA/RNA, što bi se opazilo kao promjene u CD vrpcama u području 230−300 nm, ali su opažene bisignatne ICD vrpce

karakteristične za dimere boja u utorima pri visokim koncentracijama boja ($r_{[spoj]/[polinukleotid]} > 0,1$).

Rezultati mjerenja viskoznosti i raspodjele veličina čestica (DLS) ukazuju na produljenje duljine dvostruke uzvojnice *ct*-DNA uslijed dodatka svih ispitivanih boja. Povećanje viskoznosti je opaženo za sve boje s povećanjem molarnog omjera $r_{[spoj]/[polinukleotid]}$, osim za spoj **6-Cl-TOTO-1**, gdje je najveća viskoznost dobivena za molarni omjer $r_{[spoj]/[polinukleotid]} = 0,05$, koji odgovara bisinterkalativnom načinu vezanja boje. Povećanjem $r_{[spoj]/[polinukleotid]}$ za taj spoj se viskoznost smanjuje, što je u skladu s CD i ITC analizama.

Rezultati određivanja zeta potencijala pokazuju da čista DNA ima zeta potencijal −34 mV, što je u skladu s negativno nabijenom površinom te ukazuje na stabilnost pripremljene otopine DNA u odabranom puferskom sustavu.

Dodatkom dimera boja **6-Cl-TOTO-1** i **6-Cl-YOYO-1** u *ct*-DNA nije došlo do drastične promjene zeta potencijala u odnosu na čistu DNA, usprkos četiri pozitivna naboja dimera. I dodatkom monomera boje **6-Cl-TO-1** u ct-DNA uočen je slični zeta potencijal onome određenom za *ct*-DNA.

Za razliku od navedenog, uzorak **6-Cl-YO-1** pokazuje značajnu razliku u zeta potencijalu u odnosu na čistu DNA tj. −21 mV. Rezultati upućuju na agregaciju boje i izloženost mnoštva pozitivnih naboja okolnom otapalu. Isto tako, određeni zeta potencijal upućuje na smanjenu stabilnost kompleksa u odnosu na čistu DNA, te mogućnost agregacije. Ti rezultati zeta su u skladu s rezultatima određivanja raspodjele veličina čestica, gdje je upravo kompleks **6-Cl-YO-1** s DNA pokazao najveći srednji hidrodinamički radijus.

§ 7. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

RNA – ribonukleinska kiselina

A – adenin

G – gvanin

C – citozin

T – timin

U – uracil

UV – ultraljubičasto zračenje

VIS – vidljivo zračenje

CD- cirkularni dikroizam

ICD – inducirani cirkularni dikroizam

IR – infracrveno zračenje

DSC – razlikovna pretražna kalorimetrija

TGA- Termogravimetrijska analiza

§ 8. LITERATURNI IZVORI

1. E. Trinquet, G. Mathis, *Mol. Bio Syst*. **2** (2006) 380-387.
2. R. B. Silverman, *The organic chemistry of drug design and drug action*, 2nd ed., Elsevier Academic Press, Amsterdam; Boston, 2004.
3. M. Demeunynck, C. Bailly, W. D. Wilson, *Small molecule DNA and RNA binders: from synthesis to nucleic acid complexes,* Wiley-VCH, Weinheim, 2003.
4. B. Willis, D. P. Arya, *Biochemistry* **49** (2010) 452-469.
5. a) J. Gershberg, M. Radić Stojković, M. Škugor, S. Tomić, T.H. Rehm, S. Rehm, C.R. Saha-Möller, I. Piantanida, F. Würthner, *Chem. Eur. J.* **21** (2015) 7886–7895.
   b) T. H. Rehm, M. Radić Stojković, S. Rehm, M. Škugor, I. Piantanida, F. Würthner, *Chem. Sci*. **3** (2012) 3393–3397.
6. a) M. Radić Stojković, P. Piotrowski, C. Schmuck, I. Piantanida; *Org. Biomol. Chem.* **13** (2015) 1629–1633.
   b) J. Wu, Y. Zou, W. Sicking, I. Piantanida, T. Yi, C. Schmuck, *J. Am. Chem. Soc.* **134** (2012) 1958–1961.
   c) L. Hernandez-Folgado, D. Baretić, I. Piantanida, M. Marjanović, M. Kralj, T. Rehm, C. Schmuck; *Chemistry, Eur. J.* **16** (2010) 3036-3056.
7. M. Radić Stojković, M. Škugor, S. Tomić, M. Grabar, V. Smrečki, Ł. Dudek, J. Grolik, J. Eilmes, I Piantanida, *Org. Biomol. Chem.* **11** (2013) 4077–4085.
8. A. Biancardi, T. Biver, A. Marini, B. Mennucci, and F. Secco, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13** (2011) 12595-12602.
9. L.-M. Tumir, I. Crnolatac, T. Deligeorgiev, A. Vasilev, S. Kaloyanova, M. Grabar Branilović, S. Tomić, I. Piantanida, *Eur. J. Org. Chem*. **18** (2012) 3859–3864.
10. a) I. Crnolatac, L.-M. Tumir, N. Y. Lesev, A. A. Vasilev, T. G. Deligeorgiev, K. Mišković, Lj. Glavaš-Obrovac, O. Vugrek, I. Piantanida, *Chem. Med. Chem.* **8** (2013) 1093 – 1103.

b) A. Šarić, I. Crnolatac, B. Frédéric, S. Sobočanec, A.-M. Mikecin, Ž. Mačak Šafranko, T. Deligeorgiev, I. Piantanida, T. Balog, P. X. Petit, *Methods Appl. Fluoresc.* **5** (2017) 015007.

11. I. Crnolatac, I. Rogan, B. Majić, S. Tomić, T. Deligeorgiev, G. Horvat, D. Makuc, J. Plavec, G. Pescitelli, I. Piantanida, *Anal. Chim. Acta* **940** (2016) 128–135.
12. F. Johansen, and J. P. Jacobsen, *J. Biomol. Struct. & Dyn*. **16** (1998) 205-222.
13. X. N. Fei, and Y. Gu, *Prog. Nat. Sci.* **19** (2009) 1-7.
14. B.A. Armitage, *DNA Binders and Related Subjects: Cyanine dye-DNA interactions: Intercalation, groove binding, and aggregation, Topics in Current Chemistry*, **253** (2005) 55-76.
15. A. Furstenberg, M.D. Julliard, T.G. Deligeorgiev, N.I. Gadjev, A.A. Vasilev, E. Vauthey, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) 7661-7669.
16. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, Fifth edition, W. H. Freeman and Company, New York, 2002.
17. S. Neidle, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Elsevier, London, 2008.
18. C. F. Guerra, F. M. Bickelhaupt, J. G. Snijders, E. J. Baerends, *J. Am. Chem. Soc.* **122** (2000) 4117–4128.
19. J. Dolenc et al., *Nucleic Acids Research* **33**(2005) 725–733.
20. Drew, H.R. et al, *Proc. Natl. Acad. Sci .USA* **78** (1981) 2179-2183, PDB entry 1bna, DOI: 10.2210/pdb1bna/pdb
21. Mandal, P.K., Venkadesh, S., Gautham, N, *Acta Crystallogr. Sect. F* **68** (2012) 393 - 399.
22. a) Drew, H.R., Dickerson, R.E., *J. Mol. Biol.* **152** (1981) 723-736.
    b) Chatake, T., *J. Syncrotron Radiat.* **20** (2013) 864–868.
23. J.D. Watson, T.A. Baker, S.P.Bell, A.Gann, M.Levine, R. Losick; *Molecular Biology of the Gene*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, San Francisco, 5th edition, 2004.
24. J. Šponer, H. A. Gabb, J. Leszczynski, P. Hobza, *Biophys. J.* **73** (1997) 76–87.
25. Westhof, E., Dumas, P., Moras, D., *Acta Crystallogr. Sect. A* **44** (1988) 112 – 123.
26. Dahm R, *Developmental Biology* **278** (2005) 274–288.

27. a) M. Egli and W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer-Verlag, New York, 1983; b) Cantor, C. R., and Schimmel, P. R., *Biophysical Chemistry* **3** (1980), WH Freeman and Co., San Francisco.
28. C. Bailly, *Curr. Med. Chem.* **7** (2000) 39–58.
29. D. A. Burden, N. Osheroff, *Biochim. Biophys. Acta* **1400** (1998) 139–154.
30. R. Garcia-Carbonero, J. G. Supko, *Clin. Cancer Res.* **8** (2002) 641–661.
31. T. Hermann, E. Westhof, *Curr. Opin. Biotechnol. 9* (1998) 66–73.
32. L. Guan, M. D. Disney, *ACS Chem. Biol.* **7** (2012) 73–86.
33. Y. Tor, *Angew. Chem. Int. Ed.* **38** (1999) 1579–1582.
34. K.R., Sangeetha Gowda, Blessy Baby Mathew, C.N. Sudhamani, and H.S. Bhojya Naik, *Biomedicine and Biotechnology* **2** (2014) 1-9.
35. Brown, T., Brown (Jr), T., *Nucleic Acids Book,* ATDBIO http://www.atdbio.com/content/16/Nucleic-acid-drug-interactions, (preuzeto 25.srpnja 2017).
36. Fukui, K., Tanaka, K., *Nucleic Acids Res.* **24** (1996) 3962-3967.
37. Wang, J.C., *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **3** (2002) 430-440.
38. Bickle, T.A., Krüger, D.H., *Microbiol. Rev.* **57** (1993) 434-450.
39. Sangeetha Gowda K.R., Blessy Baby Mathew, C.N. Sudhamani, H.S. Bhojya Naik, *Biomedicine and Biotechnology* **2** (2014) 1-9.
40. Kochetkov, N.K., Budovskii, E.I, *Reactions Involving the Cleavage or Rearrangement of Heterocyclic Rings of Nucleic Acid Bases and their Derivatives, Organic Chemistry of Nucleic Acids*, Springer, 1972, 381-423.
41. Kochevar, I. E.; Dunn, A., *Bioorg. Photochem.* **1** (1990) 273-316.
42. Paillous, N; Vicendo, P. J., *Photochem. Photobiol. B* **20** (1993) 203-209.
43. Fernandez, M.J., Grant, K. B., Herraiz, F.,Yang, X., Lorente, A, *Tetrahedron Lett.* **42** (2001) 5701-04.
44. Armitage B., *Chem. Rev.* **98** (1998) 1171.
45. I. Piantanida, *Kem. Ind. **52*** (2003) 545–552.
46. Strekowski L, Wilson B, *Mutat. Res.* **623** (2007) 3-13.
47. Palchaudhuri, R., Hergenrother, P.J., *Current Opinion in Biotechnology* **18** (2007) 497-503.
48. H.M. Berman, *Curr. Opin. Struct. Biol*. **4** (1994), 599.

49. http://chemweb.bham.ac.uk/~hannonmj/Mike%20page/3wayjonction.html (preuzeto 03. 08. 2017.)
50. S. Neidle, *Nat. Prod. Rep.* **18** (2001) 291–309.
51. D. E. Wemmer, *Biopolymers* **52** (1999/2000) 197–211.
52. E. Gavathiotis, G. J. Sharman, M. S. Searle, *Nucleic Acids Res.* **28** (2000) 728–735.
53. L. S. Lerman, *J. Mol. Biol.* **3** (1961) 18–30.
54. D. M. Crothers, *Biopolymers* **6** (1968) 575.
55. J. L. Botour et al., *Biopolymers* **17** (1978) 873.
56. http://what-when-how.com/molecular-biology/ethidium-bromide-molecular-biology/ (preuzeto 03. 08. 2017.).
57. H. W. Zimmerman, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **25** (1986) 115.
58. J. Kapucinski, Z.Darzynkewicz, *J. Biomol. Struct. Dyn*. **5** (1987) 127.
59. Graves, D. E.; Velea, L. M., *Curr. Org. Chem* **4** (2000) 915-929.
60. Berman; H. M., and Young, P. R., *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **10** (1981) 87-114.
61. Gago, F., *Methods* **14** (1998) 277-292.
62. Karimi Goftar et al., *Int. J Adv. Biol. Biom. Res.* **2** (2014) 811-822.
63. N. Schmid, J-P. Behr, *Biochemistry* **30** (1990) 4357.
64. A. J. Ruiz-Chica, A. Soriano, I. Tuñón, F. M. Sánchez-Jiménez, E. Silla, F. J. Ramírez, *Chem. Phys.* **324** (2006) 579–590.
65. Vertino, P. M.; Bergeron, R. J.; Camanaugh, P. F., Jr.; Porter, C. *Biopolymers* **26** (1987) 691-703.
66. a) Pegg, A. E. *Cancer Res*. **48** (1988) 759-774.
    b) Tabor, C. W.; Tabor, H., *Annu. Rev. Biochem.* **45** (1976) 285-306.
    c) Russel, W. C.; Precious, B.; Martin, S. R.; Bayley, P. M., *EMBO J.* **2** (1983) 1647-1653.
    e) McCann, P. P., Pegg, A. E., Sjoerdsma, A., *Inhibition of Polyamine Metabolism Biological Significance and Basis for New Therapies*; Academic Press: New York, 1987; 79-105.
    f) Cohen, S. S., *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol*. **41** (1982), 3061-3063.
    g) Heby, O.; Persson, L., *Trends Biochem. Sci.* **15** (1990) 153-158.
67. Diego Esposito, Pompea Del Vecchio, and Guido Barone, *J. Am. Chem. Soc.* **119** (1997) 2606-2613.

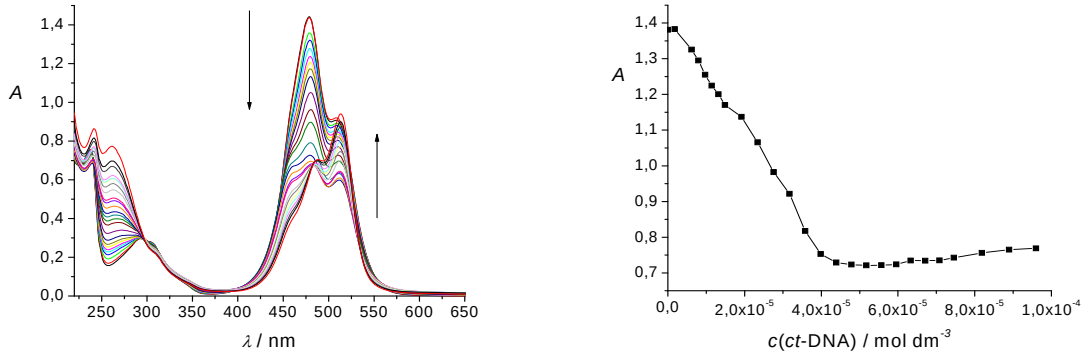
68. Williams C. G., *Trans. R. Soc. Edinburgh* **21** (1857) 377–401.
69. Mishra A, Behera RK, Behera PK, Mishra BK, Behera GB, *Chem. Rev.* **100** (2000) 1973.
70. Lerman LS, *J. Mol. Biol*. **3** (1961) 18.
71. Nordén B, Tjerneld F, *Biophys. Chem.* **6** (1977) 31.
72. Cao R, Venezia C. F., Armitage B.A., *J Biomol. Struct. Dyn.* **18** (2001) 844.
73. J. Nygren, N. Svanvik, M. Kubista, *Biopolymers* **46** (1998) 39-51.
74. A. Larrson, C. Carlsson, M. Jonsson, B. Albison, *J Am. Chem. Soc.* **116** (1994), 8459.
75. Lee L. G., Chen C., Liu L. A., *Cytometry* **7** (1986) 508.
76. Bordelon J.A., Feierabend K.J., Siddiqui S.A., Wright L.L., Petty J.T., *J Phys. Chem. B* **106** (2002) 4838.
77. C. U. Murade, V. Subramaniam, C. Otto, and Martin L. Bennink, *Biophysical Journal* **97** (2009) 835–843.
78. Alexander N. Glazer, Hays S. Rye, *Nature* **359** (1992) 859-861.
79. F. Johansen, J.P. Jacobsen, *J Biomol Struct Dynam* **16** (1998), 153.
80. H.P. Spielman, D.E. Wemmer, J.P. Jacobsen, *Biochemistry* **34** (1995), 8542.
81. J. B. Chaires, N. Dattagupta and D. M. Crothers, *Biochemistry* **21** (1982) 3933-40.
82. G. Malojčić, I. Piantanida, M. Marinić, M. Žinić, M. Marjanović, M. Kralj, K.Pavelić and H.-J. Schneider, *Org. Biomol. Chem*. **3** (2005) 4373-4381.
83. J.L. Mergny, L. Lacroix, *Oligonucleotides* **13** (2003) 515-537.
84. I. Piantanida, B. S. Palm, P. Cudic, M. Zinic, H. J. Schneider, *Tetrahedron* **60** (2004) 6225-6231.
85. D. M. Crothers, *Biopolymers* **6** (1968) 575-584.
86. G. Horvat, *GlobalFit*, v.1.14
87. George Socrates, *Infrared Characteristic Group Frequencies: Tables and Charts, second edition*, Wiley, 1994.
88. I. A. Degen, *Tables of characteristic group frequencies for the interpretation of infrared and Raman spectra*, Acolyte Publications, 1997.
89. Ulrich Rosch, Sheng Yao, R.Wortmann and F.Wurthner, *Angew. Chem. Int. Edit.* **45** (2006) 7026.
90. G. Scatchard, The attractions of proteins for small molecules and ions, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **51** (1949) 660–672.

91. J. D. McGhee, P. H. von Hippel, *J. Mol. Biol*. **86** (1974) 469–489.
92. M. Egli and W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer-Verlag, New York, 1983.
93. Jonathan B. Chaires, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **453** (2006) 26–31.
94. Agnieszka K. Bronowska (November 2nd 2011), *Thermodynamics of Ligand-Protein Interactions: Implications for Molecular Design*, Thermodynamics, Juan Carlos Moreno-Pirajan, IntechOpen, DOI: 10.5772/19447. https://www.intechopen.com/books/thermodynamics-interaction-studies-solids-liquids-and-gases/thermodynamics-of-ligand-protein-interactions-implications-for-molecular-design (preuzeto 25.07.2018.)
95. Perozzo, R.; Folkers, G.; Scapozza, L., *J. Recept. Signal Transduct. Res*. **24** (2004)1-52.
96. A Rodger, B Norden. *Circular Dichroism and Linear Dichroism,* Chapter 2, New York: Oxford University Press; (1997).
97. N.C. Garbett, P.A. Ragazzon, J.B. Chaires, *Nature Protocols* **2** (2007) 3166-3172.
98. M. Eriksson, B. Nordén, *Methods in Enzymology* **340** (2001) 68–98.
99. L. M. Tumir, I. Crnolatac, T. Deligeorgiev, A. Vasilev, S. Kaloyanova, M. G. Branilovic, S. Tomic and I. Piantanida, *Chemistry - a European Journal* **18** (2012) 3859-3864.
100. G. Cohen, H. Eisenberg, *Biopolymers* **8 (**1969) 45
101. M. Wirth, O. Buchardt, T. Koch, P.E. Nielsen, B. Nordén, *J. Am. Chem. Soc.* **110** (1988) 932.
102. Willis, B. and D. P. Arya, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **19** (2009) 4974-4979.
103. Sourav Bhattacharjee, *Journal of Controlled Release* **235** (2016) 337–351.

