

# Ispitivanje interakcija imidazo-piridinskih derivata s DNA i RNA spektroskopskim metodama

---

Grgić, Lea

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:567642>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijски odsjek

Lea Grgić

# **ISPITIVANJE INTERAKCIJA IMIDAZO- PIRIDINSKIH DERIVATA S DNA I RNA SPEKTROSKOPSKIM METODAMA**

## **Diplomski rad**

predložen Kemijском odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2021.



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

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



## Zahvale

*Zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Marijani Radić Stojković na svom strpljenju, razumijevanju, konstruktivnim kritikama i savjetima koji su me polako, ali sigurno doveli do kraja ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se i svima u LBIS laboratoriju na ugodnoj radnoj atmosferi i pomoći kada je ona bila potrebna.*

*Također, zahvaljujem se i mentorici prof. dr. sc. Ivi Juranović Cindrić na podršci, strpljenju i svim lijepim riječima.*

*Hvala svim mojim prijateljima koji su mi uljepšali studentske dane (a bilo ih je...).*

*Hvala mojoj zagrebačkoj obitelji na ogromnoj podršci i vjeri u mene kada je ni sama nisam imala. Hvala i Liz na svim našim šetnjicama i avanturama koje smo prošle!*

*I na kraju, hvala mojim roditeljima, Loretani i Željku i sestri Zrinki na bezuvjetnoj ljubavi, podršci i strpljenju čekajući ovaj dan. Bez vas ovo ne bi bilo moguće!*

*Veliko HVALA svima!*

*P. S....*

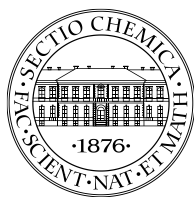


## Sadržaj

<b>SAŽETAK.....</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XI</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>2</b>
2.1. Imidazo-piridinski derivati .....	2
2.2. Struktura i svojstva nukleinskih kiselina.....	3
2.3. Vežanje malih molekula s DNA i RNA .....	5
2.4. Polinukleotidni supstrati i metode ispitivanja interakcija s DNA i RNA .....	7
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>15</b>
3.1. Materijali .....	15
3.2. Spektroskopska karakterizacija otopina ispitivanih spojeva.....	16
3.3. Istraživanje interakcija spojeva s polinukleotidima .....	17
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>19</b>
4.1. Cilj istraživanja.....	19
4.2. Spektroskopska karakterizacija spojeva .....	19
4.3. Interakcije spojeva s polinukleotidima .....	23
<b>§ 5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>33</b>
<b>§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....</b>	<b>35</b>
<b>§ 7. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>36</b>
<b>§ 8. DODATAK.....</b>	<b>XV</b>
<b>§ 9. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>XXXIV</b>







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

Diplomski rad

## SAŽETAK

### ISPITIVANJE INTERAKCIJA IMIDAZO-PIRIDINSKIH DERIVATA S DNA I RNA SPEKTROSKOPSKIM METODAMA

Lea Grgić

U ovom diplomskom radu spektroskopski su okarakterizirane vodene otopine šest derivata imidazo[4,5-b]piridina s molekulama DNA i RNA. Spojevi apsorbiraju u području 230 – 500 nm i utvrđeno je da u tom koncentracijskom području, ne agregiraju. Ispitane su interakcije spojeva s različitim dvolančanim polinukleotidima koristeći UV/Vis-spektroskopiju (termička denaturacija polinukleotida), fluorimetriju i spektroskopiju cirkularnog dikroizma (CD). Zamijećeno je da na promjenu fluorescencije u titracijama s DNA i RNA utječe položaj amino bočnih ogranaka na tetracikličkom prstenu. Na jačinu interakcije s DNA/RNA utjecali su i položaj amino bočnog ogranka i naboj liganda. Ispitivani spojevi su akiralni te nemaju CD spektar. Mjerenja CD sa spojevima s amino bočnim ogrankom na C2 položaju upućuju na mješoviti način vezanja tih derivata u DNA i RNA. Promjene u CD spektrima s piperazinskim derivatima upućuju na interkalativni način vezanja, dok kod spojeva s amino bočnim ogrankom na položaju C5 upućuju na nespecifično vezanje agregiranih spojeva uz okosnicu DNA/RNA.

(37 stranica, 22 slika, 3 tablice, 28 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: apsorbanacija, cirkularni dikroizam, fluorescencija, imidazo[4,5-b]piridini

Mentor: dr. sc. Marijana Radić Stojković, v.zn.sur.

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

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
  2. izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković
  3. prof. dr. sc. Dubravka Matković-Čalogović
- Zamjena: prof. dr. sc. Nives Galić

Datum diplomskog ispita: 23. rujna 2021.





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

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### STUDY OF THE INTERACTION OF IMIDAZO-PYRIDINE DERIVATIVES WITH DNA AND RNA BY SPECTROSCOPIC METHODS

Lea Grgić

Water solutions of six imidazo[4,5-b]pyridine derivatives with DNA and RNA were spectroscopically characterized. The compounds absorb in the 230-500 nm range and do not aggregate in that concentration range. Interactions of compounds with different double-stranded polynucleotides were studied using UV/Vis spectroscopy (thermal denaturation of polynucleotides), fluorimetry and CD spectroscopy. The change in fluorescence in the titrations with DNA and RNA was influenced by the position of the amino side pendants on the tetracyclic ring. DNA/RNA interaction strength was also influenced by the position of the amino side pendant and ligand's charge. These compounds are achiral and do not have CD spectrum. CD measurements of derivatives with an amino side pendant at the C2 position suggest a mixed binding mode to DNA and RNA. Changes in the CD spectra with piperazine derivatives indicate intercalation binding, whereas compounds with an amino side pendant at the C5 position indicate nonspecific binding of aggregated compounds along the DNA/RNA backbone.

(37 pages, 22 figures, 3 tables, 28 references, original in croatian)

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

Keywords: absorbance, circular dichroism, fluorescence, imidazo[4,5-b]derivatives

Mentor: Dr. Marijana Radić Stojković, Senior Research Associate

Supervisor: Dr. Iva Juranović Cindrić, Associate Professor

Reviewers:

1. Dr. Iva Juranović Cindrić, Associate Professor
  2. Dr. Vesna Petrović Peroković, Associate Professor
  3. Dr. Dubravka Matković-Čalogović, Associate Professor
- Substitute: Dr. Nives Galić, Associate Professor

Date of exam: September 23rd 2021.





## § 1. UVOD

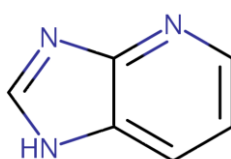
Otkrićem nukleinskih kiselina i njihovih bioloških funkcija ustanovljena je veza između poremećaja njihove građe i raznih bolesti, na primjer tumora i genetski prenosivih bolesti. Molekulske interakcije s nukleinskim kiselinama intenzivno se istražuju zbog njihove velike primjene u medicini i biokemiji.<sup>[1]</sup> Male, organske molekule mogu se nekovalentno vezati na prirodne i sintetske molekule DNA i RNA interkaliranjem, vezanjem u mali ili u veliki utor polinukleotida, te elektrostatskim vezanjem pozitivno nabijenih molekula uz fosfatnu okosnicu. Interakcija malih organskih molekula s DNA i RNA može biti jedan od mogućih mehanizama biološkog djelovanja. Stoga bi istraživanje interakcija novosintetiziranih spojeva s nukleinskim kiselinama moglo doprinijeti liječenju mnogih vrsta tumora.<sup>[2]</sup>

U ovom diplomskom radu spektroskopski je okarakterizirano šest novosintetiziranih derivata imidazo[4,5-b]piridina i istražene su njihove interakcije s molekulama DNA i RNA. Derivati se međusobno razlikuju prema tipu i položaju bočnih ogranaka sa amino skupinama i prema položaju dušikovog atoma u piridinskoj jezgri. Utvrđeno je da je u sličnim derivatima, položaj dušikovog atoma u piridinskom prstenu imao značajni utjecaj na poboljšanje antiproliferativne aktivnosti.<sup>[3,4]</sup> Interakcije novosintetiziranih spojeva s polideoksiribonukleotidima i poliribonukleotidima ispitane su UV/Vis spektrofotometrijskim metodama i fluorescencijskom spektroskopijom te spektroskopijom cirkularnog dikroizma (CD).

## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Imidazo-piridinski derivati

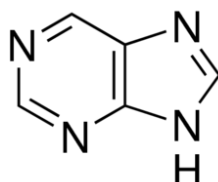
Imidazo[4,5-b]piridin je heterociklički spoj aromatskog karaktera molekulske formule  $C_6H_5N_3$ . Sastoji se od dva heterociklička prstena, imidazolski prsten je kondenziran na piridinsku jezgru (slika 1).<sup>[5]</sup>



Slika 1. Strukturna formula imidazo[4,5-b]piridina

Imidazopiridini i njegovi derivati predmet su brojnih istraživanja zato što posjeduju različite kemijske i farmakološke značajke koje im pružaju razna biološka svojstva poput antikancerogenih, antimikrobnih, antivirusnih, protuupalnih i drugih aktivnosti, a navedene aktivnosti ovise o broju i vrsti supstituenata vezanih na jezgru.<sup>[6]</sup> Derivati imidazo[4,5-b]piridina, kao male molekule, pokazuju inhibitorno djelovanje na specifične enzime vezane uz karcinogenezu. Kao tetraciklički derivati mogu antitumorsko djelovanje ostvariti i interkaliranjem. Imidazo[4,5-b]piridin je strukturni analog purina čiji derivati lako stupaju u interakciju s velikim biomolekulama poput RNA, DNA i različitih proteina.<sup>[7]</sup>

Purin je heterociklički aromatski spoj, molekulske formule  $C_5H_4N_4$ , koji nastaje kondenzacijom pirimidina i imidazola, a aromatski karakter posljedica je konjugiranih veza te ih to čini najstabilnijim spojevima u prirodi (slika 2).<sup>[8]</sup>



Slika 2. Strukturna formula purina

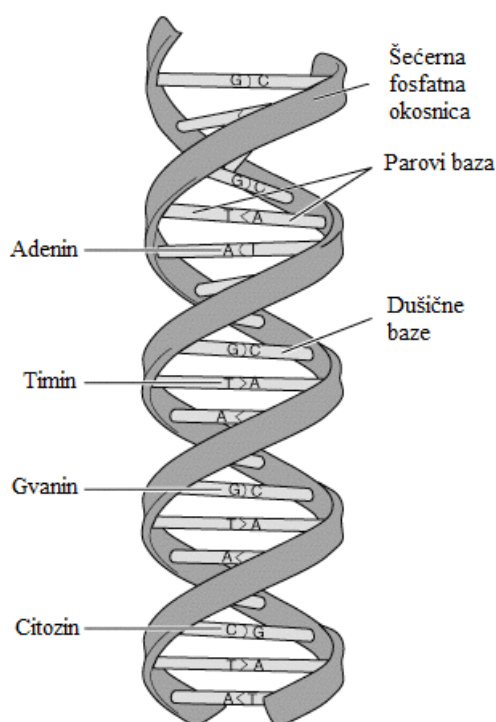


Adenin i gvanin su purinske baze prisutne u nukleotidima, gradivnim jedinicama RNA i DNA. Adenin i gvanin u DNA i RNA sparuju se s komplementarnim pirimidinskim bazama-citozinom, timinom i uracilom.<sup>[9]</sup>

## 2.2. Struktura i svojstva nukleinskih kiselina

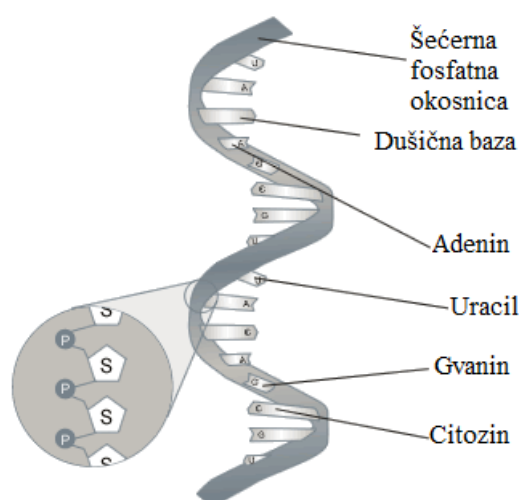
Nukleinske kiseline, gradivni blokovi svih živih organizama, su dugolančani polimeri sastavljeni od nukleotida. To su složene organske makromolekule koje nose nasljednu informaciju za sintezu svih proteina te tako izravno ili neizravno kontroliraju strukturu i funkciju stanice.<sup>[9]</sup>

Postoje dvije vrste nukleinskih kiselina: deoksiribonukleinska kiselina (DNA) i ribonukleinska kiselina (RNA). Lanac DNA sastoji se od tisuća ponovljenih parova nukleotida, od kojih se svaki sastoji od šećera pentoze (deoksiriboza), fosfatne skupine i dušične baze. Dušične baze su klasificirane kao pirimidini s jednim prstenom, citozin (C) i timin (T) i purini s dvostrukim prstenom, adenin (A) i gvanin (G).<sup>[9]</sup> Vodikovim vezama povezuju se komplementarni dušični parovi baza (A-T i G-C) kako bi postigli strukturu karakteristične dvostruke zavojnice DNA. Adenin se uvijek sparuje s timinom pomoću dvije vodikove veze, a gvanin s citozinom preko tri vodikove veze. Svaka dušična baza pričvršćena je na vanjsku okosnicu šećer pentoza-fosfata s bazama usmjerenim unutar lanca (slika 3). Nukleotidi su povezani spajanjem fosfatne skupine na 5' ugljiku jednog nukleotida s 3' hidroksilnom skupinom sljedećeg, komplementarni lanac ide u smjeru 3' prema 5', koji lancu DNA osigurava polaritet. Lanci su antiparalelni te takve parove zovemo Watson-Crickovim parovima baza.<sup>[10]</sup> Lanci u dvostrukoj zavojnici su međusobno komplementarni. Iako su same dušične baze hidrofobne molekule, usmjerenost okosnice šećer-fosfat rezultira strukturom topivom u vodi. Dvostruka zavojnica DNA je jako kisela s velikom gustoćom negativnih naboja.<sup>[9]</sup>



Slika 3. Shematski prikaz strukture deoksiribonukleinske kiseline

Uz DNA i proteine, RNA je također važna biološka makromolekula. Ribonukleinske kiseline jednolančane su molekule (slika 4). Nukleotidi koji grade RNA sastoje se od pentoze (riboza), a timin je zamijenjen dušičnom bazom uracilom (U). Također služe kao prenositelji genetičke informacije u biosintezi proteina. Tri su osnovna tipa RNA u živim stanicama: ribosomska RNA (rRNA), transportna (tRNA) i glasnička RNA (mRNA). Molekule RNA nastaju transkripcijom DNA pomoću enzima koji se nazivaju RNA-polimeraze. Ribonukleinska kiselina može djelovati i kao enzim za ubrzanje kemijskih reakcija. RNA također igra veliku ulogu u regulaciji staničnih procesa – od diobe stanica, diferencijacije i rasta do starenja i apoptoze. <sup>[8,9]</sup>

