

# Spektroskopska karakterizacija dipeptida pirena i cijanina i njihove interakcije s dvolančanim polinukleotidima

---

**Badovinac, Marko**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:918142>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-18**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijски odsjek

Marko Badovinac

SPEKTROSKOPSKA KARAKTERIZACIJA  
DIPEPTIDA PIRENA I CIJANINA I NJIHOVE  
INTERAKCIJE S DVOLANČANIM  
POLINUKLEOTIDIMA

**Diplomski rad**

predložen Kemijском odsjeku  
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu  
radi stjecanja akademskog zvanja  
magistra kemije

Zagreb, 2019.



Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za biomolekularne interakcije i spektroskopiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc. Ive Piantanide, znanstvenog savjetnika i naslovnog profesora, i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Tamare Šmidlehner. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je doc. dr. sc. Gordan Horvat.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom „Višenamjensko očitavanje DNA / RNA sekundarne strukture molekularnim kemijskim senzorima“ (HRZZ-IP-2013-11-1477).



## Zahvale

Veliko hvala dr. sc. Tamari Šmidlehner na ogromnom strpljenju i potrošenom vremenu u svezi izrade diplomskog rada, na znanju kojeg mi je prenijela, na bodrenju te prijateljskom odnosu tokom izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Veliko hvala dr. sc. Ivi Piantanidi na odabiru teme, na susretljivosti, ljubaznosti, strpljenju te velikoj pomoći oko izrade diplomskog rada i svih formalnih stvari vezanih za obranu.

Veliko hvala doc. dr. sc. Gordanu Horvatu na susretljivosti, ljubaznosti, srdačnosti te stručnim savjetima vezanim za izradu diplomskog rada.

Veliko hvala svima u labosu na pomoći kada god je trebalo i na razgovoru.

Veliko hvala Siniši, Antoniu i Ivi na svom vremenu provedenom u druženju.

Veliko hvala roditeljima na tome što su mi uvijek podrška, na razumijevanju i strpljenju.

Veliko hvala Ani, doista najboljoj sestri na svijetu.

Mojoj Jasmini, hvala na podršci i ogromnoj ljubavi.



# Sadržaj

|  |            |
|--|------------|
| <b>SAŽETAK.....</b>  | <b>X</b>   |
| <b>ABSTRACT .....</b>  | <b>XII</b> |
| <b>§ 1. UVOD.....</b>  | <b>14</b>  |
| <b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>  | <b>16</b>  |
| <b>2.1. Nukleinske kiseline.....</b>   | <b>16</b>  |
| 2.1.1. Otkriće DNA.....  | 16         |
| 2.1.2. Građa nukleinskih kiselina.....   | 16         |
| 2.1.3. Struktura i vrste DNA.....  | 19         |
| 2.1.4. Različiti načini vezanja malih molekula na DNA/RNA sustave .....                                      | 23         |
| <b>2.2. Cijaninske boje.....</b>   | <b>24</b>  |
| 2.2.1. Klasifikacija cijaninskih boja.....   | 26         |
| 2.2.2. Spektroskopska svojstva cijaninskih boja .....  | 26         |
| 2.2.3. Cijaninske boje tiazol oranž (TO) i oksazol žuto (YO).....  | 28         |
| <b>2.3. Piren .....</b>  | <b>30</b>  |
| <b>2.4. FRET .....</b>   | <b>31</b>  |
| 2.4.1. Potrebni uvjeti za nastanak FRET-a.....   | 32         |
| 2.4.2. Primjena FRET-a u kvantitativnoj fluorescencijskoj mikroskopiji .....                                 | 34         |
| <b>2.5. Spektroskopske metode vezane uz proučavanje interakcija malih molekula s DNA/RNA sustavima .....</b> | <b>35</b>  |
| 2.5.1. UV/Vis spektrofotometrija.....  | 35         |
| 2.5.2. Molekulska fluorescencijska spektroskopija .....  | 37         |
| 2.5.3. Metoda cirkularnog dikroizma.....   | 40         |
| 2.5.4. Metoda temperaturnog mekšanja.....  | 43         |
| <b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>  | <b>46</b>  |
| <b>3.1. Materijali .....</b>   | <b>46</b>  |
| 3.1.1. Kemikalije .....  | 46         |
| 3.1.2. Instrumenti .....   | 46         |
| 3.1.3. Program za izradu grafova i obradu podataka.....  | 46         |
| <b>3.2. Eksperimentalni postupak .....</b>   | <b>47</b>  |
| 3.2.1. Provedba UV/Vis spektrofotometrije na spojevima <b>1</b> , <b>3a</b> i <b>3b</b> .....                | 47         |
| 3.2.2. Ispitivanje termičke stabilnosti spojeva <b>1</b> , <b>3a</b> i <b>3b</b> .....                       | 48         |
| <b>3.3. Ispitivanje interakcija spojeva s polinukleotidima .....</b>   | <b>49</b>  |



---

|  |             |
|--|-------------|
| 3.3.1. Provedba molekulske fluorescencijske spektroskopije.....  | 49          |
| 3.3.2. Provedba metode cirkularnog dikroizma.....  | 50          |
| 3.3.3. Provedba metode temperaturnog mekšanja.....   | 50          |
| <b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>   | <b>52</b>   |
| <b>4.1. Osnovni parametri strukture spojeva 1, 3a i 3b.....</b>  | <b>52</b>   |
| 4.1.1. Fizikalno-kemijska svojstva spojeva 1, 3a i 3b u puferu natrijeva kakodilata i DMSO .....       | 53          |
| 4.1.2. Intrinzična fluorescencija spojeva 1, 3a i 3b .....   | 58          |
| <b>4.2. Proučavanje interakcija ispitivanih spojeva s dvolančanim polinukleotidima .....</b>           | <b>60</b>   |
| 4.2.1. Fluorimetrijske titracije spojeva 1, 3a i 3b s dvolančanim polinukleotidima.....                | 60          |
| 4.2.2. Temperaturno mekšanje dvolančanih polinukleotida uz dodatak spojeva 1, 3a i 3b.....             | 64          |
| 4.2.3. Titracije u sklopu metode cirkularnog dikroizma .....   | 64          |
| <b>§ 5. ZAKLJUČAK .....</b>  | <b>68</b>   |
| <b>§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....</b>   | <b>70</b>   |
| <b>§ 7. LITERATURNI IZVORI.....</b>  | <b>71</b>   |
| <b>§ 8. DODATAK .....</b>  | <b>XV</b>   |
| 8.1.1. Podaci i spektri vezani uz UV/Vis spektroskopiju i termičku stabilnost spojeva 1, 3a i 3b ..... | xv          |
| 8.1.2. Podaci i spektri vezani uz fluorescencijsku metodu.....   | xvii        |
| 8.1.3. Podaci i grafovi vezane uz metodu temperaturnog mekšanja.....                                   | xxvi        |
| 8.1.4. Podaci i spektri vezani uz metodu cirkularnog dikroizma .....                                   | xxx         |
| <b>§ 9. ŽIVOTOPIS .....</b>  | <b>XXXI</b> |





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

Diplomski rad

## SAŽETAK

### SPEKTROSKOPSKA KARAKTERIZACIJA DIPEPTIDA PIRENA I CIJANINA I NJIHOVE INTERAKCIJE S DVOLANČANIM POLINUKLEOTIDIMA

Marko Badovinac

Pireni i cijanini poznate su fluorescentne probe. Pireni se često koriste za praćenje konformacijskih promjena proteina kovalentno vezanih na njih dok se cijanini, intrinzično nefluorescentni, odlikuju izrazitom fluorescencijom prilikom vezanja na biološke mete kao što su proteini ili nukleinske kiseline. U sklopu ovog diplomskog rada proučavana su dva novosintetizirana i do sad nepoznata izomera dipeptida pirena i cijanina. Prvo su ispitana njihova spektroskopska svojstva, temperaturna stabilnost te uvjeti agregiranja UV/Vis spektroskopijom. Potom su ispitane interakcije dvaju izomera s dvolančanim polinukleotidima različitih slijedova baza i sekundarnih struktura. Obradom fluorimetrijskih titracija dobivene su konstante stabilnosti kompleksa s polinukleotidima te ovisnost intenziteta emisije o sekundarnoj strukturi polinukleotida. Način vezanja spojeva na polinukleotide određen je spektroskopijom cirkularnog dikroizma, dok je utjecaj na stabilizaciju dvolančane uzvojnice određen spektroskopski određivanjem temperature mekšanja kompleksa. Dobiveni rezultati ukazuju na biološki relevantne interakcije novih spojeva s DNA i RNA.

(89 stranica, 75 slika, 9 tablica, 40 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: cirkularni dikroizam, dipeptidi pirena i cijanina, fluorimetrijske titracije, fluorescentne probe, nukleinske kiseline, temperatura mekšanja

Mentor: dr. sc. Ivo Piantanida, znanstveni savjetnik i naslovni profesor

Neposredni voditelj: dr. sc. Tamara Šmidlehner

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): doc. dr. sc. Gordan Horvat

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Gordan Horvat
  2. doc. dr. sc. Morana Dulić
  3. izv. prof. dr. sc. Snežana Miljanić
- Zamjena: prof. dr. sc. Davor Kovačević

Datum diplomskog ispita: 18.9.2019.





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

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### **Spectroscopic characterization of pyrene-cyanine dipeptides and their interactions with double-stranded polynucleotides**

Marko Badovinac

Pyrenes and cyanines are known fluorescent probes. Pyrenes are often used to monitor the conformational changes of proteins by covalently bound to them, whereas cyanines, intrinsically non-fluorescent, are characterized by a pronounced fluorescence emission when bound to biological targets such as proteins or nucleic acids. Two newly synthesized and still unknown isomers of pyrene and cyanine dipeptides were studied as part of this thesis. First, their spectroscopic properties, temperature stability, and aggregation conditions by UV/Vis spectroscopy were examined. The interactions of the two isomers with double-stranded polynucleotides of different base sequences and secondary structures were then examined. Treatment with fluorimetric titrations obtained the stability constants of the complex with polynucleotides and the dependence of the emission intensity on the secondary structure of the polynucleotides. The mode of binding compounds to polynucleotides was determined by spectroscopy of circular dichroism, while the influence on stabilization of the double-stranded helix was determined spectroscopically by determining the melting temperature of the complex. The results obtained indicate the biologically relevant interactions of new compounds with DNA and RNA.

(89 pages, 75 figures, 9 tables, 40 references, original in Croatian)

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

Keywords: circular dichroism, fluorescent probes, fluorimetric titrations, nucleic acids, pyrene-cyanine dipeptides, melting temperature

Mentor: Dr. Ivo Piantanida, Senior Scientist and Professor

Assistant mentor: Dr. Tamara Šmidlehner

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Gordan Horvat, Associate Professor

Reviewers:

1. Dr. Gordan Horvat, Assistant Professor
  2. Dr. Morana Dulić, Assistant Professor
  3. Dr. Snežana Miljanić, Associate Professor
- Substitute: dr. Davor Kovačević, Professor

Date of exam: 18.9.2019.



## § 1. UVOD

Biološki važni procesi u živim stanicama poput replikacije i popravka DNA, transkripcije i translacije uključuju interakcije nukleinskih kiselina s raznim drugim biološkim molekulama.<sup>1</sup> S ciljem boljeg razumjevanja interakcija liganada s DNA/RNA sustavima i proteinima danas se razvijaju sasvim nove tehnike obilježavanja nukleinskih kiselina i proteina uz pomoć fluorescentnih proba nekovalentnim interakcijama.<sup>2</sup>

U ovome radu korišteni dipeptidi pirena i cijanina s DNA/RNA sustavima ostvaruju nekovalentne interakcije i spadaju u grupu fluorescentnih proba.<sup>2</sup> Povezivanjem dva poznata fluorofora, pirena i cijanina, u jednu molekulu na dva različita načina putem poveznice koja sadrži peptidnu vezu (donor i akceptor vodikovih veza) omogućena je interakcija s DNA/RNA sustavima.<sup>2</sup>

Cijaninske i pirenske boje imaju veliki afinitet prema DNA/RNA sustavima ili proteinima (ovisno o naboju cijaninske jezgre ili pirenskog bočnog lanca) pa su zbog toga idealne za spektrofotometrijska istraživanja interakcija s biomakromolekulama. Ipak, pireni i cijanini se značajno razlikuju: pirenska jezgra je potpuno planarna i izrazito hidrofobna te apsorbira svjetlo u bliskom UV dijelu elektromagnetskog spektra i relaksacijom dio energije emitira kao fluorescenciju u plavom dijelu vidljivog spektra (400–500 nm), dok su maksimumi apsorpcije cijanina najčešće u vidljivom dijelu elektromagnetskog spektra.<sup>2,3</sup> Cijaninske boje posjeduju i veoma visoke vrijednosti molarnih apsorpcijskih koeficijenata, što omogućuje njihovu upotrebu pri nižim koncentracijama.<sup>3</sup> U slobodnom stanju cijaninske boje u otopini ne fluoresciraju, ali kada se vežu na DNA/RNA/protein mete emitiraju snažnu fluorescenciju uslijed zakočene rotacije oko jednostruke veze metinske skupine. Osim toga, cijaninske boje pokazuju i sklonost agregiranju u vodenim medijima, pritom tvoreći dvije različite vrste agregata: H i J agregate.<sup>4</sup>

Interakcije između dipeptida pirena i cijanina s raznim vrstama polinukleotida (prirodnih i sintetičkih) su u ovome radu ispitane s ciljem što boljeg prepoznavanja različitih sekundarnih struktura DNA/RNA sustava. Korišteni polinukleotidi se međusobno razlikuju u primarnoj i sekundarnoj strukturi, a njihove interakcije s dipeptidima pirena i cijanina su ispitane uz pomoć raznih spektrofotometrijskih metoda poput: UV/Vis apsorpcijske i fluorescencijske spektroskopije te metode cirkularnog dikroizma. Osim spomenutih metoda, u radu je korištena i metoda temperaturnog mekšanja polinukleotida u kompleksu s dipeptidima pirena i cijanina.



## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Nukleinske kiseline

Predstavnici nukleinskih kiselina su deoksiribonukleinska kiselina i ribonukleinska kiselina. DNA i RNA sudjeluju u pohrani, prijenosu i ekspresiji genetičke informacije. S druge strane DNA sadrži genetičku informaciju za funkcioniranje i razvitak svih živih organizama, a RNA sudjeluje u sintezi proteina i u mnogim drugim životno važnim procesima.<sup>1</sup>

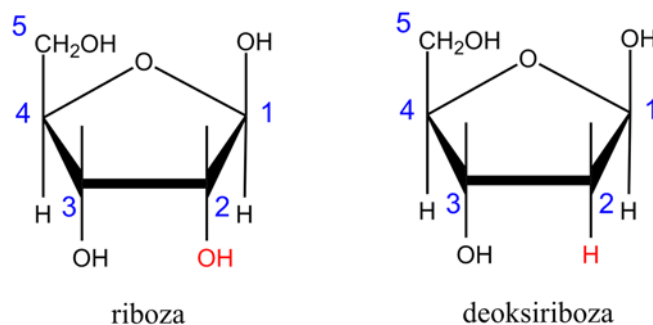
#### 2.1.1. Otkriće DNA

Povijesno gledano, otkriće nukleinskih kiselina pripisuje se švicarskom liječniku i biologu Friedrichu Miescheru koji ih je 1869. godine izolirao iz razgrađenih leukocita (bijelih krvnih stanica). Već deset godina kasnije, 1879. godine, A. Kossel je otkrio sastavne dijelove nukleinskih kiselina i odredio da one ne djeluju niti kao izvor energije u organizmu niti kao sustav za pohranu energije. Zatim je pedesetih godina dvadesetog stoljeća Chargaff sa suradnicima otkrio da su molarni omjeri purinskih i pirimidniskih baza gotovo uvijek jednaki, ali međusobni omjeri svih baza nisu jednaki jedan.<sup>5</sup> Različiti omjeri baza su karakteristični i specifični za pojedinu vrstu organizma. S druge strane, tek 1952. godine je od strane A. Hershey i M. Chase potvrđeno da je DNA uistinu genetski materijal.<sup>5</sup>

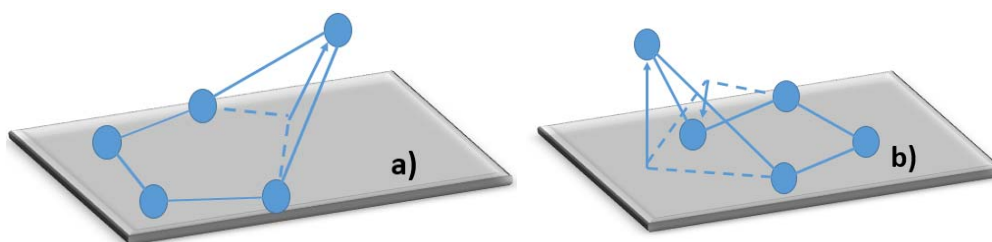
#### 2.1.2. Građa nukleinskih kiselina

DNA i RNA su dugački linearni polimeri i biomakromolekule koje su izgrađene od međusobno povezanih monomernih jedinica zvanih nukleotidi. Svaka monomerna jedinica se sastoji od šećera, fosfata i jedne od četiriju baza. Stoga se DNA i RNA razlikuju prema šećernoj komponenti i prema jednoj od baza.<sup>1</sup> Šećer u deoksiribonukleinskoj kiselini je deoksiriboza. Prefiks deoksi- označuje da na 2'-C atomu nema hidroksilne skupine, koje u sastavu ribonukleinske kiseline točnije njezine šećerne okosnice (riboze) ima (slika 1).<sup>1</sup>

Obje molekule šećera koje grade nukleinske kiseline su derivati furanoze i  $\beta$ -D-stereoizomeri.<sup>6</sup> Oba šećera u prostoru nisu planarna, već postoje u dvije konformacije: „omotnice“ i „stolca“ (slika 2).



Slika 1. Razlika u strukturi šećera riboze i deoksiriboze

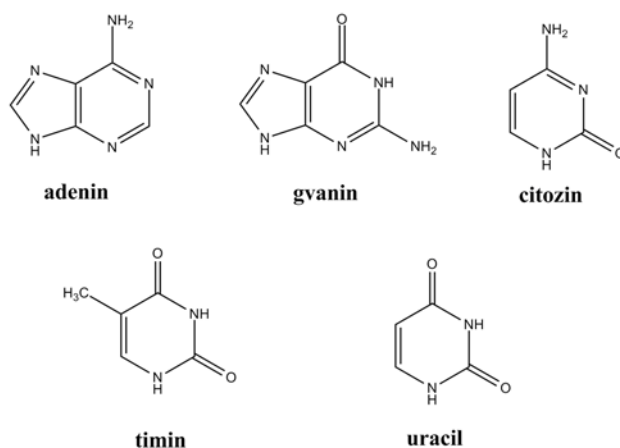


Slika 2. Konformacije šećera: a) „omotnica“ i b) „stolica“

Konformaciju „omotnice“, šećer posjeduje kada se jedan atom nalazi izvan ravnine koju čine preostala četiri atoma, a konformaciju „stolice“ šećer zauzima kada su mu dva susjedna atoma izvan ravnine. Jedan atom je iznad ravnine, a drugi ispod ravnine prstena (slika 2). Najčešće jedan od atoma koji se nalazi izvan ravnine prstena više odstupa od drugoga.<sup>7, 8</sup> Veza između baze i šećera naziva se glikozidna veza. Za purinske baze vezane na šećer glikozidni torzijski kut definiran je s četiri atoma O4'–C1'–N9–C4, a za pirimidinske baze s O4'–C1'–N1–C2.<sup>7</sup> Glikozidni torzijski kut može poprimiti dvije konformacije: *sin* i *anti*. *Anti* konformaciju kod purina čini N1–C2 veza usmjerena nasuprot prstenu šećera, a kod pirimidina C2–N3 veza također usmjerena nasuprot prstenu šećera. S druge strane, kod *sin* konformacije je veza baza usmjerena na istoj strani prstena šećera.<sup>7</sup>

Šećeri su u nukleinskim kiselinama povezani fosfodieterskim mostovima, točnije 3'-OH skupina jednog šećera u nukleotidu je esterificirana fosfatnom skupinom i zatim vezana na 5'-OH skupinu susjednog šećera. Niz međusobno povezanih šećera fosfodieterskim mostovima čini okosnicu nukleinskih kiselina. Svaki fosfodieterski most nosi negativan naboj. Uzrok negativnog naboja leži u prisutvu fosfata.<sup>6</sup>

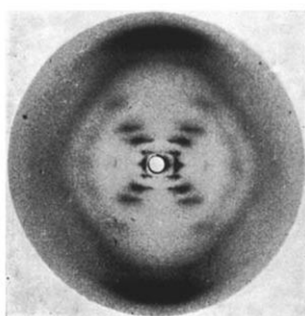
Ovisno o pH vrijednosti medija u kojem se nukleinska kiselina nalazi, ona može biti dvostruko negativno nabijena ( $\text{pH} > 7$ ) ili jednostruko negativno nabijena ( $\text{pH} < 7$ ) s obzirom na fosfate. Prisustvo negativnog naboja odbija nukleofilne reagense, što fosfodietersku vezu čini manje osjetljivom na hidrolizu. Stoga odsutnost 2'-OH skupine na šećeru deoksiribozi u molekuli DNA dodatno povećava njezinu otpornost na hidrolizu (slika 1). Upravo u toj otpornosti na hidrolizu leži razlog da je DNA genetički materijal i prenosioc informacija u svim stanicama u odnosu na RNA.<sup>1</sup> Nukleinske kiseline poput DNA i RNA sadrže i purinske i pirimidinske baze. Purinske i pirimidinske baze su aromatske, planarne i heterocikličke molekule. Predstavnici purinskih baza su adenine i gvanin, a pirimidinskih su timin, citozin i uracil (slika 3). RNA umjesto timina u svojoj strukturi sadrži uracil (nemetilirana forma timina), što je i jedna od razlika u odnosu na DNA.<sup>1</sup>



Slika 3. Struktura purinskih i pirimidinskih baza

2.1.3. *Struktura i vrste DNA*

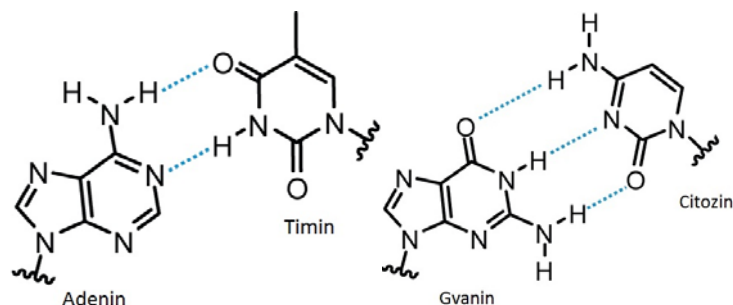
Povijesno gledano, struktura DNA određena je 1952. godine uz pomoć rendgenske difrakcije od strane Rosalind Franklin i Raymond Goslinga (poznata fotografija 51, slika 4). Godinu kasnije su Francis Crick i James Watson predložili ideju da se DNA sastoji od dva polinukleotidna lanca, koja se protežu u suprotnim smjerovima te se omataju oko zajedničke osi i time tvore desnu dvostruku uzvojnica. Predloženi model Watsona i Cricka, poznatiji kao B-DNA-uzvojnica, temelji se na poznatoj fotografiji 51, a za to otkriće su zajedno sa M. H. F. Wilkinsom dobili Nobelovu nagradu iz fiziologije 1962. godine.<sup>1,9</sup>



Slika 4. Fotografija dobivena difrakcijom X-zraka s hidratiziranog vlakna DNA<sup>1</sup>

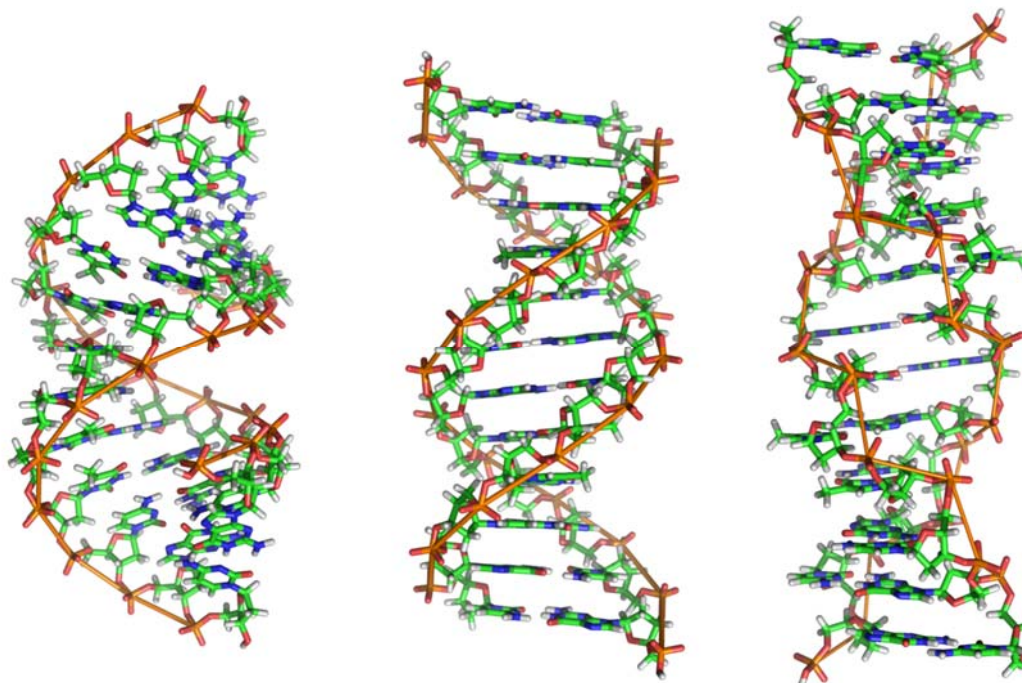
Purinske i pirimidinske baze nalaze se s unutrašnje strane uzvojnice, dok su fosfati i deoksiriboze smješteni s vanjske strane uzvojnice. Adenin se sparuje s timinom preko dvije vodikove veze, a gvanin i citozin s tri vodikove veze (slika 5). U slučaju ribonukleinske kiseline, adenin se sparuje s uracilom dvjema vodikovim vezama.<sup>6</sup>

Prisustvo vodikovih veza između komplementarnih dušičnih baza te aromatskog slaganja baza čini dvostruku uzvojnica DNA stabilnom. Stoga, značajan doprinos u stabilizaciji molekule DNA čini velik broj privlačnih interakcija između vertikalno susjednih parova baza.<sup>1</sup>



Slika 5. Watson-Crickovi parovi baza (plavom isprekidanom linijom prikazana je vodikova veza)

Studije raspršenja rendgenskih zraka na hidratiziranim oblicima DNA pokazale su da se DNA može nalaziti u tri različita oblika. Ti oblici ili forme DNA su redom: A-DNA, B-DNA i Z-DNA (slika 6).<sup>1</sup>



Slika 6. Usporedba struktura A, B i Z-DNA (redosljed s lijeva na desno)<sup>10</sup>

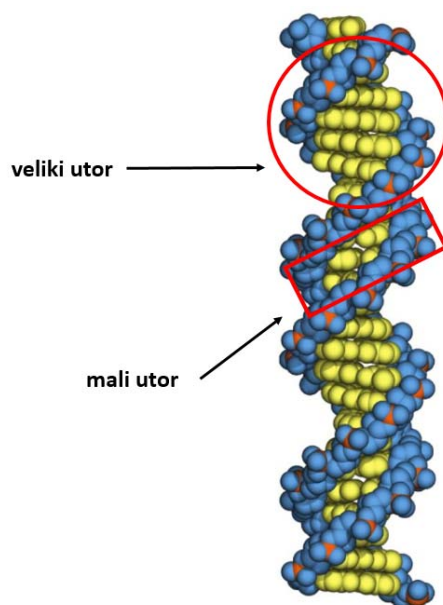
A i B-DNA su obje desne dvolančane uzvojnice koje čine antiparalelni lanci povezani Watson-Crickovim sparivanjem baza. Uzvojnica tipa A šira je i kraća od B-uzvojnice, a njezini su parovi baza nagnuti, a ne okomiti na os uzvojnice (tablica 1). Stanična DNA je općenito u B-obliku, a dvolančane regije RNA i neki hibridi DNA-RNA poprimaju oblike dvostruke uzvojnice slične A-obliku.<sup>1</sup>

Tablica 1. Usporedba strukturnih obilježja A-DNA, B-DNA i Z-DNA<sup>1</sup>

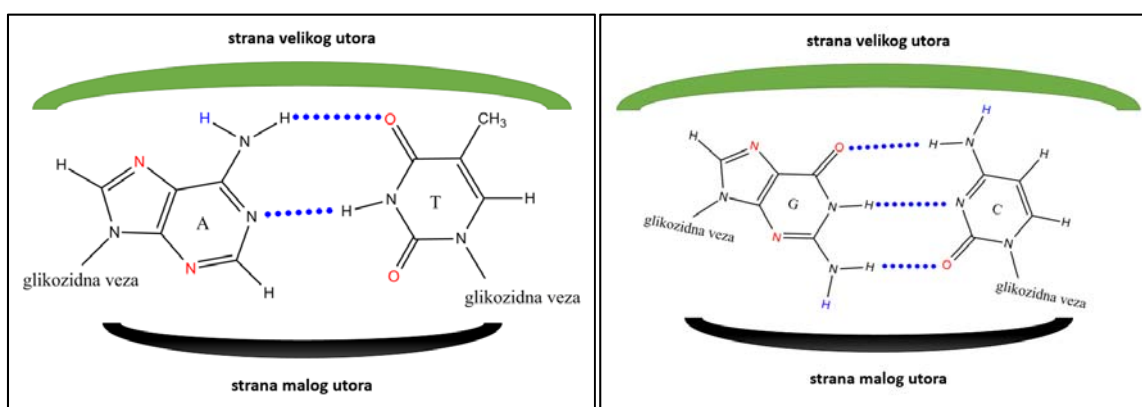
|                               | TIP UZVOJNICE        |                        |                                  |
|-------------------------------|----------------------|------------------------|----------------------------------|
|                               | A                    | B                      | Z                                |
| oblik uzvojnice               | najšira              | srednja                | najuža                           |
| uspon između baznih parova/Å  | 2,3                  | 3,4                    | 3,8                              |
| promjer uzvojnice/Å           | 25,5                 | 23,7                   | 18,4                             |
| smjer navoja                  | desni                | desni                  | lijevi                           |
| broj baznih parova po navoju  | 11                   | 10,4                   | 12                               |
| visina navoja/Å               | 25,3                 | 35,4                   | 45,6                             |
| nagib baznog para prema osi/° | 19                   | 1                      | 9                                |
| glikozidna veza*              | <i>anti</i>          | <i>anti</i>            | izmjena <i>anti</i> i <i>sin</i> |
| karakteristike velikog utora  | uzak i vrlo dubok    | širok i prilično dubok | plošan                           |
| karakteristike malog utora    | veoma širok i plitak | uzak i prilično dubok  | veoma uzak i dubok               |

\**Sin* i *anti* se odnose na orijentaciju N-glikozidne veze između baze i deoksiriboze. U *anti*-orijentaciji baze se odmiču od deoksiriboze, a u *sin* je baza iznad deoksiriboze. Purini mogu biti u obje orijentacije, ali pirimidini mogu biti samo u *anti*-orijentaciji.