§ 8. DODATAK

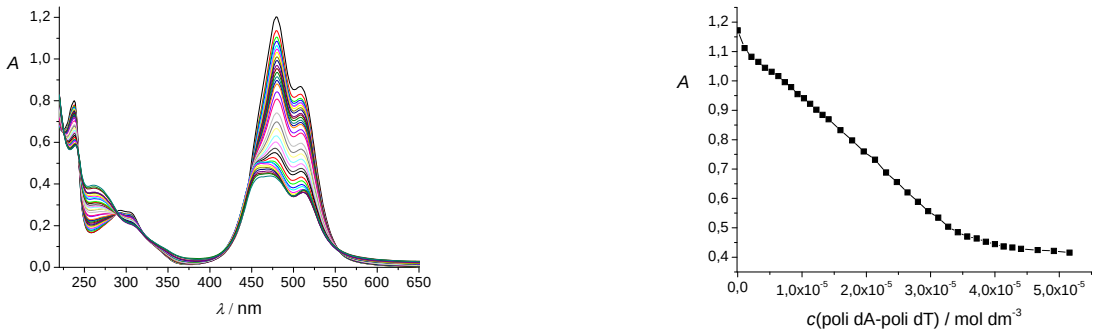
8.1.1. UV/Vis titracije

8.1.1.1. 6-Cl-TOTO-1



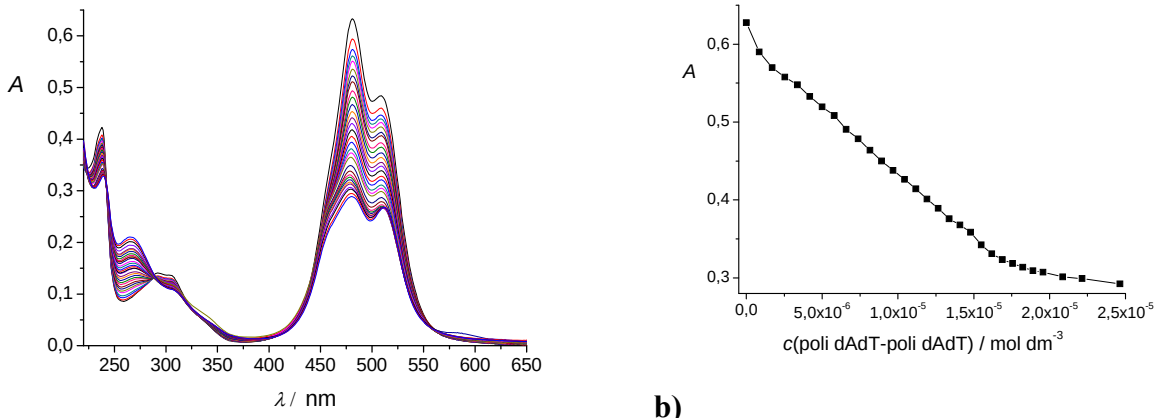
a) **b)**

Slika 1 **a) UV/Vis titracija 6-Cl-TOTO-1 (c = 8,2 × 10^{-4} mol dm^{-3}) s *ct*-DNA; b) Promjene u UV/Vis spektru 6-Cl-TOTO-1 pri λ_{max} = 483 nm kao posljedica titracije s *ct*-DNA, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3} pri 25 °C.**



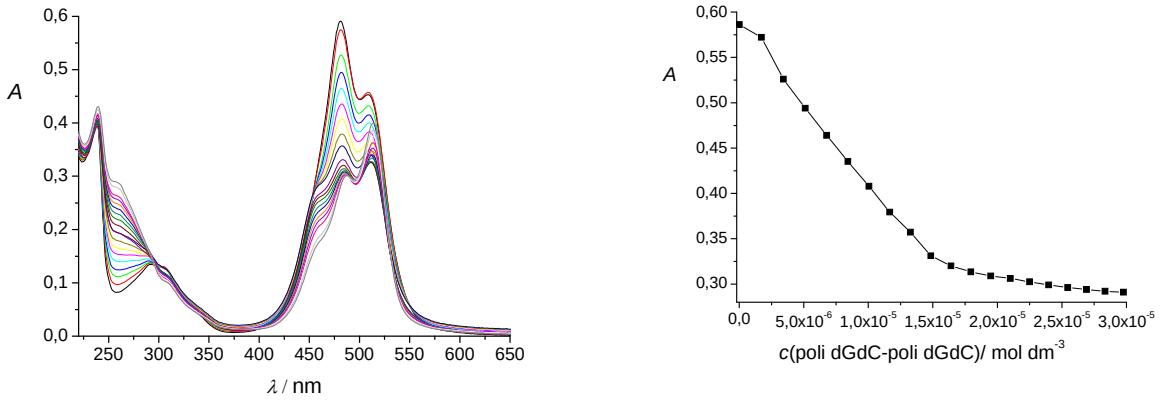
a) **b)**

Slika 2 **a) UV/Vis titracija 6-Cl-TOTO-1 (c = 8,2 × 10^{-4} mol dm^{-3}) s poli dA-poli dT; b) Promjene u UV/Vis spektru 6-Cl-TOTO-1 pri λ_{max} = 483 nm kao posljedica titracije s poli dA-poli dT, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3} pri 25 °C.**



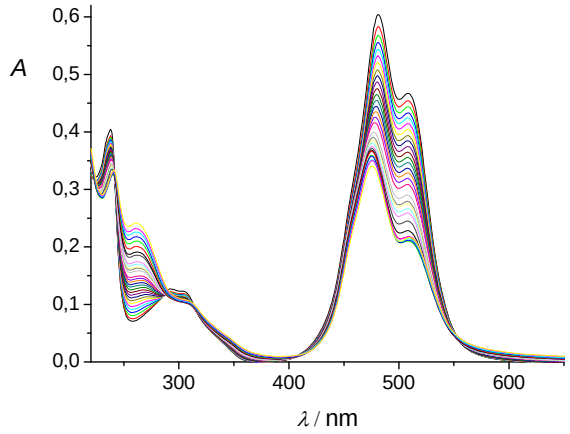
a) b)

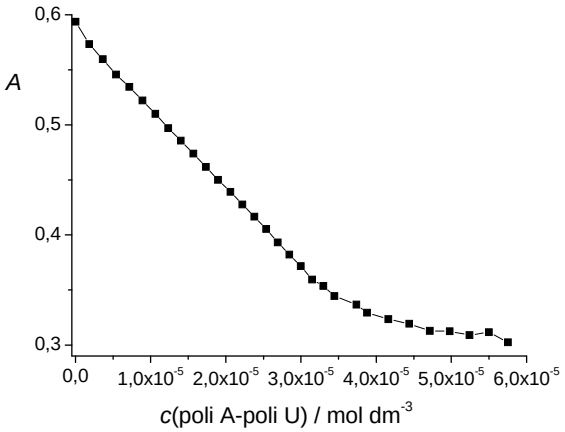
Slika 3 **a) UV/Vis titracija 6-Cl-TOTO-1 (c = 8,2 × 10^{-4} mol dm^{-3}) s poli dAdT-poli dAdT; b) Promjene u UV/Vis spektru 6-Cl-TOTO-1 pri λ_{max} = 483 nm kao posljedica titracije s poli dAdT-poli dAdT, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3} pri 25 °C.**



a) b)

Slika 4 **a) UV/Vis titracija 6-Cl-TOTO-1 (c = 8,2 × 10^{-4} mol dm^{-3}) s poli dGdC-poli dGdC; b) Promjene u UV/Vis spektru 6-Cl-TOTO-1 pri λ_{max} = 483 nm kao posljedica titracije s poli dGdC-poli dGdC, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3} pri 25 °C.**

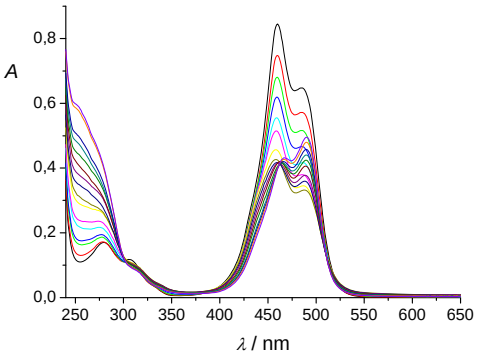


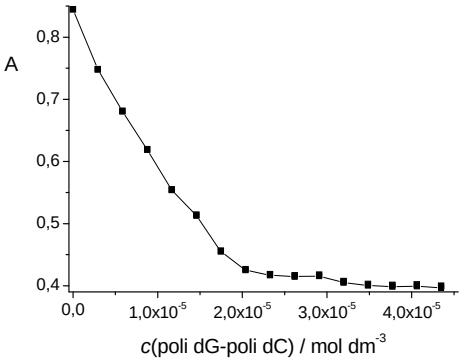


a) **b)**

Slika 5 **a) UV/Vis titracija 6-Cl-TOTO-1 (c = 8,2 × 10^{-4} mol dm^{-3}) s poli A-poli U; b) Promjene u UV/Vis spektru 6-Cl-TOTO-1 pri λ_{max} = 483 nm kao posljedica titracije s poli A-poli U, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3} pri 25 °C.**

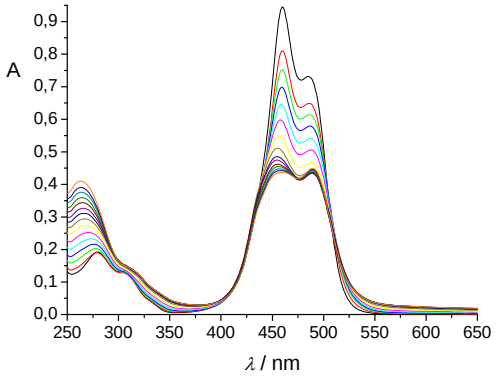
8.1.1.1. 6-Cl-YOYO-1



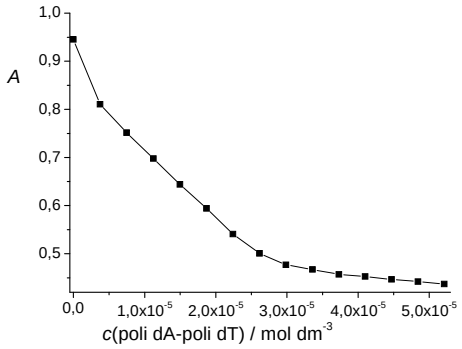


a) **b)**

Slika 6 **a) UV/Vis titracija 6-Cl-YOYO-1 (c = 6,98 × 10^{-6} mol dm^{-3}) s poli dG-poli dC; b) Promjene u UV/Vis spektru 6-Cl-YOYO-1 pri λ_{max} = 460 nm kao posljedica titracije s poli dG-poli dC, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3} pri 25 °C.**

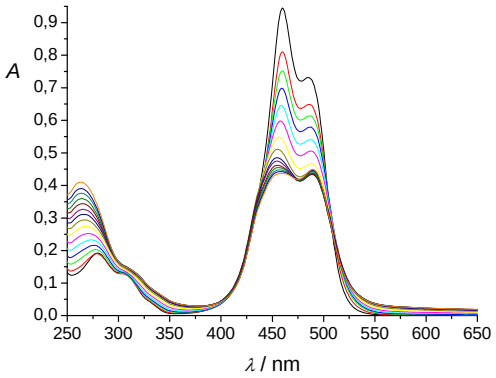


a)

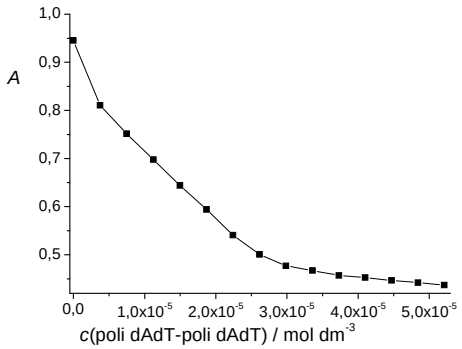


b)

Slika 7. **a) UV/Vis titracija 6-Cl-YOYO-1 (c = 6,98 × 10^{-6} mol dm^{-3}) s poli dA-poli dT; b) Promjene u UV/Vis spektru 6-Cl-YOYO-1 pri λ_{max} = 460 nm kao posljedica titracije s poli dA-poli dT, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3} pri 25 °C.**

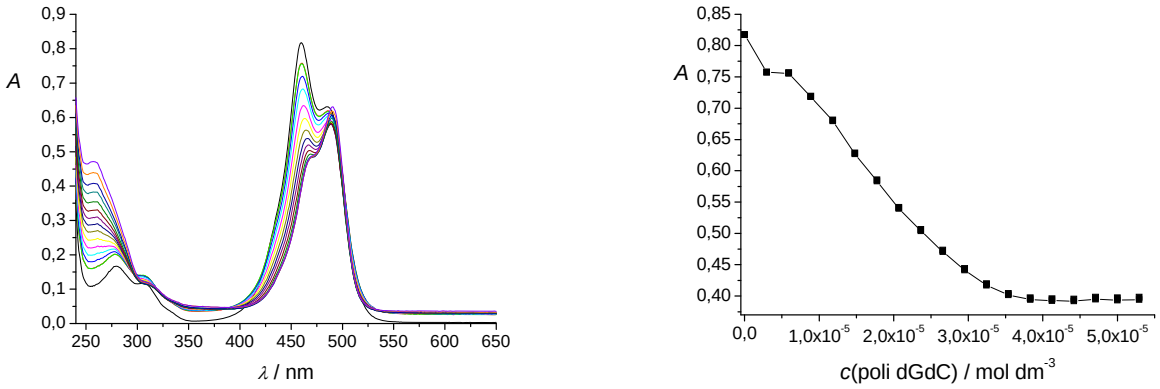


a)



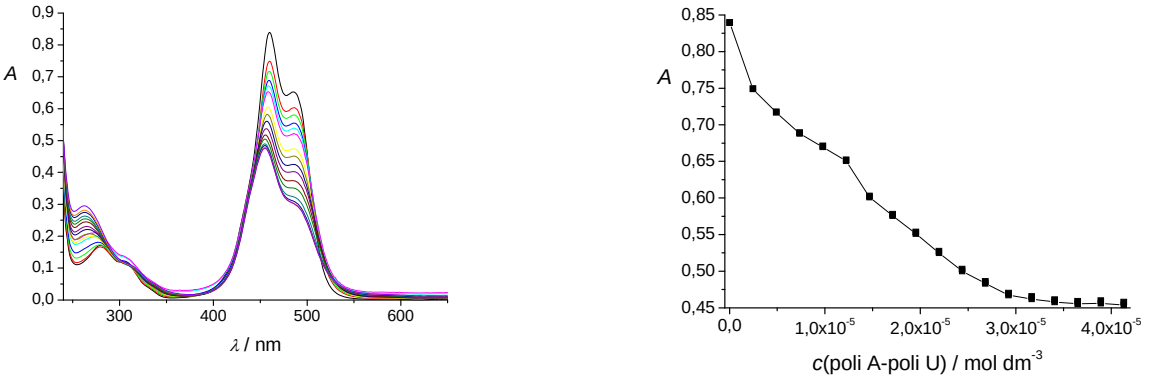
b)

Slika 8 **a) UV/Vis titracija 6-Cl-YOYO-1 (c = 1,4 × 10^{-5} mol dm^{-3}) s poli dAdT-poli dAdT; b) Promjene u UV/Vis spektru 6-Cl-YOYO-1 pri λ_{max} = 460 nm kao posljedica titracije s poli dAdT-poli dAdT, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3} pri 25 °C.**



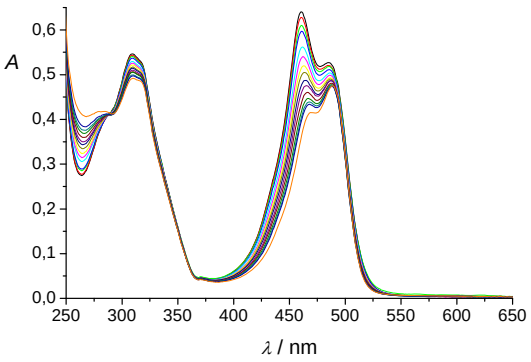
a) **b)**

Slika 9. **a) UV/Vis titracija 6-Cl-YOYO-1 (c = 6,98 × 10^{-6} mol dm^{-3}) s poli dGdC-poli dGdC; b) Promjene u UV/Vis spektru 6-Cl-YOYO-1 pri λ_{max} = 460 nm kao posljedica titracije s poli dGdC-poli dGdC, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3} pri 25 °C.**

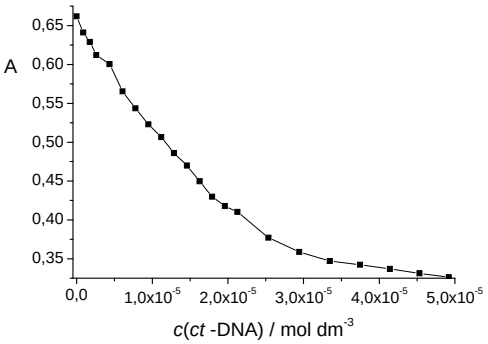


a) **b)**

Slika 10. **a) UV/Vis titracija 6-Cl-YOYO-1 (c = 6,98 × 10^{-6} mol dm^{-3}) s poli A-poli U; b) Promjene u UV/Vis spektru 6-Cl-YOYO-1 pri λ_{max} = 460 nm kao posljedica titracije s poli A-poli U, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3} pri 25 °C.**