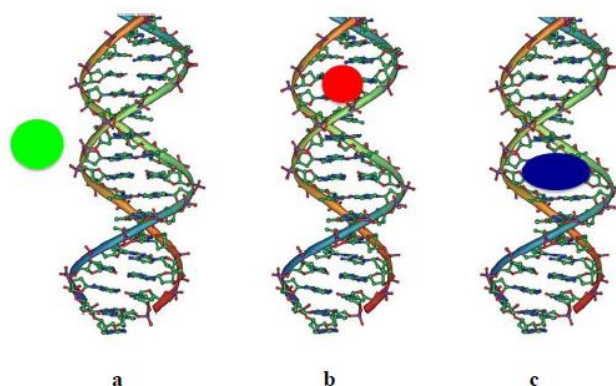


Slika 4. Shematski prikaz strukture ribonukleinske kiseline

### 2.3. Vežanje malih molekula s DNA i RNA

Interakcijama malih organskih molekula s nukleinskim kiselinama može se razjasniti djelovanje prirodnih i sintetskih lijekova na DNA/RNA, kao i kontrola osnovnih funkcija DNA *in vivo* i *in vitro* radi primjene u dijagnostici te potencijalno genskoj terapiji.<sup>[2]</sup>

Interakcije organskih molekula s nukleinskim kiselinama dijele se na nepovratne (nastaju kovalentni kompleksi) i ravnotežne (nastaju nekovalentni kompleksi). Ravnotežne, nekovalentne interakcije uključuju nastajanje stabilnog termodinamičkog kompleksa. Razlikuju se tri vrste nekovalentnih interakcija malih organskih molekula s DNA ili RNA: elektrostatske interakcije polikationskih spojeva s negativno nabijenim fosfatima polinukleotida, vežanje spojeva u manji utor DNA/RNA te umetanje između parova baza odnosno interkaliranje (slika 5).<sup>[2]</sup>

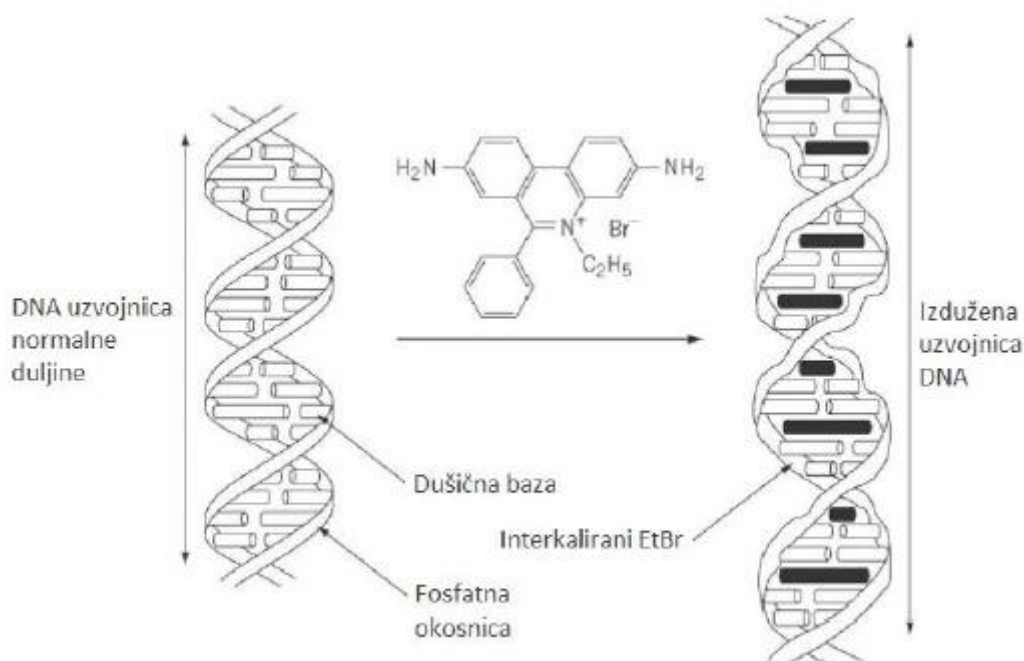


Slika 5. Načini vežanja malih molekula na polinukleotide: a) elektrostatske interakcije, b) vežanje u mali utor DNA, c) interkalacija u DNA

Elektrostatsko vezanje kationa na negativno nabijenu fosfatnu okosnicu DNA ili RNA je nespecifično vezanje. U otopini se kationi elektrostatski vežu na nukleinske kiseline koje neutraliziraju naboj okosnice. Interakcija ion-ion najvećeg je dometa od svih nekovalentnih interakcija te se na molekule često dodaju pozitivno nabijeni dijelovi čija je funkcija zbližavanje molekula DNA i RNA.<sup>[10]</sup>

Mali i veliki utori su važno strukturno svojstvo polinukleotida. Utori, zavisno o slijedu, imaju različite potencijale sudjelovanja u vodikovim vezama kao donori ili akceptori vodika.<sup>[11]</sup> Vezanje u mali utor nema definiran broj veznih mjesta na polinukleotidu i osjetljivije je od interkaliranja jer se dijelovi baza dA-dT i dG-dC koji čine mali utor razlikuju. Par baza dG-dC čini plići utor, a gvanin ima i amino skupinu koja strši u utor i sterički otežava vezanje molekule pa molekule koje se vežu u manji utor uglavnom pokazuju selektivnost prema paru baza dA - dT.<sup>[12]</sup> Mnogi antibiotici i antitumorski lijekovi predmet su istraživanja jer se njihovo ljekovito djelovanje temelji na tom načinu vezanja.

Umetanje molekula između parova baza polinukleotida tj. interkaliranje stabilizira i ukrućuje polinukleotidni lanac pri kojem dolazi do produljenja uzvojnice, ali i njenog odvijanja i deformacije.<sup>[13]</sup> Takav način vezanja ima ključnu ulogu u primjeni antitumorskih lijekova te pojedinih antibiotika. Interkalacija je poseban tip interakcije specifičan za planarne aromatske prstene. Interkalator se umetne između susjednih parova baza, u paralelnoj orijentaciji.  $\pi$ - $\pi$  interakcija do koje dolazi između sličnih parova baza je energetska nepovoljna zbog odmatanja uzvojnice i odvajanja parova baza. Međutim, ipak je takvo vezanje stabilno zbog hidrofobnog i elektrostatskog doprinosa vezanja, a i van der Waalsovih interakcija. Interkaliranjem dolazi do odmatanja uzvojnice DNA, razmicanja dušičnih baza i produljenja nukleinske kiseline. Etidijev bromid je najpoznatiji predstavnik te vrste vezanja.<sup>[2,10]</sup> Karakteristika interkalativnog vezanja je princip isključenja susjeda prema kojem ne smije doći do umetanja molekula u šupljinu pokraj već umetnute molekule (slika 6).



Slika 6. Princip isključenja susjeda

Interkalator svojom veličinom razmakne nukleobaze koje ga okružuju i sprječava ubacivanje drugih molekula u susjednu šupljinu dvolančane uzvojnice. Time se definira maksimalni omjer molekula spoja i veznih mjesta, odnosno fosfata na polinukleotidu, koji je jedna molekula spoja na četiri fosfata. Taj omjer se označava kao  $n$ , te se koristi u razlikovanju interkaliranja od drugih načina vezanja.<sup>[14]</sup> Posebnu vrstu interkalatora čine bis-interkalatori koji se sastoje od povezanih konjugiranih aromatskih sustava. Poveznica mora biti dovoljno dugačka da preskoči par baza zbog principa isključenja susjeda, tako da se oba aromata mogu umetnuti između baza.<sup>[15]</sup>

Spojevi koji ostvaruju interakcije s polinukleotidima predmet su istraživanja mnogih antitumorskih i mikrobioloških studija. Vezanjem spojeva na polinukleotide dolazi do promjene u njihovoj strukturi što dovodi i do promjene u biološkoj aktivnosti kao posljedice vezanja na DNA.<sup>[1]</sup>

#### 2.4. Polinukleotidni supstrati i metode ispitivanja interakcija s DNA i RNA

Male, organske molekule nekovalentno se vežu na prirodne i sintetske polinukleotide. Glavna karakteristika prirodnih polinukleotida je nasumičnost slijeda nukleotida koje sadrže. Najčešće korišten prirodni polinukleotid, s otprilike 40 % udjela G-C parova baza i 60 % udjela parova

baza A-T, je DNA telećeg timusa, odnosno ctDNA (*calf thymus* DNA) čiji redoslijed baza nije poznat. U različitim uvjetima vodene otopine u kojoj se nalaze, kao što su temperatura, pH te ionska jakost, prirodni polinukleotidi mogu poprimiti različite konformacije. Varijabilnost njihove strukture onemogućava precizno određivanje specifičnosti i selektivnosti vezanja.<sup>[1,16]</sup>

Zbog mogućnosti organske sinteze nukleinskih kiselina, a samim time i postizanja željene strukture, određene tipom šećera i slijedom nukleotida, sintetski polinukleotidni supstrati su nezamjenjivi u ispitivanju nekovalentnih interakcija malih organskih molekula s molekulama nukleinskih kiselina. Za sintetske polinukleotide, čiji je redoslijed baza poznat, koriste se homopolinukleotidi (osnovne strukture poli X – poly Y) i alternirajući polinukleotidi (osnovne strukture poli XY – poli XY).

Razlikujemo jednolančane i dvolančane polinukleotide, a dvolančani se dijele na već spomenute homopolinukleotide i alternirajuće polinukleotide. Jednolančani polinukleotidi su homopolimeri od 100 do 200 kopija ribonukleotida ili dekosiribonukleotida. Dvolančani se sastoje od dva komplementarna lanca prema shemi poli X – poli Y (A-U, G-C, dA-dT, dG-dC). Alternirajući se sastoje od jednakih lanaca sa dva različita komplementarna nukleotida koji se izmjenjuju u jednom lancu te su komplementarni prema shemi poli XY – poli XY (dAdt - dAdT, dGdC - dGdC). Alternirajući polinukleotidi su stabilniji i koriste se kada pri određenim uvjetima ili prilikom vezanja nekih spojeva, dvolančane uzvojnice postaju trostruke ili druge složene strukture što smanjuje pouzdanost usporedbe afiniteta ispitivanog spoja prema različitim polinukleotidima.<sup>[1,16]</sup>

Spektroskopske metode su najčešće korištene za ispitivanje interakcija s DNA i RNA i imaju najviše različitih izvedbi. Uobičajeno se koristi IR (u infracrvenom dijelu spektra), UV/Vis (u ultraljubičastom i vidljivom dijelu spektra) i Raman spektroskopija, fluorimetrija, spektroskopija linearnog i cirkularnog dikroizma i dr.<sup>[1]</sup>

Za ispitivanje nekovalentnih interakcija koriste se eksperimentalne metode poput: promjene viskoziteta otopine DNA/RNA, promjena sedimentacijskog koeficijenta ili elektroforetske pokretljivosti cirkularne DNA, promjene temperature mekšanja dvostruke zavojnice nakon vezanja spoja, UV/Vis, <sup>1</sup>H NMR (koji daje visoku rezoluciju i omogućava uvid u dinamiku pojedinačnih atoma) i fluorescencijska spektroskopija te spektroskopija cirkularnog dikroizma.

U tekstu će se opisati metode korištene u eksperimentalnom dijelu ovog diplomskog rada: promjene temperature mekšanja dvostruke zavojnice nakon vezanja spojeva, UV/Vis i fluorescencijska spektroskopija te spektroskopija cirkularnog dikroizma.

#### 2.4.1. UV/Vis spektroskopija

Ultraljubičasta – vidljiva spektroskopija (engl. *ultraviolet-visible spectroscopy*, UV/Vis) je jedna od najkorištenijih metoda za identifikaciju i određivanje organskih i anorganskih spojeva koji apsorbiraju ultraljubičasto ili vidljivo zračenje. UV/Vis spektroskopija je apsorpcijska spektroskopija kod koje uslijed pobude elektrona atoma ili molekula u elektromagnetnom zračenju dolazi do prijelaza elektrona iz osnovnog u pobuđeno elektronsko stanje. Elektroni iz dvostrukih i trostrukih veza organskih spojeva nisu snažno vezani pa se lakše pobuđuju. U apsorpcijskoj spektroskopiji mjeri se količina apsorbirane svjetlosti kao funkcija valne duljine. Tako se dobivaju i kvalitativni i kvantitativni podaci o uzorku. Prednost ove metode su široka primjenjivost, visoka osjetljivost, točnost i jednostavnost.<sup>[1,17]</sup>

UV/Vis metoda uključuje određivanje spektroskopskih parametara spoja od kojih je najvažniji molarni apsorpcijski koeficijent prema Beer-Lambertovu zakonu, određivanje vremenske i temperaturne stabilnosti spoja u otopini, najčešće puferu, te praćenje apsorpcijskih promjena prilikom titracije male organske molekule s polinukleotidom i određivanje promjene točke mekšanja polinukleotida. Beer-Lambertov zakon glasi:

$$A = \varepsilon c l$$

gdje  $A$  označava apsorbanciju,  $\varepsilon$  molarni apsorpcijski koeficijent ( $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ),  $c$  molarnu koncentraciju ( $\text{mol dm}^{-3}$ ) te  $l$  duljinu optičnog puta (cm).

Dodatkom polinukleotida, spektroskopska krivulja liganda može biti jačeg ili slabijeg intenziteta (hiperkromni ili hipokromni efekt) te se može pomaknuti prema manjoj ili većoj valnoj duljini, takvi pomaci se nazivaju hipsokromni ili batokromni pomaci. Takve karakteristične promjene mogu ukazati na određene interakcije koje se javljaju u kompleksu ligand – polinukleotid. Batokromni pomak i hipokromni efekt spektra liganda su karakteristični za  $\pi$ - $\pi$  interakcije koje se javljaju slaganjem aromatskih jezgara jednih na drugu.<sup>[18]</sup> DNA ne apsorbira u vidljivom spektru za razliku od većine heterocikličkih molekula. Dodani polinukleotidi mogu pomaknuti spektar liganda prema većim valnim duljinama ili ako dolazi do dimerizacije ili agregacije, prema manjim valnim duljinama. Ako se na spektru liganda po dodatku polinukleotida očituje pad apsorpcijskog maksimuma, tada se vezani ligand vjerojatno

nalazi u manje polarnom okruženju nego slobodni ligand. Takav slučaj mogao bi biti prilikom interkaliranja.<sup>[10]</sup>

Ovom metodom možemo dobiti informacije o konstanti stabilnosti kompleksa spoja i polinukleotida te omjer koncentracije vezanog spoja i koncentracije veznih mjesta na polinukleotidu. Ti se podaci dobivaju obradom spektra prema Scatchardovoj izotermi:

$$\frac{r}{c_v} = k_s(n - r)$$

u kojoj  $r$  predstavlja omjer efektivnih koncentracija spoja i polinukleotida,  $c_v$  koncentraciju interkaliranog spoja,  $K_s$  konstantu stabilnosti kompleksa spoja i polinukleotida, te  $n$  omjer koncentracija vezanog spoja i veznih mjesta na polinukleotidu. Scatchardova jednadžba je linearna prilagodba Langmuirove izoterme za površinsku adsorpciju na polinukleotide.<sup>[2]</sup>