Sve dvostruke uzvojnice nukleinskih kiselina, bez obzira na sastav baza, sadrže dvije vrste utora: veliki i mali (slika 7).<sup>6</sup>

Slika 7. Veliki i mali utori DNA u B-formi<sup>6</sup>

Glikozidne veze u jednom baznom paru nisu potpuno nasuprot jedna drugoj, što za posljedicu ima nastanak utora (slika 8). Mali utor sadržava pirimidinski O-2 i purinski N-3 baznog para, a veliki je utor na suprotnoj strani para. Unutar malog utora N-3 adenina ili gvanina te O-2 timina (citozina) služe kao akceptori vodikove veze, a  $-NH_2$  skupina vezana na C-2 gvanina služi kao donor u vodikovoj vezi. S druge strane, u velikom utoru, N-7 gvanina (adenina) te O-4 timina i O-6 gvanina služe kao potencijalni akceptori vodikove veze, a  $-NH_2$  skupina vezana na C-6 adenina i C-4 citozina može poslužiti kao donor vodikove veze (slika 8).<sup>1</sup>



Slika 8. Prikaz strana velikog i malog utora s potencijalnim donorima (plavo) i akceptorima (crveno) vodikove veze (plava točkasta linija)

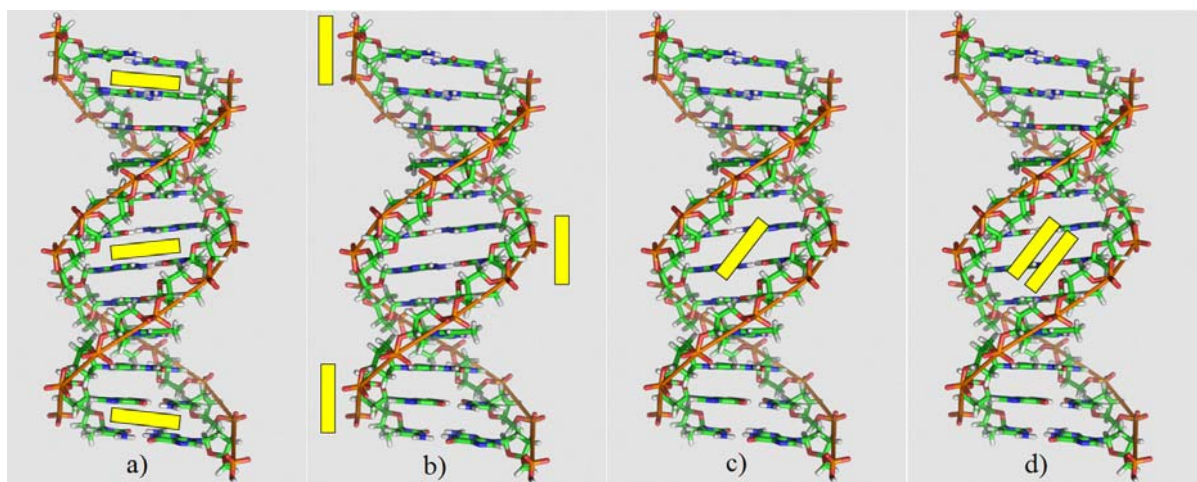
Nukleinske kiseline korištene u ovome radu je DNA iz timusne žlijezde goveda (*calf thymus* DNA, *ctDNA*) te sljedeći sintetski polinukleotidi: poli dGdC - poli dGdC ( $p(dGdC)_2$ ), poli dAdT-poli dAdT ( $p(dAdT)_2$ ) te poliA – poliU ( $pApU$ ). DNA iz timusne žlijezde goveda se sastoji od 41,9 % molarnog udijela GC parova i 58,1 % molarnog udijela AT parova.<sup>11</sup>

Tablica 2. Dimenzije utora kod nukleinskih kiselina korištenih u ovome radu<sup>12</sup>

| Nukleinske<br>kiseline | Širina utora / Å |           | Dubina utora / Å |           |
|------------------------|------------------|-----------|------------------|-----------|
|                        | veliki utor      | mali utor | veliki utor      | mali utor |
| <i>ctDNA</i>           | 11,7             | 5,7       | 8,5              | 7,5       |
| $p(dAdT)_2$            | 11,2             | 6,3       | 8,5              | 7,5       |
| $p(dGdC)_2$            | 13,5             | 9,5       | 10,0             | 7,2       |
| $pApU$                 | 3,8              | 10,9      | 13,5             | 2,8       |

#### 2.1.4. Različiti načini vezanja malih molekula na DNA/RNA sustave

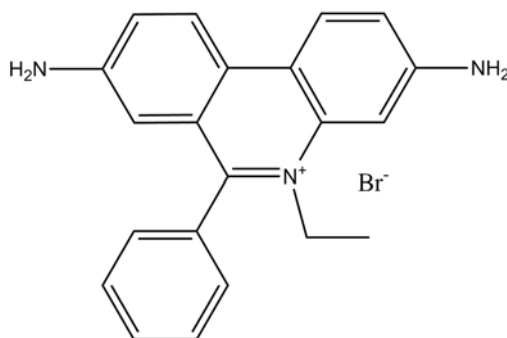
Male organske molekule se mogu povezivati s biološkim makromolekulama u obliku kovalentnih (nepovratne interakcije) i nekovalentnih interakcija (povratne ili ravnotežne interakcije). Najzastupljeniji oblici interakcija su upravo nekovalentne interakcije, poput, interkalacije malih molekula između parova baza DNA i RNA, smještanje cijaninske boje u mali utor DNA ili veliki utor RNA, agregiranje unutar utora (nastanak H-agregata) i elektrostatske interakcije s okosnicom DNA (slika 9).<sup>13</sup>



Slika 9. Različiti načini vezanja cijaninskih boja na sustave DNA/RNA: interkaliranje (a), elektrostatske interakcije (b), vezanje u mali utor (c) i agregiranje u malom utoru (d), žuti pravokutnik je cijaninska boja

Planarni heterociklički dijelovi molekule cijaninskih boja imaju sposobnost smještanja između parova baza u DNA/RNA sustave, pri tome ne ometajući vodikove veze između komplementarnih dušičnih baza. Interkalaciju stabiliziraju  $\pi$ - $\pi$  interakcije između parova baza unutar DNA/RNA sustava i interkalirajućeg agensa. Interkalatori se približavaju mjestu vezanja unutar DNA/RNA sustava kroz utore. Stabilizacija putem  $\pi$ - $\pi$  interakcija onemogućuje novu interkalaciju u susjednom prostoru oko već interkalirane molekule tzv. princip „isključenja susjeda“ (engl. *neighbour exclusion principle*).<sup>11, 12</sup> Interkalirajući agensi produljuju i smanjuju dvostruku uzvojniju molekuli DNA. Klasični interkalatori su molekule koje sadrže nezasićene aromatske prstenove, a najpoznatiji interkalirajući agensi su oni koji se koriste za detekciju dvolančane DNA, a to su etidij-bromid (fenantridinski derivat, slika 10), *GelRed*, *SYBR Safe*, *Nancy-520*.<sup>14</sup>





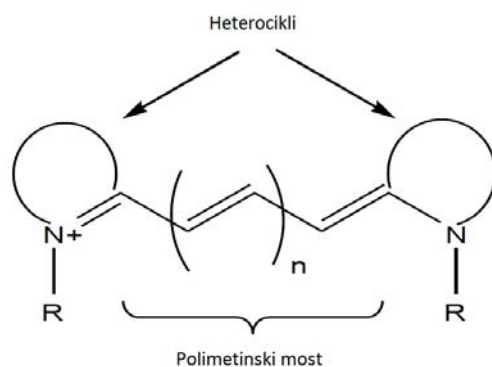
Slika 10. Struktura etidij-bromida

Sposobnost uvijanja fleksibilnog polimetinskog mosta omogućuje vezanje malih organskih molekula u mali utor DNA ili veliki utor RNA. Male organske molekule koje posjeduju konformaciju polumjeseca (engl. *crescent-shape molecules*) se mogu vezati u mali utor DNA.<sup>12</sup> One molekule koje se ugrađuju u mali utor DNA imaju veći afinitet spram ostvarivanja interakcija s AT parovima baza u odnosu na GC parove baza. Ugrađivanjem malih molekula u male ili velike utore dovodi do konformacijskih promjena unutar DNA/RNA sustava.<sup>13</sup> Nastale konformacijske promjene moguće je detektirati uz pomoć CD spektroskopije (engl. *circular dichroism*).<sup>15</sup>

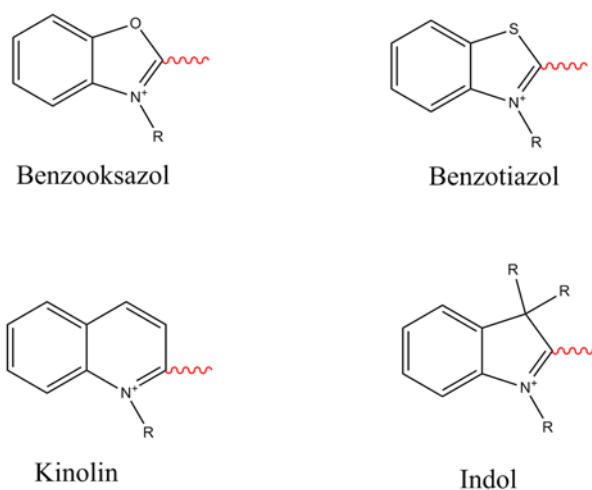
Osim interkalacije i vezanja cijaninskih boja u mali utor DNA moguće su i elektrostatske interakcije s negativno nabijenom fosfatnom okosnicom DNA. U ovome slučaju je cijaninska boja pozitivno nabijena, a elektrostatske interakcije ne mjenjaju strukturu DNA pa stoga nisu specifične.<sup>13</sup>

## 2.2. Cijaninske boje

Cijaninske boje i njezini derivati prvotno su sintetizirani 1856. godine od strane Williamsa. Prvotni spoj ove grupe dobio je ime cijanin (prema plavoj boji spoja) pa od tuda i dolazi ime ove grupe spojeva. Drugi naziv za cijaninske boje je polimetinske boje zbog prisustva međuveznog mosta. Radi se o spojevima koji imaju široku lepezu primjene u različitim nišama industrije pa tako i znanosti. Njihova relativno jednostavna sinteza i bogata paleta boja razlog su njihovog prvotnog korištenja u tekstilnoj industriji te razvoju fotografskih filmova. S druge strane, danas, cijaninske boje i njezini derivati pronalaze svoje mjesto u biotehnologiji, kao fluorescentni markeri biomolekula poput nukleinskih kiselina i proteina. Cijaninske boje pokazuju veliki afinitet vezanja za biomakromolekule.<sup>3, 16, 17</sup>

Slika 11. Prikaz osnovne strukture cijaninskih boja<sup>16</sup>

Strukturno gledano, cijaninske boje sadrže polimetinski most koji odvaja dva N-atoma u različitim podjedinicama molekule. Varijacije u duljini polimetinskog mosta, koji sadrži neparan broj C-atoma, i u raznim oblicima aromatskih sustava (slika 12) koji sadrže N-atome omogućuje širinu i bogatstvo grupe cijaninskih boja.<sup>17</sup>



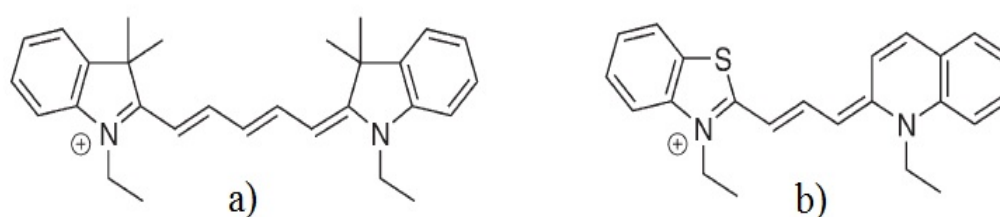
Slika 12. Primjer čestih heterocikličkih grupa u strukturi cijaninskih boja. (R-alkilne grupe, crvena valovita linija-polimetinski most)

### 2.2.1. Klasifikacija cijaninskih boja

Općenita klasifikacija cijaninskih boja se može podijeliti s obzirom na duljinu polimetinskog mosta ili na heterociklički sustav koji se nalazi s obaju strana polimetinskog mosta. Ukoliko polimetinski most sadrži jedan C-atom tada se ta grupa cijaninskih spojeva naziva cijanini. One grupe cijaninskih spojeva koje sadrže 3, 5 i 7 C-atoma u međuveznom mostu nazivaju se redom: karbocijanini, dikarbocijanini i trikarbocijanini.<sup>17</sup>

Alkiliranjem dušikovih atoma u cijaninskim bojama postižu se razna svojstva, a neka od njih su npr.: promjena elektronskih svojstava kromofora, veća topljivost u vodi, smanjena ili povećana agregacija, veća stabilnost spoja i dr.<sup>17</sup>

Druga podjela s obzirom na ono što se nalazi s lijeve i desne strane polimetinskog mosta dijeli cijaninske boje na simetrične i asimetrične (slika 13). Simetrične cijaninske boje sadrže identične heterocikličke sustave s obje strane polimetinskog mosta, a asimetrične sadrže različite heterocikličke sustave ili iste, ali povezane na različitim mjestima u sustavu.<sup>17</sup>

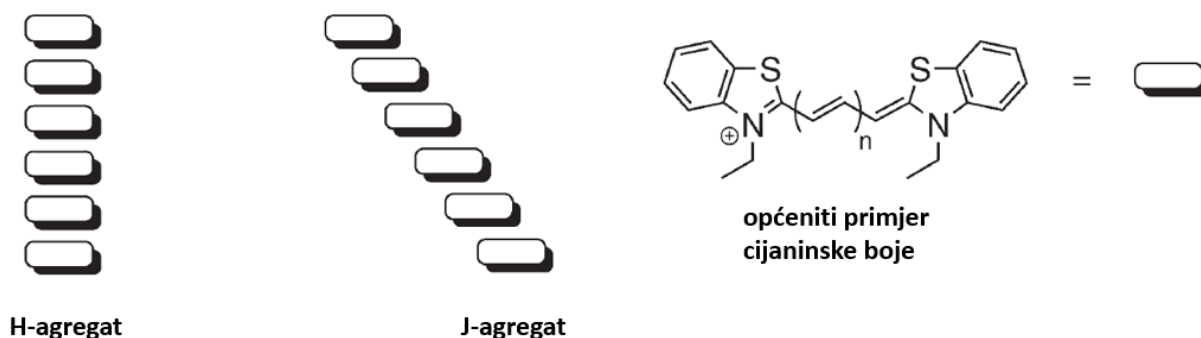


Slika 13. Općeniti primjeri simetričnih (a) i asimetričnih cijaninskih boja (b)<sup>17</sup>

### 2.2.2. Spektroskopska svojstva cijaninskih boja

Cijaninske boje i njezini derivati apsorbiraju svjetlost u području ultraljubičastog, vidljivog i bliskog infracrvenog područja elektromagnetskog spektra (zbog prisustva  $\pi$  elektrona duž polimetinskog mosta), a ekstincijski koeficijenti ovih boja dosežu vrijednosti do  $10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ cm}^{-1}$ .<sup>16</sup> Upravo neparan broj C-atoma odnosno hiperkonjugiranost polimetinskog mosta omogućuje delokalizaciju pozitivnog naboja rezonancijom između dva dušikova atoma. Proširenje polimetinskog mosta za svaku novu podjedinicu uzrokuje spektralni pomak za 100 nm prema većim valnim duljinama. Cijaninske boje u vodenim otopinama ne pokazuju emisiju fluorescenciju. Razlog tome leži u brzom neradijativnom povratku iz pobuđenog stanja u osnovno kroz torzijsko gibanje u polimetinskom mostu.<sup>17</sup>

Pri nižim temperaturama, visokoj ionskoj jakosti otopine i velikim koncentracijama cijaninskih spojeva dolazi do njihovog agregiranja. Pojava agregiranja je uočljiva u UV/Vis spektrima kao dodatna vrpca s jedne ili druge strane vrpce monomera cijanina. Postoje dva tipa agregata cijaninskih boja: H i J agregati (slika 14).<sup>3</sup>



Slika 14. Ilustrativni prikaz H i J tipa agregata cijaninskih boja u vodi<sup>3</sup>

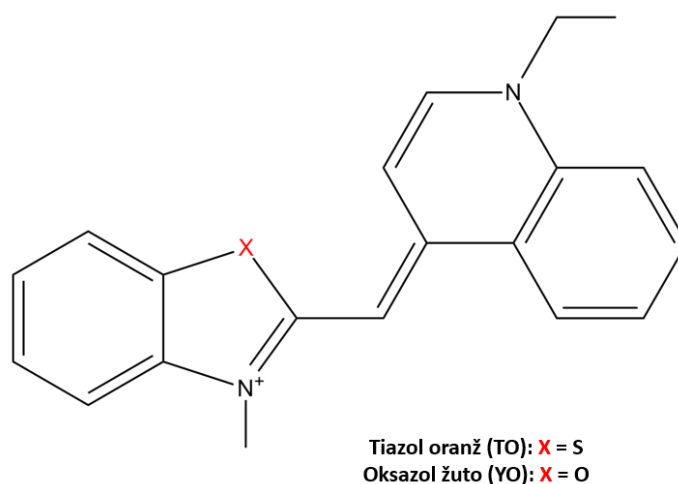
Najstabilnija forma cijaninskih agregata je H-forma, zbog antiparalelnog aranžmana slaganja (slika 14). H-agregati pokazuju hipsokromni pomak ili plavi pomak (engl. *blue shift*) odnosno pomak apsorpcijskih maksimuma prema kraćim valnim duljinama u odnosu na monomernu vrstu. H i J-agregate još očituje i niska emisija fluorescencije te mali Stokesov pomak. S druge strane, J-agregati su manje stabilna forma u odnosu na H-agregate te se rjeđe pojavljuju u domeni cijaninskih boja. U odnosu na H-agregate, J-agregati pokazuju batokromni pomak ili crveni pomak (engl. *red shift*).<sup>18</sup> Radi se o pomaku apsorpcijskih maksimuma prema većim valnim duljinama u odnosu na monomernu vrstu.<sup>3</sup>

U vodenim otopinama su cijaninske boje često nefluorescentne, no vezanjem za nukleinsku kiselinu njihova se emisija fluorescencije višestruko pojačava (čak i do 1000 puta).<sup>16</sup> Nekovalentnim vezanjem cijaninske boje na biološke makromolekule dolazi do ograničavanja mobilnosti polimetinskog mosta što se onda očituje u većoj fluorescenciji. Pozadinska fluorescencija u sustavima cijaninska boja-nukleinska kiselina svedena je na minimum jer slobodne (nevezane) cijaninske boje ne fluoresciraju.<sup>2</sup>

Dva najčešće spominjana nedostatka cijaninskih boja je njihova mogućnost agregiranja, gdje nastali agregati nefluoresciraju, te kratko poluvrijeme fluorescencije. Vezanjem alkil sulfonatnih grupa (-SO<sub>2</sub>-O-R) na postojeću strukturu cijanina moguće je doskočiti ovim nedostacima i time povećati fotokemijsku stabilnost cijaninskih boja.<sup>3, 16</sup>

### 2.2.3. Cijaninske boje tiazol oranž (TO) i oksazol žuto (YO)

Tiazol oranž (TO; engl. *thiazole orange*) i oksazol žuto (YO; engl. *oxazole yellow*) spadaju u asimetrične cijaninske boje. Njihova je struktura bazirana na prisustvu kinolina i heterocikličkih sustava poput benzotiazola i benzoksazola međusobno povezanih putem polimetinskog mosta (slika 15).<sup>17</sup>



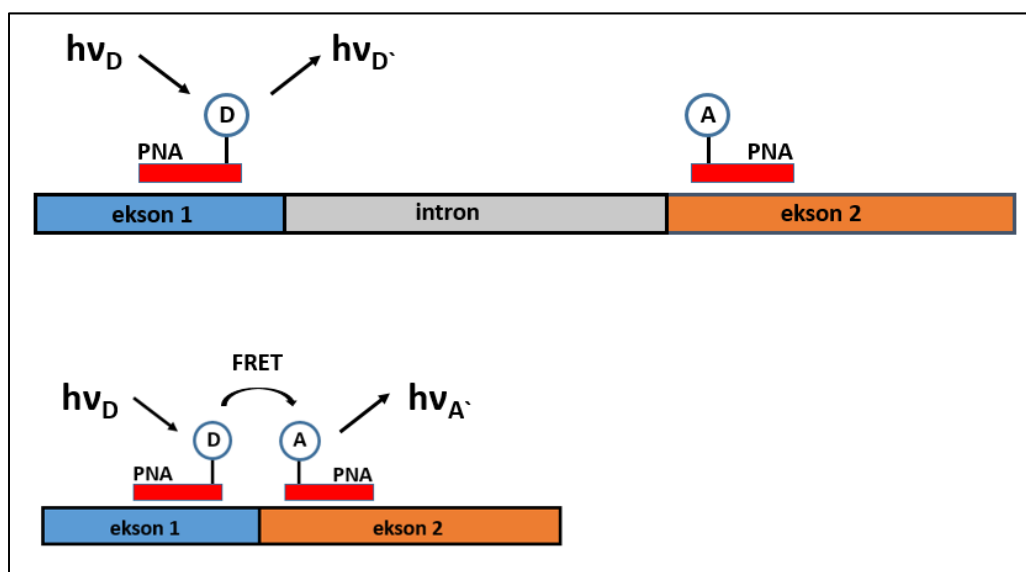
Slika 15. Struktura TO i YO

Asimetrične cijaninske boje poput TO i YO imaju vrlo male vrijednosti kvantnog iskorištenja ukoliko nisu vezane za nukleinske kiseline. Vezanjem za nukleinske kiseline, vrijednosti kvantnog iskorištenja za TO i YO rastu u rasponu za  $10^2$  do  $10^3$  puta.<sup>12</sup>

S obzirom na način vezanja za nukleinske kiseline, TO i YO su interkalatori.<sup>17</sup> Pojedini dikationski analozi TO poput TO-PRO-1 i TO-PRO-3, gdje su dvije molekule TO međusobno premošćene dugom poveznicom, pokazuju svojstvo vezanja u mali utor DNA.<sup>17</sup>

Zbog svojstva interkaliranja i slabe pozadinske fluorescencije u odsutnosti molekule DNA, TO i YO pronalaze primjenu u detekcijskim i probirnim metodama s obzirom na DNA. Mogućnost detekcije neke određene sekvence unutar molekule DNA od velike je važnosti za kliničku dijagnostiku i analizu ekspresije gena.<sup>3, 17</sup> U domeni kliničke dijagnostike, TO i YO su pronašli primjenu u sklopu određivanja stupnja zaraženosti pacijenata s citomegalovirusom ili virusom koji uzrokuje teški akutni respiratorni sindrom, SARS, (engl. *severe acute respiratory syndrome*) putem *LightUp* proba. U ovome slučaju je *LightUp* proba konjugat TO i peptidne nukleinske kiseline, PNA-TO (engl. *peptide nucleic acid - thiazole orange*). PNA su sintetski homolozi nukleinskih kiselina koji umjesto fosfatno-šećerne okosnice sadrže peptidnu okosnicu.<sup>20</sup>

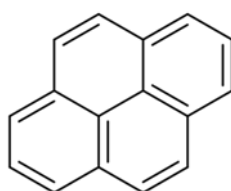
U sklopu analiza genske ekspresije, napravljen je FRET (engl. *Förster resonance energy transfer*) sustav u kojem su PNA probe obilježene fluorescentnim markerima. TO je bio u ulozi FRET donora (D), a boja pod komercijalnim nazivom Alexa u ulozi FRET akceptora (A). Komplementarnom hibridizacijom dviju PNA proba za krajeve eksona koji omeđuju intron praćen je mehanizam izrezivanja introna (engl. *intron splicing*). Uslijed izrezivanja introna dolazi do povezivanja dvaju eksona čime PNA probe dolaze u međusobnu blizinu koja rezultira nastankom FRET-a (slika 16).<sup>17</sup>



Slika 16. Shema hibridizacije PNA proba za regije eksona s ciljem proučavanja procesa prekranja preteče mRNA<sup>17</sup>

### 2.3. Piren

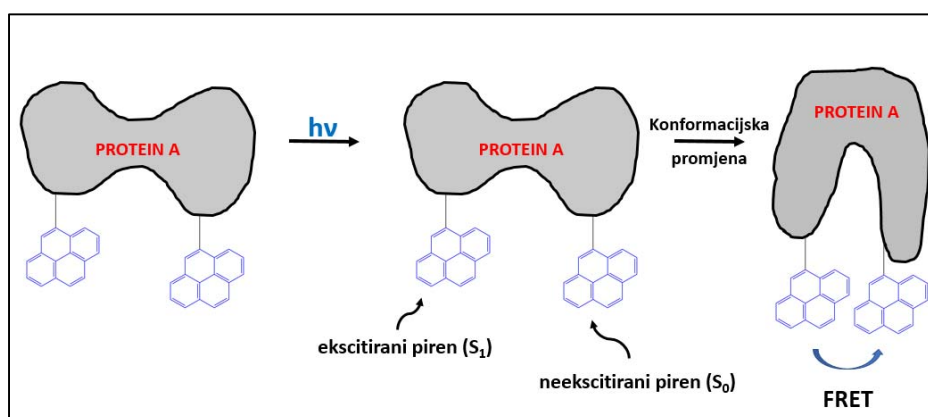
Piren je policiklički aromatski ugljikovodik sastavljen od četiriju međusobno povezanih benzenskih podjedinica (slika 17). Struktura pirena je planarna, a najčešće nastaje u procesu nepotpunog sagorjevanja (u atmosferi s manjkom kisika) ugljikovodika. Komercijalno se piren i njegovi derivati najčešće primjenjuju kao prekursori u proizvodnji boja i novije kao fluorescentne probe.<sup>21</sup>



Slika 17. Struktra pirena

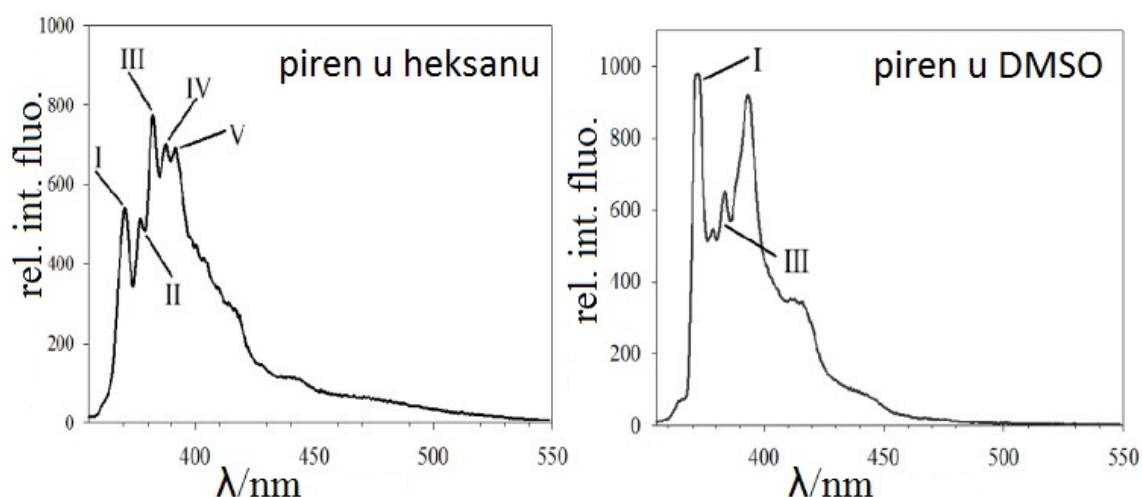
Konformacijske promjene u biološkim makromolekulama mogu se proučavati kovalentnim vezanjem pirena na njih.<sup>21</sup> U mikromolarnim koncentracijama se piren koristi kao fluorescentna proba za proučavanje konformacijskih promjena, odmatanja/smatanja proteina i interakcija u sustavima protein-membrana-nukleinska kiselina.<sup>21</sup>