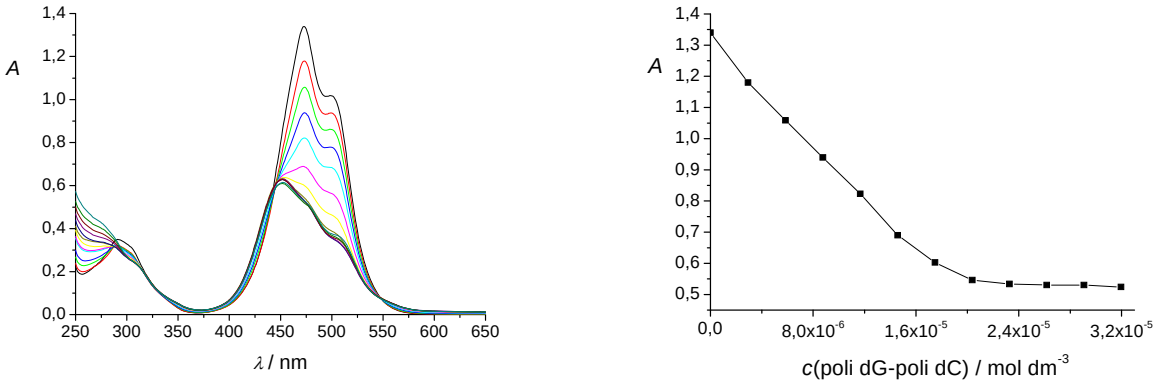
a)



b)

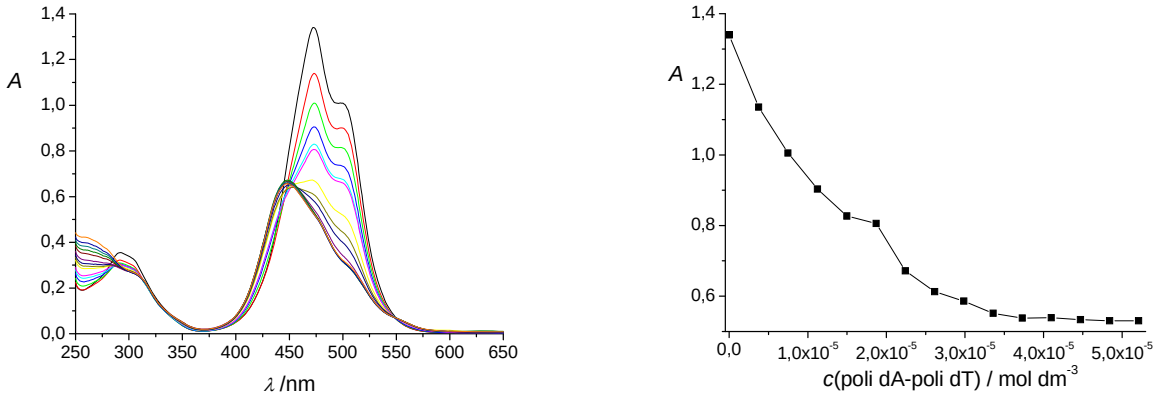
Slika 11 **a) UV/Vis titracija 6-Cl-YOYO-1 (c = 4,45 × 10^{-6} mol dm^{-3}) s *ct*-DNA; b) Promjene u UV/Vis spektru 6-Cl-YOYO-1 pri λ_{max} = 461 nm kao posljedica titracije s *ct*-DNA, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3} pri 25 °C.**

8.1.1.1. 6-Cl-TO-1



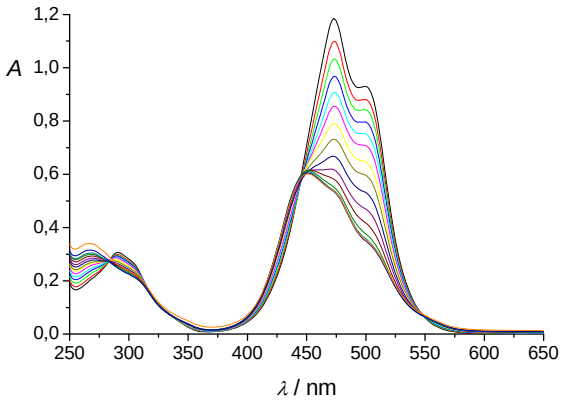
a) **b)**

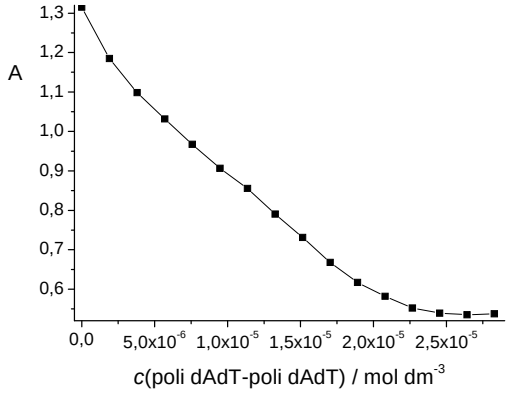
Slika 12. **a) UV/Vis titracija 6-Cl-TO-1 (c = 3,7 × 10^{-5} mol dm^{-3}) s poli dG-poli dC; b) Promjene u UV/Vis spektru 6-Cl-TO-1 pri λ_{max} = 473 nm kao posljedica titracije s poli dG-poli dC, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3} pri 25 °C.**



a) **b)**

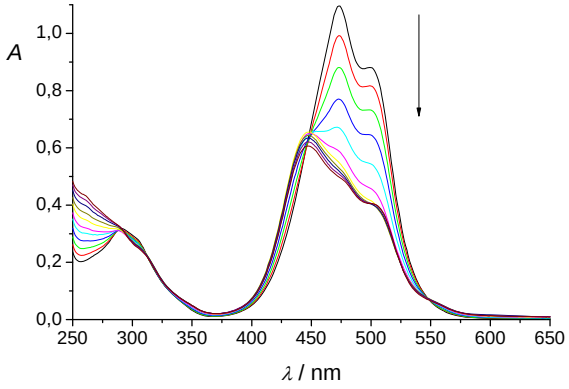
Slika 13. **a) UV/Vis titracija 6-Cl-TO-1 (c = 3,7 × 10^{-5} mol dm^{-3}) s poli dA-poli dT; b) Promjene u UV/Vis spektru 6-Cl-TO-1 pri λ_{max} = 473 nm kao posljedica titracije s poli dA-poli dT, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3} pri 25 °C.**

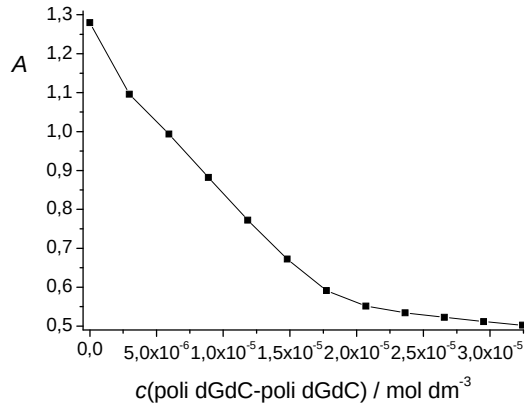




a) **b)**

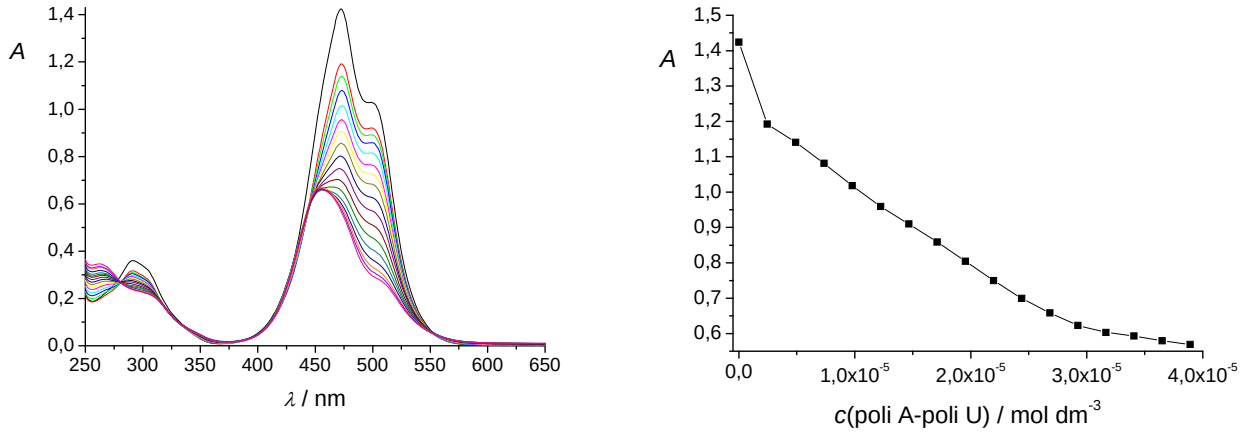
Slika 14. **a) UV/Vis titracija 6-Cl-TO-1 (c = 3,7 × 10^{-5} mol dm^{-3}) s poli dAdT-poli dAdT; b) Promjene u UV/Vis spektru 6-Cl-TO-1 pri λ_{max} = 473 nm kao posljedica titracije s poli dAdT-poli dAdT, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3} pri 25 °C.**





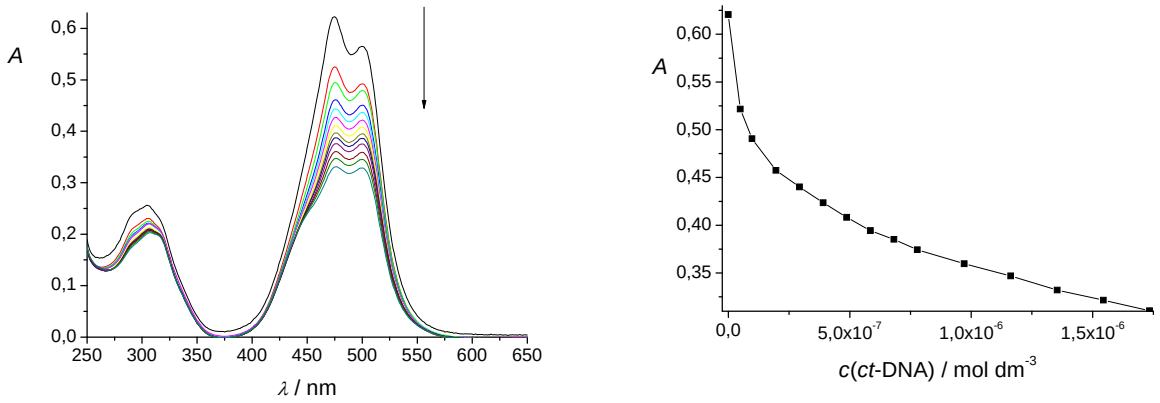
a) **b)**

Slika 15. **a) UV/Vis titracija 6-Cl-TO-1 (c = 3,7 × 10^{-5} mol dm^{-3}) s poli dGdC-poli dGdC; b) Promjene u UV/Vis spektru 6-Cl-TO-1 pri λ_{max} = 473 nm kao posljedica titracije s poli dGdC-poli dGdC, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3} pri 25 °C.**



a) **b)**

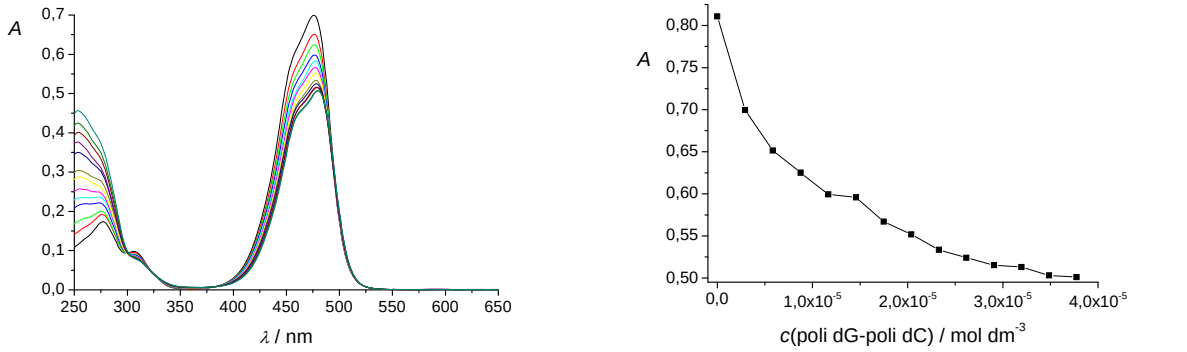
Slika 16. **a) UV/Vis titracija 6-Cl-TO-1 (c = 3,7 × 10^{-5} mol dm^{-3}) s poli A-poli U; b) Promjene u UV/Vis spektru 6-Cl-TO-1 pri λ_{max} = 473 nm kao posljedica titracije s poli A-poli U, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3} pri 25 °C.**



a) **b)**

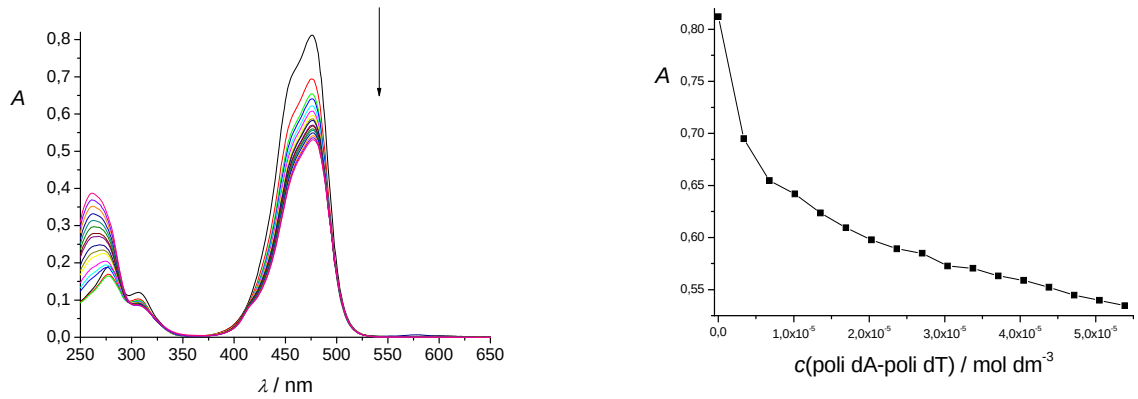
Slika 17. **a) UV/Vis titracija 6-Cl-TO-1 (c = 1,76 × 10^{-5} mol dm^{-3}) s *ct*-DNA; b) Promjene u UV/Vis spektru 6-Cl-TO-1 pri λ_{max} = 473 nm kao posljedica titracije s *ct*-DNA, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3} pri 25 °C.**

8.1.1.1. 6-Cl-YO-1



a) **b)**

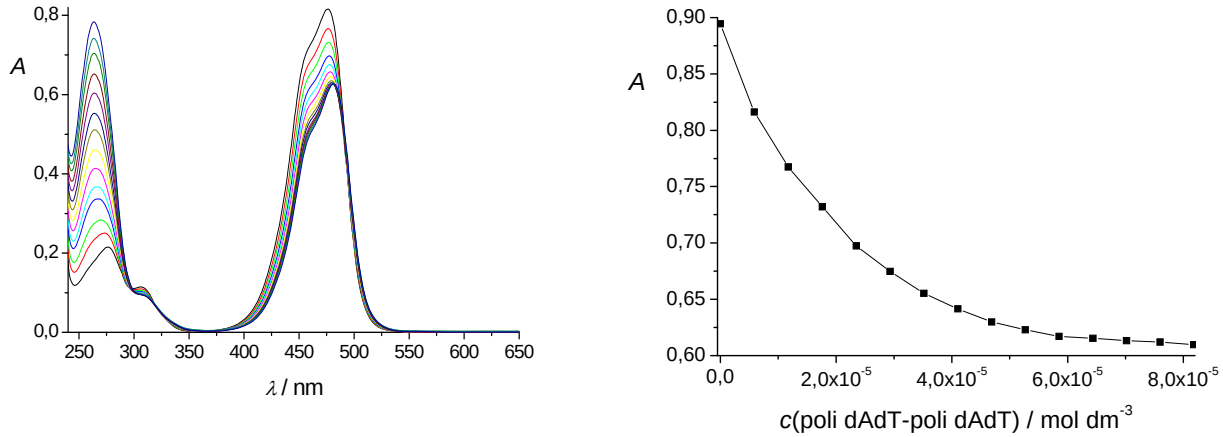
Slika 18. **a) UV/Vis titracija 6-Cl-YO-1 (c = 1,3 × 10^{-5} mol dm^{-3}) s poli dG-poli dC; b) Promjene u UV/Vis spektru 6-Cl-YO-1 pri λ_{max} = 476 nm kao posljedica titracije s poli dG-poli dC, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3} pri 25 °C.**



b)

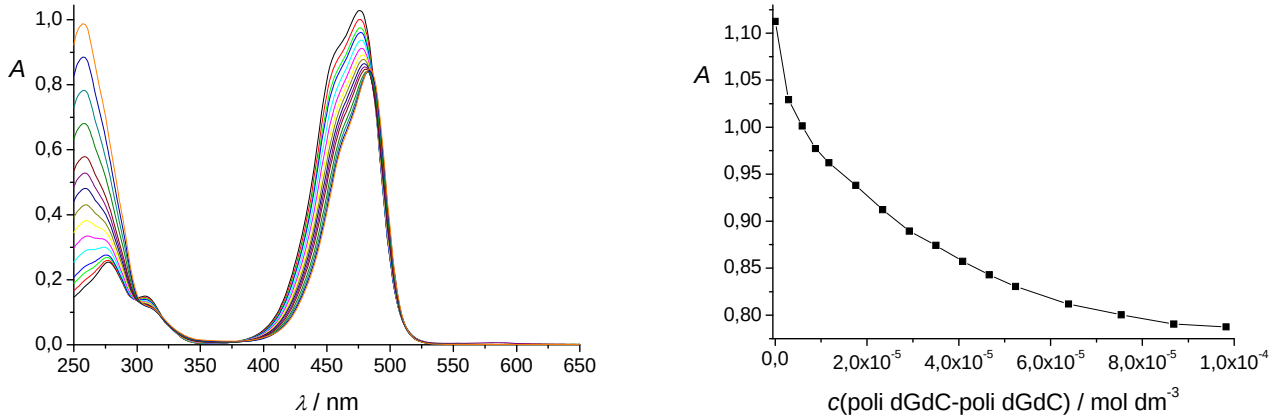
a)

Slika 19: **a) UV/Vis titracija 6-Cl-YO-1 (c = 1,53 × 10^{-5} mol dm^{-3}) s poli dA-poli dT; b) Promjene u UV/Vis spektru 6-Cl-YO-1 pri λ_{max} = 476 nm kao posljedica titracije s poli dA-poli dT, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3} pri 25 °C.**