UV/Vis spektrofotometar je uređaj koji mjeri omjer intenziteta zračenja koje prolazi kroz uzorak ( $I$ ) i intenziteta upadnog zračenja ( $I_0$ ). Omjer  $I/I_0$  se naziva propusnost ili transmitancija i obično se izražava u obliku postotka (%T). Apsorbancija,  $A$ , može se prikazati izrazem:

$$A = -\log(\%T/100\%)$$

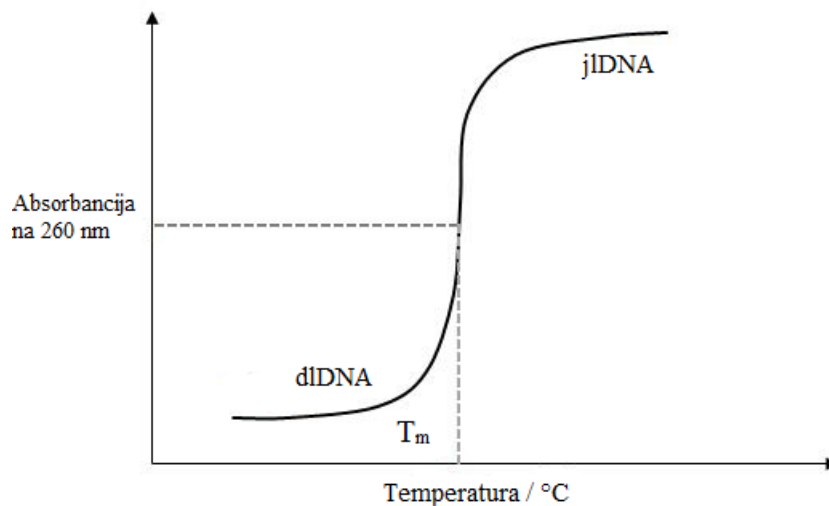
#### 2.4.2. Promjena temperature mekšanja nukleinskih kiselina

Unutar dvolančane zavojnice DNA ostvaruju se vodikove veze preko dušičnih veza. Povišenjem temperature lanci se mogu razdvojiti pri čemu dolazi do destabilizacije, pucanja vodikovih veza i odvajanja lanaca. Do toga dolazi grijanjem otopine DNA ili dodatkom kiseline ili lužine što dovodi do ionizacije baza.<sup>[20]</sup> Razdvajanje dvostruke uzvojnice događa se pri određenoj temperaturi. Temperatura mekšanja ( $T_m$ ) definira se kao točka mekšanja pri kojoj se približno pola dvolančane uzvojnice razdvojilo (slika 7).<sup>[20]</sup> Pri spektroskopskom promatranju primjećuje se povišenje apsorbancije otopine koje se objašnjava apsorbancijom slobodnih dušičnih baza. Taj se efekt zove hiperkromni efekt i kod genske i DNA iz telećeg timusa se događa iznad  $T_m = 80$  °C.<sup>[14,19,21]</sup>

Denaturacijom molekule DNA mijenja se i njena apsorbancija. Dušikove baze apsorbiraju svjetlost u ultraljubičastom dijelu spektra. Nakon denaturacije one nisu gusto složene pa apsorbiraju oko 40 % više svjetlosti na svim valnim duljinama u ultraljubičastom dijelu spektra. Taj učinak denaturacije na apsorpcijski spektar se zove hiperkromizam.



Denaturacija zavojnice je kooperativan proces jer razdvajanje zavojnice na jednom mjestu jako destabilizira ostatak zavojnice i potiče njenu daljnju denaturaciju. <sup>[19]</sup>



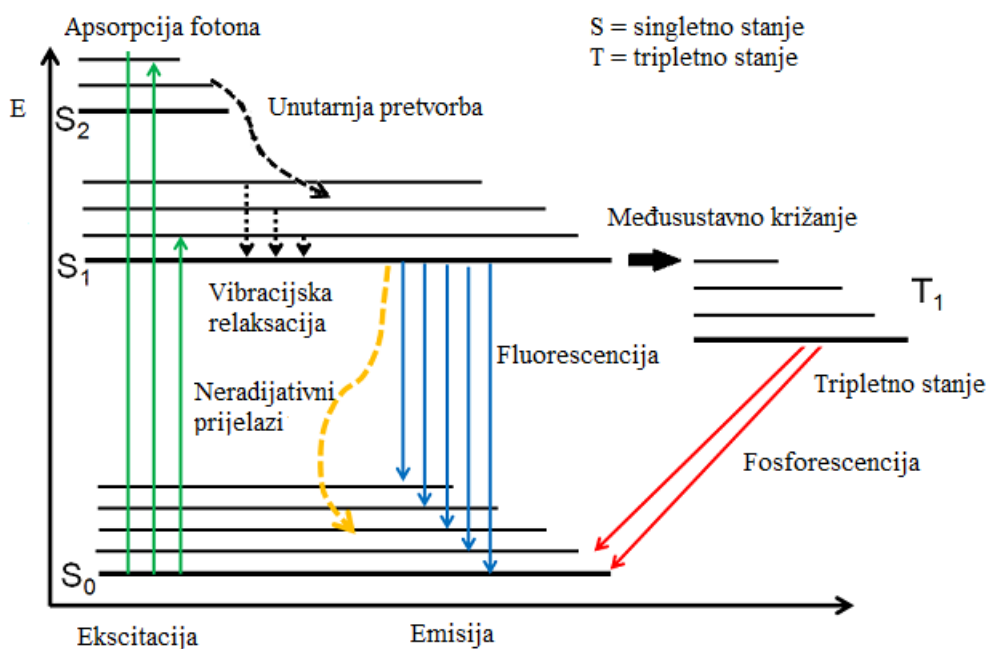
Slika 7. Temperatura mekšanja DNA

Praćenje promjene temperature mekšanja u ovisnosti o omjeru koncentracija daje informacije o načinu vezanja. Ako kod interkaliranja dolazi do zasićenja veznih mjesta na omjeru  $r = 0,25$  ( $r = [\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]$ ), onda iznad tog omjera odnos povećanja temperature mekšanja i povećanja omjera više nije linearan, temperatura ne raste više iznad tog omjera. Kod molekula koje se vežu u manji utor i kod omjera  $r$  većih od 0,25 temperatura mekšanja može rasti ili čak linearno padati, iako se nekad i u tom slučaju javljaju zasićenja veznih mjesta na polinukleotidu, ali u manjoj mjeri. Preduvjet za ovu metodu je termička stabilnost spoja na cijelom rasponu temperatura. <sup>[14]</sup>

#### 2.4.3. Fluorescencijska spektroskopija

Fluorescencijska spektroskopija ili fluorimetrija je analitička metoda kojom se molekule kromofora pobuđuju elektromagnetskim zračenjem u UV/Vis području te povratkom u osnovno stanje emitiraju zračenje. Fluorescencijska spektroskopija može biti za osam redova veličine osjetljivija od apsorpcijske (UV/Vis) spektroskopije zbog Stokesovog pomaka. Zbog visoke osjetljivosti i selektivnosti, fluorescencija je našla široku primjenu u mnogim područjima analitičke znanosti. Fluorescencijska spektroskopija se koristi u biokemijskim, medicinskim i kemijskim istraživanjima te se s njom istražuje struktura, dinamika i interakcije molekula u otopini, krutom stanju, a rijede u plinovitom stanju. <sup>[7]</sup>

Apsorpcijom zračenja molekula prelazi iz osnovnog u jedno od pobuđenih singletnih elektronskih stanja. Vrlo brzo vibracijskom relaksacijom molekula prelazi u osnovno vibracijsko stanje istog pobuđenog elektronskog stanja, iz kojeg neradijativnim putem “unutarnjom pretvorbom” prelazi u najniže pobuđeno elektronsko stanje ili može međusustavnim križanjem prijeći u stanje različitog multipliciteta (tripletno stanje). Iz prvog pobuđenog singletnog stanja molekula se vraća u osnovno elektronsko stanje procesom fluorescencije dok se iz tripletnog stanja procesom fosforescencije vraća u isto osnovno stanje. Pri fluorescenciji ne dolazi do promjene multipliciteta stanja, dok se pri fosforescenciji on mijenja. Oba navedena procesa nazivamo luminiscencijom. Proces se prikazuje dijagramom po Jablonskom (slika 8).<sup>[14]</sup>



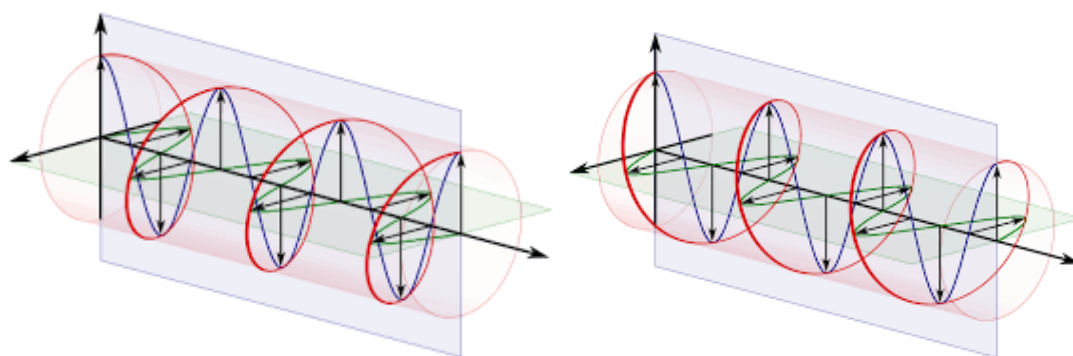
Slika 8. Dijagram po Jablonskom

Elektroni molekula mogu se vratiti u bilo koje od vibracijskih stanja u osnovnom stanju. Emitirani fotoni će imati različite energije, a time i frekvencije dajući vrpцу emitiranog zračenja. Zbog pojave Stokesova pomaka sve linije emisijskog zračenja imat će nešto veću valnu duljinu i manju energiju od pobudnih linija.<sup>[19]</sup>

#### 2.4.4 Cirkularni dikroizam

Cirkularni dikroizam (CD) je spektroskopska i optička metoda koja daje informacije o promjenama konformacije na razini sekundarne i tercijarne strukture nukleinskih kiselina i proteina. Daje informacije o kiralnim vrstama u otopini koje apsorbiraju svjetlost u UV/Vis području tijekom prijelaza iz osnovnog u jedno ili više pobuđenih stanja. Cirkularni dikroizam se temelji na diferencijalnoj apsorpciji cirkularno polariziranog svjetla, koje može biti u UV, vidljivom ili infracrvenom području valnih duljina.

Polarizirana svjetlost je ona vrsta svjetlosti kod koje elektromagnetni valovi titraju u samo jednoj ravnini. Pojava nesimetričnog titranja magnetnog i električnog polja koje tijekom širenja čini svjetlost naziva se polarizacija svjetlosti. Svjetlost može biti linearno i cirkularno polarizirana. Ako električno polje konstantno titra u istoj ravnini radi se o linearno polariziranoj svjetlosti, dok se kod cirkularno polarizirane svjetlosti ravnina titranja električnog polja jednoliko vrti. Ovisno o tome okreće li se ravnina titranja električnog polja u smjeru kazaljke na satu ili u suprotnom smjeru, razlikujemo lijevu i desnu polariziranu svjetlost (Slika 9). Takva svjetlost je kiralna pa će i kiralne molekule različito apsorbirati lijevo i desno cirkularno polariziranu svjetlost.<sup>[22,23]</sup>



Slika 9. Lijevo cirkularno polarizirana svjetlost (lijevo) i desno cirkularno polarizirana svjetlost (desno) u CD spektroskopiji

Kiralne molekule različito apsorbiraju lijevo i desno cirkularno polarizirano svjetlo. Većina polinukleotida su desne zavojnice, i promjene njihove konformacije se mogu proučavati na ovaj način. Spektar cirkularnog dikroizma se prikazuje kao razlika apsorbanacija,  $\Delta A$ , što je prema Beer-Lambertovom zakonu ekvivalentno razlici molarnih apsorpcijskih koeficijenata spoja za lijevu i desnu cirkularno polariziranu svjetlost. Akiralni ili simetrični spojevi nemaju CD spektar, odnosno jednako apsorbiraju lijevu i desnu polariziranu svjetlost.<sup>[23]</sup> Ali, u

interakciji s polinukleotidima koji jesu kiralni, moguće je da ti spojevi budu orijentacijski kiralni ili dobiju inducirani CD spektar ili ICD. Dva su uvjeta za ICD koji mogu upućivati na određeni način vezanja male molekule na polinukleotid: 1) spojevi moraju imati barem jedan apsorpcijski maksimum na valnim duljinama većim od 300 nm jer se na manjim valnim duljinama preklapaju CD spektar polinukleotida i ICD spektar spoja, te 2) veći stupanj uređenosti i homogenosti interakcije spoja sa polinukleotidom pa prisutnost ICD spektra može upućivati na npr. interkaliranje ili vezanje u manji utor kao moguće načine interakcije spoja i polinukleotida.

Prema jačini ICD signala može se zaključiti o kojem se tipu interakcije spoja i polinukleotida radi. Slabi negativni ili pozitivni ICD signali upućuju na interkaliranje dok jači ICD signali upućuju da se spoj vezao u mali utor polinukleotida.<sup>[22]</sup> Ovisno o predznaku ICD signala može se zaključiti koja je orijentacija male molekule.<sup>[21]</sup> Bisignatni signali (pozitivni i negativni signal) upućuju na vezanje spoja u obliku dimera ili agregata u utor polinukleotida.

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Kemikalije

- Spojevi: oznake spojeva su LB3, LB4, LB15, LB16, LB19 i LB20

**LB3** 2-[(3-(N,N-dimetilamino)propil)amino]pirido[2'3':4,5]imidazo[1,2-a]kinolin-6-karbonitril

**LB4** 2-[(3-(N,N-dimetilamino)propil)amino]pirido[3'2':4,5]imidazo[1,2-a]kinolin-6-karbonitril

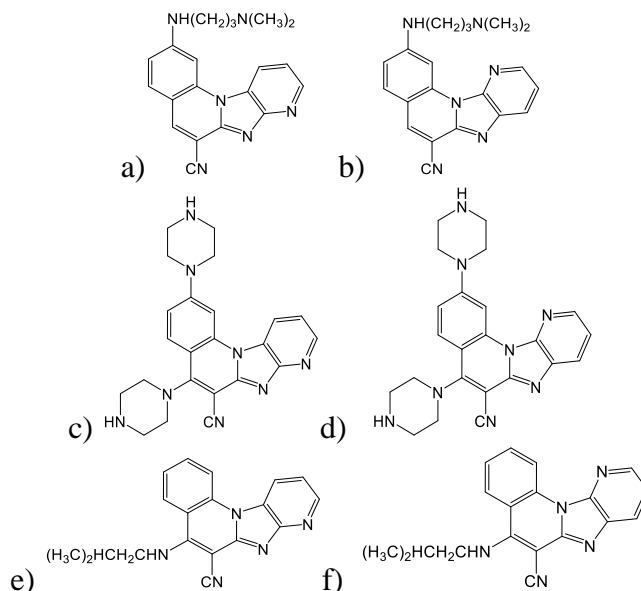
**LB15** 2-5-(N-piperazin-1-il)pirido[2'3':4,5]imidazo[1,2-a]kinolin-6-karbonitril

**LB16** 2-5-(N-piperazin-1-il)pirido[3'2':4,5]imidazo[1,2-a]kinolin-6-karbonitril

**LB19** 5-(N-izobutilamino)pirido[2'3':4,5]imidazo[1,2-a]kinolin-6-karbonitril

**LB20** 5-(N-izobutilamino)pirido[3'2':4,5]imidazo[1,2-a]kinolin-6-karbonitril

Imidazo-piridinski derivati, koji su se koristili u ovom diplomskom radu, sintetizirani su u grupi koju vodi prof. dr. sc. Marijana Hranjec (Zavod za organsku kemiju, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije). Strukturne formule spojeva prikazane su na slici 10.