Kovalentno vezane za određenu biomakromolekulu, molekule pirena služe za proučavanje intramolekulskih interakcija. Uslijed ekscitacije pirena pri otprilike 340 nm dolazi do prijelaza pirena iz osnovnog u prvo pobuđeno singletno stanje ( $S_0 \rightarrow S_1$ ), a zatim dolazi do nastanka ekscimera ukoliko je druga molekula pirena (u  $S_0$  stanju) u blizini pobuđene. Fluorescirajući ekscimer je posljedica intramolekulske interakcije npr. u domeni smatanja proteina (slika 18).<sup>21</sup>



Slika 18. Shematski prikaz nastanka ekscimera pirena uslijed intramolekulske konformacijske promjene u proteinu A<sup>21</sup>

S druge strane, emisijski spektar fluorescencije pirena veoma je osjetljiv na polarnost otapala, što omogućuje pirenu da bude proba za identifikaciju utjecaja otapala u nekom eksperimentu. Posjeduje veliki ekstincijski koeficijent ( $40\,000\text{ mol dm}^{-3}\text{cm}^{-1}$  pri  $344\text{ nm}$ ).<sup>21,22</sup> Monomer pirena u emisijskom spektru fluorescencije ima pet karakterističnih maksimuma apsorpcije (pri  $375$ ,  $379$ ,  $385$ ,  $395$  i  $410\text{ nm}$ ) čiji intenzitet ovisi o polarnosti otapala i o okruženju u kojem se monomer pirena nalazi.<sup>23</sup>



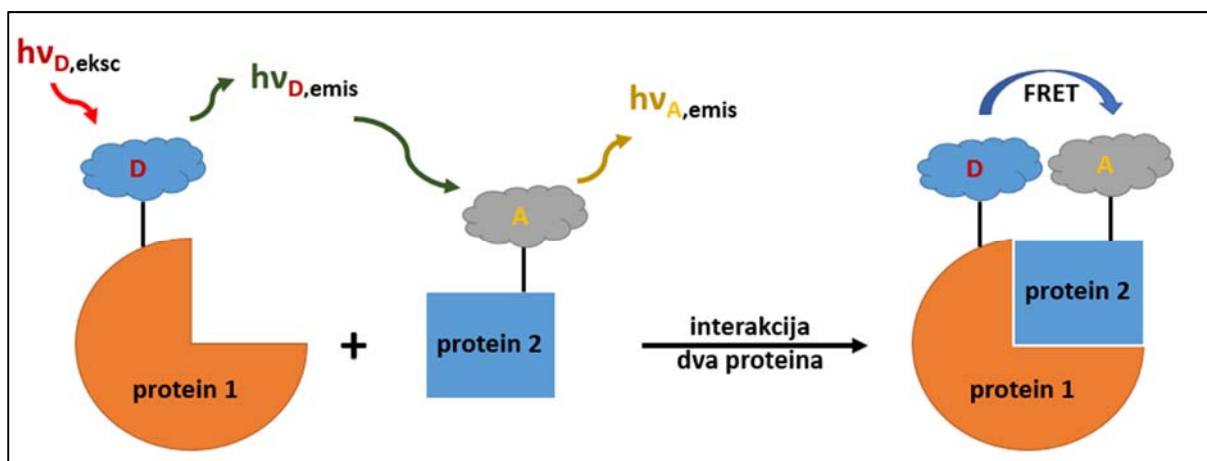
Slika 19. Ovisnost relativnog inteziteta emisije fluorescencije o polarnosti otapala. Emisijski spektar fluorescencije pirena u heksanu i DMSO<sup>12,23</sup>

Sa slike 19. je vidljivo da se pikovi I/III pri valnim duljinama od  $375$  i  $385\text{ nm}$  pojavljuju u oba otapala, a pikovi II, IV i V se pojavljuju samo u heksanu. Piren u vodenim otopinama pri povišenim koncentracijama stvara dimere, koji uzrokuju batokromni pomak u valnim duljinama fluorescencije (od  $425\text{ nm}$  do  $550\text{ nm}$ ).<sup>12</sup>

## 2.4. FRET

Fenomen neradijativnog prijenosa energije odnosno FRET, otkrio je njemački kemičar Theodor Förster 1964. godine.<sup>24</sup> **FRET** ili *Förster Resonance Energy Transfer* je mehanizam kojim se opisuje prijenos energije između dva električna dipola na način da energija ekscitirane molekule prijeđe direktno na molekulu akceptora bez emisije fotona (neradijativnim putem).<sup>25</sup> Akceptorska se molekula time pobuđuje i fluorescira (slika 20). Kako bi mehanizam tekao neometano potrebno je da emisijski spektar donora odgovara ekscitacijskom spektru akceptora. Prijenos energije je moguć kada su donor i akceptor blizu jedan drugome ( $< 100\text{ nm}$ ).<sup>25</sup>





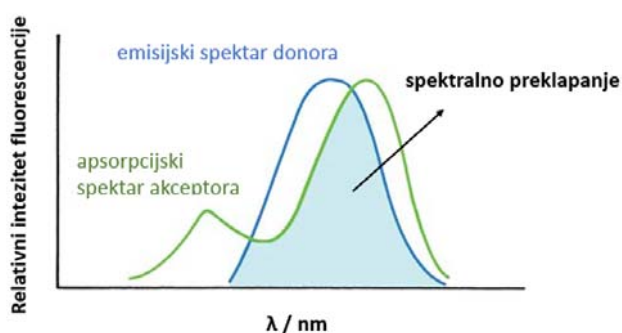
Slika 20. Shematski prikaz interakcije dva proteina koji je prepoznat uz pomoć FRET-a. Protein 1 je konjugiran s donorskom molekulom koja se ekscitira crvenom svjetlošću, a emitira zelenu svjetlost. Ukoliko dođe do interakcije dvaju proteina, akceptorska molekula konjugirana s proteinom 2 se ekscitira zelenom svjetlošću (od strane donorske molekule), a emitira žutu svjetlost te dolazi do pojave FRET-a

FRET je izvrstan mehanizam za praćenje makromolekulskih interakcija. Svoju primjenu pronalazi u praćenju razine unutarstaničnog kalcija.<sup>26</sup> U stanicama, mehanizam FRET-a može odgonetnuti koji proteini međusobno interagiraju (protein-protein interakcije). Između ostaloga, mehanizam FRET-a se može primjenjivati i u *in vitro* i u *in vivo* metodama.<sup>26, 27</sup>

#### 2.4.1. Potrebni uvjeti za nastanak FRET-a

Uvjeti koje je potrebno zadovoljiti kako bi došlo do nastanka FRET-a su:

- a) Spektralno preklapanje<sup>28</sup> – emisijski spektar donora se treba preklapati s apsorpcijskim spektrom akceptora (slika 21). Što je površina preklapanja ( $A_{\text{preklapanja}}$ , engl. *area*) dvaju spektara veća to je i pojava FRET-a izraženija ( $A_{\text{preklapanja}} > 30\%$ ). Odabirom donora u FRET paru s velikom vrijednošću kvantnog iskorištenja ( $QY$ , engl. *quantum yield*) i akceptora s velikom vrijednosti molarnog ekstincijskog koeficijenta ( $\epsilon$ ) povećavamo vjerojatnost pojave FRET-a. S druge strane, kako bi se izbjegla pozadinska fluorescencija (*SBT*, engl. *spectral bleed through*) potrebno je odabrati akceptor u FRET paru koji se neće ekscitirati onom valnom duljinom kojom se ekscitira donor u FRET paru.<sup>28</sup>



Slika 21. Prikaz spektralnog preklapanja za nastanak FRET-a

- b) Orijehtacija dipola<sup>28</sup> - mehanizam FRET-a opisuje prijenos energije između dva električna dipola (između donora i akceptora). Ovisnost kuta između dva dipola koji stupaju u međusobnu interakciju je opisana orijentacijskim faktorom,  $\kappa^2$ . Ovisno o relativnoj orijentaciji donora i akceptora, vrijednost  $\kappa^2$  može varirati između 0 i 4. U većini slučajeva, kada je orijentacija donora i akceptora nasumična, vrijednost  $\kappa^2$  dogovorno iznosi  $2/3$ , a u ostalim se slučajevima orijentacijski faktor izračunava prema sljedećoj formuli:

$$\kappa^2 = [d \times a - 3 \times (d \times r_{da}) \times (a \times r_{da})]^2 \quad (1)$$

gdje su  $d$  i  $a$  dipolni momenti tranzicije donora i akceptora, a  $r_{da}$  predstavlja duljinu vektora koji povezuje ova dva FRET para.<sup>29</sup>

- c) Udaljenost između dva fluorofora<sup>26</sup> - efikasnost FRET-a je obrnuto proporcionalna sa šestom potencijom udaljenosti između dva fluorofora, što je i vidljivo iz Försterove formule (2):

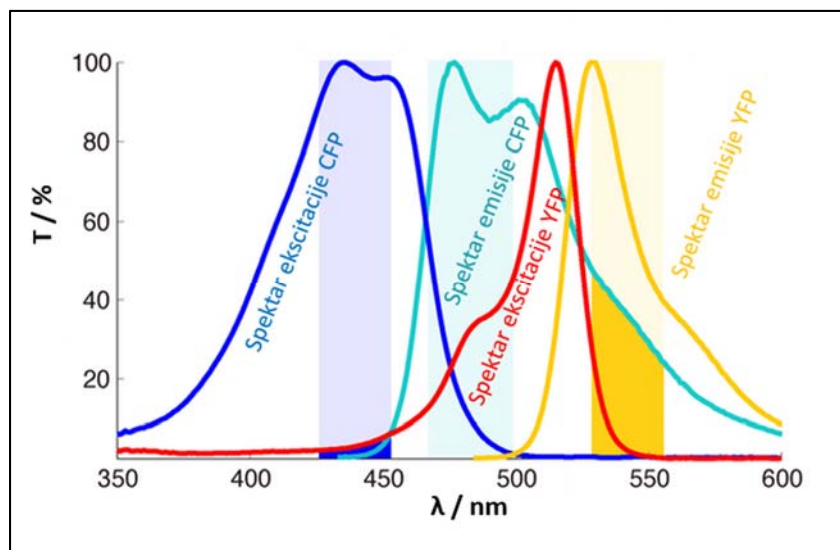
$$E_{fret} = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \quad (2)$$

gdje je  $E_{fret}$  efikasnost FRET-a,  $r$  stvarna udaljenost između dva fluorofora i  $R_0$  Försterov radijus.  $R_0$  predstavlja udaljenost na kojoj je 50 % eksitirane energije preneseno s donora na akceptor. Uobičajene vrijednosti Försterova radijusa su u području od 15 do 60 Å.<sup>26,26</sup>

#### 2.4.2. Primjena FRET-a u kvantitativnoj fluorescencijskoj mikroskopiji

Kvantitativna fluorescencijska mikroskopija je neinvazivna metoda u realnom vremenu (engl. *real time*) kojom se mogu analizirati femtolitarski volumeni uzoraka.<sup>26</sup> Metoda FLIM (engl. *fluorescence lifetime imaging*) se bavi proučavanjem protein-protein interakcija, posttranslacijskih modifikacija poput fosforilacije<sup>1</sup> (dodavanje fosfatne grupe na Ser, Tyr i Thr najčešće u svrhu de/aktivacije pojedinih enzima) i ubikvitinacije<sup>1</sup> (dodavanje jedne ili više podjedinica ubikvitina najčešće u svrhu proteolize) te transporta i difuzije pojedinih staničnih komponenata u živim stanicama.<sup>26</sup> Svoju primjenu između ostaloga pronalazi i u domeni forenzike, ali i u domeni konzervacije umjetničkih dijela<sup>30</sup>. Stoga je metoda FLIM primjenjiva u širokom spektru ljudskih djelatnosti, a spomenute procese prati uz pomoć konfokalnog mikroskopa, gdje se dobivene snimke kasnije obrađuju raznim računalnim tehnikama.

Najčešće korišteni fluorescentni proteini u metodama koje iskorištavaju pojavu FRET-a poput FLIM-a su YFP (engl. *yellow fluorescent protein*) i CFP (engl. *cyan fluorescent protein*) (slika 22). Metoda FLIM-a mjeri trajanje fluorescencije donora na dva različita načina: u frekvencijskoj domeni i u vremenskoj domeni.<sup>28</sup> U frekvencijskoj domeni se uzorak pobudi širokim spektrom frekvencija, a vrijeme trajanja fluorescencije donora moguće je izračunati iz amplitude kašnjenja između procesa emisije i ekscitacije. S druge strane, metoda FLIM-a u vremenskoj domeni mjeri vrijeme potrebno da foton s donora dođe do detektora. S obzirom na različite valne duljine ekscitacije, fotoni se različito bilježe u svrhu nastanka histograma iz kojega se izračunava vrijeme trajanja fluorescencije donora.<sup>28</sup>



Slika 22. Normalizirani spektri emisije i ekscitacije CFP (engl. *cyan fluorescent protein*) i YFP (engl. *yellow fluorescent protein*) uz vidljivo preklapanjem emisijskog spektra CFP i ekscitacijskog spektra YFP s ciljem nastanka FRET-a<sup>31</sup>

## 2.5. Spektroskopske metode vezane uz proučavanje interakcija malih molekula s DNA/RNA sustavima

### 2.5.1. UV/Vis spektrofotometrija

Spektroskopija u ultraljubičastom i vidljivom području elektromagnetskog spektra odnosi se na apsorpcijsku vrstu spektroskopije. Najčešće se radi o kvantitativnoj analizi u kojoj se određuje analiti poput prijelaznih metala (bitno prisustvo d-elektrona), visoko konjugiranih organskih spojeva i bioloških makromolekula poput DNA i RNA (prisustvo purinskih i pirimidinskih baza). Otopala koja se koriste u UV/Vis spektroskopiji ne smiju apsorbirati u valnom području u kojem apsorbira analit. Između ostaloga, otopalo mora moći otopiti dovoljnu količinu analita da bi se dobili dobro definirani maksimumi.<sup>32</sup> Činitelji koji mogu utjecati na konačni izgled spektra analita su polarnost i pH otopala, temperatura pri kojoj se odvija analiza, koncentracija elektrolita u otopini, vrijeme trajanja analize te prisustvo tvari koje interferiraju.<sup>32</sup>

Razlog korištenja UV/Vis spektroskopije leži u njezinoj širokoj primjenjivosti i velikoj osjetljivosti (detekcijska granica u standardnim uvjetima od 1 cm za optički put iznosi do  $10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup>). U UV/Vis području valentni ili vanjski elektroni atoma ili molekula uslijed apsorpcije elektromagnetskog zračenja prelaze iz osnovnog i/ili nižeg u jedno od pobuđenih ili viših elektronskih stanja. U osnovnom stanju molekule, svi elektroni zauzimaju molekulske orbitale najniže energije. Jednom kada barem jedan elektron neke molekule više nije u najnižoj mogućoj orbitali kažemo da je molekula u pobuđenom stanju. Stoga, karakteristične vrpce u UV/Vis spektrima posljedica su elektronskih prijelaza u molekuli ili atomu u njihovo pobuđeno stanje. Kod identifikacije organskih spojeva od interesa je područje valnih duljina od 200-800 nm odnosno energijskih raspona od 150-600 kJ mol<sup>-1</sup>.<sup>32</sup>

Razlikujemo tri “tipa” elektrona:  $\sigma$ ,  $\pi$  i  $n$  elektrone. Postoje četiri moguća prijelaza elektrona u pobuđeno stanje  $\pi\text{-}\pi^*$ ,  $n\text{-}\pi^*$ ,  $\sigma\text{-}\sigma^*$  i  $n\text{-}\sigma^*$ , a energija potrebna za dane prijelaze kreće se u nizu  $\sigma\text{-}\sigma^* > n\text{-}\sigma^* > \pi\text{-}\pi^* > n\text{-}\pi^*$ .<sup>33,32</sup>  $\sigma$ -elektroni su uključeni u zasićene  $\sigma$ -veze i zahtijevaju puno veće energije za pobudu nego što je to energija UV zračenja.  $\pi$ -elektroni su uključeni u nezasićene  $\pi$ -veze i prisutni su u dienima, trienima i aromatskim spojevima.  $n$ -elektroni su nevezni elektroni. Sadrže ih organski spojevi koji sadrže atome s nevezanim elektronskim parovima poput kisika, dušika i predstavnika halogene skupine elemenata. Prijelaz elektrona  $n\text{-}\pi^*$  zahtjeva najmanju energiju i karakterističan je za nezasićene molekule koje sadrže kisikove, dušikove i sumporove atome. S druge strane, prijelazi elektrona  $\pi\text{-}\pi^*$  pokazuju nezasićene molekule. Njihovi su spektri vidljivi u UV/Vis području (200-800 nm) te su karakteristični za konjugirane sustave.<sup>32, 33</sup>

Dijelovi molekule koji apsorbiraju u UV/Vis području nazivaju se kromoforima. Kromofore možemo podijeliti u tri tipa: u konjugirane karbonile, konjugirane poliene i aromatske prstenove. Supstituenti koji se nalaze vezani na osnovne tipove kromofora mogu uzrokovati pomak  $\lambda_{\text{maks}}$  prema duljim ili kraćim valnim duljinama. Batokromni ili crveni pomak je pomak  $\lambda_{\text{maks}}$  prema većim valnim duljinama, a plavi ili hipsokromni je pomak  $\lambda_{\text{maks}}$  prema kraćim valnim duljinama. Heteroatomi poput dušika, kisika i sumpora uzrokuju batokromni pomak pa se još zovu auksokromi.<sup>33</sup>

Instrument koji služi za snimanje UV/Vis spektara naziva se spektrofotometar i mjeri omjer intenziteta zračenja koje prolazi kroz uzorak ( $I_t$ ) i intenzitet upadnog zračenja ( $I_0$ ). Omjer ovih dvaju intenziteta naziva se transmitancija ( $T$ ) i izražava se u postocima. S druge strane, Beer-Lambertov<sup>34</sup> zakon predviđa da je apsorpcija odnosno njen intenzitet direktno proporcionalan množinskoj koncentraciji analita i širini kivete, što je i vidljivo iz formule:

$$A = -\log(T) = \log\left(\frac{I_0}{I_t}\right) = \varepsilon \times c \times l \quad (3)$$

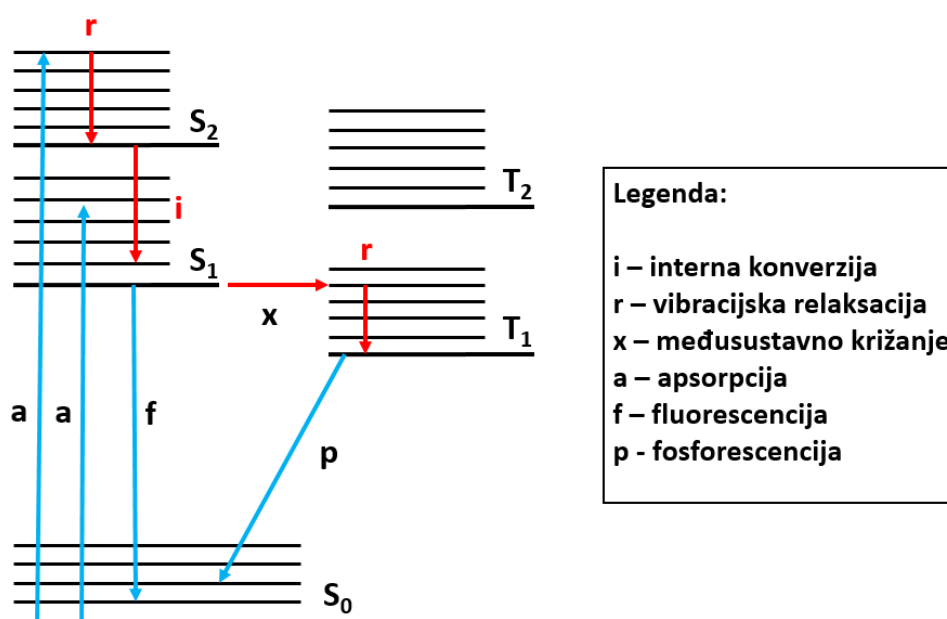
pri tome je  $A$  apsorbcija,  $\varepsilon$  molarni apsorpcijski koeficijent,  $c$  množinska koncentracija uzorka,  $l$  duljina puta zračenja odnosno debljina kivete izražena u centrimetrima. Molarni apsorpcijski koeficijent je mjera i konstanta koja izražava efikasnost prijelaza koji se odvija prilikom pobude apsorpcijom te je karakterističan za sami spoj. Odstupanje od Beer-Lambertova zakona ukazuje najčešće na agregiranje kromofora u otopinama.<sup>32</sup>

### 2.5.2. Molekulska fluorescencijska spektroskopija

Molekulska fluorescencijska spektroskopija je analitička metoda koja promatra pojavu fluorescencije u analitu. Fluorescencijske su metode deset do sto puta osjetljivije od onih metoda koje se temelje na apsorpciji. Najvažniju primjenu fluorometrija pronalazi u analizi prehrambenih proizvoda, kliničkih i farmaceutskih uzoraka te prirodnih produkata.<sup>32</sup> Fluometrijske titracije nam daju informacije o fluorescencijskim promjenama uslijed vezanja ispitivanih spojeva za razne polinukleotide, ali nam ne daju uvid u geometriju vezanja spojeva za polinukleotide.<sup>2</sup>

Fluorescencija je emisijski proces u kojem se atomi ili molekule pobuđuju apsorpcijom snopa elektromagnetskog zračenja. Najčešće se molekule pobuđuju elektromagnetskim zračenjem u području ultraljubičastog ili vidljivog dijela spektra. Pobuđena vrsta se nakon apsorpcije elektromagnetskog zračenja relaksira u osnovno stanje otpuštanjem suviška energije u obliku fotona (većinom u vidljivom dijelu elektromagnetskog spektra). Trajanje fluorescencijske emisije je najčešće u rasponu od  $10^{-5}$  do  $10^{-7}$  sekundi.<sup>25</sup> Stoga, vrijeme života pobuđene vrste veoma je kratko, zbog postojanja nekoliko mehanizama povrata ekscitiranog atoma ili molekule relaksacijom u osnovno stanje.<sup>32</sup> Dva najvažnija mehanizma su: relaksacija bez pojave zračenja i fluorescencijska relaksacija. Nadalje se relaksacija bez pojave zračenja dijeli na vibracijsko deaktiviranje i tako zvanu unutrašnju pretvorbu.<sup>32</sup>

Vibracijska deaktivacija ili kolizijska relaksacija se pojavljuje za vrijeme sudara pobuđenih molekula s molekulama otapala. Trajanje vibracijske relaksacije u kojem se suvišak vibracijske energije prenosi na molekule otapala iznosi oko  $10^{-15}$  sekundi. Relaksacija između najniže vibracijske razine nekog pobuđenog elektronskog stanja i gornje vibracijske razine drugog elektronskog stanja naziva se unutrašnjom pretvorbom. Ovaj način relaksacije puno je manje učinkovit od vibracijske relaksacije. Prosječno vrijeme života elektronskog pobuđenog stanja za unutrašnju pretvorbu iznosi između  $10^{-6}$  i  $10^{-9}$  sekundi. Vibracijska relaksacija i unutrašnja pretvorba su popraćene povišenjem temperature sredine u kojoj se ovi procesi odvijaju.<sup>32</sup>



Slika 23. Dijagram *Jablonskog*; radijativni prijelazi su prikazani plavim strelicama, a neradijativni prijelazi crvenim strelicama<sup>34</sup>

Dijagram *Jablonskog* (slika 23) prikazuje energetske razine singletnih i tripletnih elektronskih stanja.  $S_0$  je osnovno singletno stanje, a  $S_1$ ,  $S_2$  itd. su pobuđena stanja istog multipliciteta,  $T_1$  je najniže tripletno stanje, a  $T_2$  je više tripletno elektronsko stanje. Apsorpcijom elektromagnetskog zračenja molekula redovito prelazi iz osnovnog u neko pobuđeno singletno stanje. Tako pobuđena molekula može izgubiti višak nastale energije radijativnim ili neradijativnim putem.<sup>19, 34</sup>

Ukoliko se molekula emisijom elektromagnetskog zračenja vrati iz prvog pobuđenog singletnog elektronskog stanja u osnovno elektronsko stanje tada se ta pojava naziva fluorescencijom. Pri fluorescenciji ne dolazi do promjene multipliciteta, on ostaje očuvan.<sup>19, 34</sup>

U teoriji sve molekule koje apsorbiraju elektromagnetsko zračenje posjeduju mogućnost fluoresciranja. Međutim, većina ih ne fluorescira. Ukoliko struktura molekule omogućuje relaksaciju bez pojave zračenja, koja je brža od fluorescencijske emisije, ne dolazi do fluorescencije. Molekule koje u svojoj strukturi sadrže aromatske i visoko konjugiran sustave najčešće fluoresciraju. Najjednostavniji heterociklički spojevi poput piridina, tiofena, pirola i furana nemaju svojstvo molekulske fluorescencije, no kada se nađu međusobno povezani u veće heterocikličke sustave s više prstenova tada imaju sposobnost fluoresciranja. Eksperimentalno je nađeno da krutost (rigidnost) molekule i mogućnost supstitucije na aromatskim sustavima utječe na fluorescencijsku djelotvornost.<sup>32</sup>

Krutost odnosno rigidnost molekule i njezina mogućnost povezivanja nekovalentnim interakcijama za biološke makromolekule smanjuje brzinu relaksacije bez pojave zračenja do stupnja u kojem ima dovoljno vremena za relaksaciju fluorescencijom. S druge strane, povišenjem temperature sustava i smanjenjem viskoznosti otapala povećava se frekvencija sudara što pogoduje kolizijskoj relaksaciji. Povećavanjem koncentracije analita koji ima sposobnost emisije fluorescencijom dolazi do pojave samoprigušenja. Pojava u kojoj molekule analita apsorbiraju fluorescenciju koju daju druge molekule istog analita. Pojava samoprigušenja odvija se pri vrlo visokim koncentracijama analita gdje je apsorbancija veća od 0,05.<sup>32</sup>

S druge strane, fluorimetrijske titracije nam daju podatke vezane uz konstante vezanja ( $\log K_s$ ) i vrijednosti kvantnog iskorištenja ( $QY$ , engl. *quantum yield*). Kvantno iskorištenje ili  $QY$  (engl. *Quantum Yield*) je omjer broja molekula koje fluoresciraju i ukupnog broja pobuđenih molekula ili omjer broja emitiranih i apsorbiranih fotona.<sup>25</sup> Osim toga,  $QY$  izražava vjerojatnost da se pobuđeno stanje nekog sustava deaktivira fluorescencijom, a ne neradijativnim putem.<sup>25</sup> Visoko fluorescentne molekule poput rodamina 6G i fluoresceina imaju vrijednosti kvantnog iskorištenja blizu jedinici. Točnije za rodamin 6G (Fluka, Buchs, Švicarska) kvantno iskorištenje iznosi 0,95 u etanolu.<sup>35</sup> One molekule koje ne fluoresciraju imaju vrijednost kvantnog iskorištenja jednaku nuli.



U ovome radu, je kvantno iskorištenje računano prema sljedećoj formuli:

$$QY = QY_{rodamin\ 6G} \times \frac{\eta_{voda}^2}{\eta_{etanol}^2} \times \frac{I}{A} \times \frac{A^{rodamin\ 6G}}{I^{rodamin\ 6G}} \quad (4)$$

gdje je  $QY_{rodamin\ 6G}$  kvantno iskorištenje za rodamin 6G (0,95),  $\eta$  (grčko slovo eta) je indeks loma svjetlosti za vodu (1,335) i etanol (1,360) pri 20 °C,  $I$  je integrirani intezitet emisije fluorescencijom, a  $A$  je vrijednost apsorbancije pri eksitacijskoj valnoj duljini.  $A^{rodamin\ 6G}$  jednaka je vrijednosti od 0,036, a  $I^{rodamin\ 6G}$  jednak je vrijednosti od 1878,843. Vrijednost kvantnog iskorištenja uvelike ovisi o izboru otapala, temperaturi, vrsti i koncentraciji fluorofora te o vrsti detektora.<sup>32</sup> U ovom radu, rodamin je korišten kao standard budući da se njegov emisijski spektar u dovoljnoj mjeri poklapa sa cijaninom.

### 2.5.3. Metoda cirkularnog dikroizma

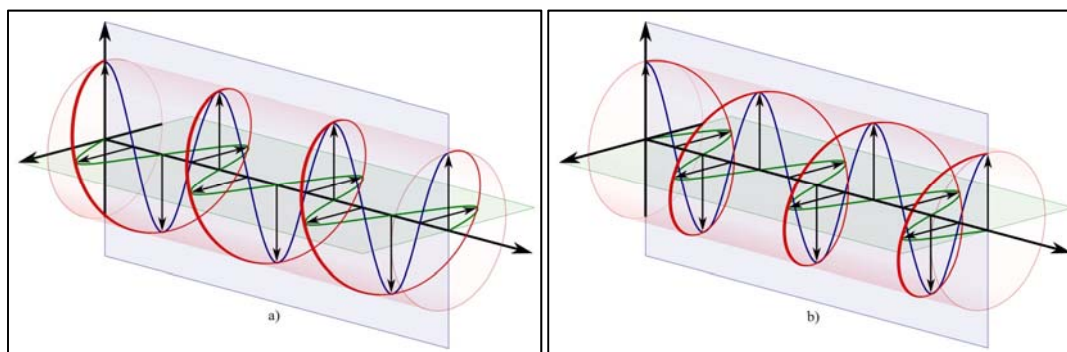
Cirkularni dikroizam je spektroskopska i optička metoda koja se bavi proučavanjem optički aktivnih spojeva i njihovih interakcija s drugim molekulama. Svoju primjenu pronalazi u farmaceutskoj industriji za praćenje razvoja kiralnih lijekova, u medicini rada za praćenje izloženosti stanovništva pojedinim toksičnim tvarima i u određivanju apsolutne konfiguracije kiralnih spojeva. Spektri nastali uz pomoć ove spektroskopske metode otkrivaju nam konfiguracije kiralnih spojeva, sekundarne strukture bioloških makromolekula, poput DNA, RNA i proteina te njihove strukturne promjene uslijed vezanja pojedinih liganada. Valno područje u kojem cirkularni dikroizam dolazi do izražaja je od 200 do 1000 nm. U valnom području između dalekog ultraljubičastog zračenja i bliskog infracrvenog dolazi do elektronskih prijelaza jer u tom području organske molekule najčešće apsorbiraju elektromagnetsko zračenje.<sup>15</sup>

Primjenjivost metode cirkularnog dikroizma zasniva se na optičkoj aktivnosti spoja odnosno njegovoj kiralnosti. Spektar cirkularnog dikroizma nastaje zbog razlike u apsorpciji lijevo i desno polariziranog svjetla u ovisnosti o valnoj duljini. S druge strane, akiralne molekule i racemične smjese nemaju CD-spektre, jer je razlika u apsorpciji između lijevog ( $\varepsilon_L$ ) i desnog cirkularnog svjetla ( $\varepsilon_R$ ) jednaka nuli ( $\Delta\varepsilon = 0$ ).