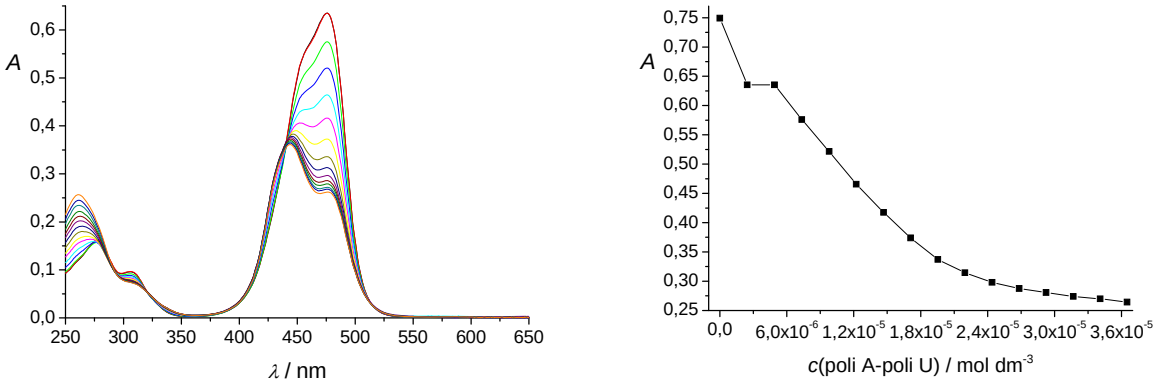
a) **b)**

Slika 20. **a) UV/Vis titracija 6-Cl-YO-1 (c = 1,4 × 10^{-5} mol dm^{-3}) s poli dAdT-poli dAdT; b) Promjene u UV/Vis spektru 6-Cl-YO-1 pri λ_{max} = 476 nm kao posljedica titracije s poli dAdT-poli dAdT, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3} pri 25 °C.**



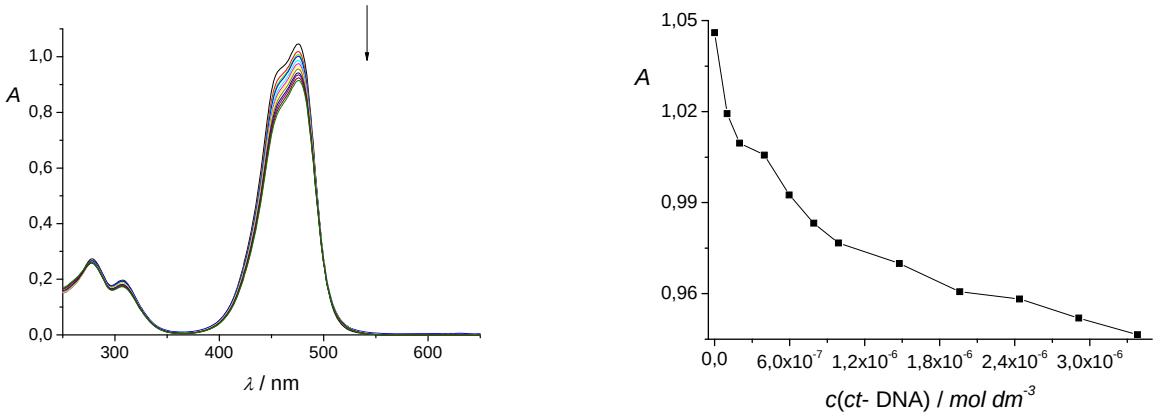
a) **b)**

Slika 21. **a) UV/Vis titracija 6-Cl-YO-1 (c = 1,9 × 10^{-5} mol dm^{-3}) s poli dGdC-poli dGdC; b) Promjene u UV/Vis spektru 6-Cl-YO-1 pri λ_{max} = 476 nm kao posljedica titracije s poli dGdC-poli dGdC, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3} pri 25 °C.**



a) **b)**

Slika 22 . **a) UV/Vis titracija 6-Cl-YO-1 (c = 1,4 × 10^{-5} mol dm^{-3}) s poli A-poli U; b) Promjene u UV/Vis spektru 6-Cl-YO-1 pri λ_{max} = 476 nm kao posljedica titracije s poli A-poli U, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3} pri 25 °C.**

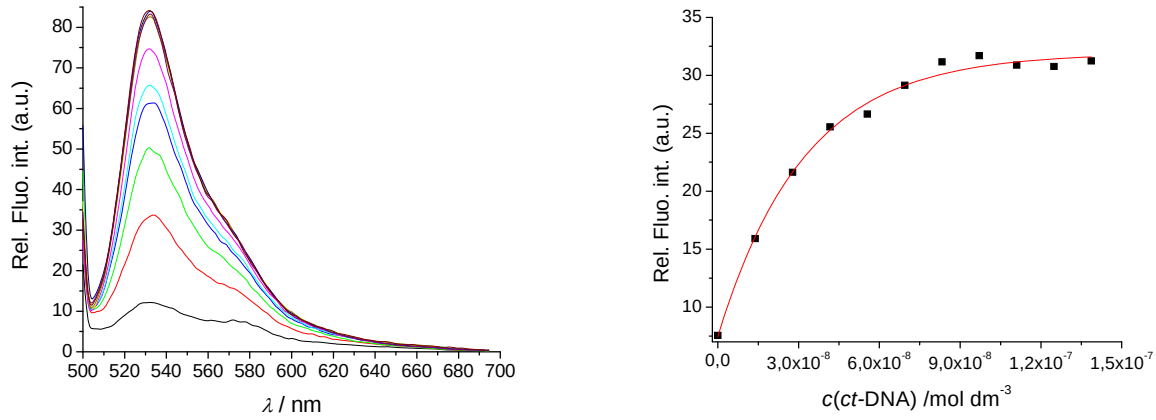


a) **b)**

Slika 23. **a) UV/Vis titracija 6-Cl-YO-1 (c = 1,92 × 10^{-5} mol dm^{-3}) s *ct*-DNA; b) Promjene u UV/Vis spektru 6-Cl-YO-1 pri λ_{max} = 476 nm kao posljedica titracije s *ct*-DNA, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3} , pri 25 °C.**

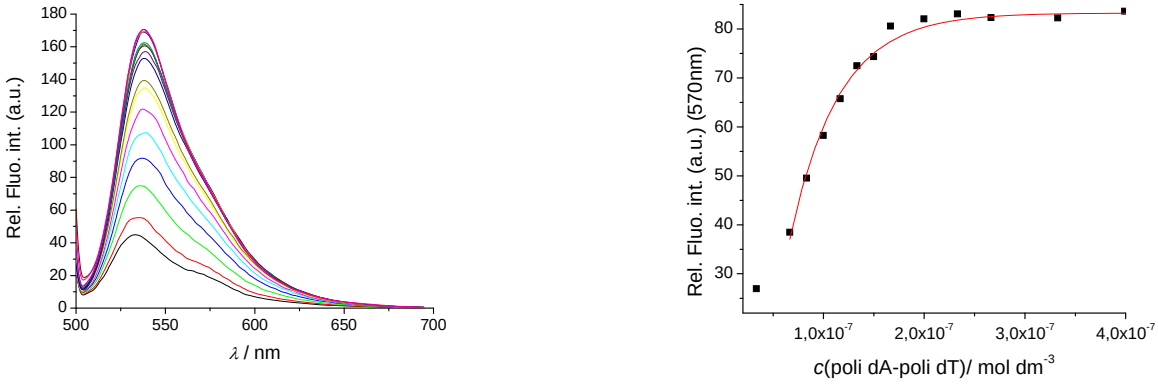
8.1.2. Fluorescencijske titracije

8.1.2.1. 6-Cl-TOTO-1



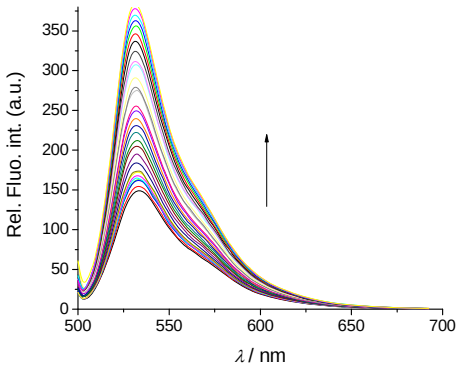
a) **b)**

Slika 24. **a) Fluorescencijska titracija 6-Cl-TOTO-1 (c = 1,4 × 10^{-8} mol dm^{-3}, λ_{exc} = 483 nm, λ_{em}=500–700nm; širina ekscitacijskih i emisijskih pukotina 10 nm) s *ct*-DNA; b) Promjene u intenzitetu fluorescencije 6-Cl-TOTO-1 pri λ_{max} = 570 nm kao posljedica titracije s *ct*-DNA, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3}, pri 25 °C.**

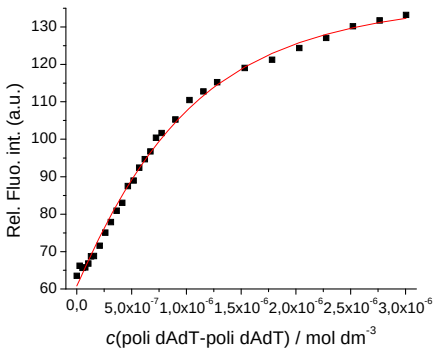


a) **b)**

Slika 25. **a) Fluorescencijska titracija 6-Cl-TOTO-1 (c = 2,79 × 10^{-8} mol dm^{-3}, λ_{exc} = 483 nm, λ_{em}=500–700nm; širina ekscitacijskih i emisijskih pukotina 10 nm) s poli dA-poli dT; b) Promjene u intenzitetu fluorescencije 6-Cl-TOTO-1 pri λ_{max} = 570 nm kao posljedica titracije s poli dA-poli dT, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3}, pri 25 °C.**

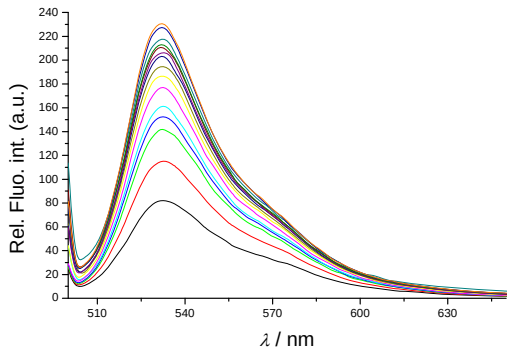


a)

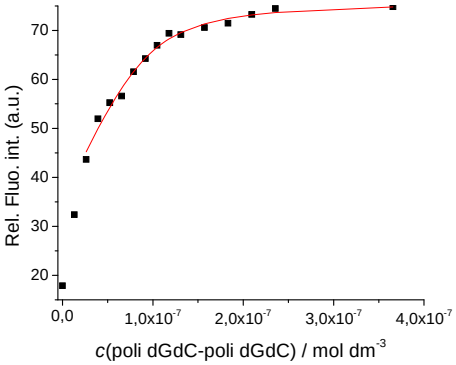


b)

Slika 26. **a) Fluorescencijska titracija 6-Cl-TOTO-1 (c = 8,4 × 10^{-8} mol dm^{-3}, λ_{exc} = 483 nm, λ_{em} = 500–700 nm; širina ekscitacijskih i emisijskih pukotina 10nm) s poli dAdT-poli dAdT; b) Promjene u intenzitetu fluorescencije 6-Cl-TOTO-1 pri λ_{max} = 570 nm kao posljedica titracije s poli dAdT-poli dAdT, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3} , pri 25 °C.**

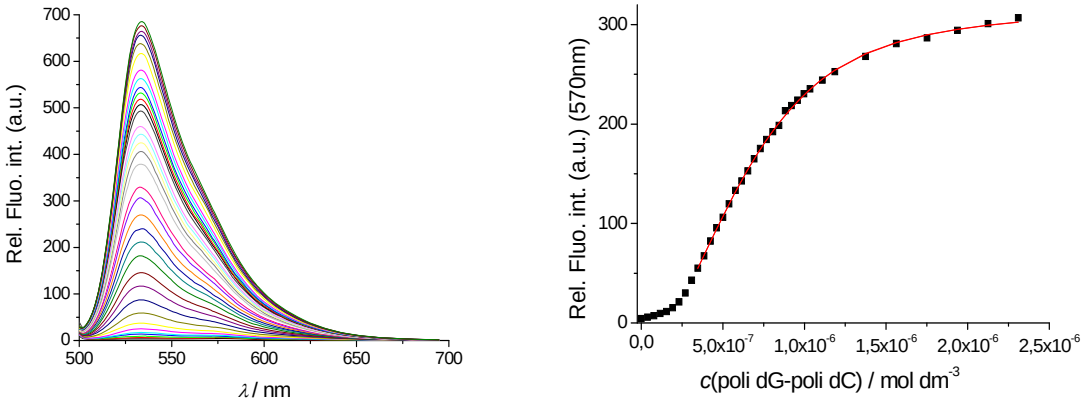


a)



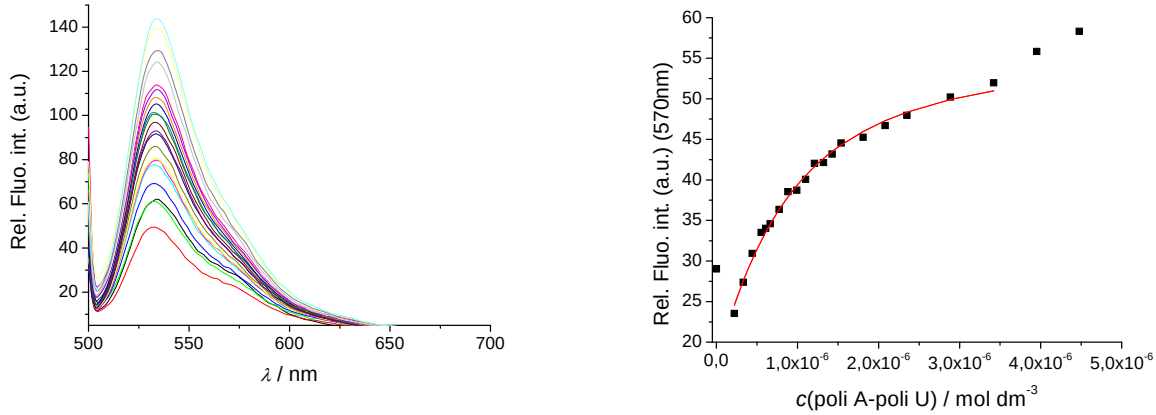
b)

Slika 27. **a) Fluorescencijska titracija 6-Cl-TOTO-1 (c = 2,79 × 10^{-8} mol dm^{-3}, λ_{exc} = 483 nm, λ_{em} = 500–700 nm; širina ekscitacijskih i emisijskih pukotina 10 nm) s poli dGdC-poli dGdC; b) Promjene u intenzitetu fluorescencije 6-Cl-TOTO-1 pri λ_{max} = 570 nm kao posljedica titracije s poli dGdC-poli dGdC, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3}, pri 25 °C.**



a) b)

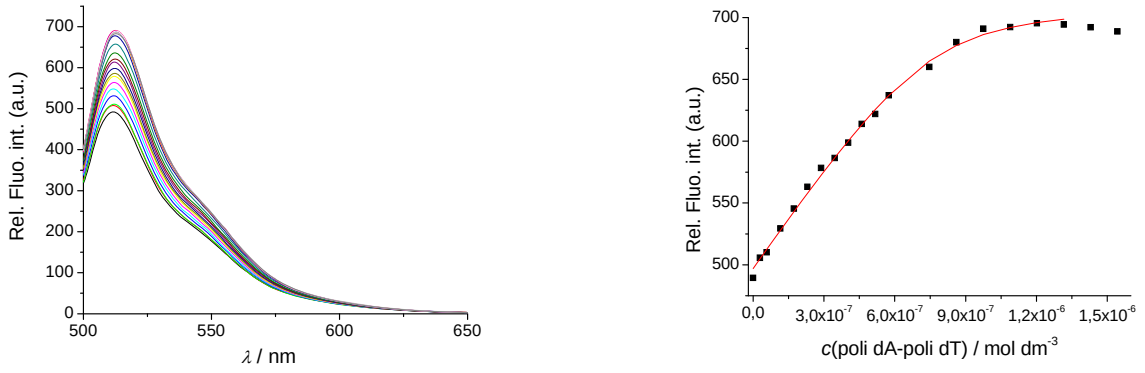
Slika 28. **a) Fluorescencijska titracija 6-Cl-TOTO-1 (c = 1,67× 10^{-7} mol dm^{-3}, λ_{exc} = 483 nm, λ_{em} = 500–700nm; širina ekscitacijskih i emisijskih pukotina 10 nm) s poli dG-poli dC; b) Promjene u intenzitetu fluorescencije 6-Cl-TOTO-1 pri λ_{max} = 570 nm kao posljedica titracije s poli dG-poli dC, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3}, pri 25 °C.**



a) b)

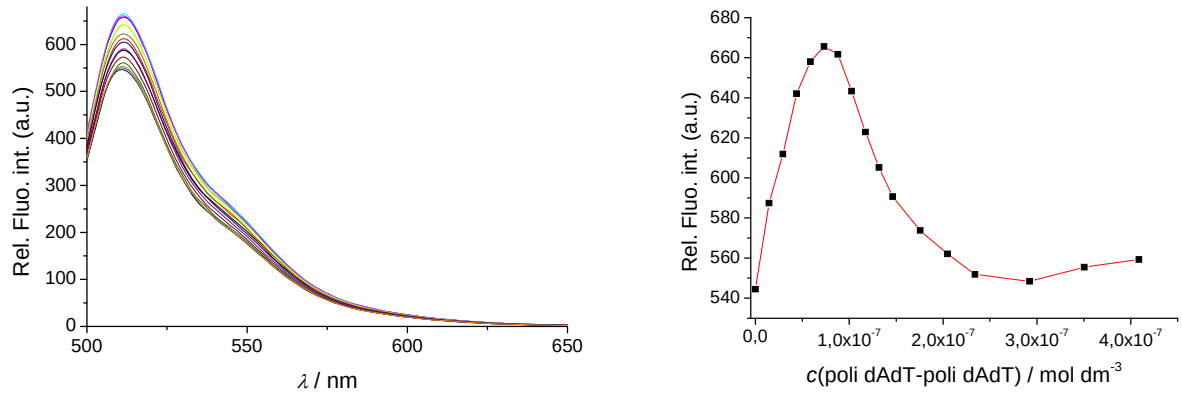
Slika 29. **a) Fluorescencijska titracija 6-Cl-TOTO-1 (c = 8,2 × 10^{-8} mol dm^{-3}, λ_{exc} = 483 nm, λ_{em} = 500–700 nm; širina ekscitacijskih i emisijskih pukotina 10 nm) s poli A-poli U; b) Promjene u intenzitetu fluorescencije 6-Cl-TOTO-1 pri λ_{max} = 570 nm kao posljedica titracije s poli A-poli U, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3}, pri 25 °C.**