Slika 10. Strukturne formule spojeva korištenih u radu; a) LB3, b) LB4, c) LB15, d) LB16, e) LB19, f) LB20

Spojevi LB3, LB4, LB15, LB16, LB19, LB20 otopljeni su u redestiliranoj vodi ( $c = 3 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ) uz primjenu ultrazvučne kupelji. Apsorbancije puferiranih vodenih otopina ispitivanih spojeva bile su proporcionalne njihovim koncentracijama do  $c = 3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ . Takvo ponašanje sugerira da ispitivani spojevi ne agregiraju intermolekularnim slaganjem u korištenim eksperimentalnim uvjetima.

- DNA iz timusne žlijezde goveda (*calf thymus* DNA, ctDNA)
- Natrijev kakodilatni pufer ( $\text{pH} = 7,0$ ;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ); natrijev kakodilat
- DMSO, dimetil-sulfoksid
- poli dGdC – poli dGdC,  $(\text{p(dGdC)})_2$
- poli dAdT – poli dAdT,  $(\text{p(dAdT)})_2$
- poli A – poli U,  $(\text{pApU})$

### 3.1.2. Instrumenti

- Spektrometar UV/Vis 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)
- Spektrometar JASCO J-8155 CD

## 3.2. Spektroskopska karakterizacija otopina ispitivanih spojeva

Za izradu baždarnog pravca za dobivanje molarnih ekstincijskih koeficijenata korišten je UV/Vis spektrometar, a korišten je Scan program. U eksperimentima je korišten kakodilatni pufer,  $\text{pH} = 7,0$ ,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ . U kvarcnu kivetu (optičkog puta 1 cm) stavljen je  $1 \text{ cm}^3$  pufera ( $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ), snimljena je bazna linija, tj. apsorbancija pufera te su zatim dodavani alikvoti otopine spoja. Mjerenja su provođena pri temperaturi od  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , u rasponu valnih duljina od 230 do 600 nm te koncentracijskom području spojeva od  $4 - 5 \times 10^{-6}$  do  $2 - 3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ . Svi podaci obrađeni su u programu OriginPro 7.5.

Za ispitivanje fluorescencije spojeva korišten je program Scan na instrumentu Agilent Cary Eclipse. U kvarcnu kivetu optičkog puta 1 cm, pipetirano je  $2 \text{ cm}^3$  pufera te je snimljen spektar pufera. Nakon što je snimljen emisijski spektar, očitana je maksimum, a ekscitacijski

spektar je snimljen pri valnoj duljini očitano maksimuma. Korišten je program Scan, a dobiveni podaci obrađeni su u programu OriginPro 7.5.

### 3.3. Istraživanje interakcija spojeva s polinukleotidima

U istraživanjima su korišteni sljedeći polinukleotidi: DNA iz timusa goveda (*calf thymus* DNA, ct-DNA, Sigma Aldrich, SAD), te sintetski polinukleotidi: poli dGdC – poli dGdC (poli(dGdC)<sub>2</sub>), poli dAdT – poli dAdT (poli (dAdT)<sub>2</sub>), te poli A – poli U (pApU), svi proizvođača Sigma Aldrich, SAD. Otopine polinukleotida određenih koncentracija unaprijed su pripravljene i čuvane na -20 °C. Svi polinukleotidi su dvolančane molekule DNA, odnosno RNA, a sintetski polinukleotidi sadrže više od 100 parova baza, koji osiguravaju više veznih mjesta duž dvostruke zavojnice.

#### 3.3.1. Fluorimetrijske titracije

Sve fluorimetrijske titracije rađene su na instrumentnu Agilent Cary Eclipse, u vodenoj otopini s kakodilatnim puferom (pH = 7,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ ), u kvarčnoj kiveti optičkog puta 1 cm dodano je 2 cm<sup>3</sup> pufera te snimljen spektar pufera. Uzorak se pobuđuje na valnoj duljini maksimuma spoja iz UV/Vis spektra s tim da se koristi maksimum pri valnoj duljini većoj od 300 nm kako bi se izbjeglo područje apsorpcije DNA/RNA. Izračuna se potreban volumen otopine ispitivanog spoja kako bi početna koncentracija spoja u kiveti bila  $5 \times 10^{-7} \text{ mol dm}^{-3}$ . Ishodne otopine polinukleotida bile su koncentracije  $5 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ . Vrijeme inkubacije između svakog mjerenja je iznosilo 2 – 4 minute.

Pri računanju konstante stabilnosti,  $K_s$ , kompleksa ispitivanog spoja s DNA/RNA koristi se Scatchardova jednadžba, koja omogućuje istovremeno računanje stabilnosti  $K_s$  i omjera  $n$  [vezani spoj]/[polinukleotid] nekom od metoda nelinearne regresije.<sup>[2]</sup>

#### 3.3.2. Temperaturno mekšanje

Za određivanje temperature mekšanja polinukleotida stabiliziranih derivatima korišten je spektrometar UV/Vis Varian Cary 100 Bio i program Thermal. U svaku kvarcnu kivetu stavi se 1 cm<sup>3</sup> pufera (natrijev kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH = 7,0). Mjeren je utjecaj ispitivanih spojeva na stabilizaciju temperaturnog mekšanja ctDNA, p(dAdT)<sub>2</sub>, pApU te p(dGdC)<sub>2</sub>. Spektroskopske promjene pri promjeni temperature od 25 °C na 95 °C praćene su

pri omjeru koncentracija spoja i polinukleotida od  $r = 0,3$  u puferu. Kao kontrole su se koristile otopine samog spoja i samog polinukleotida.

Zagrijavanjem polinukleotida dolazi do denaturacije, tj. razdvajanja dvostruke uzvojnice na dva jednolančana polinukleotida. Temperatura mekšanja ( $T_m$ ) je temperatura pri kojoj je približno pola dvolančane uzvojnice denaturirano, a karakteristična je za svaki dvolančani polinukleotid ovisno o sekundarnoj strukturi i tipu nukleobaza. Denaturacijom DNA baze postaju pokretnije, više apsorbiraju UV zračenje te dolazi do povećanja apsorbancije na svim valnim duljinama u UV području. Ta pojava se zove hiperkromizam.

Dobiveni rezultati prikazuju se u programu OriginPro 7.5., grafički kao krivulje ovisnosti apsorbancije  $A_{260\text{ nm}}$  o temperaturi koje su sigmoidalnog oblika. Sve krivulje su normalizirane, a temperature mekšanja određene su očitavanjem točki maksimuma prve derivacije sigmoidalnih krivulja. Svaka određena vrijednost  $\Delta T_m$  je prosjek dva mjerenja.

### 3.3.3. Cirkularni dikroizam

Sve CD titracije su provedene na spektrometru JASCO J-815 CD uz konstantan protok dušika. Brzina skeniranja spektra je iznosila  $200\text{ nm min}^{-1}$ . Mjerenja su provedena u kvarcnim fluorimetrijskim/CD kivetama duljine optičkog puta 1 cm. U otopine polinukleotida dodavani su alikvoti ispitivanog spoja. Od svakog spektra ručno je oduzeta prethodno snimljena bazna linija koju je činio čisti pufer. Prilikom mjerenja prati se CD spektar polinukleotida i pojavljivanje induciranih CD spektara spoja. CD spektri su snimani pri valnim duljinama 500-230/220 nm. Početna koncentracija polinukleotida je bila  $c = 3 \times 10^{-5}\text{ mol dm}^{-3}$ , a titriralo se u omjerima  $r = 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5$  i  $0,6$ , a u nekim slučajevima i  $0,7$ . Svi dobiveni podaci su obrađeni u programu OriginPro 7.5.



## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Cilj istraživanja

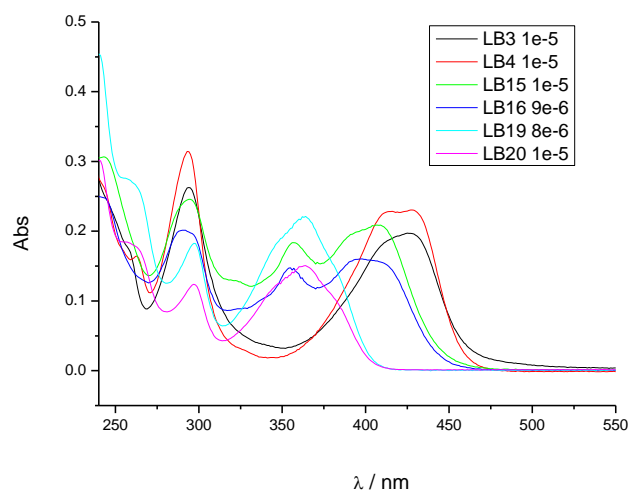
Cilj istraživanja ovog rada bio je ispitivanje interakcija imidazo-piridinskih derivata sa prirodnom DNA i sa sintetskim dvolančanim polinukleotidima spektroskopskim metodama u vodenim otopinama. Prije ispitivanja interakcija, okarakterizirano je šest novosintetiziranih spojeva: 2-[(3-(*N,N*-dimetilamino)propil)amino]pirido[2'3':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitril (simbol: LB3), 2-[(3-(*N,N*-dimetilamino)propil)amino]pirido[3'2':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitril (simbol: LB4), 2-5-(*N*-piperazin-1-il)pirido[2'3':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitril (simbol: LB15), 2-5-(*N*-piperazin-1-il)pirido[3'2':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitril (simbol: LB16), 5-(*N*-izobutilamino)pirido[2'3':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitril (simbol: LB19), 5-(*N*-izobutilamino)pirido[3'2':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitril (simbol: LB20).

### 4.2. Spektroskopska karakterizacija spojeva

#### 4.2.1. UV/Vis spektroskopija

U ovom smo radu za istraživanje interakcija novosintetiziranih derivata s polinukleotidima koristili spektrofotometrijske metode, UV/Vis i fluorescenciju. Prije analize, proveli smo karakterizaciju spojeva u vodenoj otopini (slika 14, 8. DODATAK, slike D1-D6). Spektri su snimljeni prema opisu iz poglavlja 3.2. Kod svih spojeva je došlo do linearnog povećanja apsorbancije zračenja povećanjem koncentracije spoja prema Beer-Lambertovom zakonu. Apsorbancije puferiranih vodenih otopina ispitivanih spojeva bile su proporcionalne njihovim koncentracijama do  $c = 2-3 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup>, što ukazuje da ispitivani spojevi ne agregiraju međumolekulskim slaganjem u eksperimentalnim uvjetima.

Određeni molarni ekstincijski koeficijenti dani su u tablici 1. Svi UV/Vis spektri prikazani su kao ovisnost apsorbancije o valnoj duljini (slika 14, 8. DODATAK, slike D1- D6).



Slika 14. UV/Vis spektar spojeva koncentracije  $\approx 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  pri pH 7,0, u kakodilatnom puferu,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$

Tablica 1. Molarni ekstincijski koeficijenti ( $\epsilon$ ) ispitivanih spojeva

	pH = 7,0 <sup>a</sup>	
	$\lambda_{\max}$ / nm	$\epsilon \times 10^3 /$ mmol <sup>-1</sup> cm <sup>2</sup>
<b>LB3</b>	294	25,4
	428	18,8
<b>LB4</b>	294	28,3
	428	20,2
<b>LB15</b>	294	24,4
	408	20,5
<b>LB16</b>	291	23,5
	355	17,4
	397	18,8
<b>LB19</b>	258	32,1
	298	21,0
	364	24,8
<b>LB20</b>	298	11,1
	365	13,2

<sup>a</sup>Natrijev kakodilatni pufer (pH = 7,0;  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )

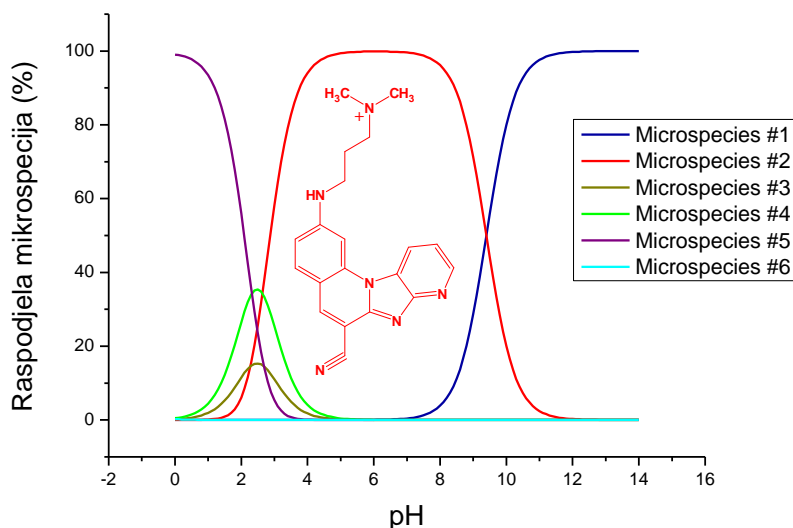
#### 4.2.2. Fluorescencija spojeva

Provjerena je i fluorescencija samih spojeva. Intenzitet emisije puferiranih vodenih otopina (Na-kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH = 7,0) ispitivanih spojeva bio je proporcionalan njihovim koncentracijama do  $c = 6 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  (8. DODATAK, slike D7-D13).

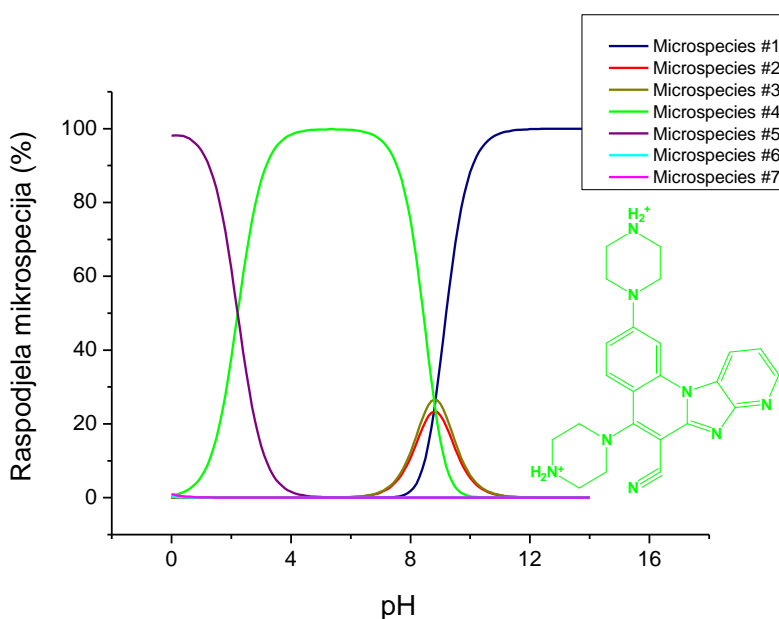
#### 4.2.3. pH ovisnost spojeva

Imidazo-piridinski derivati mogu biti protonirani na više dušikovih atoma. Da bi utvrdili utjecaj naboja molekule na interakcije sa DNA i RNA pri fiziološkom pH (pH = 7,0), morali smo istražiti pH ovisnost spojeva. Izračuni vrijednosti pKa napravljeni su pomoću izračuna

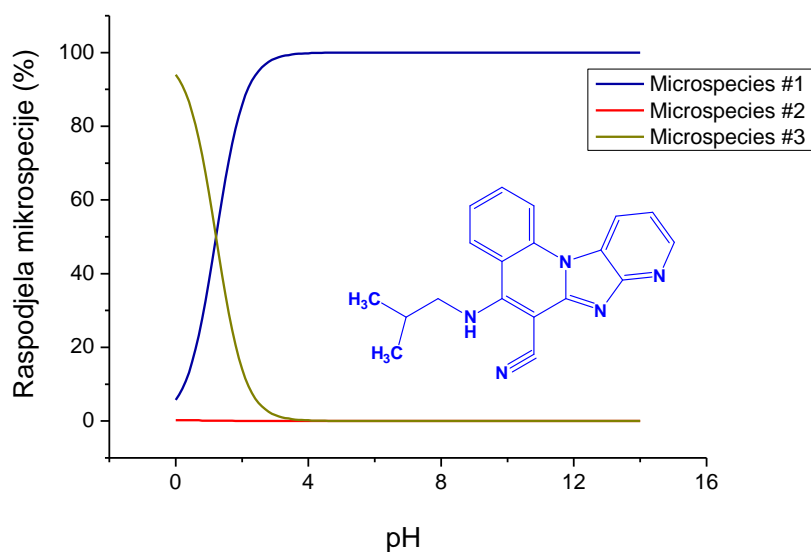
ChemAxon u *online* softverskom programu MarvinSketch.<sup>[26]</sup> Na slikama 11, 12 i 13 prikazane su raspodjele protonirane i deprotonirane forme za spojeve LB3, LB15 i LB19. Kod spojeva LB3 i LB4 dominantna forma pri pH 7,0 je struktura s jednim pozitivnim nabojem. Spojevi LB19 i LB20 nemaju naboja pri fiziološkom pH dok kod spojeva LB15 i LB16 dominantna forma je struktura s dva pozitivna naboja.