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R \quad (4)$$

Akiralne molekule uslijed vezanja na kiralnu uzvojnica polinukleotida pokazuju inducirani cirkularni dikroizam, iako same nemaju CD spektar.

Pojedina optički aktivna molekula može apsorbirati više lijevog cirkularnog polariziranog svjetla ili desnog (slika 24). Ukoliko molekula apsorbira više lijevog cirkularnog polariziranog svjetla tada se radi o pozitivnom *Cottonovom* efektu ( $\Delta\varepsilon > 0$ ). Negativni *Cottonov* efekt očituje se u većoj apsorpciji desnog cirkularnog polariziranog svjetla ( $\Delta\varepsilon < 0$ ). Bilo koji kromofor kiralne molekule u teoriji može doživjeti *Cottonov* efekt.<sup>36</sup>



Slika 24. Prikaz cirkularno polariziranog svjetla: a) desno cirkularno polarizirano svjetlo (propagacija u smjeru kazaljke na satu); b) lijevo cirkularno polarizirano svjetlo (propagacija u suprotnom smjeru od kazaljke na satu)

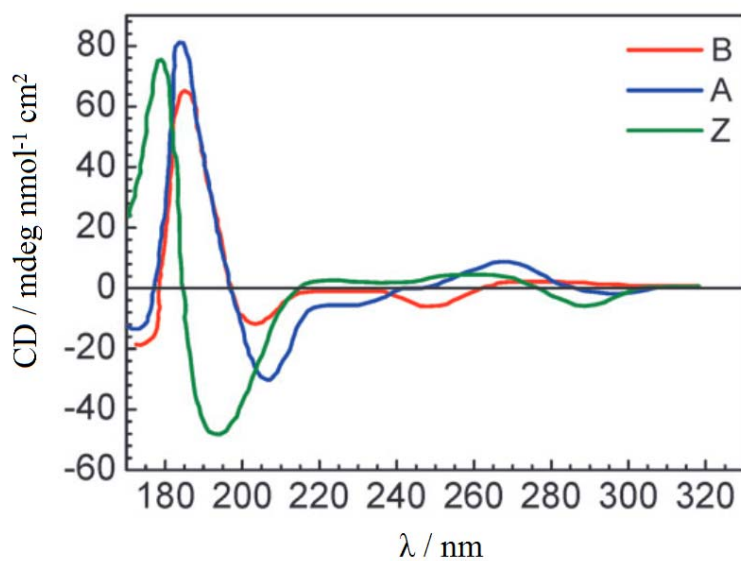
Generalna podjela polarizacijskih metoda<sup>15</sup> odnosi se na dva valna područja u kojima se provodi analiza:

a) Valno područje između 200 i 300 nm odnosi se na praćenje promjena u sekundarnim strukturama bioloških makromolekula, gdje ligand koji stupa u interakciju s makromolekulom ne apsorbira elektromagnetno zračenje. Ukoliko dodatkom liganda dolazi do interakcije (najčešće se promatra interkalacija) s makromolekulom doći će i do smanjenja inteziteta CD spektra u cijelom valnom području od 200 do 300 nm. Smanjenje inteziteta CD spektra u ovome slučaju upućuje na narušenu dvostruku uzvojnici DNA/RNA sustava.

b) Valno područje iznad 300 nm najčešće se koristi za neovisna ispitivanja liganda koji stupa u interakciju s biološkom makromolekulom, pošto u tim uvjetima biološke makromolekule ne apsorbiraju svjetlost. Uslijed vezanja akiralnog liganda u kiralno okruženje biomakromolekula često dolazi do nastanka inducirano CD spektra liganda (engl. *induced circular dichroism*) čija obilježja i intezitet ovise o načinu vezanja liganda za metu, tj. orijentaciji liganda s obzirom na kiralnu os DNA/RNA.

Na primjer, ako je zasićenje ICD odgovora pri omjeru  $r = [\text{ligand}]/[\text{polinukleotid}] = 0,2 - 0,3$  praćeno negativnim induciranim CD spektrom, to ukazuje na interkalaciju liganda (ligand je orijentiran paralelno s duljom osi koja prolazi kroz susjedne parove baza), dok pozitivan inducirani CD spektar ukazuje na vezanje liganda u utor DNA/RNA sustava. Odsutnost induciraniog CD spektra upućuje na heterogenu orijentiranost molekula liganda u odnosu na DNA/RNA kiralnu os, što je najčešće posljedica elektrostatskih interakcija između liganda i okosnice polinukleotida.<sup>15</sup>

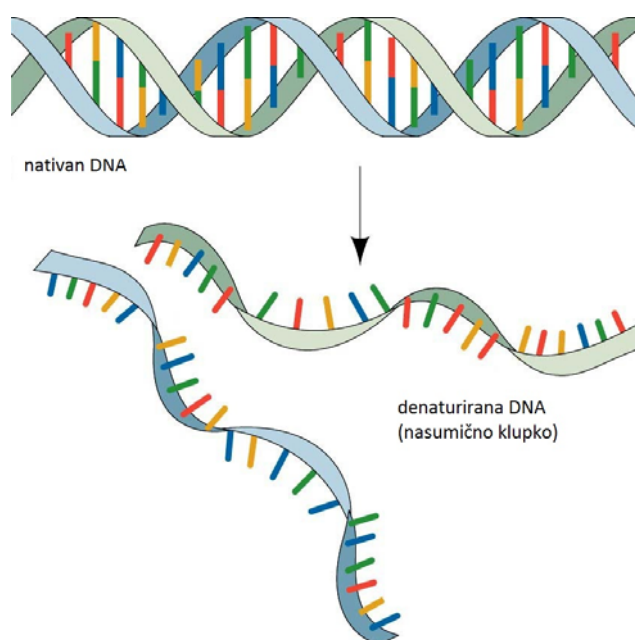
S druge strane, ukoliko je koncentracija liganda daleko veća od koncentracije polinukleotida tada može doći do agregacije liganda u utoru DNA/RNA u obliku dimera, a povećanjem koncentracije liganda može doći i do nastanka *H* i *J* agregata u domeni malog utora DNA. U takvim slučajevima inducirani CD spektar  $> 300$  nm je karakteriziran spregnutim pozitivno-negativnim signalom.<sup>15</sup>



Slika 25. CD spektar A, B i Z-DNA<sup>37</sup>

#### 2.5.4. Metoda temperaturnog mekšanja

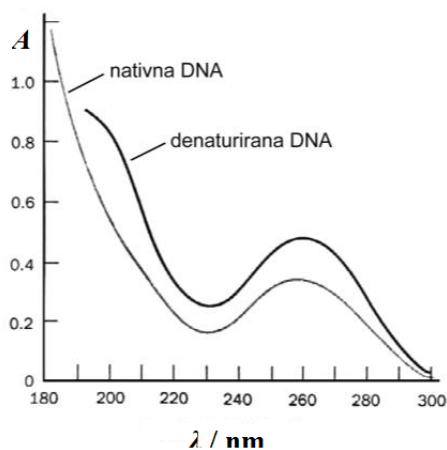
Uređena sekundarna struktura molekule DNA može se narušiti promjenom pojedinih parametara sustava, poput temperature, ionske jakosti, vrijednosti pH i vezanjem pojedinih molekula na DNA. Povišenjem temperature dolazi do kidanja vodikovih veza između Watson-Crick parova baza i posljedično do odvijanja DNA. Proces u kojem dolazi do prethodno spomenutih događaja, naziva se denaturacija. Proces denaturacije je povratan, pa je moguće ponovno uspostaviti nativnu strukturu DNA. Ako se parametri sustava vrate na početne vrijednosti, molekula DNA će se renaturirati. U otopini nakon denaturacije odvojeni lanci poprimaju strukturu nasumičnog klupka (slika 26). Ova promjena je popraćena mjerljivim promjenama fizičkih svojstava otopine. Otopina nativne DNA je viskozna jer se ukočena zavojnica opire deformacijama, no otopina denaturirane DNA manje je viskoznosti, jer su odvojeni lanci puno savitljiviji.<sup>1, 14</sup>



Slika 26. Prikaz denaturacije dvostruke zavojnice DNA<sup>14</sup>

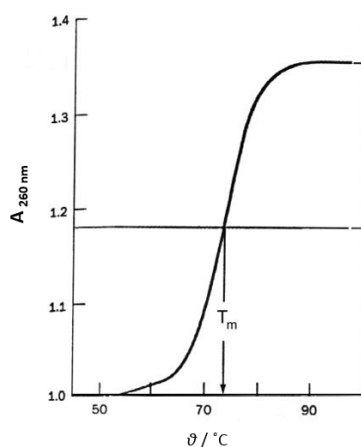
Denaturacijom DNA mijenja se i njena apsorbancija, stoga je mjerenje promjene apsorbancije vrlo pogodan način praćenja procesa denaturacije. Baze apsorbiraju u području ultraljubičastog spektra elektromagnetskog zračenja (pri  $\lambda = 260$  nm). Pojava u kojoj se apsorbancija denaturirane DNA povećava za oko 40 % u odnosu na nedenaturiranu (nativnu) DNA naziva se hiperkromizam (slika 27).<sup>14</sup>

Denaturacija ne utječe na oblik krivulje, već samo ravnomjerno podiže intenzitet apsorpcije na svim valnim duljinama. Do ovog učinka dolazi u uskom rasponu promjene temperature, što ukazuje da je denaturacija kooperativan proces. Razdvajanje jednog dijela zavojnice destabilizira ostale dijelove zavojnice i potiče daljnju denaturaciju. Stoga se denaturacija može opisati kao otapanje jednodimenzijske krutine.<sup>14</sup>



Slika 27. Apsorpcijski spektar native i denaturirane DNA iz bakterije *Escherichiae coli*. Spektar native DNA je sniman na 25 °C, a denaturirane na 82 °C. Apsorbancija je izražena u relativnim jedinicama<sup>14</sup>

Ukoliko mjerimo apsorbanciju pri 260 nm u ovisnosti o temperaturi dobiva se krivulju denaturacije (sigmoidalnog oblika). Karakteristična točka u središnjem dijelu te krivulje naziva se temperaturom mekšanja ili  $T_m$  (vidi sliku 28.).<sup>1, 14</sup> U toj točki je 50 % strukture DNA denaturirano.<sup>6</sup> Temperatura mekšanja je indikator stabilnosti zavojnice i što je njezina vrijednost veća to je zavojnica otpornija na denaturaciju pri povišenim temperaturama.<sup>1</sup>



Slika 28. Krivulja denaturacije DNA. Prikazana je relativna apsorbancija na 260 nm u ovisnosti o temperaturi<sup>14</sup>

Čimbenici koji mogu utjecati na temperature mekšanja su: sastav baza, ionska jakost, pH vrijednost otopine, molekule koje se vežu na DNA i sama priroda proučavane DNA.<sup>14</sup> Homogena DNA (virusna i plazmidna) za razliku od heterogene DNA (genomska DNA) sastoji se od identičnih kratkih molekula DNA i denaturira se u uskom području promjene temperature, dokle se heterogena DNA sastoji od mnoštva različitih fragmenata nastalih nasumičnim kidanjem kromosoma, koji svaki od njih ima svoju vrijednost  $T_m$ . S druge strane, baze poput gvanina i citozina se povezuju pomoću tri vodikove veze, a adenine i citozin se povezuju s dvije vodikove veze, pa one molekule DNA koje imaju veći udio GC parova imaju i veće vrijednosti  $T_m$ . Stoga, one molekule DNA koje sadrže veći broj GC parova se teže denaturiraju. DNA molekule ekstremofila sadrže velik udio GC parova. Ionska jakost povezana je s dielektričnom konstantom otopine. Veća ionska jakost povećava dielektričku konstantu otopine, smanjuje međusobno odbijanje fosforilnih skupina, dakle stabilizira zavojnicu. Pri većim vrijednostima ionske jakosti raste  $T_m$  i sužava se krivulja denaturacije. pH vrijednost otopine utječe na protoniranost ( $\text{pH} < 2,3$ ) i deprotoniranost ( $\text{pH} > 11,5$ ) funkcionalnih skupina na bazama, što posljedično utječe na njihovu potencijalnu ulogu u ostvarivanju vodikovih veza.<sup>14</sup>

Pri velikim vrijednostima pH dolazi do razbijanja vodikovih veza među bazama DNA i do denaturacije. Vezanjem raznih molekula na okosnicu ili unutar molekule DNA također utječe na vrijednost  $T_m$ . Bilo koja molekula koja može stvoriti vodikove veze s funkcionalnim skupinama baza u DNA može doprinijeti denaturaciji zavojnice.<sup>14</sup>

Osim temperature mekšanja  $T_m$ , bitan parametar u karakterizaciji interakcija između male molekule i polinukleotida je razlika ( $\Delta T_m$ ) u temperaturi mekšanja slobodnog polinukleotida i temperaturi mekšanja nastalog kompleksa (polinukleotid + mala molekula).  $\Delta T_m$  može imati pozitivne, negativne i vrijednosti bliske nuli. Ukoliko su vrijednosti  $\Delta T_m \gg 0$  tada vezanje male molekule za polinukleotid (bilo unutar malog utora ili interkaliranjem) dovodi do stabilizacije dvolančane uzvojnice polinukleotida. S druge strane, negativne vrijednosti  $\Delta T_m \ll 0$  upućuju na destabilizaciju dvolančane uzvojnice polinukleotida uslijed vezanja male molekule, a vrijednosti  $\Delta T_m \approx 0$  upućuju na to da nije došlo do nikakvih značajnijih konformacijskih promjena polinukleotida vezanjem malih molekula.<sup>38</sup>

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Kemikalije

- Spojevi: oznake spojeva su **1**, **3a** i **3b**

**1** (5-bromo-3-metil-2-[(1-metil-1,4-dihidrokinolin-4-iliden)metil]-1,3-benzotiazol-3-ij jodid)<sup>12</sup>

**3a** (5-bromo-3-[4-(4-{3-metoksi-3-okso-2-[4-(piren-1-il)butanamido]propil}-1H-1,2,3-triazol-1-il)butil]-2-[(1-metil-1,4-dihidrokinolin-4-iliden)metil]-1,3-benzotiazol-3-ij jodid)<sup>12</sup>

**3b** (5-bromo-2-({1-[4-(4-{3-metoksi-3-okso-2-[4-(piren-1-il)butanamido]propil}-1H-1,2,3-triazol-1-il)butil]-1,4-dihidrokinolin-4-iliden}metil)-3-metil-1,3-benzotiazol-3-ij jodid)<sup>12</sup>

- DNA iz timusne žlijezde goveda (*calf thymus* DNA, *ctDNA*), p. a., Sigma Aldrich, SAD
- Natrijev kakodilatni pufer (pH = 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ); natrijev kakodilat, p. a., Sigma Aldrich, SAD
- DMSO, dimetil sulfoksid, p.a., Alfa, Njemačka
- poli dGdC – poli dGdC (p(dGdC)<sub>2</sub>), p. a., Sigma Aldrich, SAD
- poli dAdT – poli dAdT (p(dAdT)<sub>2</sub>), p. a., Sigma Aldrich, SAD
- poliA – poliU (pApU), p. a., Sigma Aldrich, SAD

#### 3.1.2. Instrumenti

- UV/Vis spektrometar Varian Cary 100 Bio (Agilent Technologies, SAD)
- fluorimetar Varian Cary Eclipse (Agilent Technologies, SAD)
- UV/Vis spektrofotometar NanoDrop Thermo Scientific Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- JASCO J-815 CD spektrometar

#### 3.1.3. Program za izradu grafova i obradu podataka

- Origin

### 3.2. Eksperimentalni postupak

Sva mjerenja su provedena u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ). Svi pripravci DNA i RNA otopljeni su u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ), a njihove koncentracije su određene spektroskopski na NanoDrop uređaju uz pomoć molarnih apsorpcijski koeficijenata dobivenih od strane proizvođača (tablica 3). Ishodne otopine DNA i RNA pohranjene su pri temperaturi od  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ , te su u takvim uvjetima bile stabilne više mjeseci. Za svaki daljnji pokus, alikvoti ishodnih otopina DNA i RNA su dodani u vodene otopine tokom mjerenja.

Tablica 3. Molarni apsorpcijski koeficijenti za različite vrste polinukleotida pri maksimalnim valnim duljinama apsorpcije

| Polinukleotidi       | $\varepsilon / \text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ |
|----------------------|--|
| ctDNA                | 6600 ( $\lambda_{\text{maks}} = 260 \text{ nm}$ )            |
| p(dAdT) <sub>2</sub> | 6600 ( $\lambda_{\text{maks}} = 262 \text{ nm}$ )            |
| p(dGdC) <sub>2</sub> | 8400 ( $\lambda_{\text{maks}} = 254 \text{ nm}$ )            |
| pApU                 | 6000 ( $\lambda_{\text{maks}} = 260 \text{ nm}$ )            |

S druge strane, ispitivani spojevi (**1**, **3a** i **3b**) pripremljeni su i u potpunosti strukturno okarakterizirani ranije od strane dr. sc. Tamare Šmidlehner u sklopu projekta HRZZ-IP-2013-11-1477. Ishodne otopine ispitivanih spojeva (**1**, **3a** i **3b**) pripravljene su otapanjem spojeva u DMSO ( $c(\text{spoja}) = 1 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ) te su pohranjene za daljnju analizu u hladnjaku pri temperaturi od  $+8 \text{ }^\circ\text{C}$ . Ishodne otopine ispitivanih spojeva su u hladnjaku bile stabilne više mjeseci. Za svaki daljnji pokus, alikvoti ishodnih otopina ispitivanih spojeva su dodani u vodene otopine tokom mjerenja.

#### 3.2.1. Provedba UV/Vis spektrofotometrije na spojevima **1**, **3a** i **3b**

Alikvoti ishodnih otopina spojeva (**1**, **3a** i **3b**) prethodno otopljenih u DMSO su dodavani u pufer natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) radi provjere Beer-Lambertova zakona i izradu baždarnih pravaca s ciljem izračunavanja ekstincijskih koeficijenata svakog spoja pri određenom apsorpcijskom maksimumu. UV/Vis spektri spojeva u kompleksu s nukleinskim kiselinama nisu snimani zbog tehničkih ograničenja instrumenta i kromofora spojeva. Za snimanje UV/Vis spektara koristili smo UV/Vis spektrometar Varian Cary 100 Bio (dvoznačni instrument) i kvarcne kivete s duljinom optičkog puta od 1 cm.



UV/Vis spektri ispitivanih spojeva su snimani u području valnih duljina od 200 do 650 nm pri sobnoj temperaturi na način da je svakome spektru spoja automatski oduzeta prethodno snimljena bazna linija pufera natrijeva kakodilata i/ili DMSO. Koncentracijsko područje ispitivanih spojeva je kod snimanja UV/Vis spektara u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) iznosilo od  $0,2 \times 10^{-6}$  do  $2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ , a u DMSO od  $1 \times 10^{-6}$  do  $5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ . Osim toga, snimljeni su i UV/Vis spektri svakog spoja ( $c(\text{spoj}) = 2 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u puferu natrijeva kakodilata s različitim volumnim udjelom DMSO (u rasponu od 0 do 100 % s koracima od 25%).

### 3.2.2. Ispitivanje termičke stabilnosti spojeva **1**, **3a** i **3b**

Vodene otopine ispitivanih spojeva su podvrgnute istom režimu zagrijavanja do  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  na način da je temperatura zagrijavanja postupno rasla. Kod svakog povišenja temperature snimljen je UV/Vis spektar spoja. Snimanje je započelo pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , i završilo hlađenjem na istu temperaturu. Za snimanje UV/Vis spektara korišten je UV/Vis spektrometar Varian Cary 100 Bio (dvoznačni instrument) i kvarcne kivete s duljinom optičkog puta od 1 cm u valnom području od 200 do 650 nm na način da je svakome spektru spoja automatski oduzeta prethodno snimljena bazna linija pufera natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri različitim temperaturama. Spojevima **1**, **3a** i **3b** su snimljeni UV/Vis spektri termičke stabilnosti pri redom navedenim koncentracijama:  $4,5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  (**1**),  $2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  (**3a**) i  $1,8 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  (**3b**). Svi spojevi su nakon ispitivanja termičke stabilnosti još jednom podvrgnuti analizi, ali u ovome slučaju s vremenskom odgodom. Spojevi **1** i **3a** su podvrgnuti ponovnoj analizi pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  nakon 72 h, a spoj **3b** nakon 24 h. Kod obiju odgoda, prije samog ispitivanja, spojevi su bili pri sobnoj temperature.

### 3.3. Ispitivanje interakcija spojeva s polinukleotidima

#### 3.3.1. Provedba molekulske fluorescencijske spektroskopije

Fluometrijske titracije su provedene pomoću fluorimetra Agilent Cary Eclipse pri sobnoj temperaturi u puferu natrijeva kakodilata (pH = 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ). Titracije su provedene u kvarcnim kivetama čija je duljina optičkog puta iznosila 1 cm. Valne duljine ekscitacije su kod svih analiza bile iznad 300 nm kako bi se izbjegla apsorpcija ulaznog zračenja od strane dodanih DNA/RNA, a spektri fluorescencijske emisije su sakupljeni u području valnih duljina od 300 do 650 nm. Mjerna koncentracija spojeva (**1**, **3a** i **3b**) iznosila je  $5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ . Uslijed miješanja zadanog alikvota polinukleotida s mjernom otopinom spoja, ravnoteža nastalog kompleksa je postignuta u 120 s (na temelju emisijskih spektara nastalih uslijed titracije spojeva s polinukleotidima). Sve su fluometrijske titracije provedene s većim udjelom polinukleotida naspram spoja. Sakupljeno je dvadesetak točaka titracije, do omjera  $r = [\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]$  kod kojeg više ne dolazi do značajnijeg povećanja fluorescencije s novim dodatkom polinukleotida. Konstante stabilnosti ( $K_s$ ) kompleksa ispitivanog spoja (**1**, **3a** i **3b**) s DNA/RNA i omjer  $n$  ( $[\text{vezani spoj}]/[\text{polinukleotid}]$ ) dobiveni su uz pomoć programa Origin uz korištenje Scathardove<sup>39, 40</sup> jednadžbe izvedena iz Langmuirove izoterme (formule 5 i 6) i metode nelinearne regresije. Sve su vrijednosti  $K_s$  izračunate pri fiksnom omjeru  $n = 0,1$  uz koeficijent korelacije iznad 0,99.

Scathardova jednadžba za intezitet fluorescencije u slučaju spektrofotometrijski aktivnog kompleksa može se prikazati izrazom:

$$I = I_0 + \left[ \frac{(I_{lim} - I_0)}{2 \times c} \times \left( c + n \times c_{poli} + \frac{1}{K_s} - \sqrt{\left( c + n \times c_{poli} + \frac{1}{K_s} \right)^2 - 4 \times c \times n \times c_s} \right) \right] \quad (5)$$

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

$$I = I_0 - \left[ \frac{I_0}{2 \times c} \times \left( c + n \times c_{poli} + \frac{1}{K_s} - \sqrt{\left( c + n \times c_{poli} + \frac{1}{K_s} \right)^2 - 4 \times c \times n \times c_s} \right) \right] \quad (6)$$

gdje je  $c$  koncentracija ispitivanog spoja u otopini,  $c_{poli}$  koncentracija polinukleotida,  $n$  omjer koncentracije vezanog spoja i polinukleotida ili recipročna vrijednost broja nukleotida koji tvore vezno mjesto ( $[\text{vezani spoj}]/[\text{polinukleotid}]$ ),  $I_0$  spektrofotometrijski odgovor čistog spoja,  $I$  spektrofotometrijski odgovor nakon dodatka određene količine supstrata (polinukleotida).

$I_{lim}$  predstavlja spektrofotometrijski odgovor kompleksa kada više nema slobodnog spoja u otopini i  $K_s$  konstanta stabilnosti kompleksa ili konstanta ravnoteže reakcije kompleksiranja. Vrijednost  $I_{lim}$  u slučaju spektroskopski neaktivnog kompleksa iznosi nula.

### 3.3.2. Provedba metode cirkularnog dikroizma

CD spektri spojeva s odgovarajućim polinukleotidima snimljeni su uz pomoć JASCO J-815 CD spektrofotometra pri sobnoj temperaturi. Sva mjerenja su odrađena u puferu natrijevog kakodilata (pH = 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) s početnom koncentracijom polinukleotida od  $2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ . Prvotno je snimljen CD spektar otopine polinukleotida, a zatim su snimani spektri kompleksa polinukleotida s ispitivanim spojevima (**1**, **3a** i **3b**). Svi snimljeni CD spektri su korigirani za CD spektar pufera. Brzina skeniranja iznosila je 200 nm/min, a provodila se u kvarcnoj kivetu čija je duljina optičkog puta iznosila 1 cm. Početna koncentracija nakon prvog dodatka spoja (**1**, **3a** i **3b**) u kvarcnu kivetu s otopinom slobodnog polinukleotida iznosila je  $0,25 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ . Daljnji dodaci ispitivanih spojeva su se vršili prema sljedećim omjerima:  $r = [\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}] = 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5$ . Konačna koncentracija spoja u otopini je iznosila  $9,9 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ .

### 3.3.3. Provedba metode temperaturnog mekšanja

Metodom temperaturnog mekšanja ispitivan je utjecaj spojeva (**1**, **3a** i **3b**) na stabilizaciju dvolančane uzvojnice sljedećih polinukleotida uslijed povišenja temperature: *ct*DNA, p(dAdT)<sub>2</sub> te pApU. Polinukleotid p(dGdC)<sub>2</sub> nije korišten u ovoj metodi jer je njegova točka mekšanja iznad 95 °C, što je izvan mjernog područja instrumenta. Za određivanje temperature mekšanja koristili smo UV/Vis spektrometar Varian Cary 100 Bio i kvarcne kivete s duljinom optičkog puta od 1 cm. Uz pomoć programa *Simple reads* napravili smo očitavanje apsorbancije pufera pri 260 nm, a dobivene rezultate smo koristili kao nulte vrijednosti otopina. Zatim smo u svaku od kiveta dodali prethodno izračunati alikvot otopine polinukleotida tako da koncentracija polinukleotida u kivetu budu  $2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ . Sva su mjerenja odrađena u obliku duplikata, gdje su u prva dva para kiveta otopine polinukleotida bez prisustva spojeva **1**, **3a** i **3b**. U svakom sljedećem paru kiveta su se dodavali ispitivani spojevi u omjeru  $r = [\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}] = 0,1, 0,2, 0,3$ . Svaki je par podvrgnut postupnom zagrijavanju do 98 °C brzinom od 1 °C/min uz očitavanje vrijednosti  $A_{260 \text{ nm}}$  svakih 0,5 °C.

Po završetku mjerenja svi su rezultati grafički prikazani kao krivulje ovisnosti apsorbancije  $A_{260\text{nm}}$  o temperaturi. Dobivene sigmoidalne krivulje posjeduju točku infleksije koja upravo odgovara vrijednosti temperature mekšanja ( $T_m$ ). Vrijednosti  $T_m$  određene su prvom derivacijom krivulje (iz točke infleksije) i grafički provjerene metodom tangenti. Vrijednosti  $\Delta T_m$  izračunate su uz pomoć sljedeće formule:

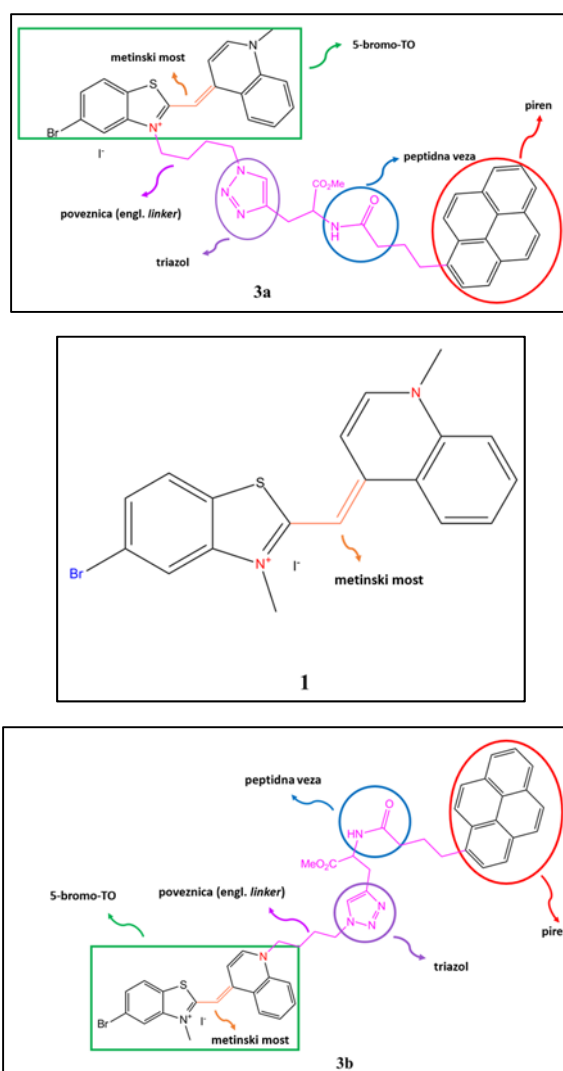
$$\Delta T_m = T_{m, \text{sl.n.k.}} - T_{m, \text{komp.}} \quad (7)$$

gdje je  $T_{m, \text{sl.n.k.}}$  temperatura mekšanja slobodne nukleinske kiseline, a  $T_{m, \text{komp.}}$  temperatura mekšanja kompleksa (nukleinska kiselina + spoj). Svaka vrijednost  $\Delta T_m$  je prosjek dvaju mjerenja, a pogreška u mjerenju iznosi  $\pm 0,5$  °C.