8.1.2.1. 6-Cl-YOYO-1



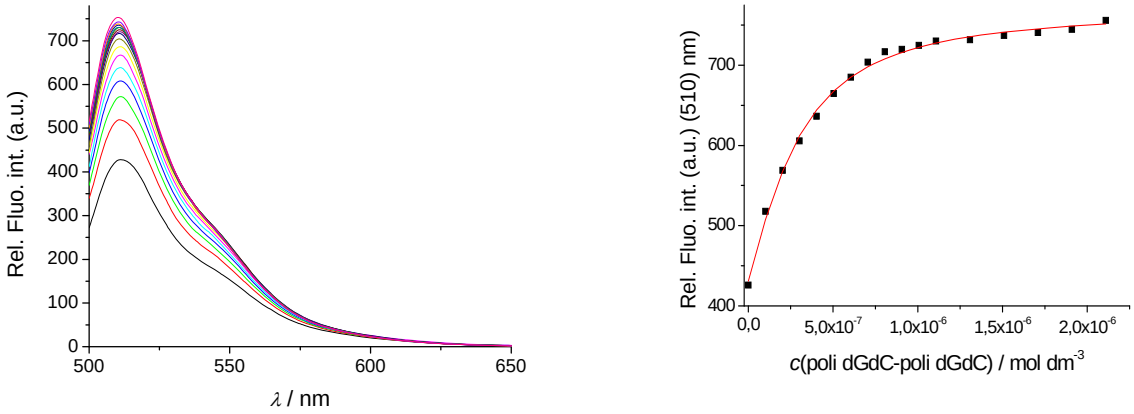
a) **b)**

Slika 30. **a) Fluorescencijska titracija 6-Cl-YOYO-1 (c = 7,69 × 10^{-8} mol dm^{-3}, λ_{exc} = 440 nm, λ_{em} = 500–700 nm; širina ekscitacijskih i emisijskih pukotina 10 nm) s poli dA-poli dT; b) Promjene u intenzitetu fluorescencije 6-Cl-YOYO-1 pri λ_{max} = 513 nm kao posljedica titracije s s poli dA-poli dT, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3}, pri 25 °C.**



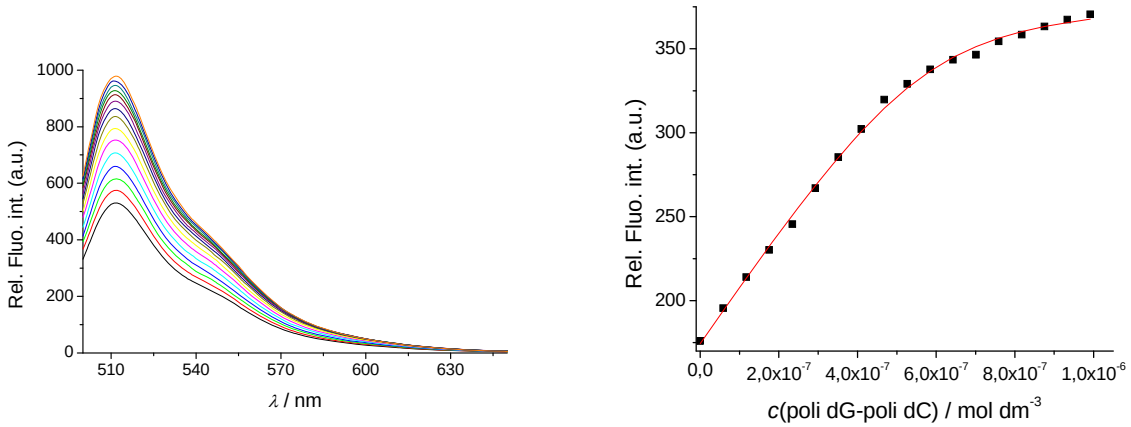
a) **b)**

Slika 31. **a) Fluorescencijska titracija 6-Cl-YOYO-1 6-Cl-YOYO-1 (c = 7,69 × 10^{-8} mol dm^{-3}, λ_{exc} = 440 nm, λ_{em} = 500–700nm; širina ekscitacijskih i emisijskih pukotina 10 nm) s poli dAdT-poli dAdT; b) Promjene u intenzitetu fluorescencije 6-Cl-YOYO-1 pri λ_{max} = 511 nm kao posljedica titracije s poli dAdT-poli dAdT, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3}, pri 25 °C.**



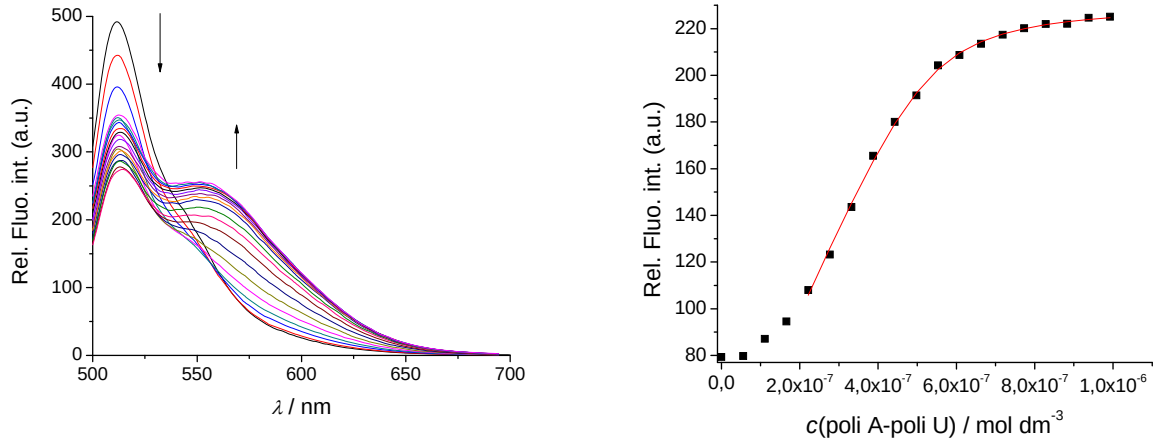
a) b)

Slika 32. **a) Fluorescencijska titracija 6-Cl-YOYO-1 (c = 7,69 × 10^{-8} mol dm^{-3}, λ_{exc} = 440 nm, λ_{em} = 500–700 nm; širina ekscitacijskih i emisijskih pukotina 10 nm) s poli dGdC-poli dGdC; b) Promjene u intenzitetu fluorescencije 6-Cl-YOYO-1 pri λ_{max} = 510 nm kao posljedica titracije s poli dGdC-poli dGdC u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3}, pri 25 °C.**



a) b)

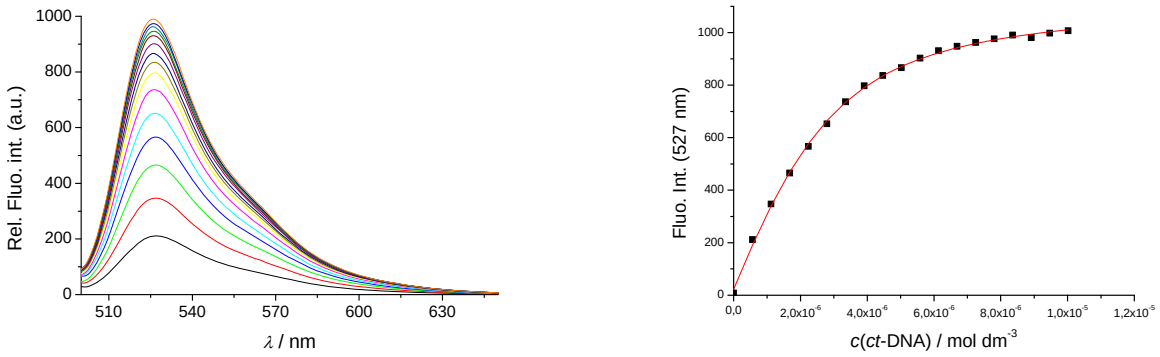
Slika 33 **a) Fluorescencijska titracija 6-Cl-YOYO-1 (c = 1,53 × 10^{-7} mol dm^{-3}, λ_{exc} = 440 nm, λ_{em} = 500–700 nm; širina ekscitacijskih i emisijskih pukotina 10 nm) s poli dG-poli dC; b) Promjene u intenzitetu fluorescencije 6-Cl-YOYO-1 pri λ_{max} = 512 nm kao posljedica titracije s poli dG-poli dC, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3}, pri 25 °C.**



a) **b)**

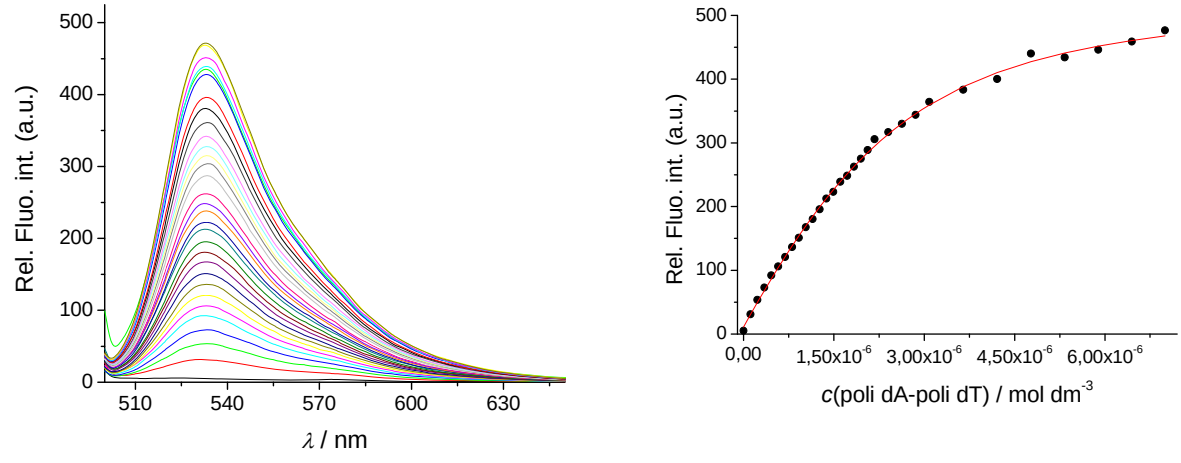
Slika 34 **a) Fluorescencijska titracija 6-Cl-YOYO-1 (c = 1,53 × 10^{-7} mol dm^{-3}, λ_{exc} = 440 nm, λ_{em} = 500–700 nm; širina ekscitacijskih i emisijskih pukotina 10 nm) s poli A-poli U; b) Promjene u intenzitetu fluorescencije 6-Cl-YOYO-1 pri λ_{max} = 570 nm kao posljedica titracije s poli A-poli U, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3}, pri 25 °C.**

8.1.2.1. 6-Cl-TO-1



a) **b)**

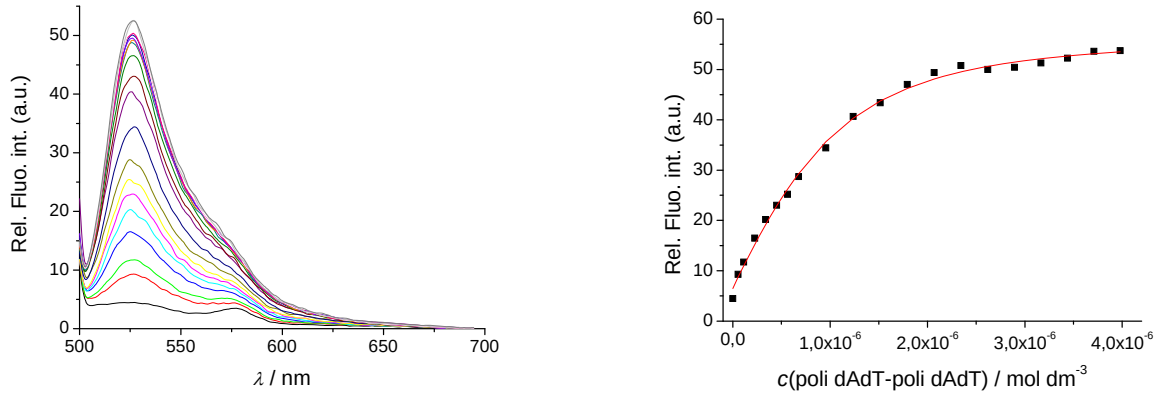
Slika 35 **a) Fluorescencijska titracija 6-Cl-TO-1 (c = 5,47 × 10^{-7} mol dm^{-3}, λ_{exc} = 483 nm, λ_{em} = 500–700 nm; širina ekscitacijskih i emisijskih pukotina 10 nm) s *ct*-DNA; b) Promjene u intenzitetu fluorescencije 6-Cl-TO-1 at λ_{max} = 527 nm kao posljedica titracije s *ct*-DNA, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3}, pri 25 °C.**



b)

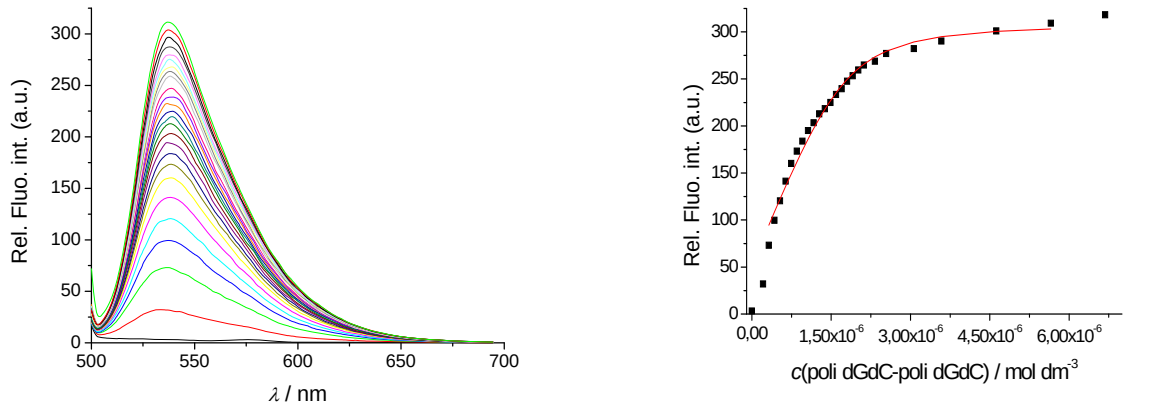
a)

Slika 36 **a) Fluorescencijska titracija 6-Cl-TO-1 (c = 5,47 × 10^{-7} mol dm^{-3}, λ_{exc} = 483 nm, λ_{em} = 500–700 nm; širina ekscitacijskih i emisijskih pukotina 10 nm) s poli dA-poli dT; b) Promjene u intenzitetu fluorescencije 6-Cl-TO-1 pri λ_{max} = 534 nm kao posljedica titracije s poli dA-poli dT, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3}, pri 25 °C.**



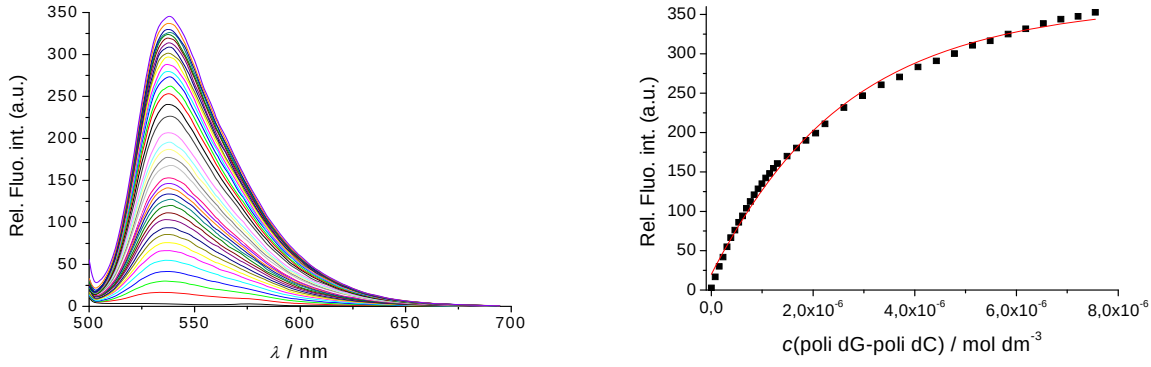
a) b)

Slika 37. **a) Fluorescencijska titracija 6-Cl-TO-1 (c = 5,47× 10^{-7} mol dm^{-3}, λ_{exc} = 483 nm, λ_{em} = 500–700 nm; širina ekscitacijskih i emisijskih pukotina 10 nm) s poli dAdT-poli dAdT; b) Promjene u intenzitetu fluorescencije 6-Cl-TO-1 pri λ_{max} = 527 nm kao posljedica titracije s poli dAdT-poli dAdT, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3}, pri 25 °C.**



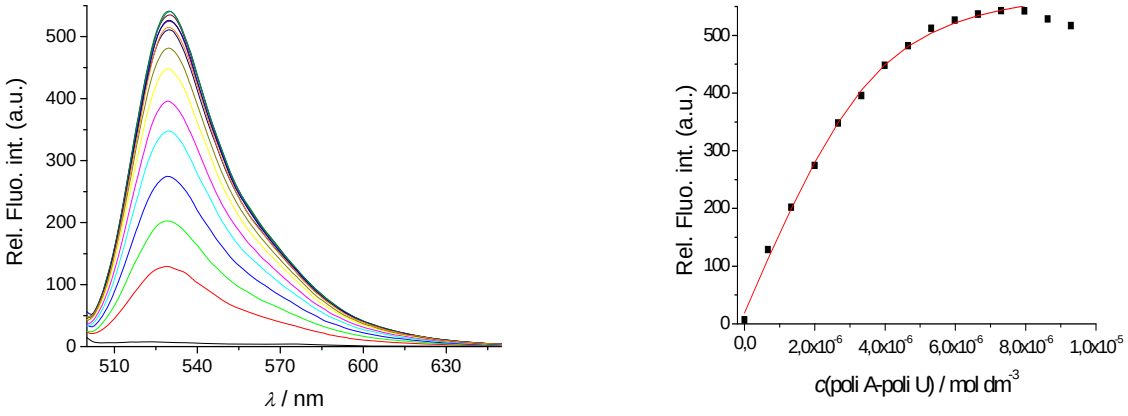
a) b)