Slika 11. Raspodjela protonirane i deprotonirane forme spoja LB3 napravljena u programu MarvinSketch pomoću alat ChemAxon



Slika 12. Raspodjela protonirane i deprotonirane forme spoja LB15 napravljena u programu MarvinSketch pomoću alat ChemAxon



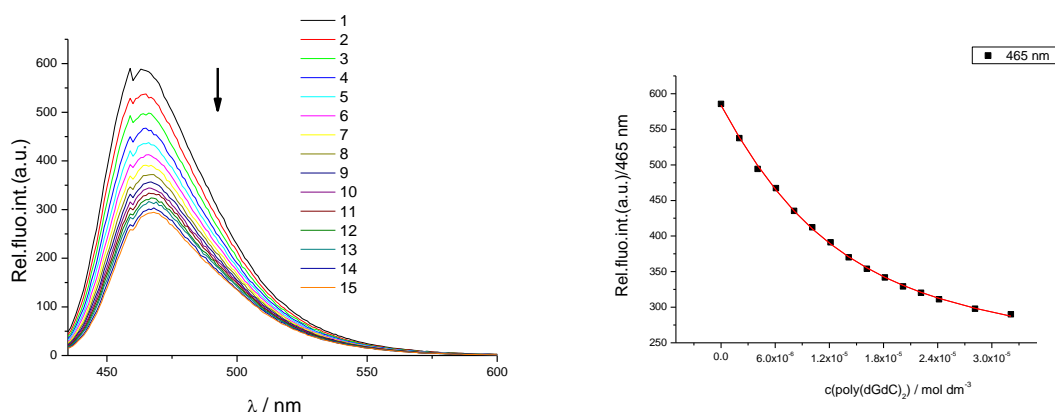
Slika 13. Raspodjela protonirane i deprotonirane forme spoja LB19 napravljena u programu MarvinSketch pomoću alat ChemAxon

### 4.3. Interakcije spojeva s polinukleotidima

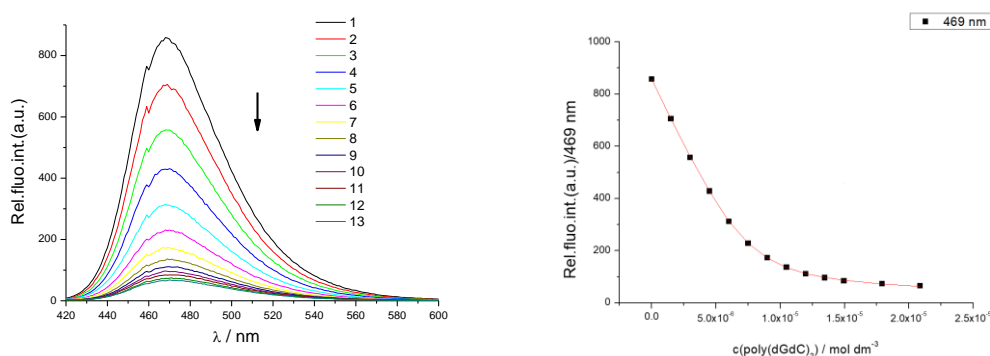
Temperatura mekšanja ( $T_m$ ), fluorimetrijske titracije i CD spektroskopija korištene su kao metode za određivanje jačine i načina vezanja ispitivanih spojeva na DNA i RNA. Pomoću Scatchardove jednadžbe metodom nelinearne regresije izračunate su konstante stabilnosti ( $K_s$ ) ispitivanih spojeva.

#### 4.3.1. Fluorimetrijske titracije

Polinukleotid poli(dGdC)<sub>2</sub> kod svih spojeva gasi fluorescenciju spojeva (slike 15, 16, 8. DODATAK, slike D17, D24, D30 i D34). Jedan od razloga gašenja fluorescencije mogla bi biti struktura malog utora koji je bogat amino skupinama gvanina koji imaju nepovoljan sterički utjecaj što otežava vezanje spoja u utor te stoga spojevi radije interkaliraju u poli(dGdC)<sub>2</sub> ili se vežu u obliku agregata najvjerojatnije unutar većeg utora (slike 15, 16).<sup>[1]</sup> Također, dodatkom ctDNA dolazi do smanjenja fluorescencije kod većine spojeva čemu je razlog mješoviti sastav baznih parova (oko 42 % GC parova baza).

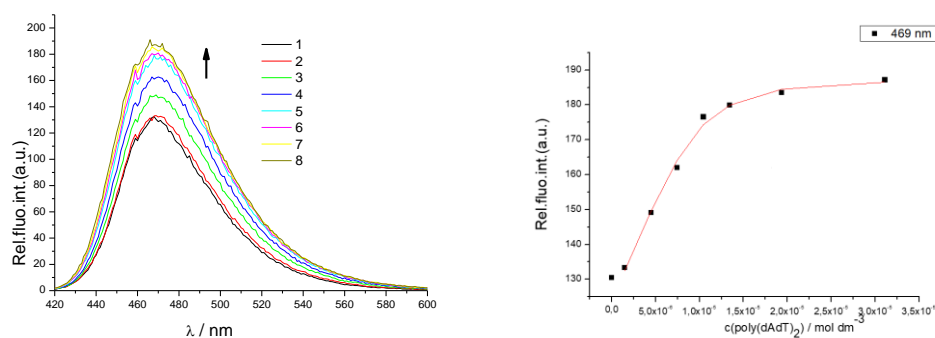


Slika 15. Lijevo: fluorimetrijska titracija spoja LB4 ( $\lambda_{\text{exc}} = 428 \text{ nm}$ ,  $c(\text{LB4}) = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s polinukleotidom poli(dGdC)<sub>2</sub> ( $c = 2,0 \times 10^{-6} - 3,2 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); desno: ovisnost apsorpcije LB4 pri  $\lambda_{\text{max}} = 465 \text{ nm}$  o  $c(\text{poli(dGdC)}_2)$  pri pH=7, Na-kakodilatni puffer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



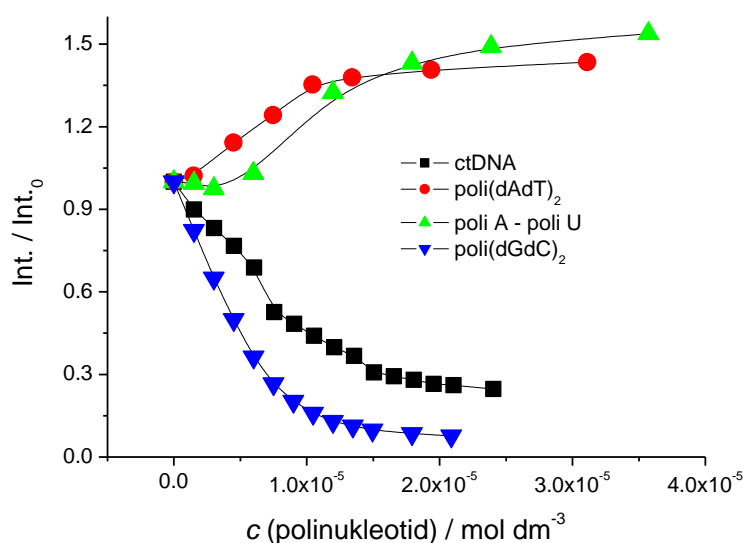
Slika 16. Lijevo: fluorimetrijska titracija spoja LB16 ( $\lambda_{\text{exc}}=397 \text{ nm}$ ,  $c(\text{LB16}) = 1,5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s polinukleotidom poli(dGdC)<sub>2</sub> ( $c = 1,5 \times 10^{-6} - 2,1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); desno: ovisnost apsorpcije LB16 pri  $\lambda_{\text{max}} = 469 \text{ nm}$  o  $c(\text{poli(dGdC)}_2)$  pri pH=7, Na-kakodilatni puffer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$

Titracijom s polinukleotidima pApU i p(dAdT)<sub>2</sub> u otopinama LB15, LB16, LB19 i LB20 došlo je do povećanja emisije (slika 17, 8. DODATAK, slike D22, D23, D26, D28, D29, D32 i D33,) dok se kod LB3 i LB4 emisija tih spojeva smanjila (8. DODATAK, slike D15, D16, D19 i D20).



Slika 17. lijevo: Fluorimetrijska titracija spoja **LB16** ( $c = 1,5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 397 \text{ nm}$ ) s  $p(\text{dAdT})_2$  ( $c = 1,5 \times 10^{-6} - 3,1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); desno: Ovisnost apsorbancije **LB16** pri  $\lambda_{\text{max}} = 469 \text{ nm}$  o  $c(p(\text{dAdT})_2)$ ,  $\text{pH} = 7,0$ , kakodilatni pufer  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$

Položaj amino bočnih ogranka na tetracikličkom prstenu najvjerojatnije je utjecao na promjene fluorescencije budući da, u slučaju LB3 i LB4, dodatak AT- i AU-sekvenci nije uzrokovao povećanje njihove emisije. Položaj i priroda supstituenta na heterocikličkom prstenu imaju značajan utjecaj na elektronsku gustoću aromatskih sustava što zauzvrat može utjecati na njegovu orijentaciju vezanja i svojstva fluorescencije nakon interakcije s nukleinskim kiselinama. Kod imidazo-piridinskih derivata, amino bočni ogranci na ugljiku C2 (kod LB3 i LB4) i na ugljiku C5 (kod LB15, LB16, LB19 i LB20) uzrokuju preraspodjelu elektronske gustoće u aromatskoj jezgri što dovodi do smanjenja fluorescencije, kod LB3, LB4 sa svim polinukleotidima i kod LB15, LB16, LB19 i LB20 s GC sekvencama, ili njezinog povećanja (kod LB15, LB16, LB19 i LB20 s AT/AU sekvencama) (slika 18).



Slika 18. Promjene fluorescencije LB16 ( $c = 1,5-2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ;  $\lambda_{\text{ex}}=397 \text{ nm}$ ) u titraciji sa ctDNA (■), poli(dAdT)<sub>2</sub>(●), poli A-poli U (▲), poly(dGdC)<sub>2</sub> (▼).

Slični fluorescentni odgovori s AT i GC sekvencama, primijećeni s LB15, LB16, LB19 i LB20, uočeni su prije kod nekoliko spojeva (derivati akridina i fenantridina, kationi 4,9-diazapirenija).<sup>[25,26]</sup> Takve su promjene povezane s interkalianjem gore spomenutih hetero/policikličkih spojeva u dvolančanu DNA/RNA budući da samo  $\pi$ - $\pi$  interakcije slaganja s nukleobazom gvaninom koja ima najizraženija elektron-donorska svojstva, rezultiraju učinkovitim gašenjem fluorescencije.<sup>[27]</sup>

Rezultati fluorimetrijskih titracija obrađeni su u programu OriginPro 7.5 prema Scatchardovoj jednadžbi i dali su konstantu vezanja spojeva sa polinukleotidima kao i omjera [vezani spoj]/[polinukleotid] (tablica 2).



Tablica 2. Konstante vezanja ( $\log K_s$ )<sup>a</sup> spojeva s polinukleotidima i omjeri  $n^b$  ([vezani spoj]/[polinukleotid]) izračunati iz fluorimetrijskih titracija spojeva sa dvolančanim polinukleotidima pri pH 7,0 (Na-kakodilatni pufer  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )

Spoj	ctDNA			pApU			p(dAdT) <sub>2</sub>			p(dGdC) <sub>2</sub>		
	$\log K_s$	$n$	$I/I_0^c$	$\log K_s$	$n$	$I/I_0^c$	$\log K_s$	$n$	$I/I_0^c$	$\log K_s$	$n$	$I/I_0^c$
LB3	6,0	0,4	0,5	5,5	0,4	0,8	6,4	0,4	0,8	5,6	0,4	0,4
LB4	5,5	0,6	0,5	6,3	0,1	0,8	6,9	0,2	0,7	5,8	0,2	0,4
LB15	6,4	0,1	0	6,5	0,1	1,8	6,8	< 0,1	1,3	6,6	0,2	0
LB16	6,3	0,3	0,1	6,6	0,1	2,0	6,8	0,2	1,5	6,8	0,3	< 0,1
LB19	4,5	< 0,1	2,2	4,7	0,1	7,1	5,1	< 0,1	8,3	5,5	< 0,1	0,5
LB20	- <sup>d</sup>	- <sup>d</sup>	- <sup>d</sup>	5,3	< 0,1	2,5	4,6	0,1	10,4	- <sup>d</sup>	- <sup>d</sup>	- <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Koeficijenti korelacije bili su  $> 0,9$  za sve izračunate  $K_s$

<sup>b</sup> Obrada podataka titracije pomoću Scatchardove jednadžbe dala je vrijednost omjera  $n = [\text{vezani spoj}]/[\text{polinukleotid}]$  osim u titracijama LB16 s p(dAdT)<sub>2</sub> i LB19 s pApU gdje je omjer  $n$  morao biti fiksiran na određenu vrijednost

<sup>c</sup>  $I_0$ -početni intenzitet fluorescencije spojeva LB3, LB4, LB15, LB16, LB19, LB20;  $I$ -intenzitet fluorescencije kompleksa spoj / polinukleotid izračunat prema Scatchardovoj jednadžbi

<sup>d</sup> mala ili linearna promjena fluorescencije onemogućila je izračunavanje konstante stabilnosti

Na jačinu interakcije s DNA/RNA utjecali su i položaj amino bočnog lanca i naboj liganda. Tako su LB3 i LB4 s amino bočnim supstituentom (dimetilaminopropilamino) na položaju C2 s jednim pozitivnim nabojem i LB15 i LB16 s piperazinom na položajima C2 i C5 s dva pozitivna naboja pokazali veće afinitete prema dvolančanim DNA i RNA u usporedbi s LB19 i LB20 s izobutilamino skupinom na položaju C5 koji nema pozitivnih naboja na pH 7,0.