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Osnovni parametri strukture spojeva 1, 3a i 3b

Od prije poznata svojstva dvaju kromofora pirena i cijanina sada su zajedno kombinirana u svojstvu jedne molekule i to u obliku dva konstitucijska izomera **3a** i **3b** (slika 29). Oba konstitucijska izomera sadrže 5-bromo-TO (spoj **1**) koja je uzeta kao referentna struktura (slika 29) radi proučavanja utjecaja pirena i poveznice (engl. *linker*) na strukturu spojeva **3a** i **3b**. S druge strane, izomeri se razlikuju u konektivnosti poveznice na 5-bromo-TO (slika 29, **N**).



Slika 29. Struktura spojeva **3a**, **1** i **3b**

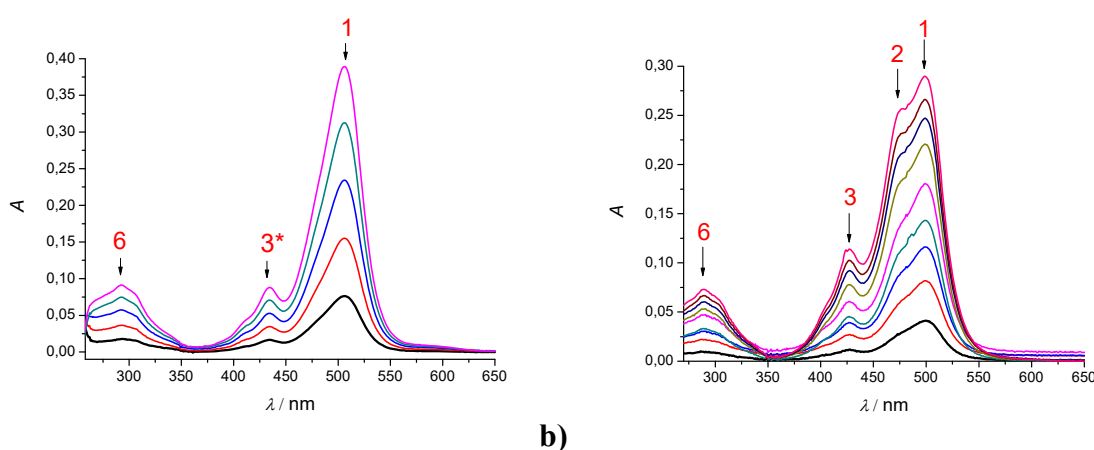
Uloga poveznice (engl. *linker*) odnosno njezinih sastavnih dijelova poput triazola, prisustva peptidne veze te alifatskog lanca se očituje u interakciji s polinukleotidima.

Peptidna veza unutar poveznice se može potencijalno ponašati kao donor ili akceptor vodikovih veza, triazol kao potencijalni akceptor vodikovih veza, a kratki alifatski lanac omogućuje bolju mobilnost dvaju kromofora prilikom njihovog vezanja za polinukleotide.

#### 4.1.1. Fizikalno-kemijska svojstva spojeva **1**, **3a** i **3b** u puferu natrijeva kakodilata i DMSO

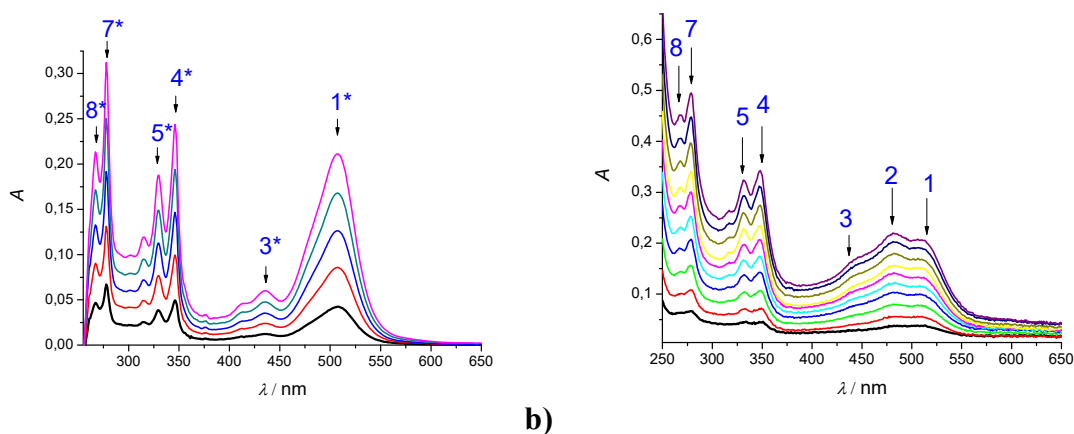
Od prije poznato svojstvo cijaninskih boja da agregiraju u vodenim otopinama, najčešće formirajući H-agregate, je ovdje ispitano snimajući UV/Vis spektre spojeva **1**, **3a** i **3b** u puferu natrijeva kakodilata i posebno u otopini DMSO. Razlog snimanja UV/Vis spektara spojeva u puferu natrijeva kakodilata (pH = 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) i DMSO leži u činjenici da spojevi agregiraju u puferu natrijeva kakodilata, a u DMSO je ta ista agregacija manje izražena ili je uopće nema.

Spoj **1** ima apsorpcijski maksimum pri 499 nm u puferu natrijeva kakodilata i u DMSO (slika 30a, maksimum apsorpcije-1 i b, maksimum apsorpcije-1) te dodatni maksimum apsorpcije u UV/Vis spektru kakodilatnog pufera pri 477 nm (slika 30b, maksimum apsorpcije-2). Apsorpcijski maksimum pri 477 nm sugerira na agregaciju spoja **1** u obliku H-agregata. S druge strane, dodatni apsorpcijski maksimumi pri 427 nm (pufer natrijeva kakodilata; slika 31b, maksimum apsorpcije-3) i 434 nm (DMSO; slika 30a, maksimum apsorpcije-3\*) pripisani su supstituentu broma u strukturi spoja **1**.<sup>2</sup> Karakterističan apsorpcijski maksimum za cijaninske boje je opažen i pri 289 nm (pufer natrijeva kakodilata; slika 30b, maksimum apsorpcije-6) i pri 292 nm (DMSO; slika 30a, maksimum apsorpcije-6\*).



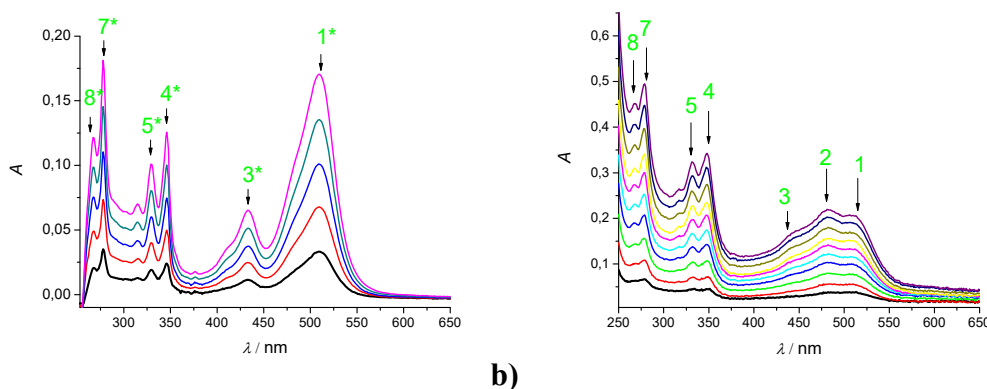
Slika 30.: **a)** Apsorpcijski spektar spoja **1** ( $c = 1 \times 10^{-6} - 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u DMSO; **b)** Apsorpcijski spektar spoja **1** ( $c = 0,2 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u puferu natrijeva kakodilata (pH = 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri 25 °C

Spoj **3a** u puferu natrijeva kakodilata i u DMSO ima maksimume apsorpcije koji odgovaraju apsorpcijskoj regiji za cijanin u valnom području od 429 do 510 nm (slika 31; maksimumi apsorpcije-1, 1\*, 2, 3\*) i apsorpcijskoj regiji za piren u valnom području od 267 do 348 nm (slika 31; maksimumi apsorpcije-4, 4\*, 5, 5\*, 7, 7\*, 8, 8\*). Pri postupnom povećanju koncentracije spoja **3a**, u puferu natrijeva kakodilata, dolazi do njegove agregacije (nastanak H-agregata), što je vidljivo iz hipsokromnog pomaka pri 481 nm unutar apsorpcijske regije za cijanin (slika 31b, maksimum apsorpcije-2).



Slika 31.: **a)** Apсорpcijski spektar spoja **3a** ( $c = 1 \times 10^{-6} - 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u DMSO; **b)** Apсорpcijski spektar spoja **3a** ( $c = 0,2 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u puferu natrijeva kakodilata (pH = 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri 25 °C

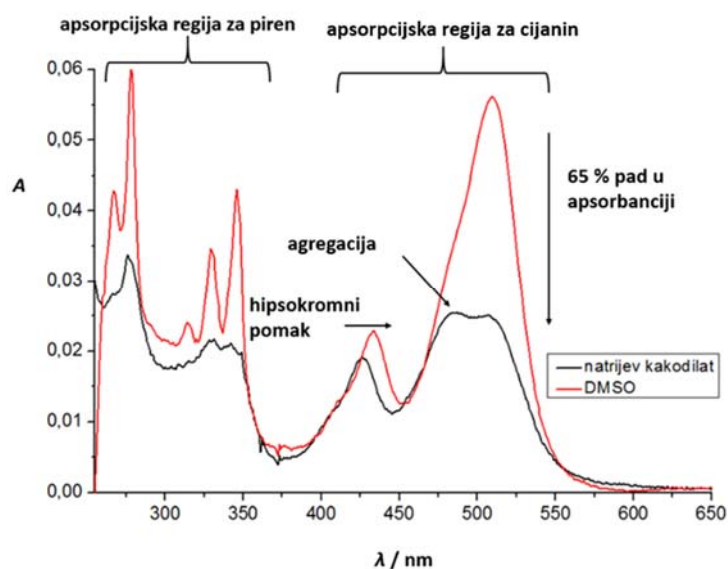
Spoj **3b** u puferu natrijeva kakodilata i u DMSO ima apsorpcijske maksimume koji odgovaraju apsorpcijskoj regiji za cijanin u valnom području od 429 do 510 nm (slika 32; maksimumi apsorpcije-1, 1\*, 2, 3\*) i apsorpcijskoj regiji za piren u valnom području od 267 do 348 nm (slika 32; maksimum apsorpcije-4, 4\*, 5, 5\*, 7, 7\*, 8, 8\*). Pri postupnom povećanju koncentracije spoja **3b**, u puferu natrijeva kakodilata, dolazi do njegove agregacije (nastanak H-agregata), što je vidljivo iz hipsokromnog pomaka pri 481 nm unutar apsorpcijske regije za cijanin (slika 32b, maksimum apsorpcije-2).



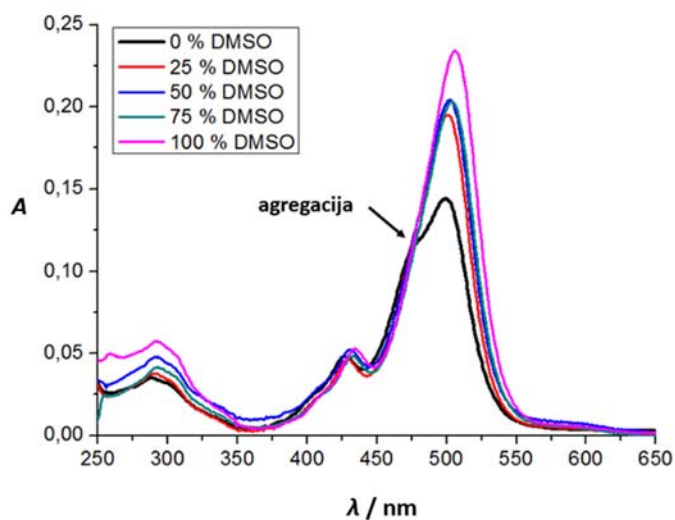
Slika 32.: **a)** Apсорpcijski spektar spoja **3b** ( $c = 1 \times 10^{-6} - 5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u DMSO; **b)** Apсорpcijski spektar spoja **3b** ( $c = 0,2 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u puferu natrijeva kakodilata (pH = 7,0;  $l = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri 25 °C

Svi ispitivani spojevi (*dodatak*, tablica D1) pa tako i spoj **3b** (slika 33) ima osjetni pad u vrijednosti apsorpcije s obzirom na dva različita medija. U puferu natrijeva kakodilata su vrijednosti apsorpcija za apsorpcijsku regiju pirena i cijanina manje nego u DMSO. Opaženo smanjenje vrijedi i u slučaju molarnih apсорpcijskih koeficijenata ( $\epsilon$ ) pošto je apsorpcija ( $A$ ) prema Beer-Lambertovom zakonu proporcionalna  $\epsilon$ .





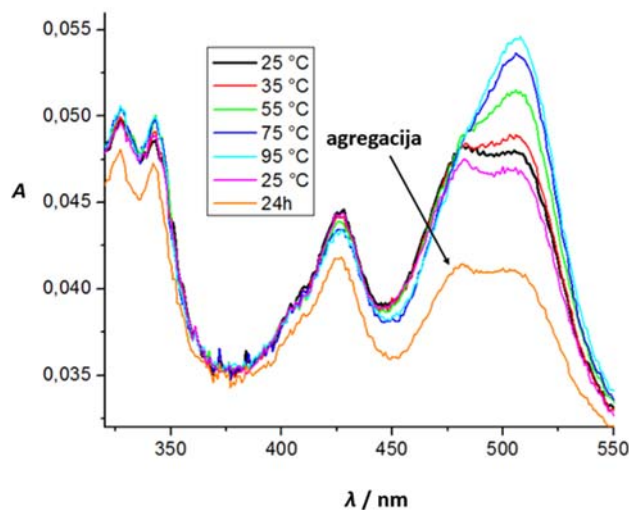
Slika 33. Apsorpcijski spektar spoja **3b** ( $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u DMSO i u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$



Slika 34. Apsorpcijski spektar spoja **3b** ( $c = 2 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s obzirom na različiti volumni udjel DMSO-a u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$

S druge strane, kod svih ispitivanih spojeva je opaženo da već pri 25 % volumnom udjelu DMSO u puferu natrijeva kakodilata dolazi do nestanka prethodno nastalih agregata (*dodatak* slike D1 b i D2 b). Ova se pojava očituje nestankom apsorpcijskih maksimuma pri 477 nm (spoj **1**, *dodatak* slika D1. b) i pri 481 nm (spoj **3a**, *dodatak* slika D2. b) kod spoja **3b** koji odgovara hipsokromnom pomaku (slika 34).

Ispitivanje temperaturne stabilnosti spojeva u puferu natrijeva kakodilata rezultiralo je značajnim promjenama u apsorpcijskim spektrima spojeva. Kod spoja **1** uočen je nestanak apsorpcijskog maksimuma pri 477 nm iznad 35 °C (*dodatak slika D1. a*), a kod spojeva **3a** (*dodatak slika D2. a*) i **3b** (slika 35) pri 481 nm iznad 55 °C. Stoga, porastom temperature dolazi do nestanka nastalih agregata.

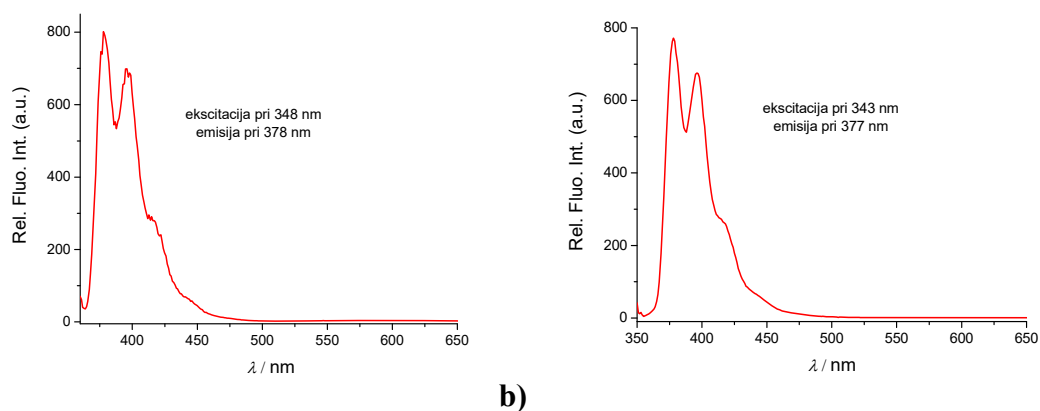


Slika 35. Apсорpcijski spektra spoja **3b** ( $c = 1,8 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u ovisnosti o temperaturi (°C) u puferu natrijeva kakodilata (pH = 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )

Duljim stajanjem spoja **3b** u puferu natrijeva kakodilata na sobnoj temperaturi u vremenskom period od 24 h (slika 35) vidljiv je znatni pad u apsorpciji, što upućuje na razgradnju ili na ireverzibilnu precipitaciju spoja **3b**. Ista pojava opažena je i kod spojeva **1** i **3a** (oba nakon 72 h, *dodatak slike D1. i D2. a*).

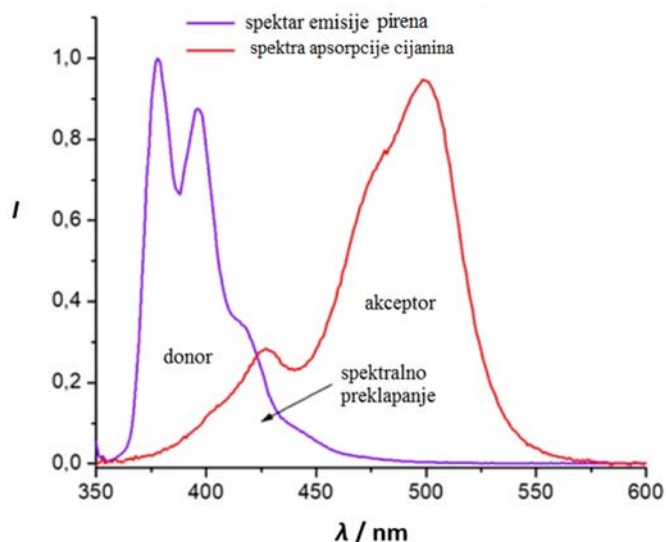
4.1.2. Intrinzična fluorescencija spojeva **1**, **3a** i **3b**

Cijaninske boje same za sebe u vodenim otopinama ne pokazuju fluorescencijsku emisiju. Kod pirena je situacija nešto drugačija. Piren pokazuje karakteristični spektar fluorescencijske emisije u puferu natrijeva kakodilata kod spojeva **3a** i **3b** pri 348, odnosno 343 nm (slika 36 a, b).



Slika 36.: **a)** Fluorescencijski spektar spoja **3a** ( $c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; **b)** Fluorescencijski spektar spoja **3b** ( $c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$

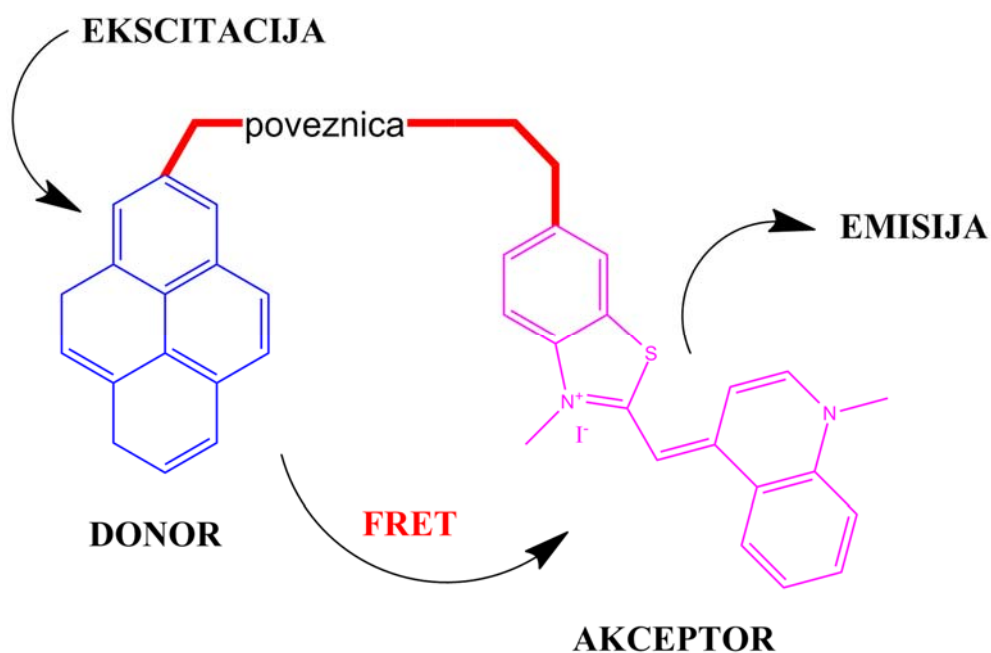
Piren i cijanin u spojevima **3a** i **3b** (slika 37) na prvi pogled predstavljaju dobar FRET par zbog preklapanja emisijskog spektra pirena (donor) s apsorpcijskim spektrom cijanina (akceptor).



Slika 37. Normaliziran spektar emisije pirena i spektar apsorpcije cijanina s vidljivim spektralnim preklapanjem Error! Reference source not found.

Fluorimetrijski pokusi su provedeni pri niskim koncentracijama spojeva ( $c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ) kako bi se izbjegla njihova eventualna agregacija.

No ekscitacijom spojeva **3a** i **3b** u području valnih duljina za piren ne dolazi do FRET-a. Razlog tome leži u brzom neradijativnom povratku iz pobuđenog stanja cijanina u osnovno kroz torzijsko gibanje u metinskom mostu. Tek po blokiranju rotacije cijanina oko metinskog mosta (kao posljedica vezanja na DNA/RNA ili proteine) može se pojaviti FRET, a sukladno s time i izmjeriti.



Slika 38. Moguća pojave FRET-a između pirena (plava boja) i cijanina (ljubičasta boja)

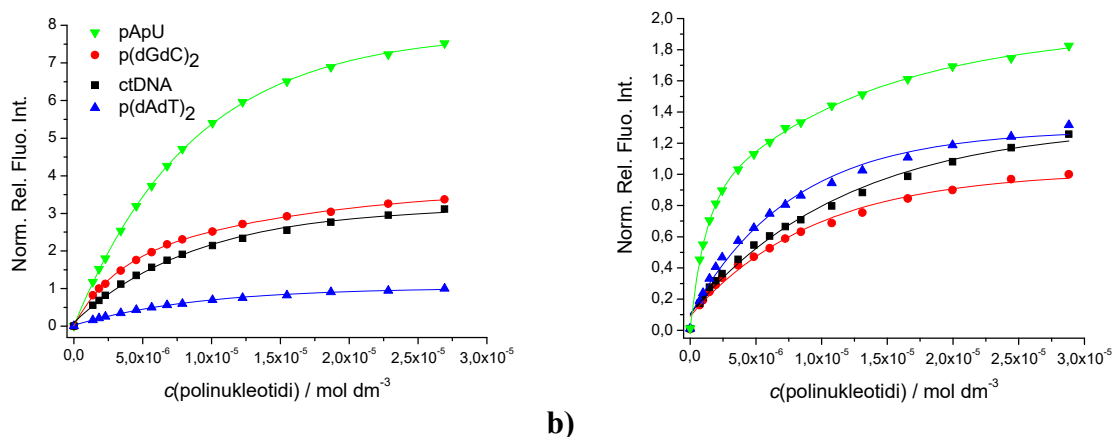
## 4.2. Proučavanje interakcija ispitivanih spojeva s dvolančanim polinukleotidima

S ciljem što boljeg razumijevanja interakcija ispitivanih spojeva s dvolančanim polinukleotidima različitih sekundarnih struktura kombinirano je više spektroskopskih metoda. U ovome radu ćemo se osvrnuti na fluometrijske titracije, titracije vezane uz metodu cirkularnog dikroizma i pokuse temperaturnog mekšanja dvolančanih DNA/RNA.

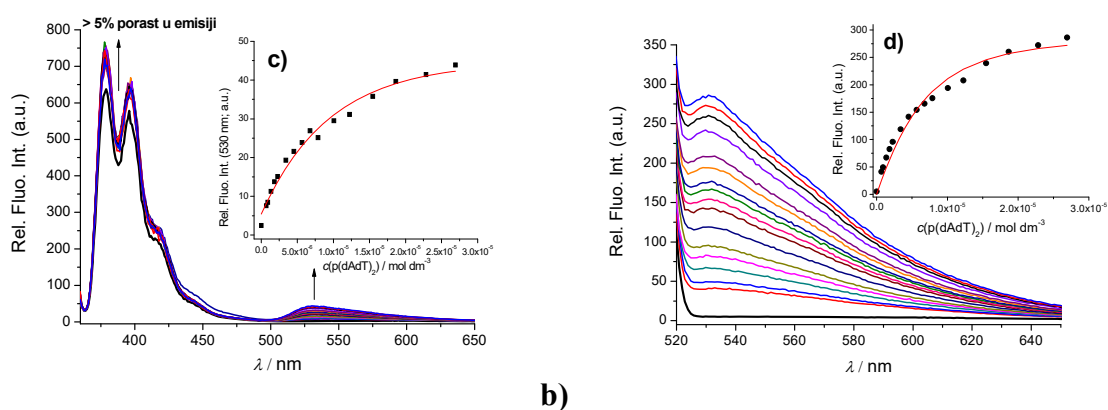
### 4.2.1. Fluorimetrijske titracije spojeva **1**, **3a** i **3b** s dvolančanim polinukleotidima

Fluorimetrijske titracije su provedene pri koncentraciji spojeva ( $c = 5 \times 10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup>) kod koje ne dolazi do intramolekulskih agregacija samih spojeva. Pri takvim uvjetima, dobiveni emisijski odgovor predstavlja vezanje neovisne molekule spoja za dvolančane polinukleotide. Dok se za intrinzično nefluorescentne cijaninske boje očekuje jak porast emisije vezanjem za polinukleotide, no piren, intrinzično fluorescentan, pokazuje veliku osjetljivost naspram okoline u kojoj se nalazi. Stoga će uvjeti u okolini pirena s obzirom na njegov spektar emisije dati informacije o načinu vezanja ispitivanih spojeva za polinukleotide. Tokom same titracije spojeva s polinukleotidima, izomeri **3a** i **3b** su bili pobuđivani na dvije valne duljine: pri 344 ili 348 nm za pirenski dio molekule spoja te pri 510 nm za cijaninski dio molekule spoja. Emisijski spektri su mjereni u području od 380 do 450 nm (po pobudi pirena za pirenski dio molekule spoja) pa sve do 600 nm (po pobudi cijanina) za cijaninski dio molekule spoja.

Ekscitacijom pri 510 nm, kompleksa spoja **1** s polinukleotidom, došlo je do pojave jake fluorescentne emisije, dok je u istim uvjetima emisija spojeva **3a** i **3b** bila bitno slabija. Opaženo sugerira da pirenski dio molekule izomera **3a** i **3b** utječe na vezanje cijaninskog dijela molekule spoja na polinukleotide. S druge strane, svi spojevi (**1**, **3a** i **3b**) pokazuju najveći intezitet fluorescencije s pApU u odnosu na druge polinukleotide (slika 39; *dodatak* slika D21.). Spoj **1** u kompleksu s pApU pokazuje čak osam puta veći intezitet fluorescencije u odnosu na kompleks s p(dAdT)<sub>2</sub>, dok spojevi **3a** i **3b** pokazuju samo dva do tri puta veće povećanje u inteziteta fluorescencije u kompleksu s pApU u odnosu na p(dGdC)<sub>2</sub> (za **3a**) i ctDNA (za **3b**).