Slika 38. **a) Fluorescencijska titracija 6-Cl-TO-1 (c = 5,47× 10^{-7} mol dm^{-3}, λ_{exc} = 483 nm, λ_{em} = 500–700 nm; širina ekscitacijskih i emisijskih pukotina 10 nm) s poli dGdC-poli dGdC; b) Promjene u intenzitetu fluorescencije 6-Cl-TO-1 na λ_{max} = 537 nm kao posljedica titracije s poli dGdC-poli dGdC, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3}, pri 25 °C.**



a) b)

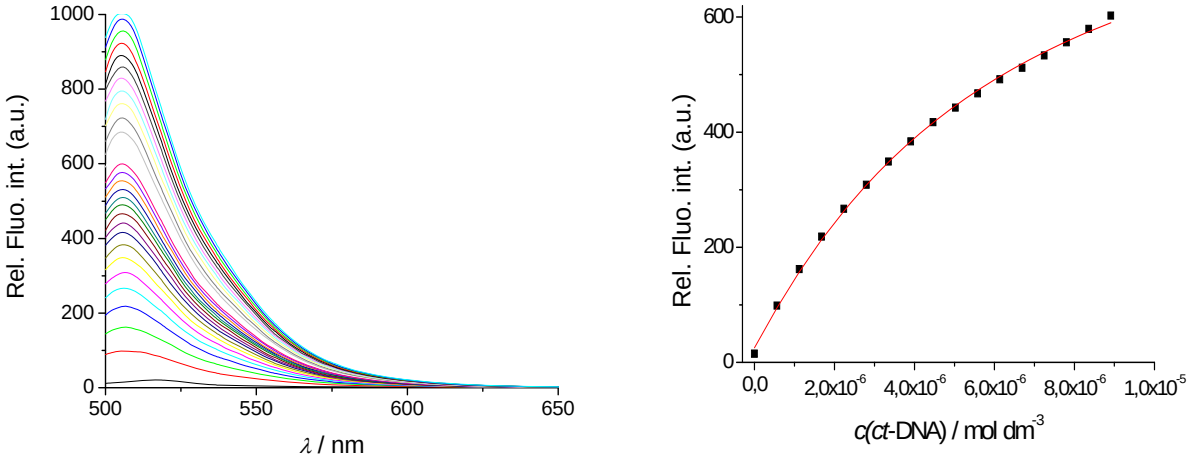
Slika 39. **a) Fluorescencijska titracija 6-Cl-TO-1 (c = 5,47 × 10^{-7} mol dm^{-3}, λ_{exc} = 483 nm, λ_{em} = 500–700 nm; širina ekscitacijskih i emisijskih pukotina 10 nm) s poli dG-poli dC; b) Promjene u intenzitetu fluorescencije 6-Cl-TO-1 na λ_{max} = 538 nm kao posljedica titracije s poli dG-poli dC, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3}, pri 25 °C.**



a) b)

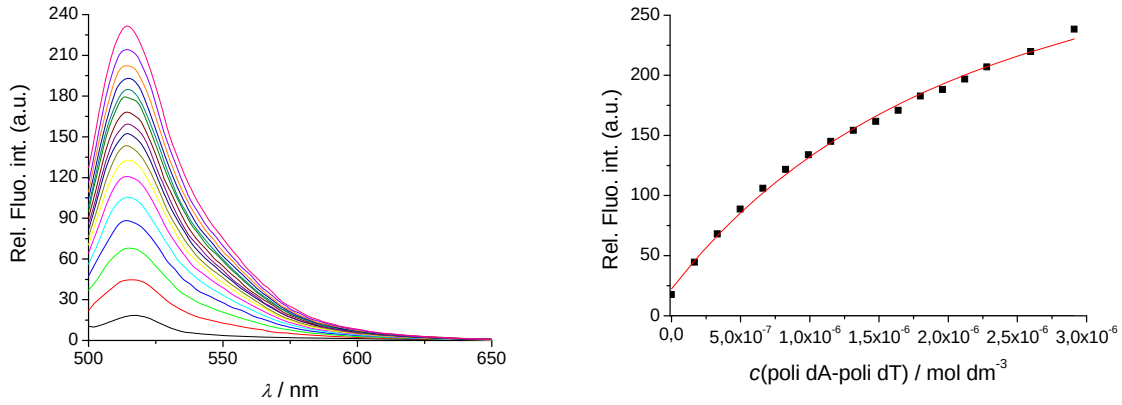
Slika 40. **a) Fluorescencijska titracija 6-Cl-TO-1 (c = 5,47 × 10^{-7} mol dm^{-3}, λ_{exc} = 483 nm, λ_{em} = 500–700 nm; širina ekscitacijskih i emisijskih pukotina 10 nm) s poli A-poli U; b) Promjene u intenzitetu fluorescencije 6-Cl-TO-1 na λ_{max} = 527 nm kao posljedica titracije s poli A-poli U u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3}, pri 25 °C.**

8.1.2.1. 6-Cl-YO-1



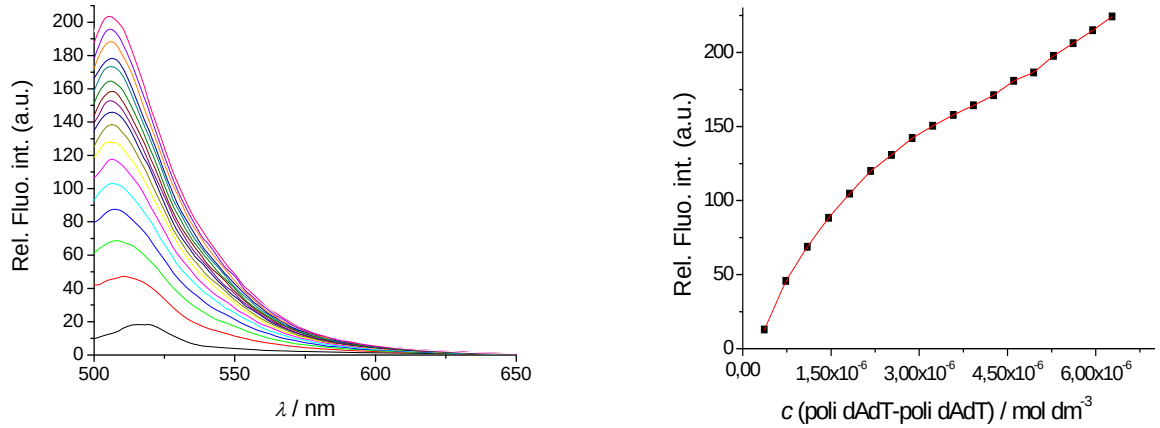
a) b)

Slika 41 **a) Fluorescencijska titracija 6-Cl-YO-1 (c = 2,32 × 10^{-7} mol dm^{-3}, λ_{exc} = 440 nm, λ_{em} = 500–700 nm; širina ekscitacijskih i emisijskih pukotina 10 nm) s *ct*-DNA; b) Promjene u intenzitetu fluorescencije 6-Cl-YO-1 na λ_{max} = 506 nm nm kao posljedica titracije s *ct*-DNA, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3}, pri 25 °C.**



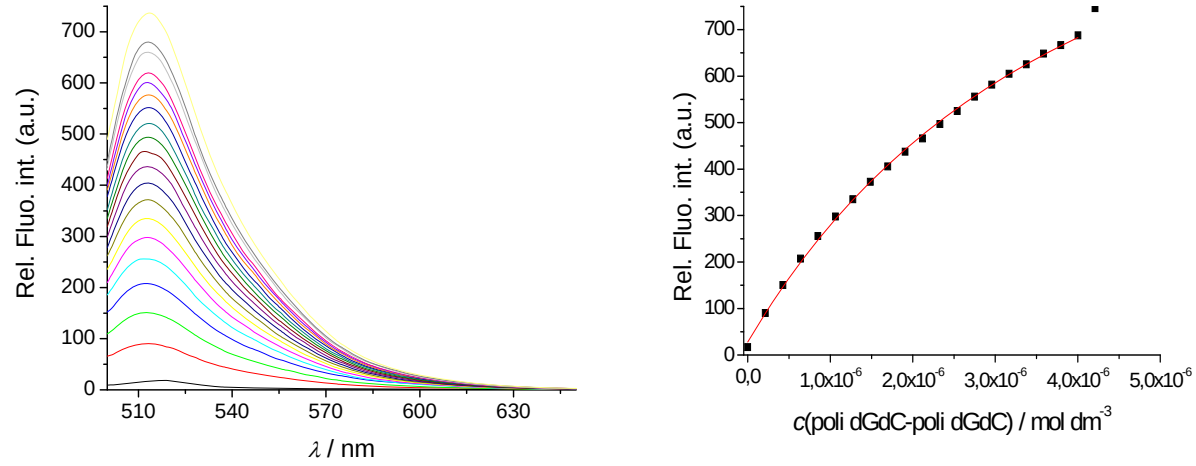
a) b)

Slika 42 **a) Fluorescencijska titracija 6-Cl-YO-1 (c = 1,15 × 10^{-7} mol dm^{-3}, λ_{exc} = 440 nm, λ_{em} = 500–700 nm; širina ekscitacijskih i emisijskih pukotina 10 nm) s poli dA-poli dT; b) Promjene u intenzitetu fluorescencije 6-Cl-YO-1 na λ_{max} = 514 kao posljedica titracije s poli dA-poli dT, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3}, pri 25 °C.**



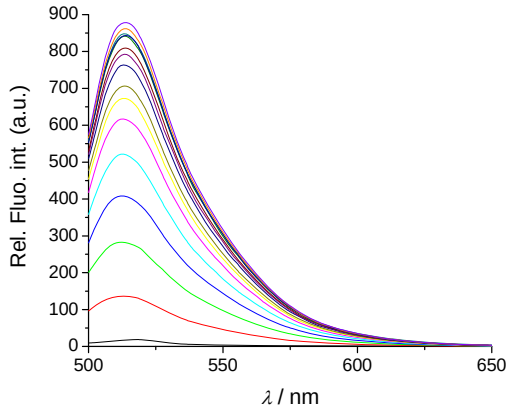
a) b)

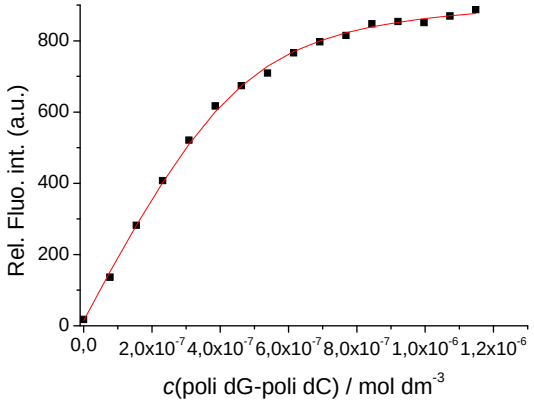
Slika 43. **a) Fluorescencijska titracija 6-Cl-YO-1 (c = 1,15 × 10^{-7} mol dm^{-3}, λ_{exc} = 440 nm, λ_{em} = 500–700 nm, širina ekscitacijskih i emisijskih pukotina 10 nm) s poli dAdT-poli dAdT; b) Promjene u intenzitetu fluorescencije 6-Cl-YO-1 na λ_{max} = 506 nm kao posljedica titracije s poli dAdT-poli dAdT, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3}, pri 25 °C.**



a) b)

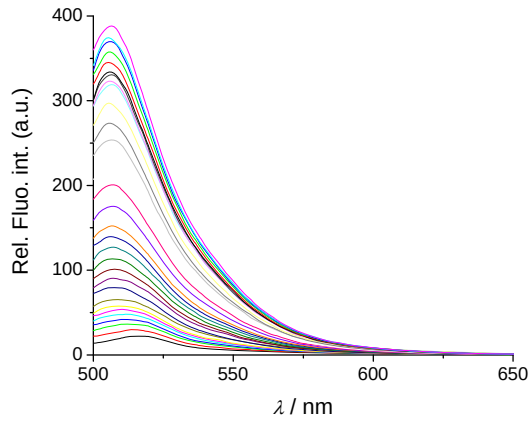
Slika 44. **a) Fluorescencijska titracija 6-Cl-YO-1 (c = 1.15 × 10^{-7} mol dm^{-3}, λ_{exc} = 440 nm, λ_{em} = 500–700 nm; širina ekscitacijskih i emisijskih pukotina 10 nm) s poli dGdC-poli dGdC; b) Promjene u intenzitetu fluorescencije 6-Cl-YO-1 na λ_{max} = 514 nm kao posljedica titracije s poli dGdC-poli dGdC, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3}, pri 25 °C.**

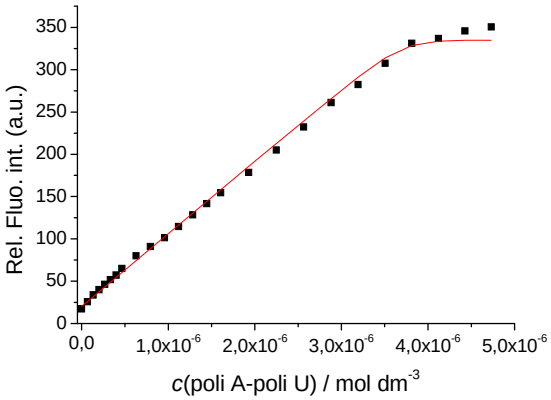




a) **b)**

Slika 45. **a) Fluorescencijska titracija 6-Cl-YO-1 (c = 1,16 × 10^{-7} mol dm^{-3}, λ_{exc} = 440 nm, λ_{em} = 500–700 nm; širina ekscitacijskih i emisijskih pukotina 10 nm) s poli dG-poli dC; b) Promjene u intenzitetu fluorescencije 6-Cl-YO-1 na λ_{max} = 514 nm kao posljedica titracije s poli dG-poli dC, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3}, pri 25 °C.**

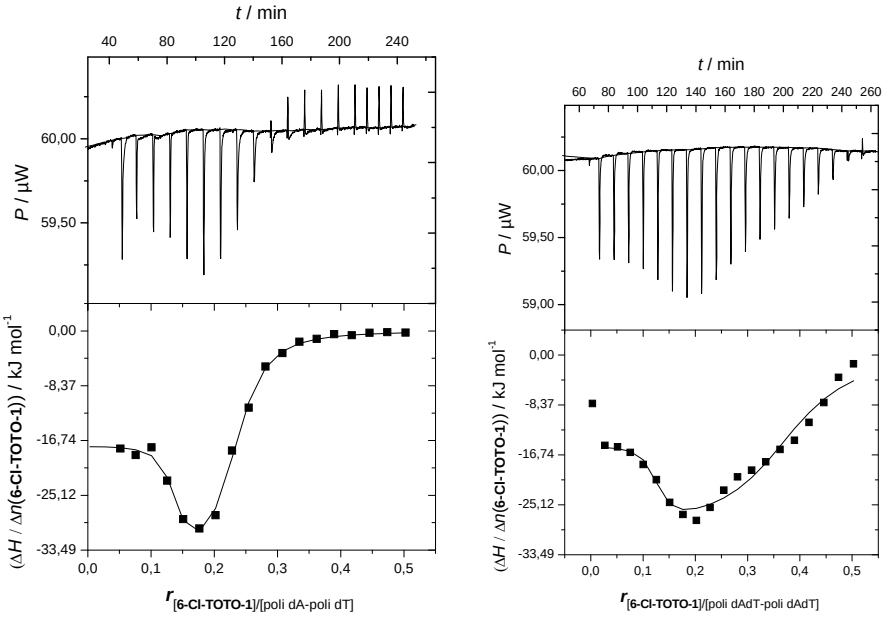




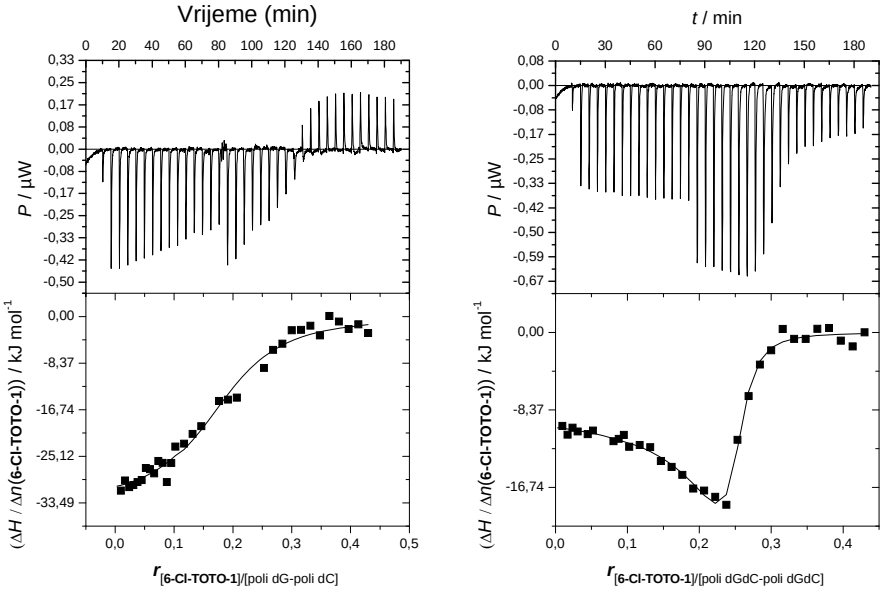
a) **b)**

Slika 46 **a) Fluorescencijska titracija 6-Cl-YO-1 (c = 2,32 × 10^{-7} mol dm^{-3}, λ_{exc} = 440 nm, λ_{em} = 500–700 nm; širina ekscitacijskih i emisijskih pukotina 10nm) s poli A-poli U; b) Promjene u intenzitetu fluorescencije 6-Cl-YO-1 na λ_{max} = 506 nm posljedica titracije s poli A-poli U, u kakodilatnom puferu, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3}, pri 25 °C.**

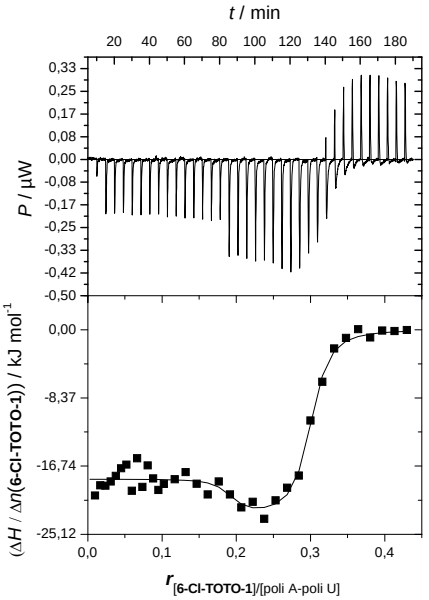
8.1.3. Izotermna titracijska kalorimetrija