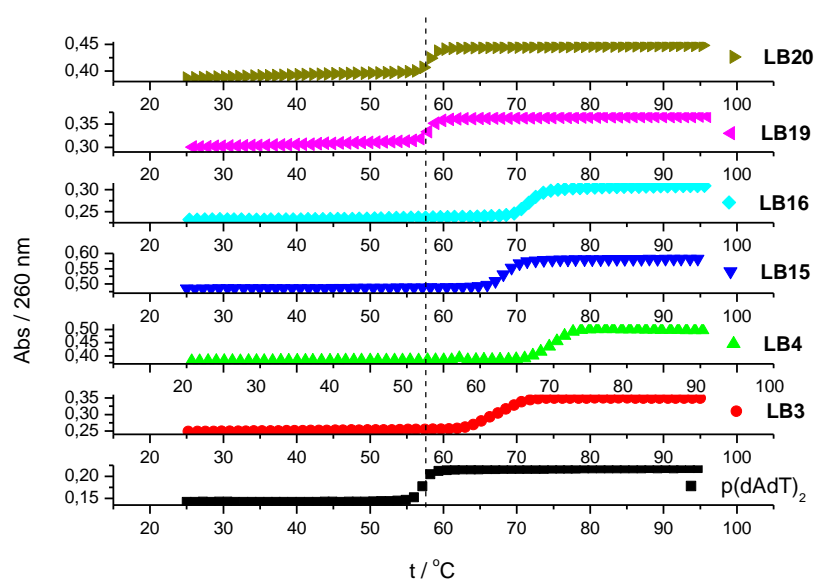
#### 4.3.2. Temperaturno mekšanje polinukleotida

Eksperimentima temperaturnog mekšanja polinukleotida istražuje se utjecaj spoja na stabilizaciju polinukleotida nakon njihove interakcije. Iz ovisnosti apsorbancije o temperaturi može se očitati temperatura mekšanja,  $T_m$ .  $T_m$  je temperatura pri kojoj je 50 % DNA denaturirano, odnosno  $T_m$  je mjera stabilnosti DNA.  $\Delta T_m$  je razlika između vrijednosti  $T_m$  slobodnog polinukleotida i kompleksa s malom molekulom. Općenita pravila ukazuju na

očekivane vrijednosti  $\Delta T_m$  za određene načine vezanja malih molekula na dvolančane DNA ili RNA. Interkaliranjem se stabiliziraju dvolančane nukleinske kiseline i daju pozitivne vrijednosti  $\Delta T_m$  dok vezanje u mali utor dvolančanih uzvojnica DNA ili RNA može uzrokovati stabilizaciju ( $\Delta T_m > 0$ ) ili destabilizirati dvolančanu DNA ili RNA ( $\Delta T_m < 0$ ). Za vrijednosti  $\Delta T_m < 2$  °C mala molekula se najvjerojatnije veže uzduž DNA/RNA uzvojnice elektrostatskim i hidrofobnim vezama, ne utječući na stabilnost uzvojnice. Za  $\Delta T_m = 2 - 5$  °C moguća vezna mjesta su utori DNA/RNA ili djelomično interkaliranje. Vrijednosti  $\Delta T_m > 6$  °C ukazuju na značajnu stabilizaciju DNA/RNA što može biti posljedica interkaliranja, vezanja u utor DNA/RNA većim brojem vodikovih veza, ali i miješani način vezanja (uključuje istovremeno prisustvo nekoliko različitih tipova veznih mjesta).

Spojevi LB3, LB4, LB15 i LB16 pokazali su umjerene do velike stabilizacijske učinke ctDNA i pApU/p(dAdT)<sub>2</sub> polinukleotida dok LB19 i LB20 imaju mali ili nikakav stabilizacijski učinak (slika 19, 8. DODATAK, slika D35 i D36). Taj zanemarivi stabilizacijski učinak najvjerojatnije je posljedica prisustva amino bočnog ogranka na položaju C5 heterocikličkog prstena i što spojevi LB19 i LB20 nisu nabijeni pri pH 7,0. Veće vrijednosti  $\Delta T_m$  primjećene kod spojeva LB3, LB4, LB15 i LB16 prema polinukleotidima AT/AU u odnosu na ctDNA mogu se pripisati mješovitom sastavu parova baza ctDNA.

Spoj LB4 je pokazao veće vrijednosti  $\Delta T_m$  za polinukleotide p(dAdT)<sub>2</sub> i pApU od njegovog regioizomera konstitucijskog izomera LB3.



Slika 19. Krivulje taljenja  $p(dAdT)_2$  nakon dodatka LB3, LB4, LB5, LB6, LB19 i LB20 pri omjeru,  $r = ([\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]) = 0,3$ ,  $\text{pH} = 7,0$ , Na-kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$

Tablica 3.  $^a\Delta T_m$  vrijednosti ( $^{\circ}\text{C}$ ) proučavanih polinukleotida nakon dodatka spojeva LB3, LB4, LB15, LB16, LB19 i LB20 (omjer  $r^b = 0,3$ ) pri  $\text{pH} = 7,0$  (Na-kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )

$^b r = 0,3$	LB3	LB4	LB15	LB16	LB19	LB20
ct-DNA	4,2	6,6	6,6	7,5	0	0,8
pApU	$^c 4,5/16,5$	$^c 9,5/23,5$	$^c 13,5/27,5$	$^c 15/27$	0,6	0
$p(dAdT)_2$	9,9	18,2	11,1	14,3	0,4	0,8

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

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

<sup>c</sup> dvofazni prijelaz

#### 4.3.3. Cirkularni dikroizam

U eksperimentima snimanja CD spektara polinukleotida tijekom titracije sa spojem korišteni su svi polinukleotidi koji su se koristili i pri snimanju fluorimetrijskih titracija. Cirkularni dikroizam je kirooptička, visoko informativna metoda za proučavanje konformacijskih

promjena u sekundarnoj strukturi kiralnih sustava, poput DNA ili RNA.<sup>[24]</sup> Akiralne male molekule koje nemaju CD spektar, mogu pokazati inducirani CD (ICD) spektar nakon vezanja na kiralnu DNA/RNA kao posljedicu jednoznačnog vezanja na kiralnu uzvojnica polinukleotida. S obzirom da se male molekule obično vežu na jedan tip veznog mjesta, takvi ICD spektri mogu pomoći u određivanju tog veznog mjesta.

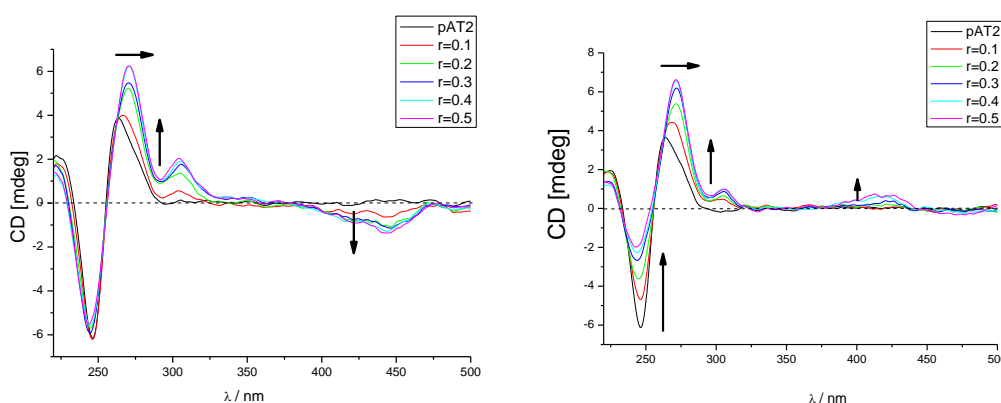
Pratile su se promjene na CD spektru samog polinukleotida ( $\lambda < 300$  nm), te u području valnih duljina iznad 300 nm, gdje DNA i RNA ne apsorbiraju svjetlost, a ispitivani spojevi apsorbiraju.

Spojevi LB3, LB4, LB15 i LB16 uzrokovali su veće promjene u CD spektrima polinukleotida u usporedbi s LB19 i LB20. Dodatkom LB3 i LB4 u otopinu polinukleotida p(dAdT)<sub>2</sub> dolazi do povećanja intenziteta CD signala oko 273 nm i do pojave pozitivnog ICD signala na 305 nm (slika 20, 8. DODATAK slika D37). Također, kod spoja LB4 zamjećuje se nastanak bisignatnih signala u području 370 - 490 nm dok u CD spektru sa spojem LB3 uočljiv je negativan ICD signal sa maksimumom oko 445 nm. To može biti posljedica miješanog načina vezanja – vezanje u manji utor dvolančanih uzvojnica i vezanja molekula uz polinukleotidnu okosnicu, najvjerojatnije unutar hidrofobnog utora. U spektrima p(dGdC)<sub>2</sub> pri dodatku LB3 i LB4 uočeni su slični ICD signali kao sa (poli dAdT)<sub>2</sub>, ali manjeg intenziteta. Razlog tome je najvjerojatnije amino skupina gvanina koja strši u manji utor i na taj način ometa interakciju. Dodatkom LB3 i LB4 u otopinu pApU došlo je do smanjenja intenziteta CD spektra RNA i stvaranja slabih negativnih ICD signala oko 305 nm. Takve promjene u ICD signalima obično ukazuju na interkalativno vezanje pri čemu je ligand sa svojom duljom osi postavljen paralelno na dulju os susjednog para baza.<sup>[28]</sup>

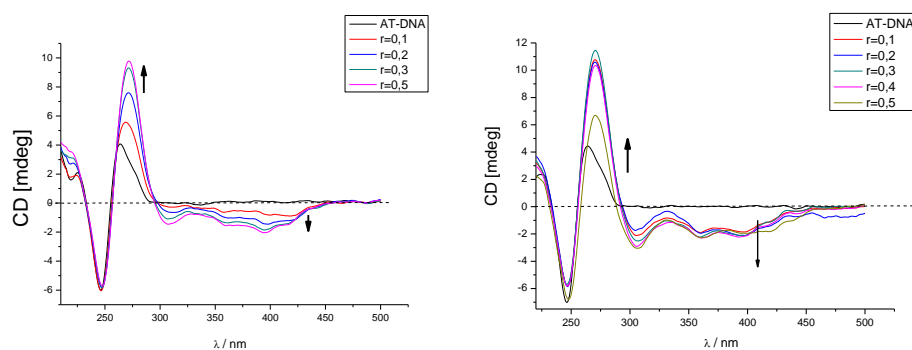
U titracijama LB15 i LB16 primjećen je nastanak sličnih ICD signala sa svim ispitivanim polinukleotidima. U većini titracija nastaje pri omjeru  $r \leq 0,1$  slab negativan ICD signal u području od 300 do 450 nm dok se pri omjerima  $r$  većim od 0,1 primjećuje jači negativan signal (slika 21, 8. DODATAK slika D37). Promjene pri nižim omjerima najvjerojatnije se mogu pripisati interkaliranju dok su pri većim omjerima vjerojatno rezultat vezanja agregiranih molekula uzduž polinukleotidne okosnice. Ova vrsta vezanja je dominantna pri većim omjerima zbog volumiznosti piperazinskih skupina koje ometaju umetanje tetracikličkog prstena između dušičnih baza.

Međutim, budući da su ti spojevi izazvali različite fluorescencijske odgovore sa AT- DNA (povećanje emisije) i GC-DNA (gašenje emisije), moguće je da pri nižim omjerima  $r$ , ti spojevi djelomično interkaliraju samo u GC-DNA.

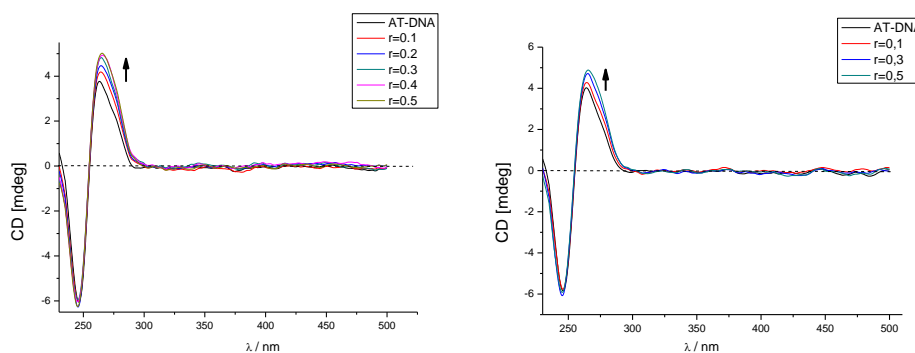
U CD titracijama sa spojevima LB19 i LB20 primjećene su značajnije promjene samo sa polinukleotidom p(dAdT)<sub>2</sub>. Dodatkom LB20 u otopinu ctDNA dolazi do pojave malih, negativnih CD signala oko 305 nm što bi moglo upućivati na interkaliranje, ali kako ti spojevi ne stabiliziraju dvolančanu DNA/RNA ne radi se o interkaliranju. Blago smanjenje intenziteta CD spektra p(dGdC)<sub>2</sub> može biti posljedica djelomičnog interkaliranja ili vezanja tetracikličkog prstena i susjednih parova baza pod kutem koji rezultira međusobnim poništavanjem pozitivnih i negativnih signala (slika 22, 8. DODATAK slika D37). Ove zanemarive promjene primjećene u većini CD titracija s LB19 i LB20 podudaraju se s izračunatim afinitetima vezanja, manjim u odnosu na druge spojeve, i odsutnošću termičke stabilnosti DNA i RNA.



Slika 20. CD titracija p(dAdT)<sub>2</sub>,  $c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  sa spojevima LB3 (lijevo) i LB4 (desno) pri različitim omjerima  $r = [\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]$ , pH = 7,0, Na-kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



Slika 21. CD titracija  $p(dAdT)_2$ ,  $c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  sa spojevima LB15 (lijevo) i LB16 (desno) pri različitim omjerima  $r = [\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]$ ,  $\text{pH} = 7,0$ , Na-kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



Slika 22. CD titracija  $p(dAdT)_2$ ,  $c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$  sa spojevima LB19 (lijevo) i LB20 (desno) pri različitim omjerima  $r = [\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]$ ,  $\text{pH} = 7,0$ , Na-kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$

## § 5. ZAKLJUČAK

U okviru ovog diplomskog rada spektroskopski je okarakterizirano šest derivata imidazo[4,5-*b*]piridina: LB3, LB4, LB15, LB16, LB19, LB20. UV/Vis spektroskopijom su određeni molarni ekstincijski koeficijenti te valne duljine maksimuma apsorpcije. Svi spojevi imaju maksimum apsorpcije i u vidljivom dijelu spektra. Otopine ispitivanih spojeva ponašaju se prema Beer-Lambertovom zakonu u koncentracijskom području od  $4,99 \times 10^{-7}$  mol dm<sup>-3</sup> do  $2,98 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> i ne dolazi do intermolekulskog slaganja molekula spoja.

Dodatak polinukleotida pApU i p(dAdT)<sub>2</sub> u otopine spojeva LB15, LB16, LB19 i LB20 doveo je do povećanja njihove fluorescencije. Dodatak polinukleotida p(dGdC)<sub>2</sub> uzrokovao je gašenje fluorescencije svih ispitivanih spojeva što se vjerojatno može pripisati učinkovitim  $\pi$ - $\pi$  interakcijama slaganja sa nukleobazom gvanin koja ima najizraženija elektron-donorska svojstva, ali i činjenici da amino skupina gvanina, koja strši u manji utor, ometa vezanje spojeva na to vezno mjesto. Vezanje spojeva LB3 i LB4 na ispitivane polinukleotide dovelo je do gašenja njihove fluorescencije. Na jačinu interakcije s DNA/RNA utjecali su i položaj amino bočnog lanca i naboj liganda. Spojevi LB19 i LB20 pokazuju manji afinitet vezanja prema skoro svim polinukleotidima, osobito ctDNA ( $\log K_s = 4,5 - 5,5$ ) u usporedbi sa drugim spojevima ( $\log K_s = 5,5 - 6,9$ ). To je najvjerojatnije posljedica prisustva amino bočnog ogranka na ugljiku C5 heterocikličkog prstena i činjenice da ti spojevi nisu nabijeni pri ispitivanom pH (pH = 7,0).