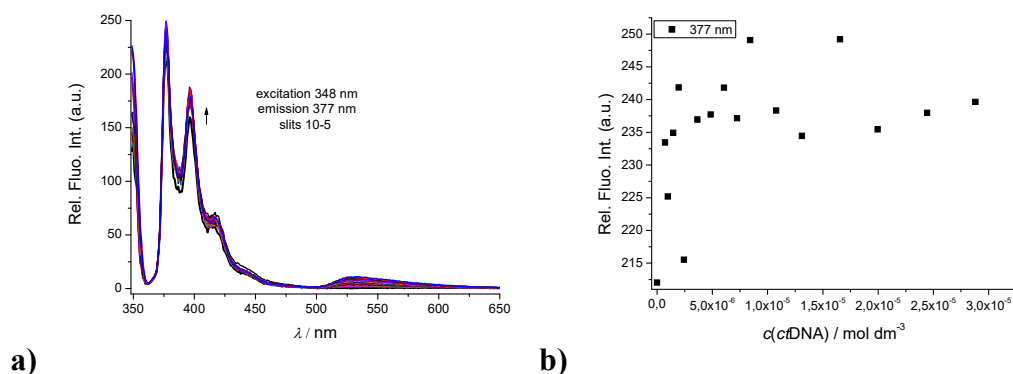
Slika 39. Ovisnost relativnog fluorescencijskog inteziteta o koncentracijama spojeva: **a)** **1** ( $c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri 524 nm ( $\lambda_{\text{eksc}} = 499 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 532 \text{ nm}$  za pApU); **b)** **3a** ( $c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri 530 nm ( $\lambda_{\text{eksc}} = 510 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 533 \text{ nm}$  za pApU) uslijed titracije sa sva četiri polinukleotida u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$



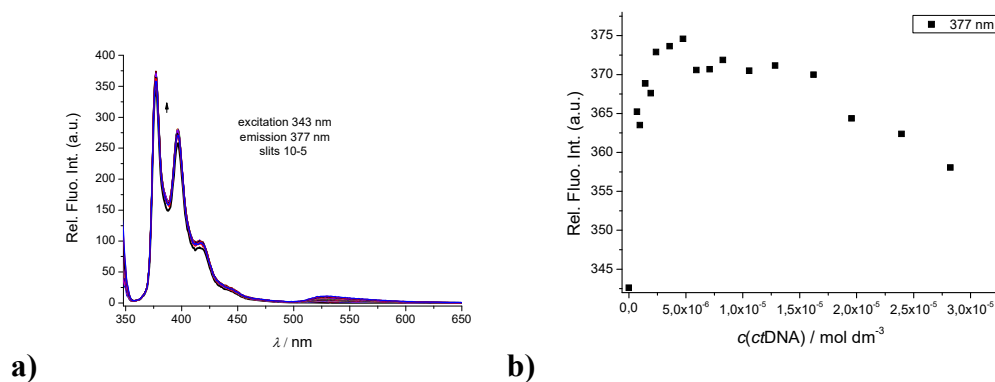
Slika 40. **a)** Fluometrijski spektar spoja **3a** ( $\lambda_{\text{eksc}} = 348 \text{ nm}$ ) uslijed titracije s p(dAdT)<sub>2</sub>, umetak **c)**: ovisnost inteziteta emisije spoja **3a** o koncentraciji p(dAdT)<sub>2</sub> pri 530 nm u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; **b)** Fluometrijski spektar spoja **3a** ( $\lambda_{\text{eksc}} = 510 \text{ nm}$ ) uslijed titracije s p(dAdT)<sub>2</sub>, umetak **d)**: ovisnost inteziteta emisije spoja **3a** o koncentraciji p(dAdT)<sub>2</sub> pri 530 nm u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$

Najmanji intezitet emisije cijanina dobiven je u slučaju kompleksa p(dGdC)<sub>2</sub>-**3a** (slika 39b) i kompleksa ctDNA-**3b** (dodatak slika D21. c). Općenito visoki inteziteti emisije u području cijaninske regije upućuju na vezanje spojeva unutar DNA/RNA.

Za razliku od cijaninske fluorescencije, dodavanje polinukleotida pri pobudi spojeva **3a** i **3b** u području pirena (pri 348 i 344 nm) rezultiralo je vrlo slabim povećanjem inteziteta fluorescencije pirena (slika 41a i 42a; *dodatak* slike D8., D10. i D12. za **3a** te D15., D17., i D19. za **3b**).



Slika 41. **a)** Promjene u fluorescencijskom spektru spoja **3a** ( $c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ) tijekom titracije s ctDNA, uz pobudu pri  $\lambda_{\text{eks}} = 348 \text{ nm}$  u puferu natrijeva kakovilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri 25 °C; **b)** Ovisnost relativnog fluorescencijskog inteziteta spoja **3a** o koncentraciji ctDNA uz emisiju pri  $\lambda_{\text{em}} = 377 \text{ nm}$  u puferu natrijeva kakovilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri 25 °C



Slika 42. **a)** Promjene u fluorescencijskom spektru spoja **3b** ( $c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ) tijekom titracije s ctDNA, uz pobudu pri  $\lambda_{\text{eks}} = 343 \text{ nm}$  u puferu natrijeva kakovilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri 25 °C; **b)** Ovisnost relativnog fluorescencijskog inteziteta spoja **3b** o koncentraciji ctDNA uz emisiju u puferu natrijeva kakovilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri 25 °C

To upućuje da se pirenski dio izomera **3a** i **3b** ne veže unutar DNA/RNA već se najvjerojatnije nalazi izložen vodi. Blizina pirena i cijanina u izomerima **3a** i **3b** nam omogućuje moguće opažanje FRET-a. No vjerojatnost pojave FRET-a uvelike će ovisiti o strukturnim obilježjima veznog mjesta na polinukleotidima.

Tako na primjer na slici 40. a) se vidi kako pobuda pirena pri 348 nm rezultira pojavom emisije cijanina pri 530 nm, što je direktni dokaz FRET-a. Zanimljivo je kako intenzitet FRET-vrpce ovisi o polinukleotidu (vidi *dodatak* D3.-21., titracije s drugim DNA/RNA).

Svi rezultati fluorimetrijskih titracija (tablica 4) su obrađeni pomoću Scatchardove jednadžbe sa svrhom dobivanja vrijednosti konstanti vezanja ( $\log K_s$ ) i Scatchardovog omjera  $n = [\text{vezani spoj}] / [\text{polinukleotid}]$ . Dobivene vrijednosti ukazuju na sličan afinitet oba spoja prema svim DNA/RNA.

Tablica 4. Vrijednosti konstanti vezanja ( $\log K_s$ )<sup>a</sup> i kvantnih iskorištenja ( $QY$ )<sup>b</sup> za komplekse spojeva **1**, **3a** i **3b** s različitim vrstama dvolančanih polinukleotida, dobivenih obradom<sup>c</sup> spektara fluometrijskih titracija u puferu natrijeva kakodilata (pH = 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )

| Vrsta spoj                           | Parametri                             |                                       | Spoj  | ctDNA | p(dAdT) <sub>2</sub> | p(dGdC) <sub>2</sub> | pAdU               |
|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|-------|-------|----------------------|----------------------|--------------------|
| <b>1</b>                             | $\log K_s$                            |                                       |       | 6,2   | 6,2                  | 6,5                  | 6,2                |
|                                      | QY                                    | $\lambda_{\text{eks}}=499 \text{ nm}$ | f     | 0,156 | 0,053                | 0,102                | 0,394 <sup>d</sup> |
|                                      |                                       | $\lambda_{\text{em}}=524 \text{ nm}$  |       |       |                      |                      |                    |
| <b>3a</b>                            | $\log K_s$                            |                                       |       | 6,2   | 6,5                  | 6,4                  | 7,0                |
|                                      | QY                                    | $\lambda_{\text{eks}}=348 \text{ nm}$ | 0,032 | 0,036 | 0,035                | 0,038                | 0,034              |
|                                      |                                       | $\lambda_{\text{em}}=377 \text{ nm}$  |       |       |                      |                      |                    |
|                                      |                                       | $\lambda_{\text{eks}}=348 \text{ nm}$ | g     | 0,016 | 0,019                | 0,015                | 0,010              |
|                                      |                                       | $\lambda_{\text{em}}=530 \text{ nm}$  |       |       |                      |                      |                    |
|                                      | $\lambda_{\text{eks}}=510 \text{ nm}$ | f                                     | 0,091 | 0,099 | 0,076                | 0,105                |                    |
| $\lambda_{\text{em}}=530 \text{ nm}$ |                                       |                                       |       |       |                      |                      |                    |
| <b>3b</b>                            | $\log K_s$                            |                                       |       | 6,4   | 6,6                  | 6,7                  | 6,3                |
|                                      | QY                                    | $\lambda_{\text{eks}}=343 \text{ nm}$ | 0,125 | 0,144 | 0,136                | 0,156                | 0,141              |
|                                      |                                       | $\lambda_{\text{em}}=377 \text{ nm}$  |       |       |                      |                      |                    |
|                                      |                                       | $\lambda_{\text{eks}}=343 \text{ nm}$ | g     | 0,023 | 0,023                | 0,019                | 0,023              |
|                                      |                                       | $\lambda_{\text{em}}=530 \text{ nm}$  |       |       |                      |                      |                    |
|                                      |                                       | $\lambda_{\text{eks}}=510 \text{ nm}$ | f     | 0,254 | 0,23                 | 0,213                | 0,303              |
| $\lambda_{\text{em}}=530 \text{ nm}$ |                                       |                                       |       |       |                      |                      |                    |

<sup>a,c</sup>Obrada podataka titracije pomoću Scatchardove jednadžbe metodom nelinearne regresije dala je vrijednosti omjera  $n = [\text{vezani spoj}] / [\text{polinukleotid}] = 0,1 - 0,3$ , radi lakše usporedbe sve su vrijednosti  $\log K_s$  ponovno izračunate za  $n = 0,1$ . Koeficijenti korelacije bili su  $> 0,99$  za sve izračunate  $K_s$ ; <sup>b</sup> vidi pod poglavlje 2.5.2. odnosno formulu pod broje 4; <sup>d</sup> emisija pri 532 nm; <sup>f</sup> nefluorescira; <sup>g</sup> vrlo slaba emisija fluorescencijom pa bi vrijednost izračunatog  $QY$  bila premala



4.2.2. Temperaturno mekšanje dvolančanih polinukleotida uz dodatak spojeva **1**, **3a** i **3b**

Dobiveni rezultati ukazuju na slabu do umjerenu stabilizaciju dvolančanih polinukleotida uslijed vezanja ispitivanih spojeva (vidi tablicu 5.; *dodatak* tablica D3, slike D22.–30.). Spoj **1** najviše selektivno stabilizira pApU i p(dAdT)<sub>2</sub> (pri omjerima  $r = [\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}] = 0,3$ ), a spojevi **3a** i **3b** pokazuju selektivnu stabilizaciju spram pApU (pri omjerima  $r = [\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}] = 0,3$ ). Najviše izražena selektivna stabilizacija se opaža kod spoja **3a** spram pApU ( $\Delta T_m = 11,6$ ; pri omjeru  $r = [\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}] = 0,3$ ), gdje je ona čak za šet puta veća od stabilizacije za p(dAdT)<sub>2</sub> (tablica 5). S povećanjem omjera  $r = [\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]$  rasla je i stabilizacija polinukleotida, koja se očituje iz proporcionalnog porasta vrijednosti  $\Delta T_m$  (*dodatak* tablica D3).

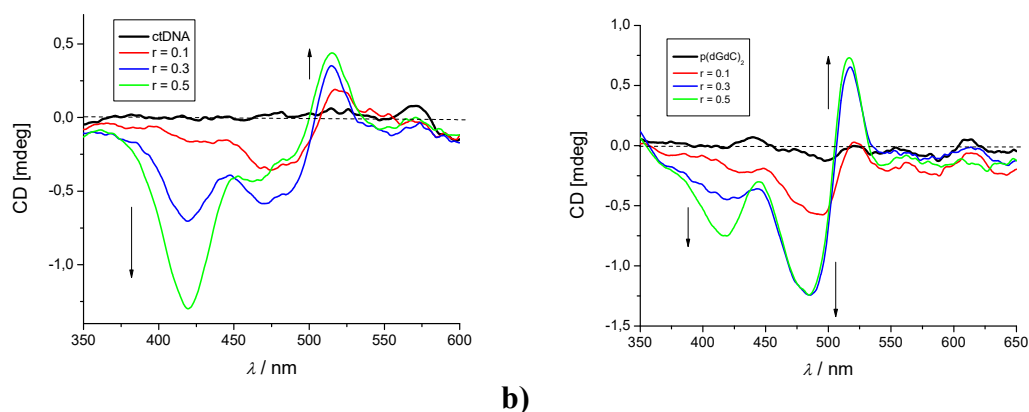
Tablica 5. Promjena temperature mekšanja  $\Delta T_m$  uslijed interakcije dvolančanih polinukleotida sa spojevima **1**, **3a** i **3b** pri omjeru  $r = [\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}] = 0,3$  u puferu natrijeva kakodilata (pH=7,0;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )

| Vrsta spoja | $r$ | $\Delta T_m / ^\circ\text{C}$ |                      |      |
|-------------|-----|-------------------------------|----------------------|------|
|             |     | ctDNA                         | p(dAdT) <sub>2</sub> | pApU |
| <b>1</b>    | 0,3 | 3,8                           | 9,1                  | 7,7  |
| <b>3a</b>   | 0,3 | 2,3                           | 1,9                  | 11,6 |
| <b>3b</b>   | 0,3 | 1,7                           | 3,5                  | 5,6  |

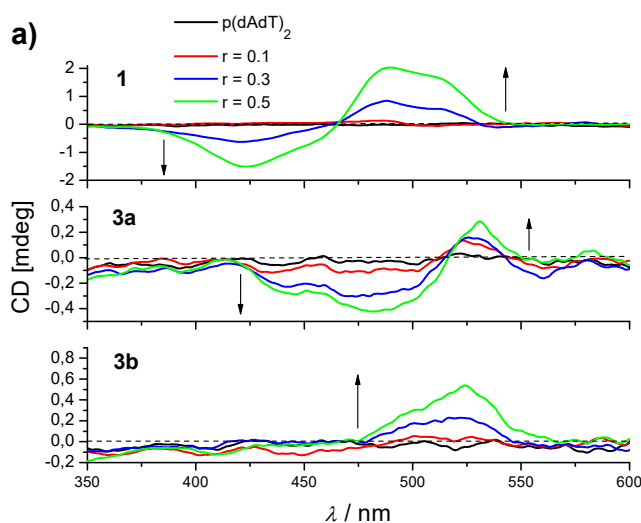
## 4.2.3. Titracije u sklopu metode cirkularnog dikroizma

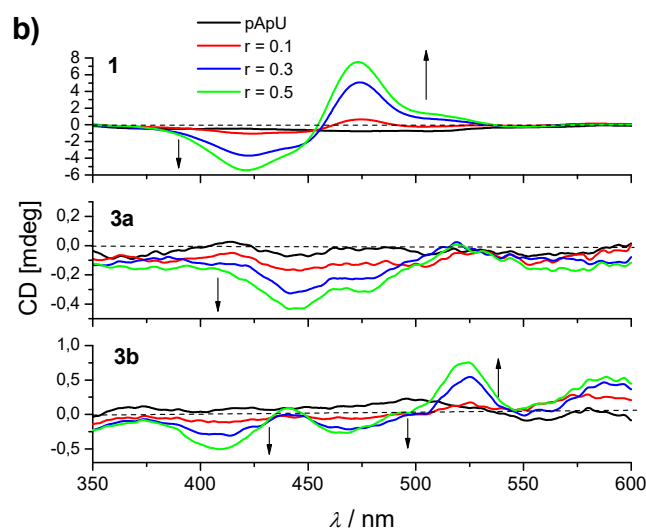
Uslijed interakcije male molekule s nukleinskom kiselinom moguće su promjene CD spektara same DNA/RNA u području valnih duljina ispod 300 nm, što omogućuje procjenu utjecaja vezanja malih molekula na promjenu kiralnosti uzvojnica nukleinskih kiselina. No pošto se apsorpcijske linije pirena, sastavne komponente izomera **3a** i **3b**, preklapaju s apsorpcijskim linijama nukleinskih kiselina nije moguće u potpunosti odrediti utjecaj vezanja izomera na promjenu konformacije dvostruke uzvojnice nukleinskih kiselina. S druge strane, fluorimetrijski podaci su nam pokazali da se cijaninski dio izomera **3a** i **3b** veže za DNA/RNA sustav, a piren ostaje van veznog mjesta, što je dodatno potvrđeno nedostatkom ICD linija u apsorpcijskoj regiji pirena od 300 do 350 nm (*dodatak* tablica D4). U ostatku ovog potpoglavlja baviti ćemo se s ICD spektrima vezanim uz cijaninski dio molekule spoja (apsorpcija u valnom području od 400 – 550 nm).

Spoj **1** u interakciji sa svim polinukleotidima pokazuje točno određeni spregnuti ICD spektar (engl. *bisignate* ICD) u slučaju vezanja na *ctDNA* i  $p(dGdC)_2$  (slika 43a i b). Ovakav uzorak unutar ICD spektra nam ukazuje na nastanak ligand-ligand interakcija, što je vrlo vjerojatno posljedica agregacije spoja **1** unutar utora DNA. ICD spektri  $p(dAdT)_2$  i  $pApU$  većeg su inteziteta u odnosu na intezitet ICD spektra *ctDNA* i  $p(dGdC)_2$ , najvjerojatnije jer je ostvarivanje interakcije između spoja **1** i malog utora kod  $p(dGdC)_2$  sterički ometano od strane  $NH_2$  grupe na gvaninu.



Slika 43.: **a)** ICD spektar titracije *ctDNA* ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) sa spojem **1** pri zadanim molarnim omjerima  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25^\circ\text{C}$ ; **b)** ICD spektar titracije  $p(dGdC)_2$  ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) sa spojem **1** pri zadanim molarnim omjerima  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25^\circ\text{C}$



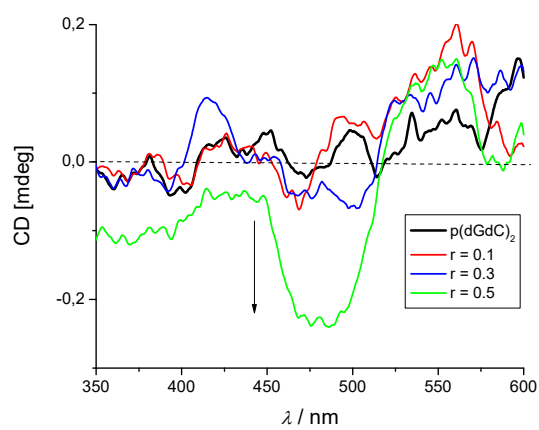


Slika 44. **a)** ICD spektri titracije p(dAdT)<sub>2</sub> ( $c = 2 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>) sa spojevima **1**, **3a** i **3b** pri zadanim molarnim omjerima  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  u puferu natrijeva kakodilata (pH = 7,0;  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>) pri 25 °C; **b)** ICD spektri titracije pApU ( $c = 2 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>) sa spojevima **1**, **3a** i **3b** pri zadanim molarnim omjerima  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  u puferu natrijeva kakodilata (pH = 7,0;  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>) pri 25 °C

Izomeri **3a** i **3b** su pokazali široku paletu različitih ICD spektara u interakciji s polinukleotidima. Vezanje spoja **3a** na p(dAdT)<sub>2</sub> uzrokovalo je pojavu negativnog i slabo pozitivnog ICD signala (slika 44a), dokle je kod spoja **3b** došlo do nastanka srednje jakog pozitivnog ICD signala.

Oba tipa ICD signala upućuju na vezanje spoja **3a** i **3b** u mali utor p(dAdT)<sub>2</sub>. Kod spoja **3a** radi se o agregiranju unutar malog utora, a u slučaju spoja **3b**, radi se o vezanju samo jedne molekule u mali utor p(dAdT)<sub>2</sub>. S druge strane, u slučaju vezanja spoja **3a** za p(dGdC)<sub>2</sub> (slika 45) i pApU dolazi do nastanka negativnog ICD signala pri 440 nm (slika 44b). Negativan ICD signal pri 440 nm karakterističan je za interkalaciju. Kod spoja **3b** dolazi do nastanka kompleksnog ICD signala s mnoštvo minimuma i maksimuma u području valnih duljina od 400 do 530 nm, što upućuje na agregiranje spoja **3b** unutar velikog utora pApU (slika 44b)

Na izgled ICD spektara odnosno na različite načine vezanja cijanina na polinukleotide, u domeni ispitivanih spojeva, veliki utjecaj imaju pirenska regija i pozicija poveznice koja spaja cijanin s pirenom.



Slika 45. ICD spektar titracije p(dGdC)<sub>2</sub> ( $c = 2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) sa spojem **3a** pri zadanim molarnim omjerima  $r = [\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}]$  u puferu natrijeva kakodilata (pH = 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri 25 °C

## § 5. ZAKLJUČAK

Kombinirajući i povezujući dva vrlo poznata biomolekularna senzora, pirena i cijanina, dobivene su dvije potpuno nove fluorescentne probe u obliku konstitucijskih izomera **3a** i **3b**.

Oba izomera kao i referentni spoj **1** pri većim koncentracijama u puferu natrijeva kakodilata agregiraju, stvarajući H-agregate. U DMSO situacija je nešto drugačija, pa do agregacije ne dolazi ukoliko je volumni udio DMSO u puferu natrijeva kakodilata iznad 25 %. Uslijed povišenja temperature dolazi do narušavanja prethodno nastalih H-agregata, a duljim stajanjem u puferu natrijeva kakodilata na sobnoj temperaturi u vremenskom periodu od 24 h kod svih je spojeva uočen znatni pad apsorbancije, što upućuje na degradaciju ili na ireverzibilnu precipitaciju spojeva.

Ekscitacijom pirenskog fluorofora u spojevima **3a** i **3b** bez prisustva polinukleotida, ne dolazi do FRET-a zbog brzog neradijativnog povratka iz pobuđenog stanja u osnovno kroz torzijsko gibanje u metinskom mostu cijanina. Uslijed vezanja cijanina na DNA/RNA sustav dolazi do nastanka FRET-a, što se najbolje očituje kod izomera **3a** i **3b** vezanjem za p(dAdT)<sub>2</sub>. Stoga su izomeri **3a** i **3b** prema svemu sudeći prvi poznati FRET sustavi koji se aktiviraju uslijed nekovalentnog vezanja za DNA/RNA sustave.

Metodom temperaturnog mekšanja utvrđeno je kako su svi ispitivani spojevi slabo do umjereno stabilizirali dvolančane polinukleotide pri molarnim omjerima  $r = [\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}] = 0,1$  i  $0,2$ , no pri molarnom omjeru  $r = [\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}] = 0,3$  je stabilizacija dvolančanih polinukleotida jače izražena. Spoj **3a** jače stabilizira pApU za razliku od njegovog izomera **3b** pri molarnom omjeru  $r = [\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}] = 0,3$ , što ponovo ukazuje na utjecaj mjesta vezanja premosnice na cijaninsku boju.

Pokusi cirkularnog dikroizma su dodatno karakterizirali načine na koje su se cijaninski dijelovi izomera **3a** i **3b** vezali za pojedine DNA/RNA sustave. Cijanin iz spoja **3a** ostvaruje interakcije s malim utorom p(dAdT)<sub>2</sub> u obliku agregata, ali interkalira u p(dGdC)<sub>2</sub> i pApU. S druge strane, cijanin u **3b** ostvaruje interakcije s malim utorom p(dAdT)<sub>2</sub> vezanjem samo jedne molekule, a u slučaju vezanja za pApU radi se o agregiranju spoja unutar velikog utora.

Izvan okvira ovog diplomskog rada napravljena je studija vezanja izomera **3a** i **3b** na albumin iz goveđeg seruma (BSA, engl. *bovine serum albumin*). Dodavanje proteina BSA pri pobudi spojeva **3a** i **3b** u području pirena (pri 348 i 344 nm) rezultiralo je povećanjem inteziteta fluorescencije pirena, što je ukazalo na preferencijalno vezanje pirena za BSA umjesto cijanina. S druge strane, u sklopu cirkularnog dikroizma nije došlo do nastanka ICD signala uslijed dodavanja spojeva **3a** i **3b** u otopinu BSA, čime je omogućena provjera prisustva DNA molekula u sustavima smjesa BSA/DNA. Pojava FRET-a zabilježena je samo u sklopu vezanja spoja **3b** za BSA.<sup>2</sup>

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

BSA – albuminom iz goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*)

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

CFP – cijan fluorescentni protein (engl. *cyan fluorescent protein*)

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

DMSO – dimetilsulfoksid (engl. *dimethyl sulfoxide*)

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

FLIM – kvantitativna fluorescencijska mikroskopija u realnom vremenu (engl. *fluorescence lifetime imaging*)

FRET – Försterov rezonancijski prijenos energije (engl. *Förster resonance energy transfer*)

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

pApU – dvolančani homopolinukleotid sastavljen od adenina i uracila

p(dAdT)<sub>2</sub> – dvolančani poli dAdT-poli dAdT polinukleotid sastavljen od adenina i timina

p(dGdC)<sub>2</sub> – dvolančani poli dAdT-poli dAdT polinukleotid sastavljen od gvanina i citozina

PNA-TO – konjugat peptidne nukleinske kiseline i tiazol oranža (engl. *peptide nucleic acid - thiazole orange*)

Rel. Int. Fluo. – relativni intenzitet fluorescencije (engl. *relative intensity of fluorescence*)

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

S<sub>0</sub> – osnovno singletno stanje (engl. *singlet ground state*)

S<sub>1</sub> – prvo pobuđeno singletno stanje (engl. *first excited singlet state*)

SARS – teški akutni respiratorni sindrom (engl. *severe acute respiratory syndrome*)

SBT – pozadinska fluorescencija (engl. *spectral bleed through*)

T<sub>1</sub> – prvo pobuđeno tripletno stanje (engl. *first excited triplet state*)

T<sub>2</sub> – drugo pobuđeno tripletno stanje (engl. *second excited triplet state*)

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

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

QY – kvantno iskorištenje (od engl. *quantum yield*)

YFP – žuti fluorescirajući protein (engl. *yellow fluorescent protein*)

YO – oksazol-žuto (engl. *oxazole yellow*)

## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko i Lubert Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, **1**, 2013., str. 107-117; str. 651-655; str. 783-788
2. T. Šmidlehner, M. Badovinac, I. Piantanida, *Pyrene – cyanine conjugates as multipurpose fluorescent probes for non-covalent recognition of ds-DNA, RNA and proteins*, *New J. Chem.*, **42** (2018), 6655-6663
3. B. A. Armitage, *Top. Curr. Chem.*, **253** (2005.), str. 55-76
4. M. S. Gonçalves, *Chem. Rev.*, **109** (2009.), str. 190-212
5. <https://www.yourgenome.org/stories/the-discovery-of-dna> (datum pristupa 7. srpanj 2018.)
6. David L. Nelson and Michael M. Cox, *Lehninger: Principles of Biochemistry*, **4**, 2005., str. 273-305
7. K. Nakamoto, M. Tsuboi, G. D. Strahan, *Drug-DNA Interactions: Structures and Spectra*, John Wiley & Sons, New Jersey, (2008.)
8. S. C. Harvey, M. Prabhakaran, *J. Am. Chem. Soc.* **108** (1986.), 6128-6136
9. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1962/summary/> (datum pristupa 10. rujan 2019.)
10. A. Ghosh and M. Bansal, *A glossary of DNA structures from A to Z*, *Acta Cryst.*, **D59** (2003.), str. 620-626
11. T. Šmidlehner, I. Piantanida, G. Pescitelli, M. Egli and W. Saenger, *Beilstein J. Org. Chem.*, **14** (2018.), str. 84-105
12. T. Šmidlehner, *Multifunctional molecular recognition of DNA/RNA secondary structure by molecular sensors*, Doctoral thesis, University of Rijeka, department of biotechnology, 2018., str. 11
13. I. Piantanida, *Kem. Ind.*, **52** (2003.), str. 545-552
14. Interna skripta za praktikum iz biokemije, Zagreb, **15** (2016.)
15. T. Šmidlehner, I. Piantanida and G. Pescitelli, *Beilstein J. Org. Chem* (2017.), str. 1-22
16. Gupta R. R., *Heterocyclic Polymethine Dyes*, *Springer-Verlag Berlin Heidelberg* (2008.)
17. B. A. Armitage, *Top. Curr. Chem.*, **253** (2005.), str. 55-76
18. Ulrich Rösch, Sheng Yao, Rüdiger Wortmann and Frank Würthner, *Fluorescent H-Aggregates of Merocyanine Dyes*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45** (2006.), 7026-7030
19. M. Sauer, J. Hofkens and J. Enderlein, *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*, 2011., str. 1-30