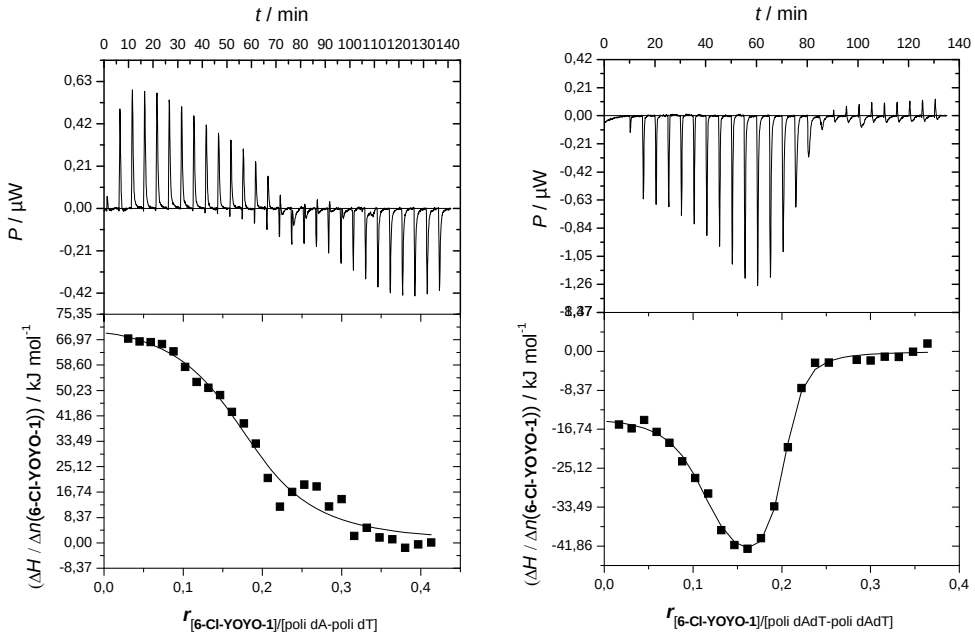
Slika 47: **ITC titracije poli-dAdT (lijevo) i poli dAdT-poli dAdT (desno) s 6-Cl-TOTO-1; Gore: sirovi podatci dodatka 6-Cl-TOTO-1 u otopinu polinukleotida. Dolje: eksperimentalno dobiveni podaci (■) i sukladnost podataka s modelom "*two set of sites*" (—).**



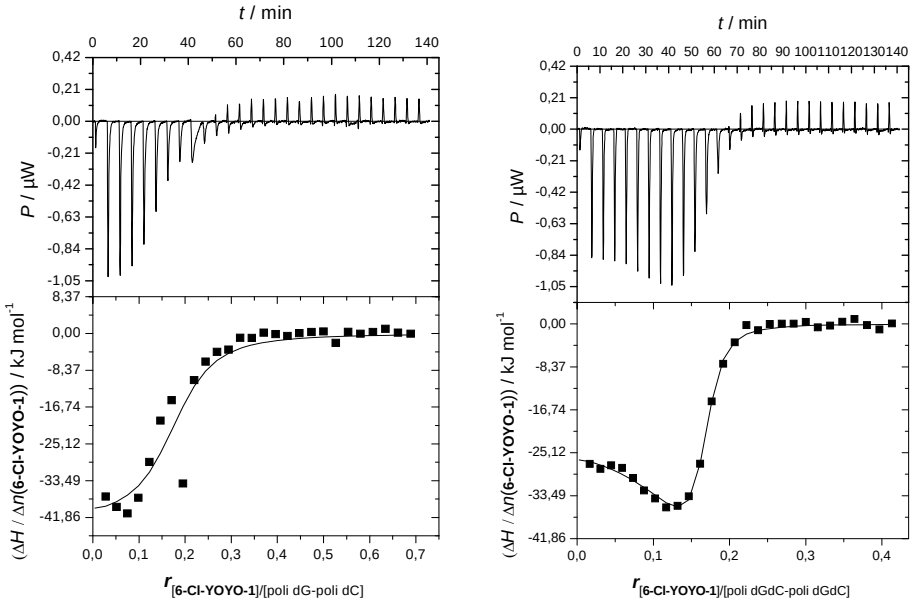
Slika 48: **ITC titracije poli dG-poli dC (lijevo) i poli dGdC-poli dGdC (desno) s 6-Cl-TOTO-1; Gore: sirovi podatci dodatka 6-Cl-TOTO-1 u otopinu polinukleotida. Dolje: eksperimentalno dobiveni podatci (■) te sukladnost podataka s modelom"*one set of sites*" za poli dG-poli dC model "*one set of sites*" i "*two set of sites*" za poli dGdC-poli dGdC (—).**



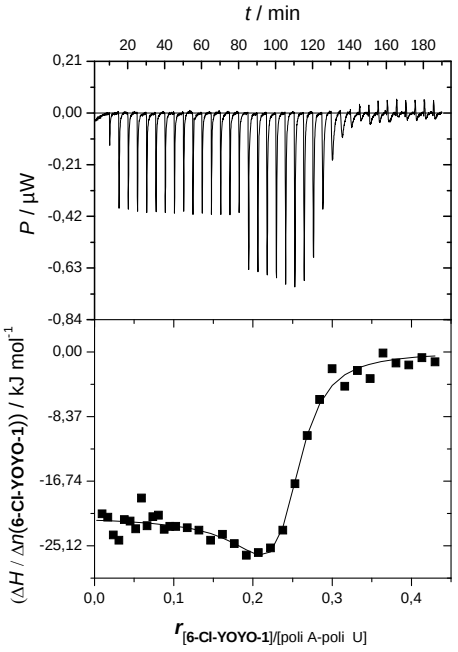
Slika 49: **ITC titracija poli A-poli U s 6-Cl-TOTO-1; Gore: sirovi podatci dodatka 6-Cl-TOTO-1 u otopinu polinukleotida. Dolje: eksperimentalno dobiveni podatci (■) te sukladnost podataka s modelom“*two set of sites*” (—).**



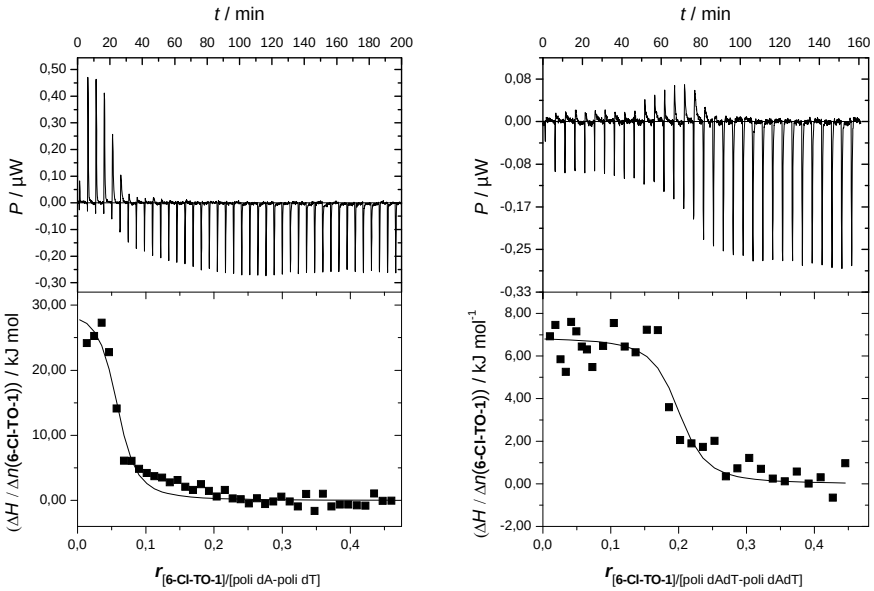
Slika 50: **ITC titracija poli dA-poli dT (lijevo) i poli dAdT-poli dAdT s 6-Cl-YOYO-1; Gore: sirovi podatci dodatka 6-Cl-YOYO-1 u otopinu polinukleotida. Dolje: eksperimentalno dobiveni podatci (■) i te sukladnost podataka s modelom“*two set of sites*” (—).**



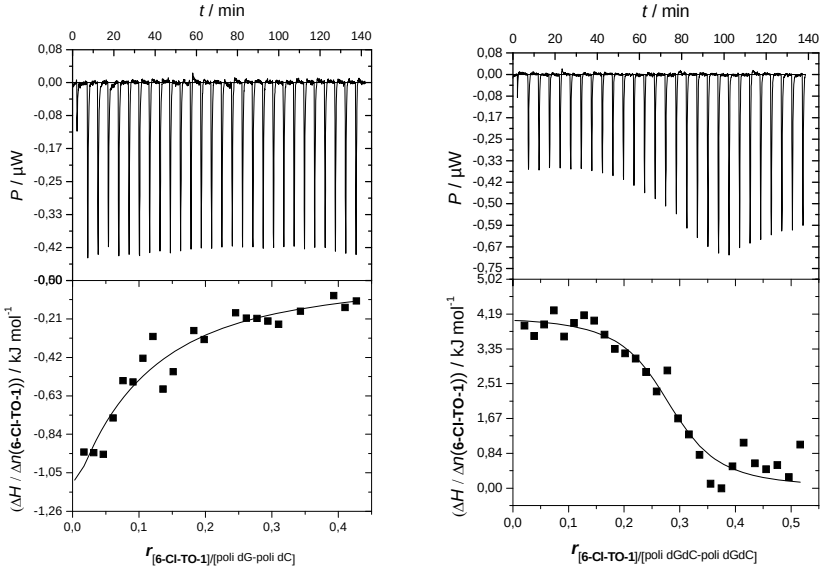
Slika 51: **ITC titracija poli dG-poli dC (lijevo) i poli dGdC-poli dGdC (desno) s 6-Cl-YOYO-1; Gore: sirovi podatci dodatka 6-Cl-YOYO-1 u otopinu polinukleotida. Dolje: eksperimentalno dobiveni podatci (■) te sukladnost podataka s modelom "*one set of sites*" za poli dG-poli dCi "*two set of sites*"za poli dGdC-poli dGdC (—).**



Slika 52: **ITC titracija poli A-poli U s 6-Cl-YOYO-1; Gore sirovi podatci dodatka 6-Cl-YOYO-1 u otopinu polinukleotida. Dolje eksperimentalno dobiveni podatci (■) i te sukladnost podataka s modelom "*two set of sites*" (—).**

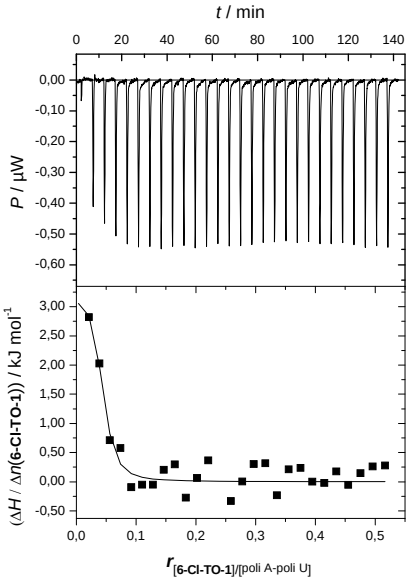


Slika 53: **ITC titracija poli dA-poli dT (lijevo) i poli dAdT-poli dAdT s 6-Cl-TO-1; Gore: sirovi podatci dodatka 6-Cl-TO-1 u otopinu polinukleotida. Dolje: eksperimentalno dobiveni podatci (■) i te sukladnost podataka s modelom"*one set of sites*" (—).**

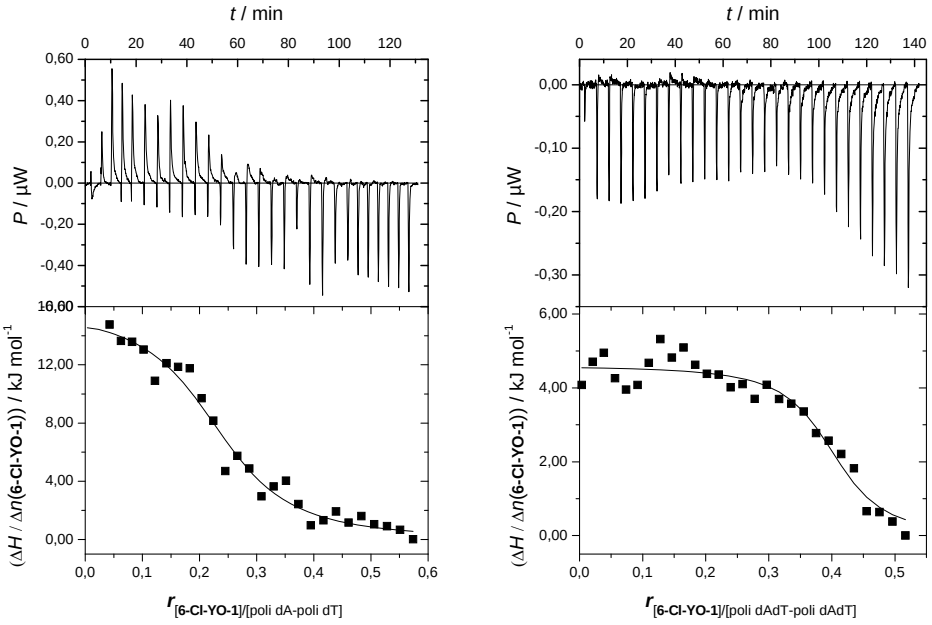


...

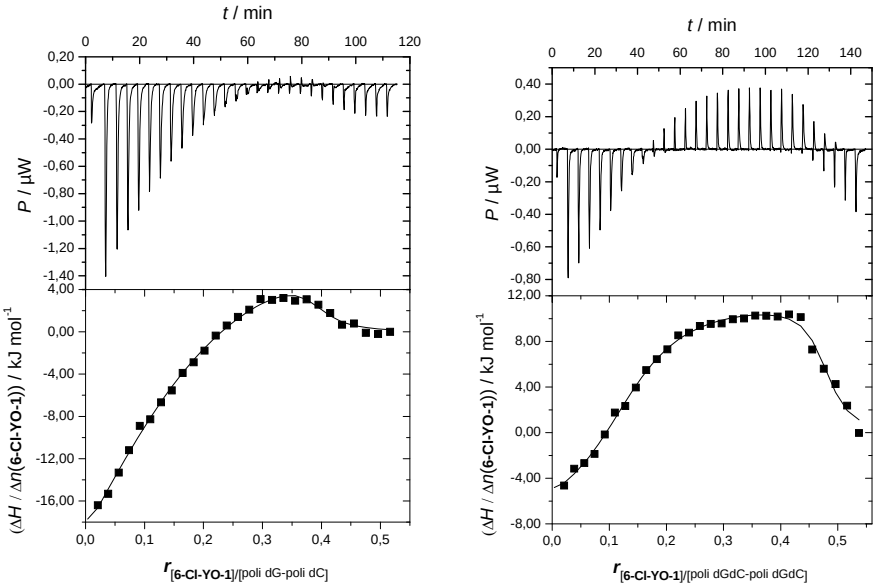
Slika 54: **ITC titracija poli dG-poli dC (lijevo) i poli dGdC-poli dGdC (desno) s 6-Cl-TO-1; Gore: sirovi podatci dodatka 6-Cl-TO-1 u otopinu polinukleotida. Dolje: eksperimentalno dobiveni podatci (■) i te sukladnost podataka s modelom"*one set of sites*"(—).**



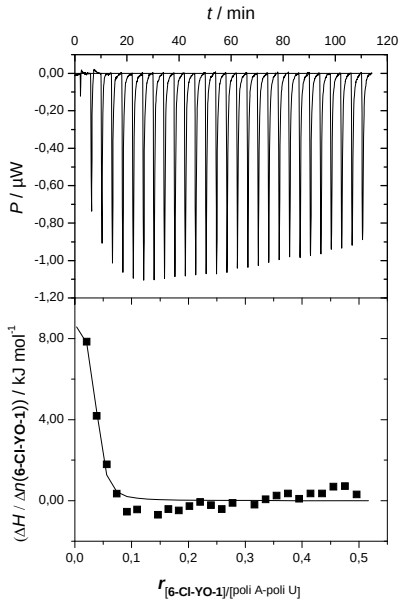
Slika 55: **ITC titracija poli A-poli U s 6-Cl-TO-1; Gore: sirovi podatci dodatka 6-Cl-TO-1 u otopinu polinukleotida. Dolje: eksperimentalno dobiveni podatci (■) i te sukladnost podataka s modelom“*one set of sites*” (—).**



Slika 56: **ITC titracija poli dA-poli dT (lijevo) i poli dAdT-poli dAdT (desno) s 6-Cl-YO-1; Gore: sirovi podatci dodatka 6-Cl-YO-1 u otopinu polinukleotida. Dolje: eksperimentalno dobiveni podatci (■) i te sukladnost podataka s modelom “*one set of sites*” (—).**



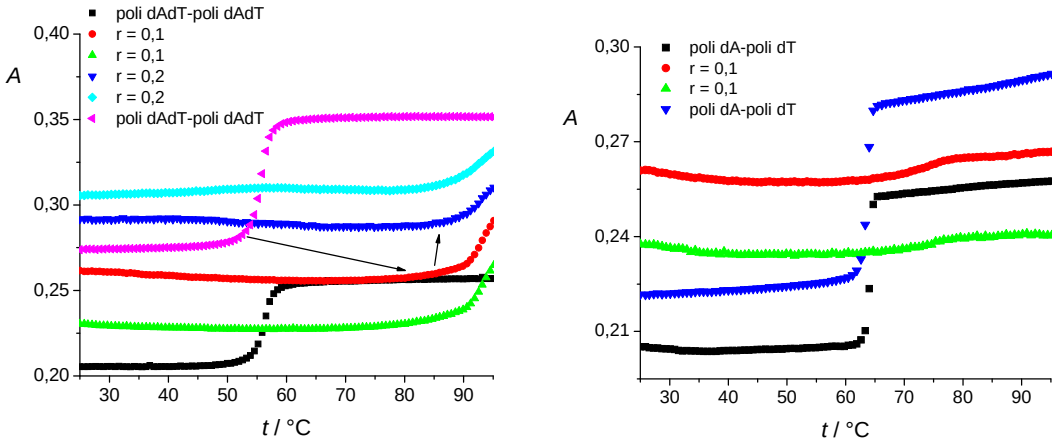
Slika 57: **ITC titracija poli dG-poli dC (lijevo) i poli dGdC-poli dGdC (desno) s 6-Cl-YO-1; Gore: sirovi podatci dodatka 6-Cl-YO-1 u otopinu polinukleotida. Dolje: eksperimentalno dobiveni podatci (■) i te sukladnost podataka s modelom "*one set of sites*" za poli dG-poli dC te "*two set of sites*" za poli dGdC-poli dGdC (—).**