Spojevi LB3, LB4, LB15 i LB16 vežu se na dvolančane polinukleotide pri čemu ih stabiliziraju tj. dobivaju se pozitivne vrijednosti  $\Delta T_m$ . Pokazali su umjerene do velike stabilizacijske učinke ctDNA i pApU/p(dAdT)<sub>2</sub> polinukleotida. Za razliku od njih, spojevi LB19 i LB20 ne pridonose stabilizaciji dvolančanih polinukleotida ili imaju mali stabilizacijski učinak.

Dodatkom spojeva dolazi do smanjenja ili povećanja CD signala dvolančanih polinukleotida u ultraljubičastom području ( $\lambda = 240 - 300$  nm). Sami spojevi su akiralni i nemaju CD spektar, ali u interakciji s dvolančanim polinukleotidima javljaju se inducirani CD signali (ICD) u području valnih duljina preko 300 nm u kojem polinukleotidi ne apsorbiraju. Pri nižim omjerima spoja prema polinukleotidu ( $r \leq 0,1$ ), pozitivni ICD signali u području

273 - 305 nm za  $p(dAdT)_2$  i  $p(dGdC)_2$  i slabi negativni ICD signali oko 305 nm za pApU sugeriraju da se LB3 i LB4 vežu unutar malog utora  $p(dAdT)_2$  i  $p(dGdC)_2$  i interkaliraju u pApU. Pri višim omjerima ( $r \geq 0,1$ ), LB4 uzrokuje nastajanje bisignatnih ICD signala u području od 370 do 490 nm dok je LB3 uzrokovao pojavu negativnih ICD signala s maksimumom oko 445 nm. Takve promjene mogle bi biti posljedica miješanog načina vezanja – vezanja u manji utor i vezanja agregiranih molekula LB3 i LB4 uzduž okosnice polinukleotida te vjerojatno unutar većeg utora.

Derivati s piperazinom, LB15 i LB16, najvjerojatnije interkaliraju između nukleobaza DNA i RNA (negativni ICD signali). Odsutnost toplinske stabilnosti polinukleotida, slabo izraženi ICD signali kao i niži afiniteti prema polinukleotidima ukazuju na neinterkalativni način vezanja najvjerojatnije agregaciju LB19 i LB20 molekula uzduž polinukleotidne okosnice.



## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

A - apsorpcija

LB3 - 2-[(3-(*N,N*-dimetilamino)propil)amino]pirido[2'3':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitril

LB4 - 2-[(3-(*N,N*-dimetilamino)propil)amino]pirido[3'2':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitril

LB15 - 2-5-(*N*-piperazin-1-il)pirido[2'3':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitril

LB16 - 2-5-(*N*-piperazin-1-il)pirido[3'2':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitril

LB19 - 5-(*N*-izobutilamino)pirido[2'3':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitril

LB20 - 5-(*N*-izobutilamino)pirido[3'2':4,5]imidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitril

*c* – molarna koncentracija

ctDNA - deoksiribonukleinska kiselina iz timusa goveda

DMSO - dimetil-sulfoksid

Na-kakodilat –  $C_2H_6AsNaO_2 \times 3H_2O$

ICD – inducirani cirkularni dikroizam

Int. fluo. – intrinzična fluorescencija

$K_s$  – konstanta stabilnosti

*n* – omjer koncentracije vezanog spoja i koncentracije polinukleotida

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

RNA – ribonukleinska kiselina

$T_m$  - temperatura mekšanja

poli A – poli U - dvostruka uzvojnica homopolimera adenilata i uridilata

poli dAdT – poli dAdT – dvostruka uzvojnica heteropolimera alternirajućih deoksiadenilata i deoksitimidilata

poli dGdC – poli dGdC – dvostruka uzvojnica heteropolimera alternirajućih deoksigvanilata i deoksicitidilata

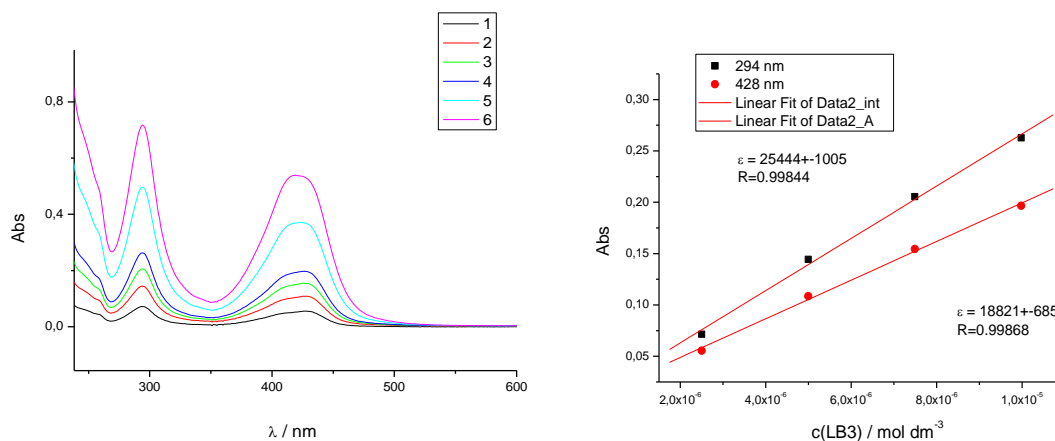
UV/Vis spektroskopija – ultraljubičasta i vidljiva spektroskopija

## § 7. LITERATURNI IZVORI

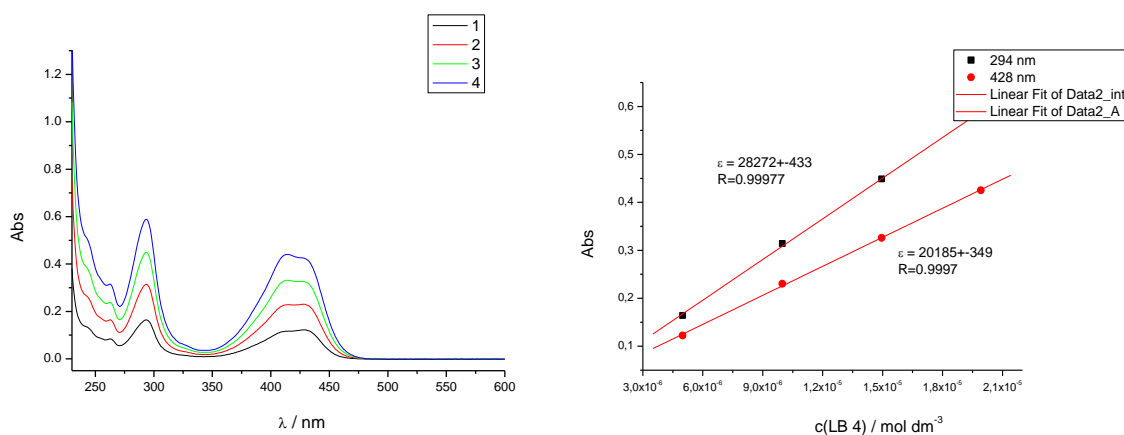
1. P. B. Dervan, *Bioorg. Med. Chem.* **9** (2001) 2215-2235.
2. I. Piantanida, *Kem. Ind.* **52 (11)** (2003) 545-552.
3. N. Perin, I. Martin-Kleiner, R. Nhili, W. Laine, M.H. David-Cordonnier, O. Vugrek, G. Karminski-Zamola, M. Kralj, M. Hranjec, *Med. Chem. Commun.* **4** (2013) 1537-1550.
4. N. Perin, R. Nhili, K. Ester, W. Laine, G. Karminski-Zamola, M. Kralj, M.-H. David-Cordonnier, M. Hranjec, *Eur. J. Med. Chem.* **80** (2014) 218-227.
5. J. A. Joule, K. Mills, G. F. Smith, *Heterocyclic Chemistry*, 5<sup>th</sup> Ed., Chichester, Wiley, 2010.
6. M. Krause, H. Foks, K. Gobis, *Molecules* **22** (2017) 399-423.
7. M. Hranjec, B. Lučić, I. Ratkaj, S. K. Pavelić, I. Piantanida, K. Pavelić, G. Karminski-Zamola, *Eur. J. Med. Chem.* **46** (2011) 2748-2758.
8. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013, 108-116.
9. J. A. McCleverty, T. J. Meyer, *Comprehensive Coordination Chemistry II*, Elsevier Science, Volume 8, 2003, 787-813.
10. H. W. Zimmermann, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **25 (2)** 1986) 115-196.
11. S. K. Panigrahi, G. R. Desiraju, *J. Biosci.* **32 (4)** (2007) 677-691.
12. C. Zimmer, U. Wahnert, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **47** (1986) 31-112.
13. P. Herzyk, S. Neidle & J. M. Goodfellow, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **10** (1992) 97-139.
14. W. D. Wilson, L. Ratmeyer, M. Zhao, L. Strekowski, D. Boykin, *Biochemistry*, **32** (1993) 4098-4104.
15. <https://open.library.ubc.ca/cIRcle/collections/ubctheses/831/items/1.0059535>  
pristupljeno 10. veljače 2021.
16. W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer, New York, 1988.
17. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *Osnove analitičke kemije*, Školska knjiga, Zagreb, 1999, 493-593.
18. D. Harvey, *Modern Analytical Chemistry*, McGraw-Hill, Boston, 2000., 368-412.
19. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Brooks/Cole – Thomson Learning, Belmont, 2004, 784-824.

20. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 7<sup>th</sup> Ed., W. H. Freeman & Company, New York, 2017, 824-829.
21. J. Matic, *N-sulfonilpurini i peptidni derivati fenantridina – sinteza, interakcije s polinukleotidima i biološka ispitivanja*, Doktorski rad, Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci, 2016, str. 128-131.
22. N. Berova, K. Nakanishi, R. W. Woody, *Circular Dichroism Principles and Applications*, Wiley-VCH, New York, 2000.
23. A. Rodger, B. Norden, *In Circular Dichroism and Linear Dichroism*, Oxford University Press, New York, 1997.
24. <https://chemicalize.com/> developed by ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>), pristupljeno u prosincu, 2020.
25. I. Piantanida, B. S. Palm, M. Žinić, H. J. Schneider, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* (2001) 1808-1816.
26. S. Georghiou, *Photochem. Photobiol.* **26** (1977) 59-68.
27. S. O. Kelley, J. K. Barton, *Science*, **283** (1999) 375-381.
28. T. Šmidlehner, I. Piantanida, G. Pescitelli, *Beilstein J. Org. Chem.* **14** (2018) 84-105.

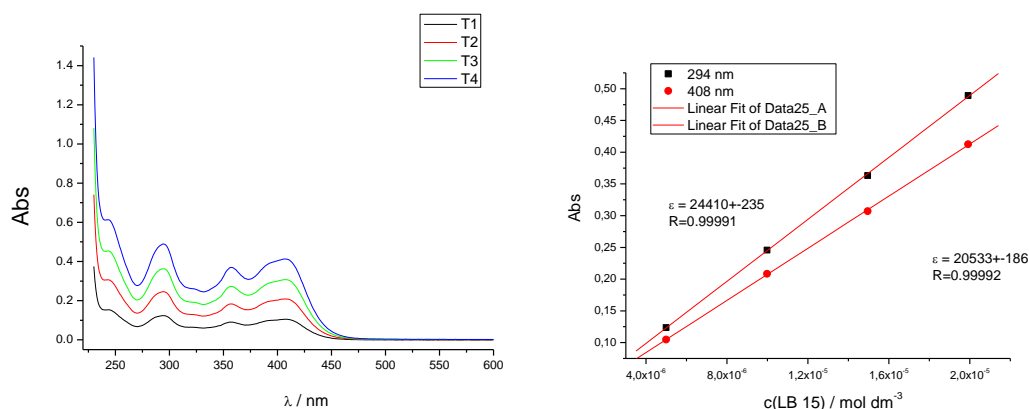
## § 8. DODATAK



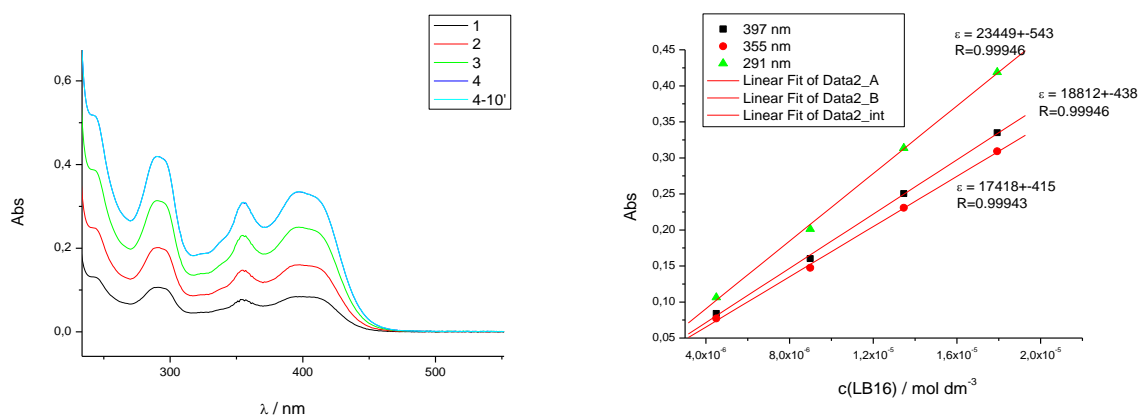
Slika D 1. lijevo: UV/Vis spektar spoja LB3 u koncentracijskom rasponu  $2,5 \times 10^{-6}$  -  $1,99 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> pri pH = 7,0, u kakodilatnom puferu  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>; desno: ovisnost apsorpcije spoja LB3 o koncentraciji pri 294 i 428 nm



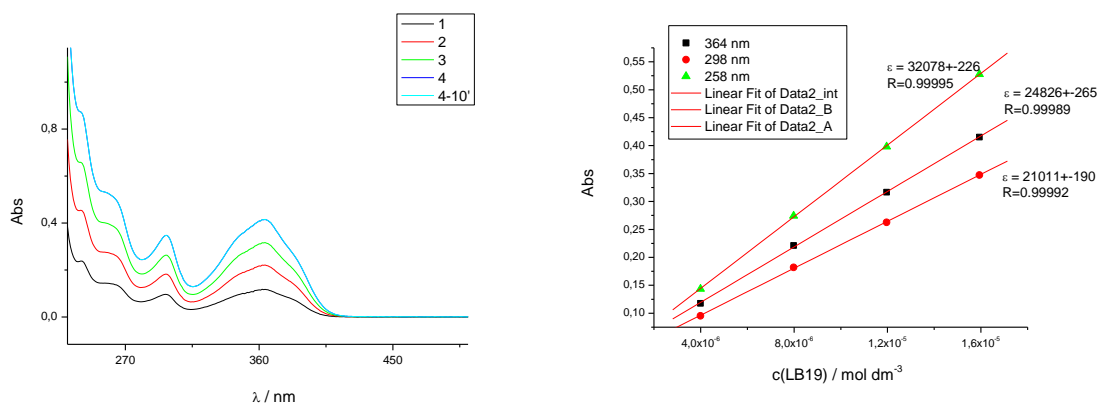
Slika D 2. lijevo: UV/Vis spektar spoja LB4 u koncentracijskom rasponu  $5 \times 10^{-6}$  -  $1,99 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> pri pH = 7,0, u kakodilatnom puferu  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>; desno: ovisnost apsorpcije spoja LB3 o koncentraciji pri 294 i 428 nm