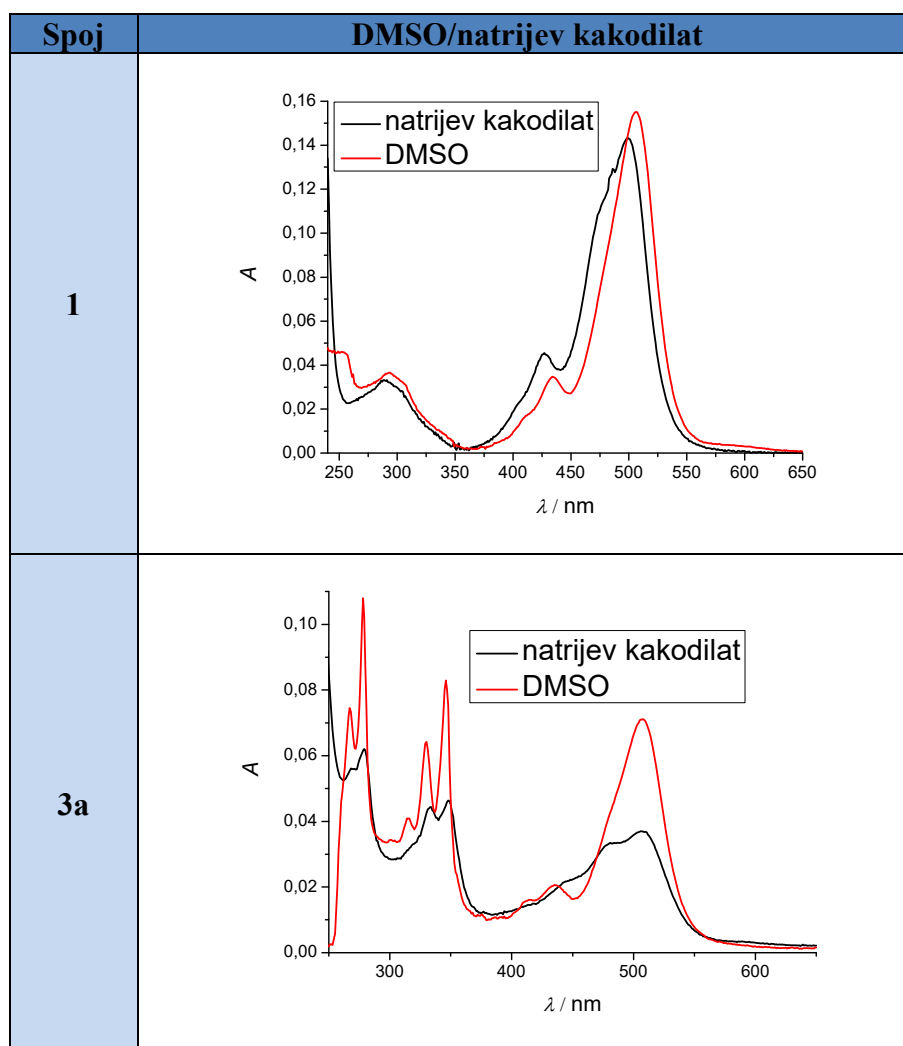
20. T. Vilaivan, *Fluorogenic PNA probes*, Beilstein J. Org. Chem., **14** (2018), str 253–281
21. Jean Duhamel, *New Insights in the Study of Pyrene Excimer Fluorescence to Characterize Macromolecules and their Supramolecular Assemblies in Solution*, Langmuir, **28** (2012.), 6527–6538
22. <https://omlc.org/spectra/PhotochemCAD/html/079.html> (datum pristupa 10. kolovoz 2018.)
23. G. Bains, Arti B. Patel and V. Narayanaswami, *Pyrene: A Probe to Study Protein Conformation and Conformational Changes*, Molecules, **16** (2011.), 7909–7935
24. H. E. A. Kramer and P. Fischer, *The Scientific Work of Theodor Förster: A Brief Sketch of his Life and Personality*, Wiley Online Libery, **12** (2011.), str. 555–558
25. J. R. Lakowicz, Ch. D. Geddes, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, **1**, 2006., str. 1-23
26. Frederic Festy, Simon M. Ameer-Beg, Tony Ngab and Klaus Suhling, *Imaging proteins in vivo using fluorescence lifetime microscopy*, Mol. BioSyst., **3** (2007.), str. 381–391
27. R. R. Duncan, *Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) to quantify protein–protein interactions inside cells*, Biochemical Society Transactions, **34** (2006.), str. 679–682
28. Yuansheng Sun, Nicole M. Hays, Ammasi Periasamy, Michael W. Davidson and Richard N. Day, *Monitoring Protein Interactions in Living Cells with Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy*, Methods in Enzymology, Elsevier Inc, **504** (2012.), str 372–389
29. M. Khrenova, I. Topol, J. Collins and Alexander Nemukhin, *Estimating Orientation Factors in the FRET Theory of Fluorescent Proteins: The TagRFP-KFP Pair and Beyond*, Biophysical Journal, **108** (2015), str. 126–132
30. D. Comelli, G. Valentini, R. Cubeddu and L. Toniolo, *Fluorescence lifetime imaging for the analysis of works of art: application to fresco painting and marble sculptures*, Journal of Neutron Research, **14** (2006.), str 81–90
31. [https://www.researchgate.net/figure/FRET-biosensor-A-Schematic-of-the-structure-of-the-intramolecular-FRET-biosensor\\_fig3\\_309455261](https://www.researchgate.net/figure/FRET-biosensor-A-Schematic-of-the-structure-of-the-intramolecular-FRET-biosensor_fig3_309455261) (datum pristupa 7. rujan 2019.)
32. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *Osnove analitičke kemije*, Školska knjiga, Zagreb, 1999., str. 493–593.
33. Tatjana Gazivoda Kraljević, *Određivanje struktura organskih spojeva*, nastavni tekst, FKIT Zagreb, ZOK
34. T. Cvitaš, *Fizikalna kemija*, skripta za internu upotrebu, Zagreb
35. R. F. Kubin and A. N. Fletcher, *J. Lumin.*, **27** (1982.), str. 455–462
36. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic\\_Chemistry/Book%3ABasic\\_Principles\\_of\\_Organic\\_Chemistry\\_\(Roberts\\_and\\_Caserio\)/19%3AMore\\_on\\_Stereochemistry/19.09%3AOptical\\_Rotatory\\_Dispersion\\_and\\_Circular\\_Dichroism](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Book%3ABasic_Principles_of_Organic_Chemistry_(Roberts_and_Caserio)/19%3AMore_on_Stereochemistry/19.09%3AOptical_Rotatory_Dispersion_and_Circular_Dichroism) (datum pristupa 14. srpanj 2018.)

37. A. I. Sander Holm, L. Munksgaard Nielsen, Søren Vrønning Hoffmann and Steen Brøndsted Nielsen, *Vacuum-ultraviolet circular dichroism spectroscopy of DNA: a valuable tool to elucidate topology and electronic coupling in DNA*, *Phys.Chem.Chem.Phys.*, **12** (2010.), 9581–9596
38. J. L. Mergny and L. Lacroix, *Oligonucleotides*, **13** (2003), str 515–537
39. J. D. McGhee , P. H. von Hippel, *J. Mol. Biol.*, **86** (1974.), str. 469–489
40. G. Scatchard, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **51** (1949.), str. 660–672

## § 8. DODATAK

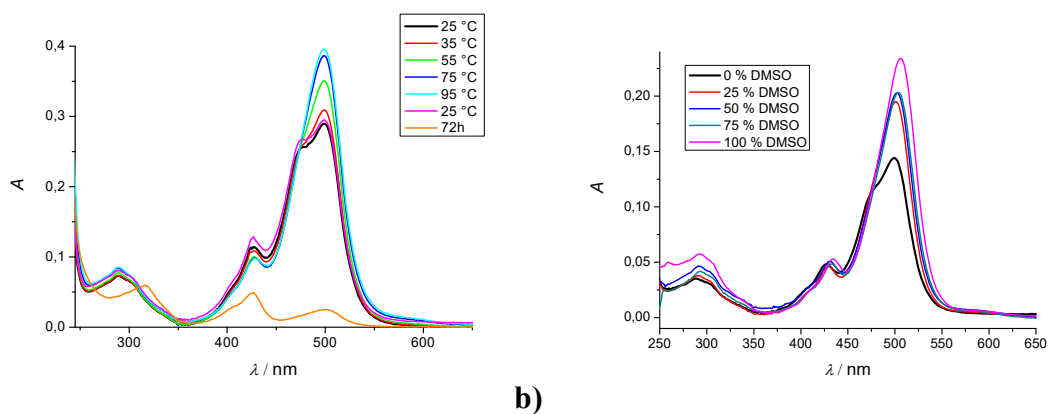
### 8.1.1. Podaci i spektri vezani uz UV/Vis spektroskopiju i termičku stabilnost spojeva **1**, **3a** i **3b**

Tablica D1. Usporedba UV/Vis spektara spojeva **1** i **3a** ( $c$  (spoj) =  $2 \times 10^{-6}$  mol dm $^{-3}$ ) u DMSO i u puferu natrijev kakodilat (pH = 7,0;  $I$  = 0,05 mol dm $^{-3}$ ) pri 25 °C

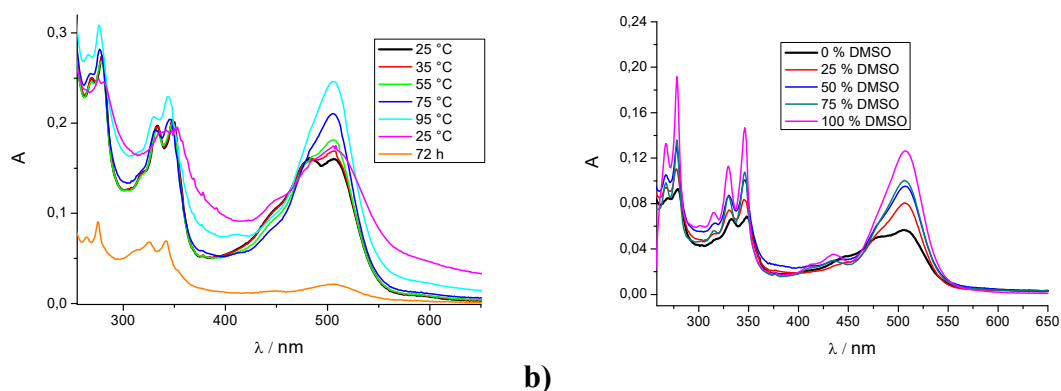


Tablica D2. Molarni apsorpcijski koeficijenti ( $\varepsilon \times 10^3 / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) spojeva **1**, **3a** i **3b** u DMSO i u puferu natrijeva kakodilata (pH = 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri različitim valnim duljinama apsorpcijskih maksimuma; valne duljine apsorpcijskih maksimuma su izražene u nm i nalaze se u zagradama uz vrijednosti  $\varepsilon$

| broj maksimuma apsorpcije | Vrsta spoja        |             |                    |             |                    |             |
|---------------------------|--------------------|-------------|--------------------|-------------|--------------------|-------------|
|                           | 1                  |             | 3a                 |             | 3b                 |             |
|                           | natrijev kakodilat | DMSO        | natrijev kakodilat | DMSO        | natrijev kakodilat | DMSO        |
| <b>1</b>                  | 63.28 (499)        | 78.76 (506) | 18.66 (510)        | 42.22 (508) | 12.26 (510)        | 34.41 (509) |
| <b>2</b>                  | 57.96 (477)        | /           | 20.31 (481)        | /           | 15.72 (481)        | /           |
| <b>3</b>                  | 25.93(427)         | 18.07 (434) | 14.29 (435)        | 12.01 (435) | 10.18 (429)        | 13.49 (433) |
| <b>6</b>                  | 15.70 (289)        | 18.62 (292) | /                  | /           | /                  | /           |
| <b>4</b>                  | /                  | /           | 33.40 (348)        | 48.61 (346) | 18.06 (343)        | 25.50 (346) |
| <b>5</b>                  | /                  | /           | 31.28 (331)        | 37.32 (330) | 18.17(329)         | 20.47 (329) |
| <b>7</b>                  | /                  | /           | 47.85 (279)        | 61.34 (278) | 29.57 (276)        | 36.64 (278) |
| <b>8</b>                  | /                  | /           | 43.21 (267)        | 41.72 (267) | /                  | /           |

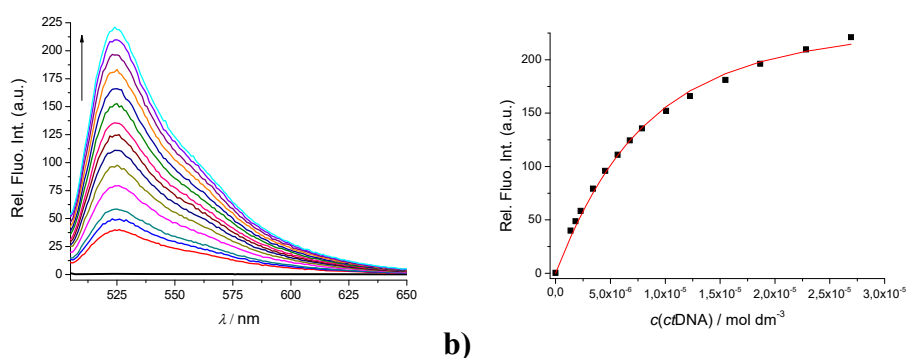


Slika D1. **a)** Ovisnost UV/Vis spektra spoja **1** ( $c = 4,5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) o temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ) u puferu natrijeva kakodilata (pH = 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ); **b)** Ovisnost UV/Vis spektra spoja **1** ( $c = 2 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ) o različitim volumnim udjelima DMSO-a u puferu natrijeva kakodilata (pH = 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$

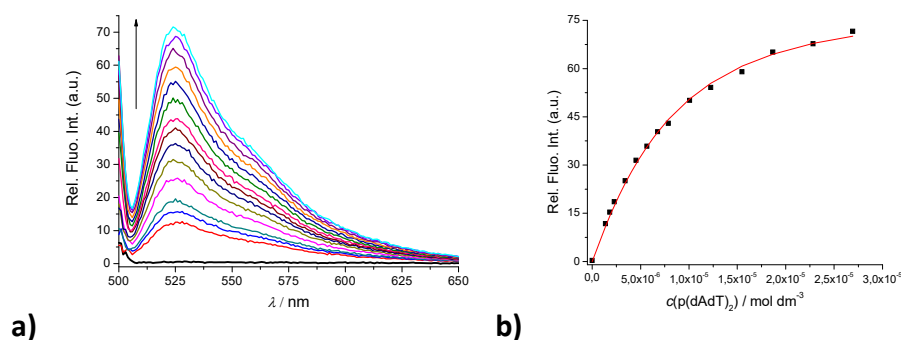


Slika D2. **a)** Ovisnost UV/Vis spektra spoja **3a** ( $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) o temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ) u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ); **b)** Ovisnost UV/Vis spektra spoja **3a** ( $c = 2 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ) o različitim volumnim udjelima DMSO-a u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$

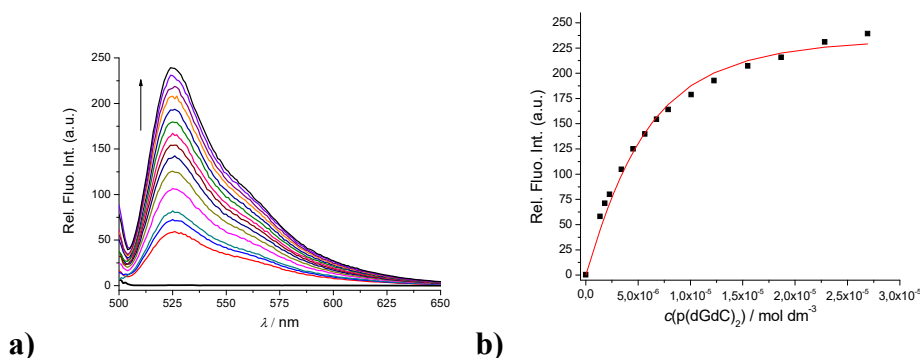
### 8.1.2. Podaci i spektri vezani uz fluorescencijsku metodu



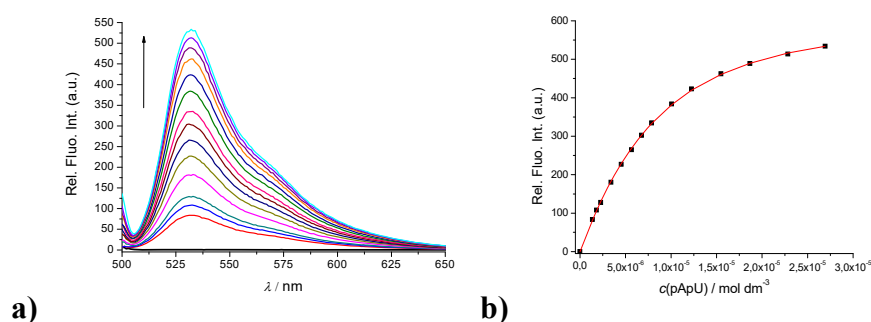
Slika D3. **a)** Promjene u fluorescencijskom spektru spoja **1** ( $c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ) tijekom titracije s *ctDNA*, uz pobudu pri  $\lambda_{\text{eks}} = 499 \text{ nm}$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ; **b)** Ovisnost relativnog fluorescencijskog inteziteta spoja **1** o koncentraciji *ctDNA* uz emisiju pri  $\lambda_{\text{em}} = 524 \text{ nm}$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$



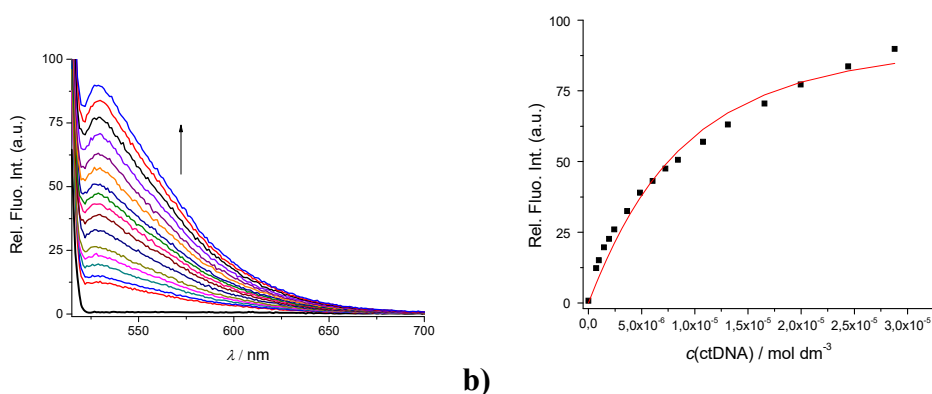
Slika D4. **a)** Promjene u fluorescencijskom spektru spoja **1** ( $c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ) tijekom titracije s  $p(\text{dAdT})_2$ , uz pobudu pri  $\lambda_{\text{eks}} = 499 \text{ nm}$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; **b)** Ovisnost relativnog fluorescencijskog inteziteta spoja **1** o koncentraciji  $p(\text{dAdT})_2$  uz emisiju pri  $\lambda_{\text{em}} = 524 \text{ nm}$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$



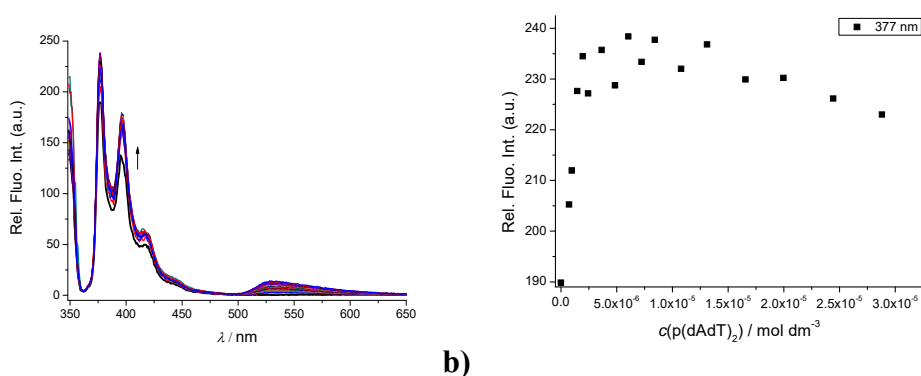
Slika D5. **a)** Promjene u fluorescencijskom spektru spoja **1** ( $c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ) tijekom titracije s  $p(\text{dGdC})_2$ , uz pobudu pri  $\lambda_{\text{eks}} = 499 \text{ nm}$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; **b)** Ovisnost relativnog fluorescencijskog inteziteta spoja **1** o koncentraciji  $p(\text{dGdC})_2$  uz emisiju pri  $\lambda_{\text{em}} = 524 \text{ nm}$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$



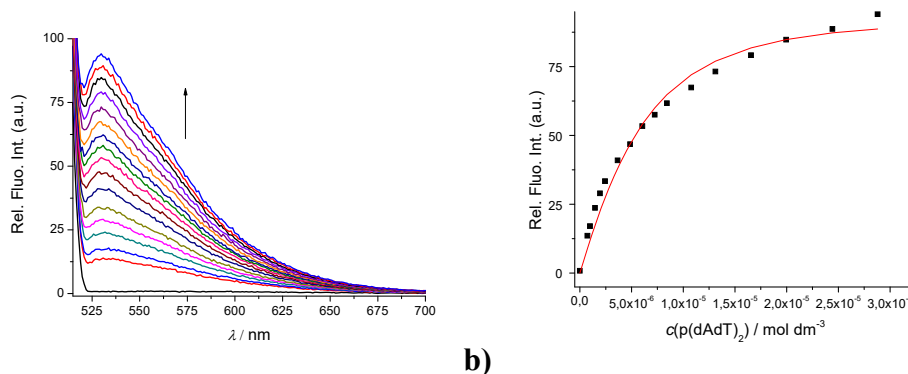
Slika D6. **a)** Promjene u fluorescencijskom spektru spoja **1** ( $c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ) tijekom titracije s  $p\text{ApU}$ , uz pobudu pri  $\lambda_{\text{eks}} = 499 \text{ nm}$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; **b)** Ovisnost relativnog fluorescencijskog inteziteta spoja **1** o koncentraciji  $p\text{ApU}$  uz emisiju pri  $\lambda_{\text{em}} = 524 \text{ nm}$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$



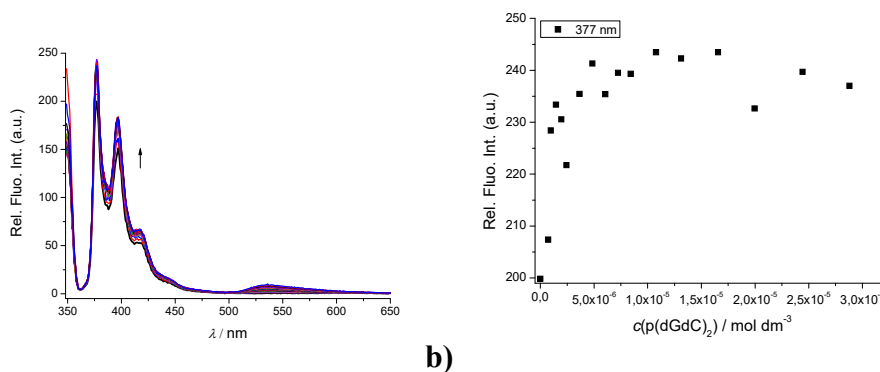
Slika D7. **a)** Promjene u fluorescencijskom spektru spoja **3a** ( $c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ) tijekom titracije s *ctDNA*, uz pobudu pri  $\lambda_{\text{eks}} = 510 \text{ nm}$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; **b)** Ovisnost relativnog fluorescencijskog inteziteta spoja **3a** o koncentraciji *ctDNA* uz emisiju pri  $\lambda_{\text{em}} = 529 \text{ nm}$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$



Slika D8. **a)** Promjene u fluorescencijskom spektru spoja **3a** ( $c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ) tijekom titracije s  $\text{p(dAdT)}_2$ , uz pobudu pri  $\lambda_{\text{eks}} = 348 \text{ nm}$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; **b)** Ovisnost relativnog fluorescencijskog inteziteta spoja **3a** o koncentraciji  $\text{p(dAdT)}_2$  uz emisiju pri  $\lambda_{\text{em}} = 377 \text{ nm}$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$

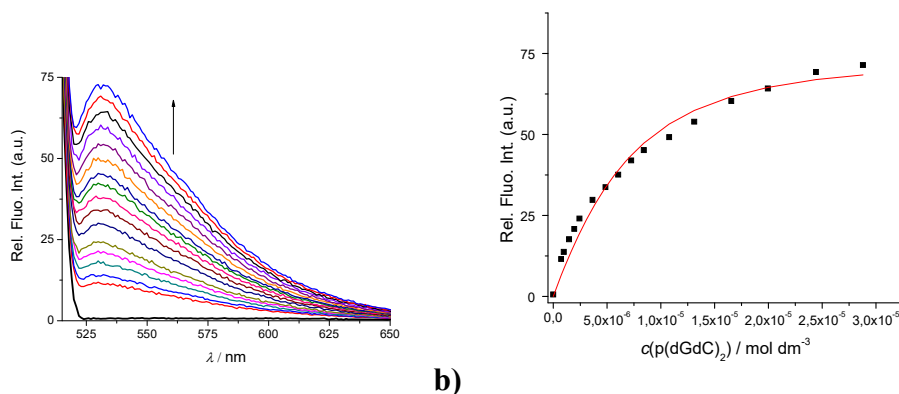


Slika D9. **a)** Promjene u fluorescencijskom spektru spoja **3a** ( $c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ) tijekom titracije s  $\text{p(dAdT)}_2$ , uz pobudu pri  $\lambda_{\text{eks}} = 510 \text{ nm}$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; **b)** Ovisnost relativnog fluorescencijskog inteziteta spoja **3a** o koncentraciji  $\text{p(dAdT)}_2$  uz emisiju pri  $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$

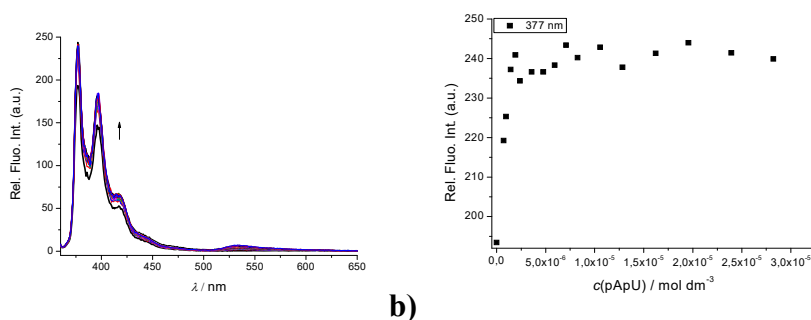


Slika D10. **a)** Promjene u fluorescencijskom spektru spoja **3a** ( $c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ) tijekom titracije s  $\text{p(dGdC)}_2$ , uz pobudu pri  $\lambda_{\text{eks}} = 348 \text{ nm}$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; **b)** Ovisnost relativnog fluorescencijskog inteziteta spoja **3a** o koncentraciji  $\text{p(dGdC)}_2$  uz emisiju pri  $\lambda_{\text{em}} = 377 \text{ nm}$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$

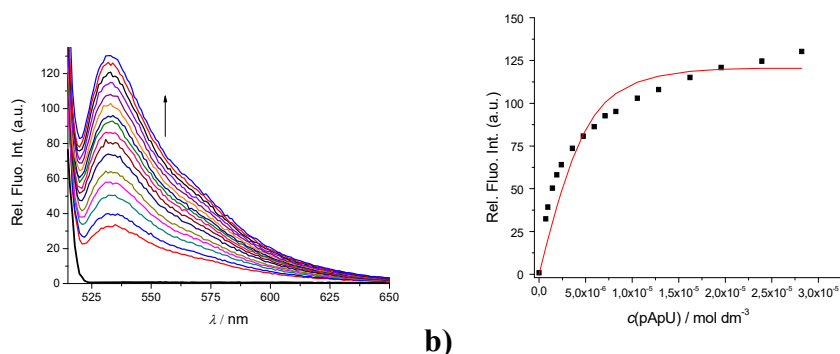




Slika D11. **a)** Promjene u fluorescencijskom spektru spoja **3a** ( $c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ) tijekom titracije s  $\text{p(dGdC)}_2$ , uz pobudu pri  $\lambda_{\text{eks}} = 510 \text{ nm}$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; **b)** Ovisnost relativnog fluorescencijskog inteziteta spoja **3a** o koncentraciji  $\text{p(dGdC)}_2$  uz emisiju pri  $\lambda_{\text{em}} = 531 \text{ nm}$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$

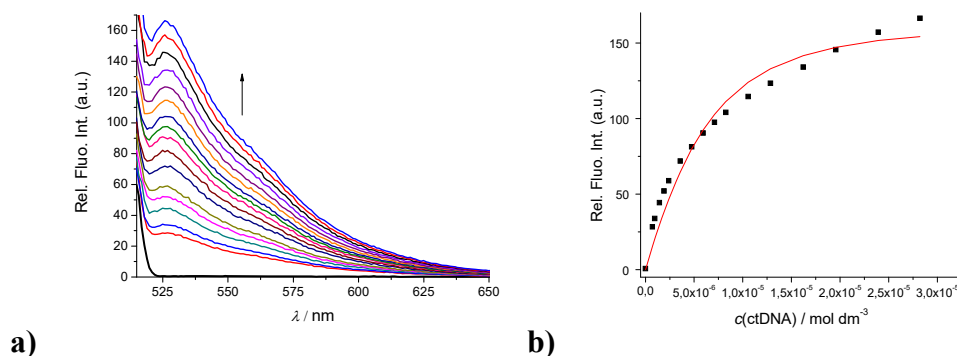


Slika D12. **a)** Promjene u fluorescencijskom spektru spoja **3a** ( $c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ) tijekom titracije s  $\text{pApU}$ , uz pobudu pri  $\lambda_{\text{eks}} = 348 \text{ nm}$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; **b)** Ovisnost relativnog fluorescencijskog inteziteta spoja **3a** o koncentraciji  $\text{pApU}$  uz emisiju pri  $\lambda_{\text{em}} = 377 \text{ nm}$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$

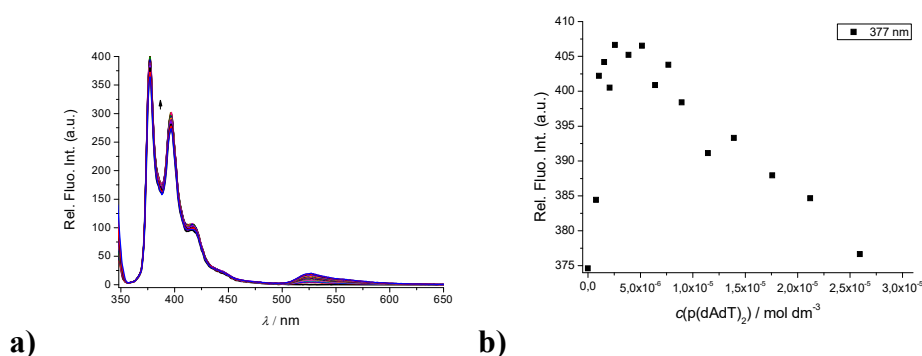


Slika D13. **a)** Promjene u fluorescencijskom spektru spoja **3a** ( $c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ) tijekom titracije s  $\text{pApU}$ , uz pobudu pri  $\lambda_{\text{eks}} = 510 \text{ nm}$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$