Slika 58: **ITC titracija poli A-poli U s 6-Cl-YO-1; Gore: sirovi podatci dodatka 6-Cl-YO-1 u otopinu polinukleotida. Dolje: eksperimentalno dobiveni podatci (■) i te sukladnost podataka s modelom "*one set of sites*" (—).**

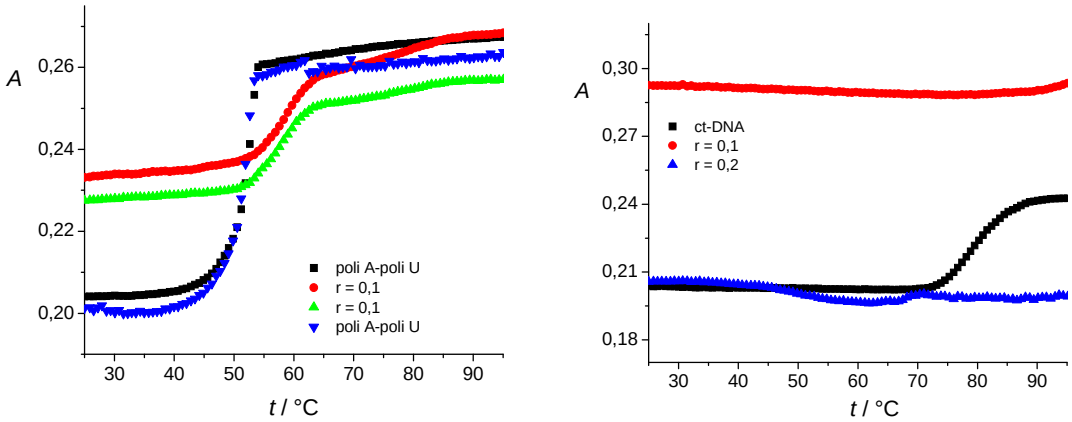
8.1.4. Određivanje temperature mekšanja

8.1.4.1. 6-Cl-TOTO-1



(a) **(b)**

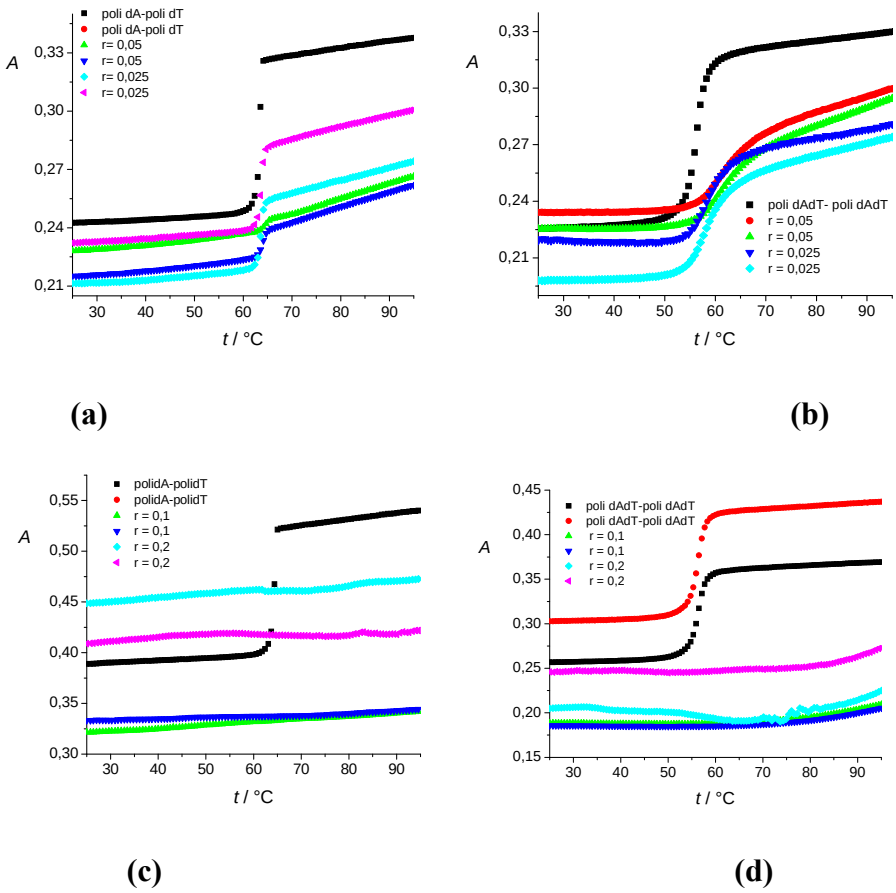
Slika 59: **Krivulje termičke denaturacije poli dAdT-poli dAdT (a) i poli dA-poli dT (b) uslijed dodatka 6-Cl-TOTO-1 pri različitim omjerima $r_{[spoj]/[polinukleotid]}$, kakodilatni pufer, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3}.**



(a) **(b)**

Slika 60: **Krivulje termičke denaturacije poli A-poli U (a), *ct*-DNA (b) uslijed dodatka 6-Cl-TOTO-1 pri različitim omjerima $r_{[spoj]/[polinukleotid]}$, kakodilatni pufer, pH = 7; I = 0,05 mol dm^{-3}.**

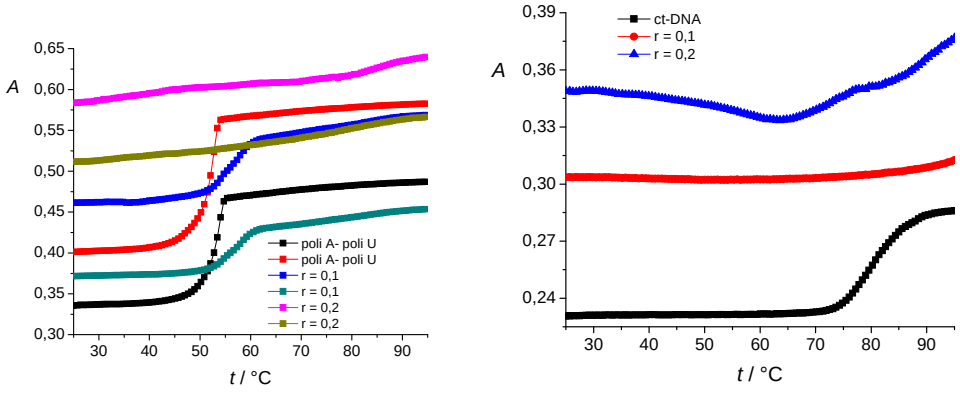
8.1.4.1. 6-Cl-YOYO-1



(a) **(b)**

(c) **(d)**

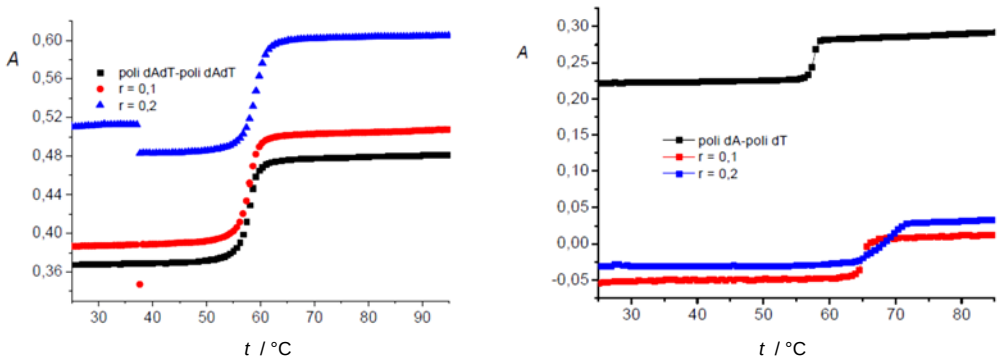
Slika 61: **Krivulje termičke denaturacije poli dA-poli dT (a, c) i poli dAdT-poli dAdT (b,d), uslijed dodatka 6-Cl-YOYO-1 pri različitim omjerima $r_{[spoj]/[polinukleotid]}$, kakodilatni pufer, pH = 7; I = 0,05 mol dm^{-3}.**



(a) **(b)**

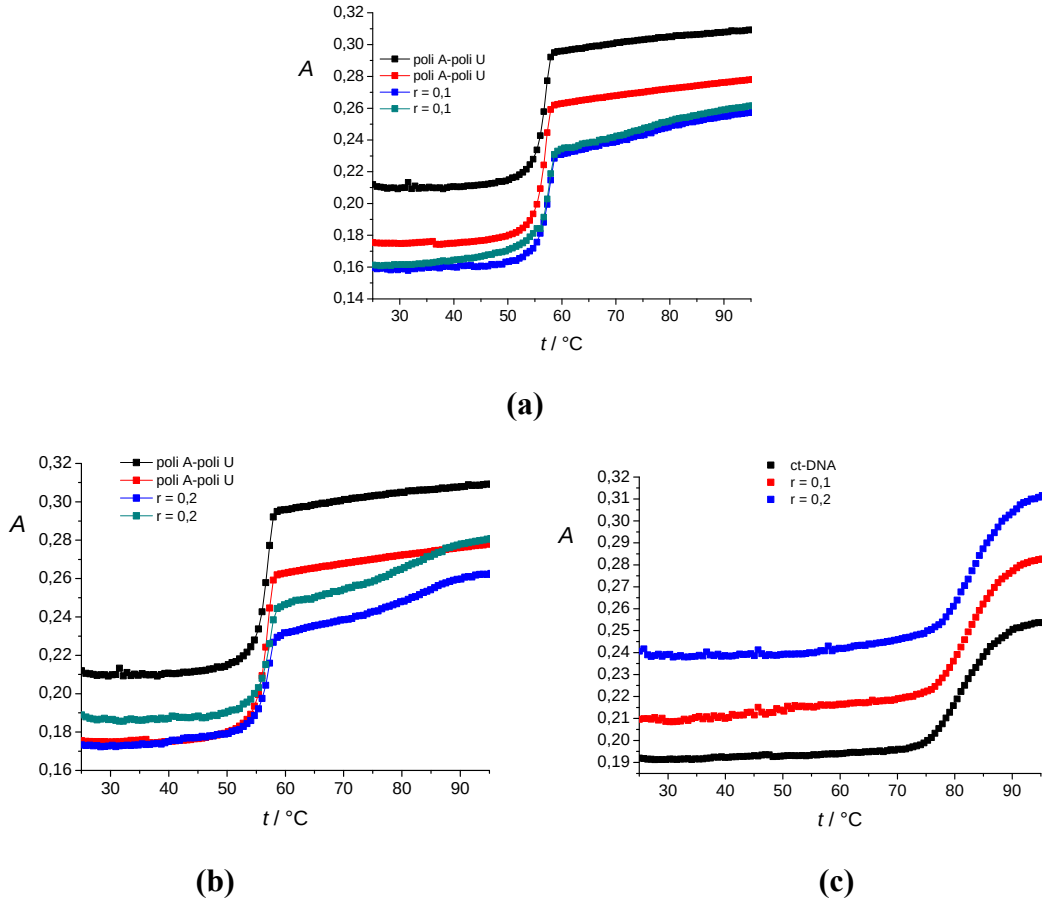
Slika 62: **Krivulje termičke denaturacije poli A-poli U (a), *ct*-DNA (b) uslijed dodatka 6-Cl-YOYO-1 pri različitim omjerima $r_{[spoj]/[polinukleotid]}$, kakodilatni pufer, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3}.**

8.1.4.1. 6-Cl-TO-1



(a) **(b)**

Slika 63: **Krivulje termičke denaturacije poli dAdT-poli dAdT (a) i poli dA-poli dT (b) uslijed dodatka 6-Cl-TO-1 pri različitim omjerima $r_{[spoj]/[polinukleotid]}$, kakodilatni pufer, pH = 7; I = 0,05 mol dm^{-3}.**

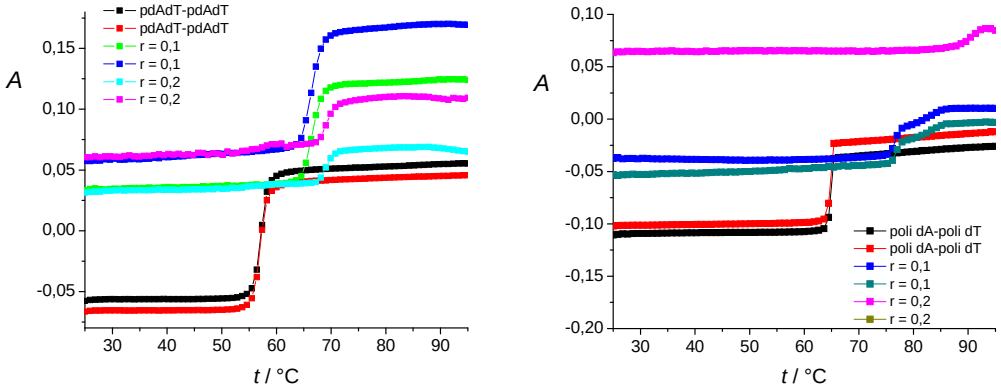


(a)

(b) **(c)**

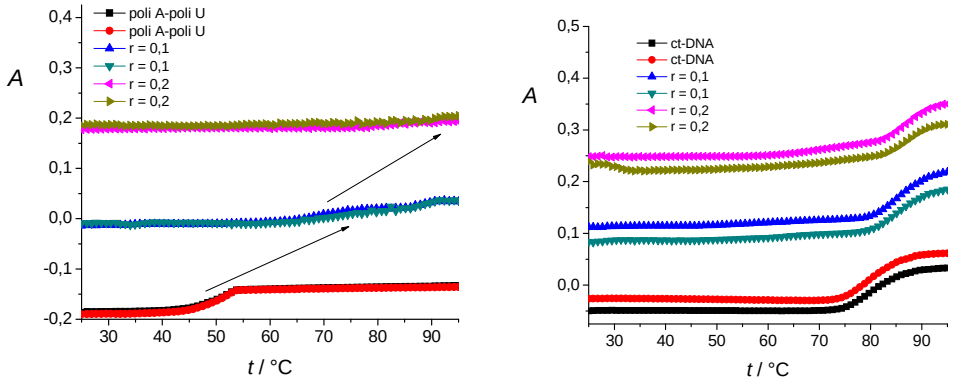
Slika 64: **Krivulje termičke denaturacije poli A-poli U (a,b) te *ct*-DNA (c) uslijed dodatka 6-Cl-TO-1 pri različitim omjerima $r_{[spoj]/[polinukleotid]}$, kakodilatni pufer, pH = 7, I = 0,05 mol dm^{-3}.**

8.1.4.2. 6-Cl-6-Cl-YO-1



(a) **(b)**

Slika 65: **Krivulje termičke denaturacije poli dAdT-poli dAdT (a) i poli dA-poli dT (b) uslijed dodatka 6-Cl-YO-1 pri različitim omjerima $r_{[spoj]/[polinukleotid]}$, kakodilatni pufer, pH = 7; I = 0,05 mol dm^{-3}.**



(a) **(b)**

Slika 66: **Krivulje termičke denaturacije poli A-poli U (a) i *ct*-DNA (b) uslijed dodatka 6-Cl-YO-1 pri različitim omjerima $r_{[spoj]/[polinukleotid]}$, kakodilatni pufer, pH = 7; I = 0,05 mol dm^{-3}.**

§ 9. ŽIVOTOPIS

Andrea Rožman

Osobni podaci

Datum i mjesto rođenja:	04. listopada 1982. u Zagrebu
Državljanstvo:	Republike Hrvatske

Školovanje

Od 2008. -.	Poslijediplomski studij Kemije, Fizikalna kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu
2001. – 2007. g.	Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, studij Kemije

Radno iskustvo

2014. –	Glavni znanstveni suradnik - Voditelj fizikalne karakterizacije PLIVA Hrvatska d.o.o., Istraživanje i razvoj, Pretformulacije
2012. – 2014. g.	Viši istraživač fizikalni kemičar PLIVA Hrvatska d.o.o., Istraživanje i razvoj, Pretformulacije
2007. – 2012. g.	Istraživač fizikalni kemičar PLIVA Hrvatska d.o.o., Istraživanje i razvoj, Pretformulacije

Znanstveni radovi

1. **Rožman, Andrea**; Crnolatac, Ivo; Deligeorgiev, Todor; Piantanida, Ivo, *Journal of luminescence* **205** (2019) 87-96.
2. Lusina Kregar, Maja; Dürrigl, Marjana; **Rožman, Andrea**; Jelčić, Želimir; Cetina-Čižmek, Biserka; Filipović-Grčić, Jelena, *International journal of pharmaceutics* **485** (2015) 202-214.

3. Vrdoljak, Višnja; Đilović, Ivica; Rubčić, Mirta; Kraljević Pavelić, Sandra; Kralj, Marijeta; Matković Čalogović, Dubravka; Piantanida, Ivo; Novak, Predrag; **Rožman, Andrea**; Cindrić, Marina, *European Journal of Medicinal Chemistry* **45** (2010) 38-48.

Sudjelovanje na znanstvenim skupovima

1. Rožman, Andrea; Cetina-Čižmek, Biserka, Selection of dispersant in particle size distribution determination of Sucralfate // *9th Central European Symposium on Pharmaceutical Technology,* Dubrovnik, Hrvatska, 2012 (Znanstveni skupovi i radionice, Poster)

2. Dragić, Tijana; Rožman, Andrea; Krtalić, Iva; Petranović, Mihaela; Dumičić, Aleksandra Aqueous enteric coating for colonic delivery, *4. hrvatski kongres farmacije s međunarodnim Sudjelovanjem* Opatija, Hrvatska, 2010 (Znanstveni skupovi i radionice, Poster)
3. Rožman, Andrea; Bevetek-Moćnik, Anita; Horvat, Michaela Optimization of the freeze-drying process by means of thermal methods of analyses // *First World Conference on Physico-Chemical methods in Drug Discovery and Development* Rovinj, Hrvatska, 2009 (Znanstveni skupovi i radionice, Poster)