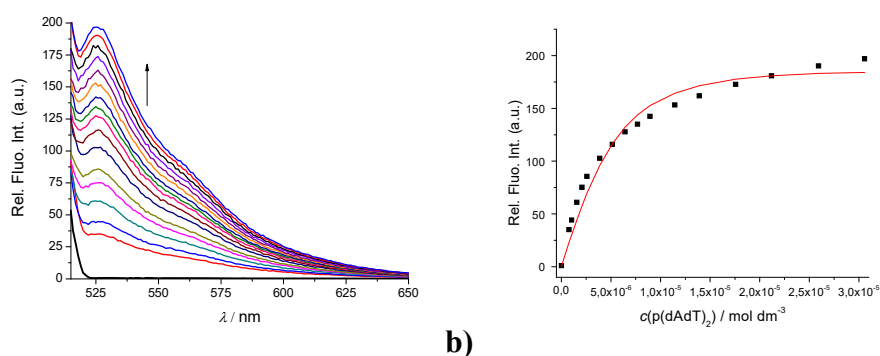
°C; **b)** Ovisnost relativnog fluorescencijskog inteziteta spoja **3a** o koncentraciji pApU uz emisiju pri  $\lambda_{em} = 533$  nm u puferu natrijeva kakodilata (pH = 7,0;  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>) pri 25 °C



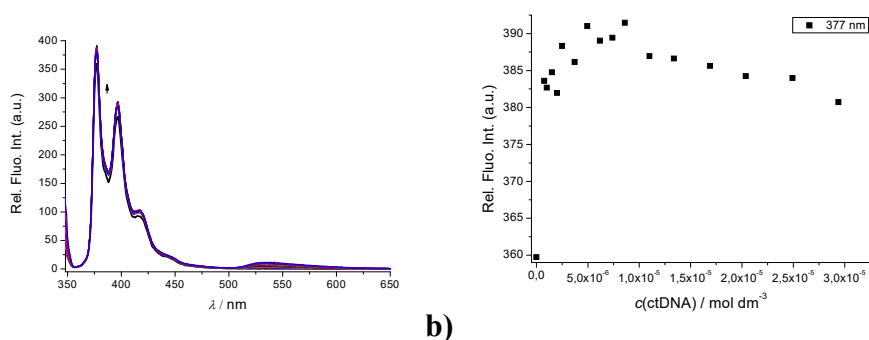
Slika D14. **a)** Promjene u fluorescencijskom spektru spoja **3b** ( $c = 5 \times 10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup>) tijekom titracije s ctDNA, uz pobudu pri  $\lambda_{eks} = 510$  nm u puferu natrijeva kakodilata (pH = 7,0;  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>) pri 25 °C; **b)** Ovisnost relativnog fluorescencijskog inteziteta spoja **3b** o koncentraciji ctDNA uz emisiju pri  $\lambda_{em} = 526$  nm u puferu natrijeva kakodilata (pH = 7,0;  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>) pri 25 °C



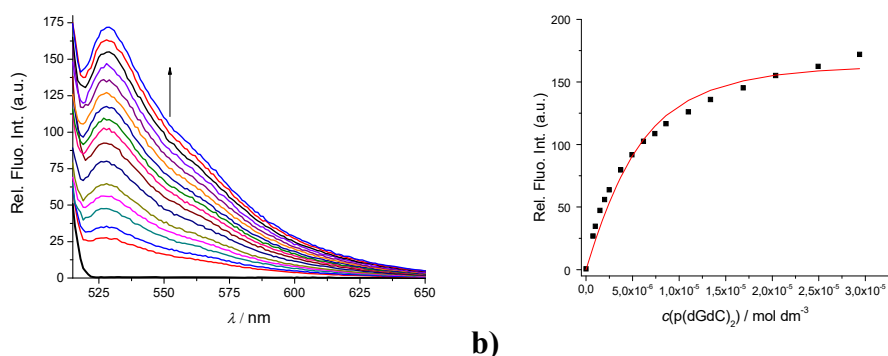
Slika D15. **a)** Promjene u fluorescencijskom spektru spoja **3b** ( $c = 5 \times 10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup>) tijekom titracije s p(dAdT)<sub>2</sub>, uz pobudu pri  $\lambda_{eks} = 343$  nm u puferu natrijeva kakodilata (pH = 7,0;  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>) pri 25 °C; **b)** Ovisnost relativnog fluorescencijskog inteziteta spoja **3b** o koncentraciji p(dAdT)<sub>2</sub> uz emisiju pri  $\lambda_{em} = 377$  nm u puferu natrijeva kakodilata (pH = 7,0;  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>) pri 25 °C



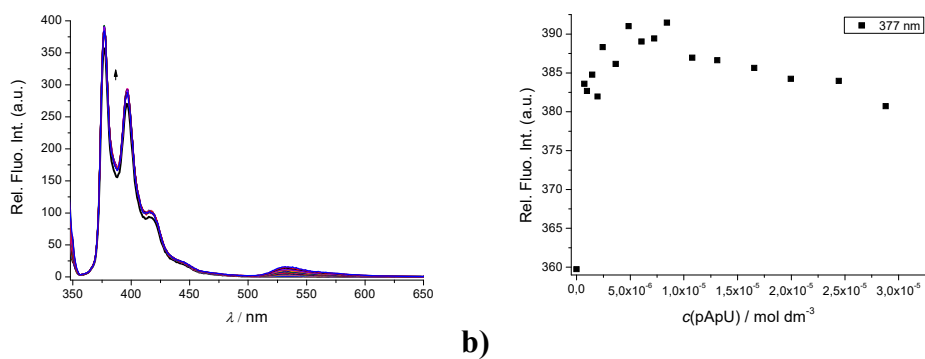
Slika D16. **a)** Promjene u fluorescencijskom spektru spoja **3b** ( $c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ) tijekom titracije s  $p(\text{dAdT})_2$ , uz pobudu pri  $\lambda_{\text{eks}} = 510 \text{ nm}$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; **b)** Ovisnost relativnog fluorescencijskog inteziteta spoja **3b** o koncentraciji  $p(\text{dAdT})_2$  uz emisiju pri  $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$



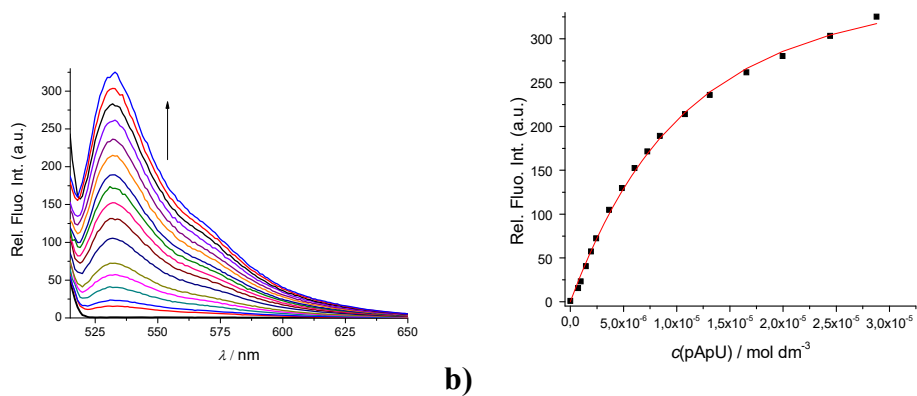
Slika D17. **a)** Promjene u fluorescencijskom spektru spoja **3b** ( $c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ) tijekom titracije s  $p(\text{dGdC})_2$ , uz pobudu pri  $\lambda_{\text{eks}} = 343 \text{ nm}$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; **b)** Ovisnost relativnog fluorescencijskog inteziteta spoja **3b** o koncentraciji  $p(\text{dGdC})_2$  uz emisiju pri  $\lambda_{\text{em}} = 377 \text{ nm}$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$



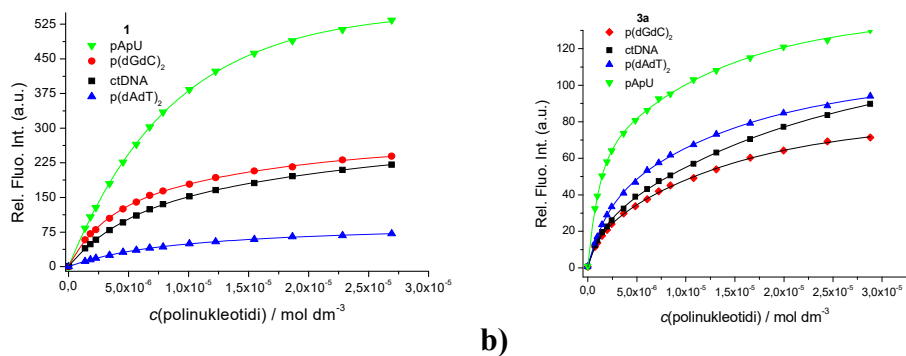
Slika D18. **a)** Promjene u fluorescencijskom spektru spoja **3b** ( $c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ) tijekom titracije s  $p(\text{dGdC})_2$ , uz pobudu pri  $\lambda_{\text{eks}} = 510 \text{ nm}$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; **b)** Ovisnost relativnog fluorescencijskog inteziteta spoja **3b** o koncentraciji  $p(\text{dGdC})_2$  uz emisiju pri  $\lambda_{\text{em}} = 529 \text{ nm}$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$



Slika D19. **a)** Promjene u fluorescencijskom spektru spoja **3b** ( $c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ) tijekom titracije s pApU, uz pobudu pri  $\lambda_{\text{eks}} = 510 \text{ nm}$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; **b)** Ovisnost relativnog fluorescencijskog inteziteta spoja **3b** o koncentraciji pApU uz emisiju pri  $\lambda_{\text{em}} = 533 \text{ nm}$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$

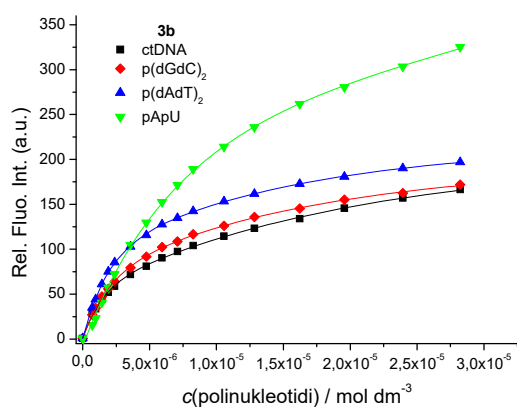


Slika D20. **a)** Promjene u fluorescencijskom spektru spoja **3b** ( $c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ) tijekom titracije s pApU, uz pobudu pri  $\lambda_{\text{eks}} = 510 \text{ nm}$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; **b)** Ovisnost relativnog fluorescencijskog inteziteta spoja **3b** o koncentraciji pApU uz emisiju pri  $\lambda_{\text{em}} = 533 \text{ nm}$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$



a)

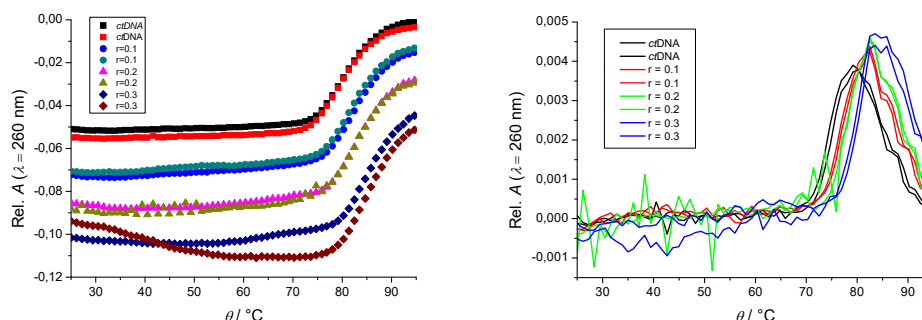
b)



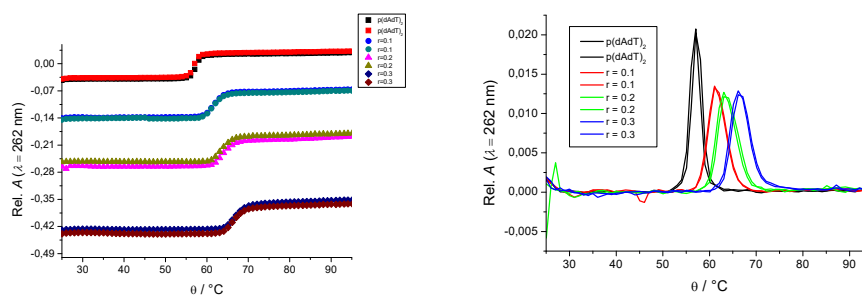
c)

Slika D21. Ovisnost relativnog fluorescencijskog inteziteta o koncentracijama spojeva: **a) 1** ( $c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ) **b) 3a** ( $c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ) i **c) 3b** ( $c = 5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ ) uslijed titracije sa sva četiri polinukleotida u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$

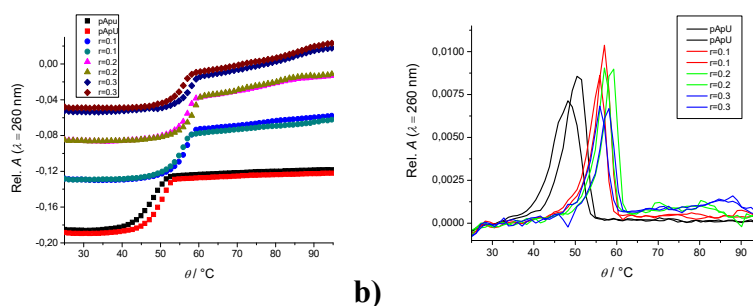
## 8.1.3. Podaci i grafovi vezane uz metodu temperaturnog mekšanja



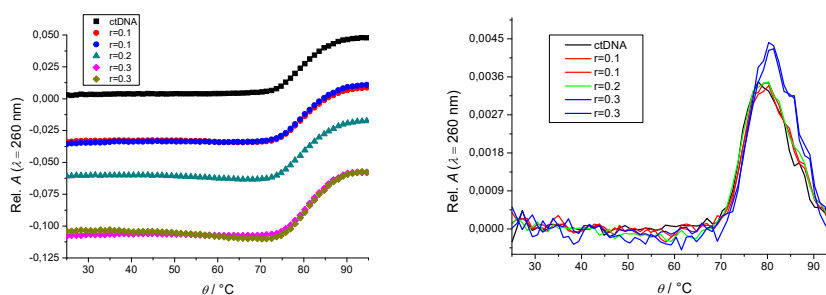
**a)** Krivulja mekšanja *ctDNA* ( $c=2 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>) nakon dodatka spoja **1** pri različitim omjerima  $r = [\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]$  u puferu natrijeva kakodilata (pH=7,0;  $I=0,05$  mol dm<sup>-3</sup>); **b)** Maksimumi prvih derivacija krivulja mekšanja *ctDNA* ( $c=2 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>) nakon dodatka spoja **1** pri različitim omjerima  $r = [\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]$  u puferu natrijeva kakodilata (pH=7,0;  $I=0,05$  mol dm<sup>-3</sup>)



**a)** Krivulja mekšanja p(dAdT)<sub>2</sub> ( $c=2 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>) nakon dodatka spoja **1** pri različitim omjerima  $r = [\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]$  u puferu natrijeva kakodilata (pH=7,0;  $I=0,05$  mol dm<sup>-3</sup>); **b)** Maksimumi prvih derivacija krivulja mekšanja p(dAdT)<sub>2</sub> ( $c=2 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>) nakon dodatka spoja **1** pri različitim omjerima  $r = [\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]$  u puferu natrijeva kakodilata (pH=7,0;  $I=0,05$  mol dm<sup>-3</sup>)



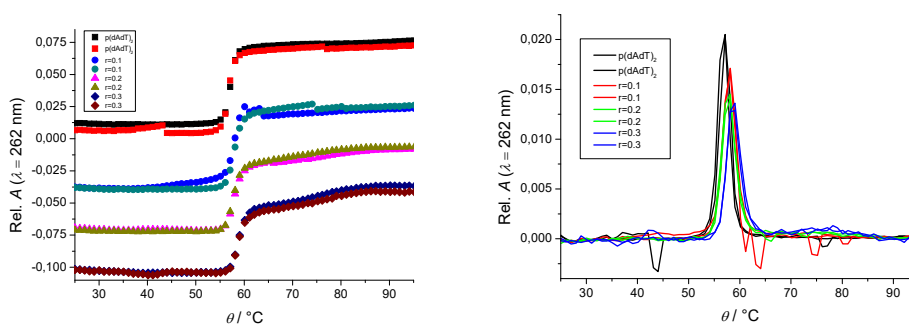
**a)** Krivulja mekšanja pApU ( $c=2 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>) nakon dodatka spoja **1** pri različitim omjerima  $r = [\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]$  u puferu natrijeva kakodilata (pH=7,0;  $I=0,05$  mol dm<sup>-3</sup>); **b)** Maksimumi prvih derivacija krivulja mekšanja pApU ( $c=2 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>) nakon dodatka spoja **1** pri različitim omjerima  $r = [\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]$  u puferu natrijeva kakodilata (pH=7,0;  $I=0,05$  mol dm<sup>-3</sup>)



a)

b)

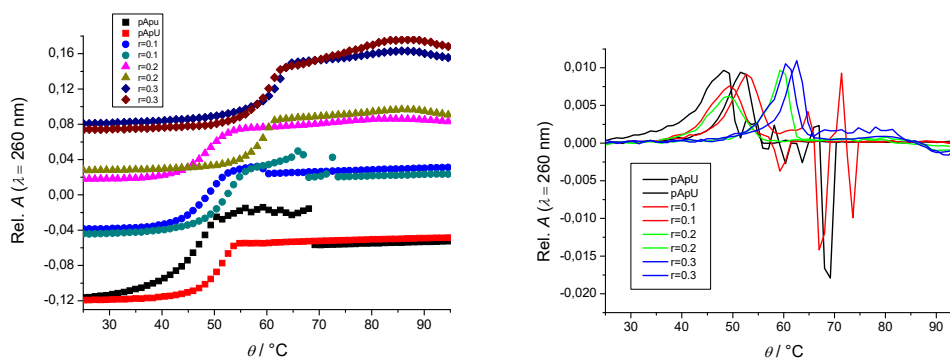
Slika D25. a) Krivulja mekšanja *ctDNA* ( $c=2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) nakon dodatka spoja **3a** pri različitim omjerima  $r=[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH}=7,0; I=0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ); b) Maksimumi prvih derivacija krivulja mekšanja *ctDNA* ( $c=2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) nakon dodatka spoja **3a** pri različitim omjerima  $r=[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH}=7,0; I=0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )



a)

b)

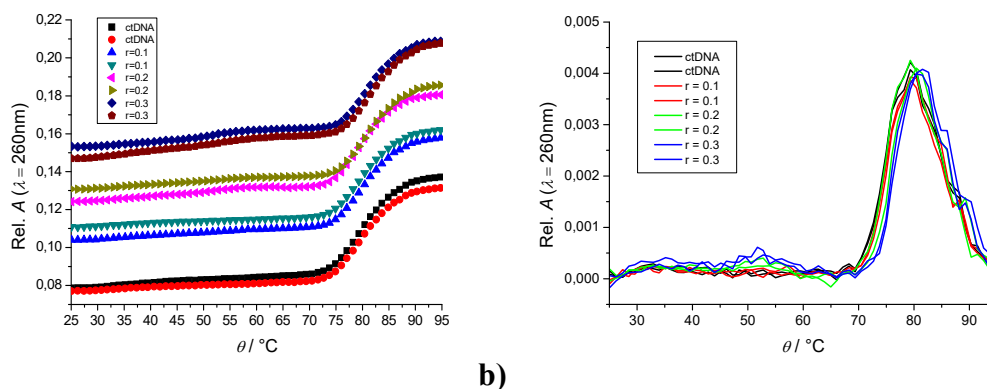
Slika D26. a) Krivulja mekšanja  $\text{p(dAdT)}_2$  ( $c=2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) nakon dodatka spoja **3a** pri različitim omjerima  $r=[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH}=7,0; I=0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ); b) Maksimumi prvih derivacija krivulja mekšanja  $\text{p(dAdT)}_2$  ( $c=2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) nakon dodatka spoja **3a** pri različitim omjerima  $r=[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH}=7,0; I=0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )



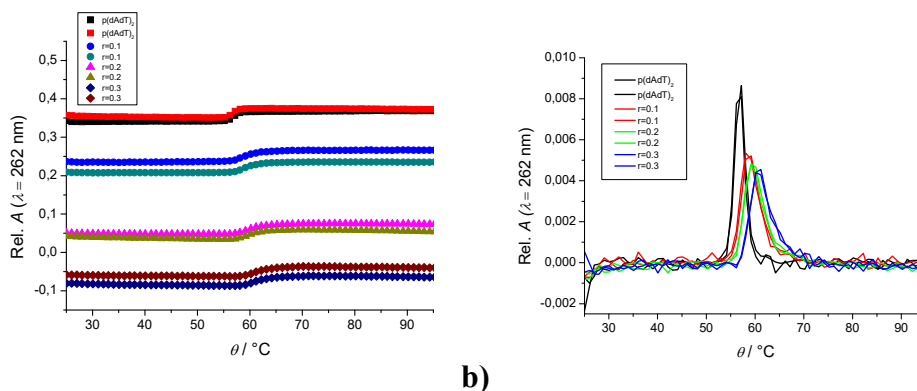
a)

b)

Slika D27. a) Krivulja mekšanja  $\text{pApU}$  ( $c=2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) nakon dodatka spoja **3a** pri različitim omjerima  $r=[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH}=7,0; I=0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ); b) Maksimumi prvih derivacija krivulja mekšanja  $\text{pApU}$  ( $c=2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) nakon dodatka spoja **3a** pri različitim omjerima  $r=[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH}=7,0; I=0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )

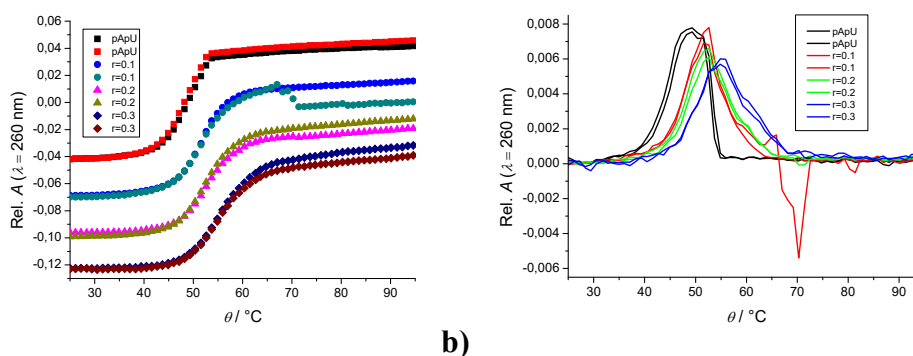


Slika D28. **a)** Krivulja mekšanja *ctDNA* ( $c=2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) nakon dodatka spoja **3b** pri različitim omjerima  $r=[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH}=7,0; I=0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ); **b)** Maksimumi prvih derivacija krivulja mekšanja *ctDNA* ( $c=2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) nakon dodatka spoja **3b** pri različitim omjerima  $r=[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH}=7,0; I=0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )



Slika D29. **a)** Krivulja mekšanja  $p(dAdT)_2$  ( $c=2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) nakon dodatka spoja **3b** pri različitim omjerima  $r=[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH}=7,0; I=0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ); **b)** Maksimumi prvih derivacija krivulja mekšanja  $p(dAdT)_2$  ( $c=2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) nakon dodatka spoja **3b** pri različitim omjerima  $r=[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH}=7,0; I=0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )





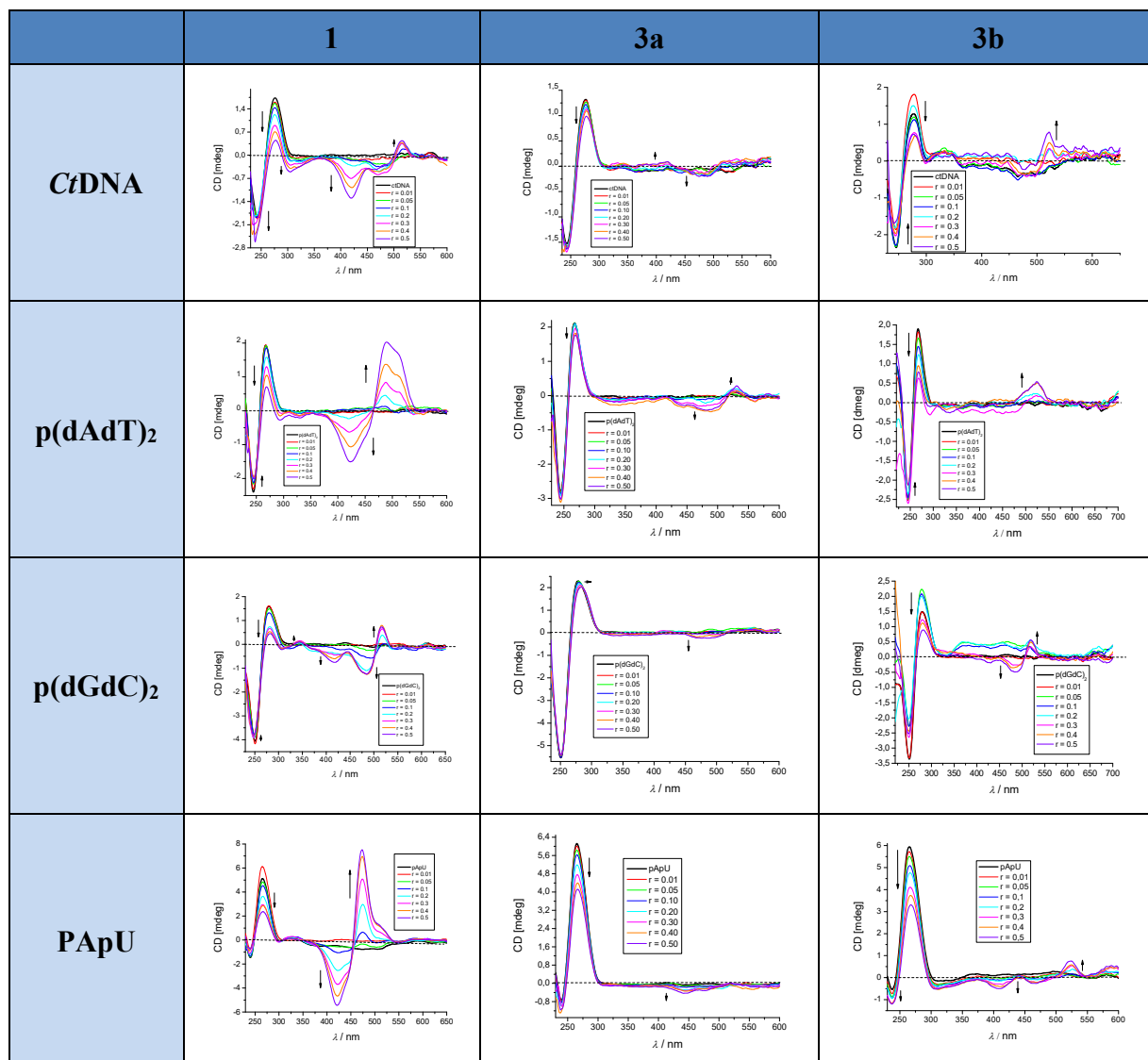
Slika D30. **a)** Krivulja mekšanja pApU ( $c=2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) nakon dodatka spoja **3a** pri različitim omjerima  $r=[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH}=7,0; I=0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ); **b)** Maksimumi prvih derivacija krivulja mekšanja pApU ( $c=2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) nakon dodatka spoja **3b** pri različitim omjerima  $r=[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH}=7,0; I=0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )

Tablica D3. Promjena temperature mekšanja  $\Delta T_m$  uslijed interakcije dvolančanih polinukleotida sa spojevima **1**, **3a** i **3b** pri različitim omjerima  $r = [\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]$  u puferu natrijeva kakodilata ( $\text{pH}=7,0; I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )

| Vrsta spoja | $r$ | $\Delta T_m / ^\circ\text{C}$ |                      |      |
|-------------|-----|-------------------------------|----------------------|------|
|             |     | <i>ct</i> DNA                 | p(dAdT) <sub>2</sub> | pApU |
| <b>1</b>    | 0,1 | 2,8                           | 4                    | 7,2  |
|             | 0,2 | 2,8                           | 6                    | 8,8  |
|             | 0,3 | 3,8                           | 9,1                  | 7,7  |
| <b>3a</b>   | 0,1 | 2,3                           | 1                    | 1,1  |
|             | 0,2 | 2,3                           | 1                    | 4,4  |
|             | 0,3 | 2,3                           | 1,9                  | 11,6 |
| <b>3b</b>   | 0,1 | 0                             | 1,5                  | 2,8  |
|             | 0,2 | 0                             | 2                    | 3,3  |
|             | 0,3 | 1,7                           | 3,5                  | 5,6  |

## 8.1.4. Podaci i spektri vezani uz metodu cirkularnog dikroizma

Tablica D4. ICD spektri spojeva **1**, **3a** i **3b** ( $c=0,25 \times 10^{-6} - 9,9 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) za sva četiri dvolančana polinukleotida ( $c=2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri različitim omjerima  $r = [\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]$



## § 9. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Marko Badovinac

Datum rođenja: 23.9.1991.

Mjesto rođenja: Karlovac

### Obrazovanje

|           |   |
|-----------|---|
| 1998–2006 | Osnovna škola Ljube Babića, Jastrebarsko  |
| 2006–2010 | Srednja škola Jastrebarsko, opća gimnazija  |
| 2010–2015 | Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu                 |
| 2015–2019 | Diplomski studij kemije, istraživački smjer, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu |

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

|      |                                |
|------|--------------------------------|
| 2013 | član Znanstvenih čarolija      |
| 2014 | Otvoreni dan Kemijskog odsjeka |

### Publikacije

1. T. Šmidlehner, M. Badovinac, I. Piantanida, *Pyrene – cyanine conjugates as multipurpose fluorescent probes for non-covalent recognition of ds-DNA, RNA and proteins*, *New J. Chem.*, **42** (2018), 6655–6663