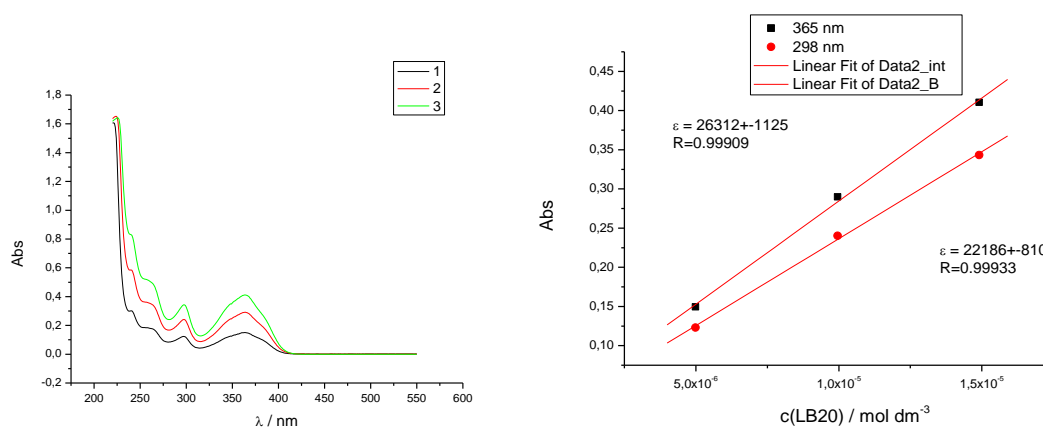
Slika D 3. lijevo: UV/Vis spektar spoja LB15 u koncentracijskom rasponu  $5 \times 10^{-6}$  –  $1,99 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> pri pH = 7,0, u kakodilatnom puferu  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>; desno: ovisnost apsorbancije spoja LB3 o koncentraciji pri 294 i 408 nm



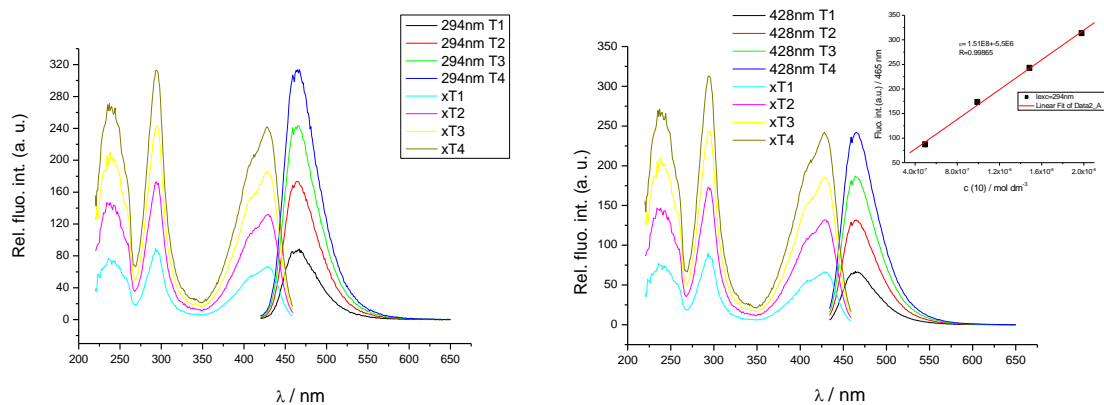
Slika D 4. lijevo: UV/Vis spektar spoja LB16 u koncentracijskom rasponu  $5 \times 10^{-6}$  –  $1,99 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> pri pH = 7,0, u kakodilatnom puferu  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>; desno: ovisnost apsorbancije spoja LB3 o koncentraciji pri 291, 355 i 397 nm



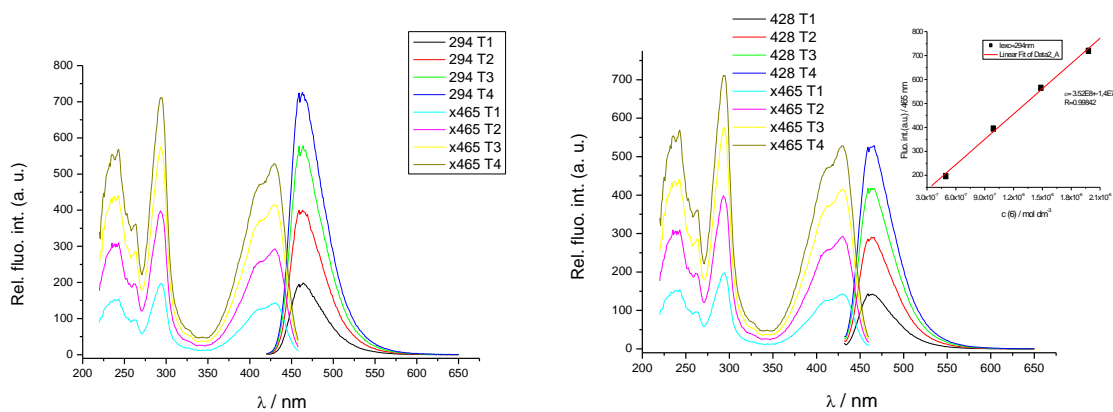
Slika D 5. lijevo: UV/Vis spektar spoja LB19 u koncentracijskom rasponu  $4 \times 10^{-6}$  –  $1,59 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> pri pH = 7,0, u kakodilatnom puferu  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>; desno: ovisnost apsorbancije spoja LB3 o koncentraciji pri 258, 298 i 364 nm



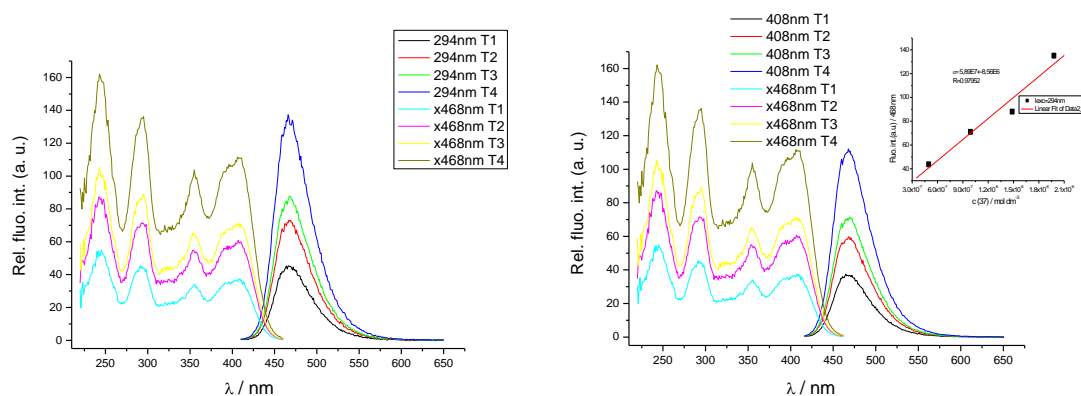
Slika D 6. lijevo: UV/Vis spektar spoja LB20 u koncentracijskom rasponu  $9,98 \times 10^{-6}$  –  $2,98 \times 10^{-5}$  mol dm<sup>-3</sup> pri pH = 7,0, u kakodilatnom puferu  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>; desno: ovisnost apsorbancije spoja LB3 o koncentraciji pri 298 i 365 nm



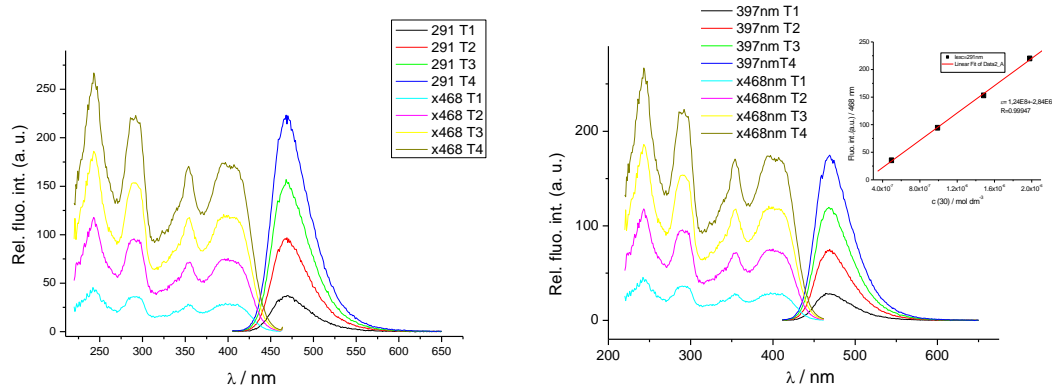
Slika D 7. Emisijski i ekscitacijski spektri spoja LB3 u koncentracijskom rasponu  $4,95 \times 10^{-7}$  –  $1,98 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup> pri  $\lambda_{exc}=294$  nm i 428 nm, pH = 7,0, kakodilatni pufer  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>



Slika D 8. Emisijski i ekscitacijski spektri spoja LB4 u koncentracijskom rasponu  $4,95 \times 10^{-7}$  –  $1,98 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup> pri  $\lambda_{exc}=294$  nm i 428 nm, pH = 7,0, kakodilatni pufer  $I = 0,05$  mol dm<sup>-3</sup>

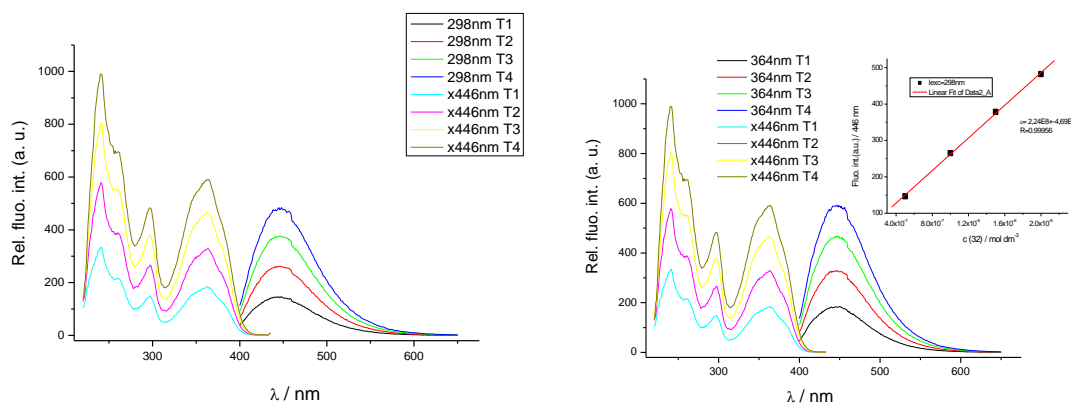


Slika D 9. Emisijski i ekscitacijski spektri spoja LB15 u koncentracijskom rasponu  $4,95 \times 10^{-7} - 1,98 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  pri  $\lambda_{\text{exc}}=294 \text{ nm}$  i  $408 \text{ nm}$ ,  $\text{pH} = 7,0$ , kakodilatni pufer  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$

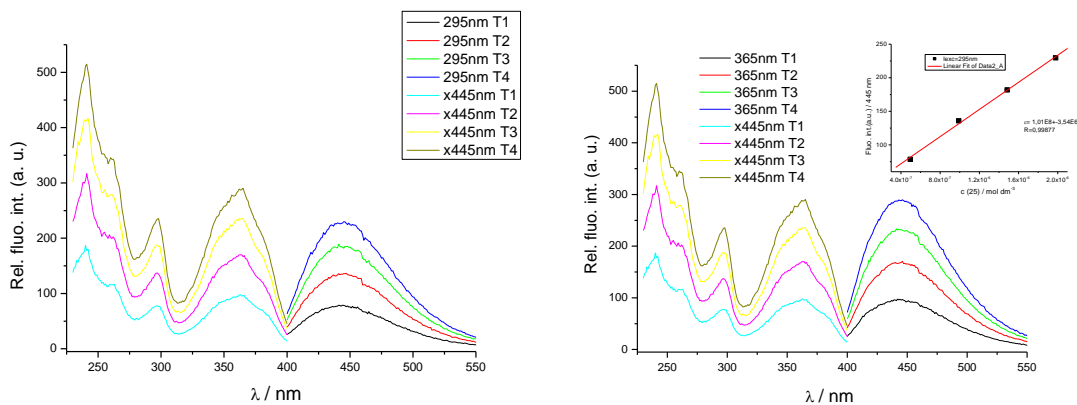


Slika D 10. Emisijski i ekscitacijski spektri spoja LB16 u koncentracijskom rasponu  $4,95 \times 10^{-7} - 1,979 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$  pri  $\lambda_{\text{exc}}=291 \text{ nm}$  i  $397 \text{ nm}$ ,  $\text{pH} = 7,0$ , kakodilatni pufer  $I=0,05 \text{ mol dm}^{-3}$

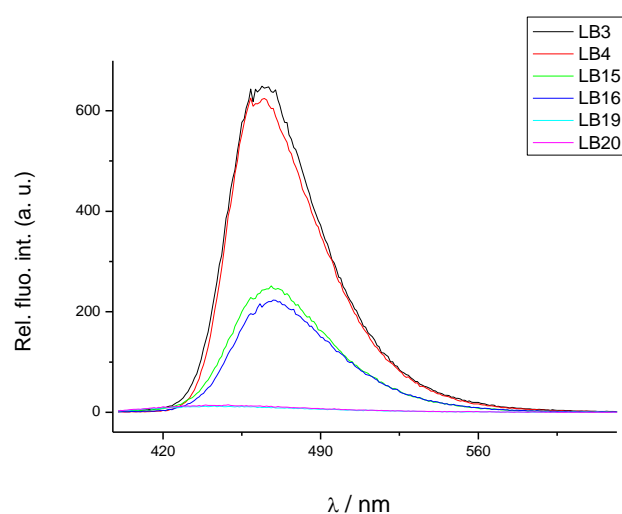




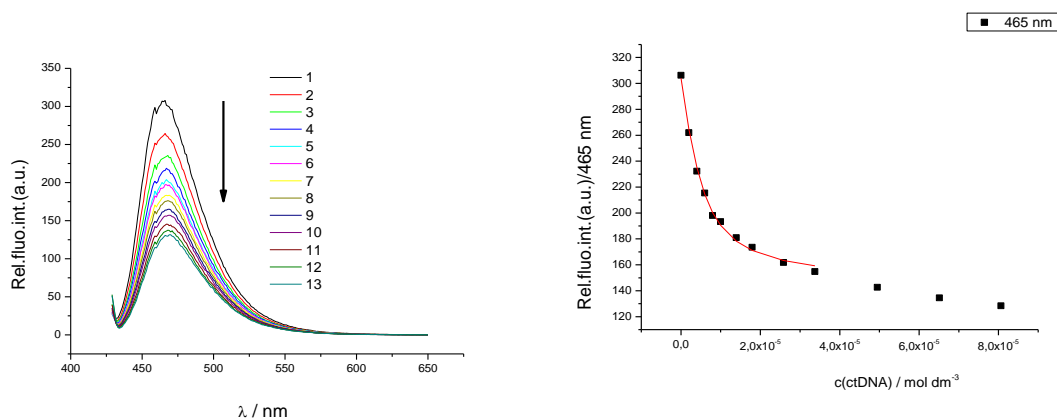
Slika D 11. Emisijski i ekscitacijski spektri spoja LB19 u koncentracijskom rasponu  $4,99 \times 10^{-7}$  –  $1,99 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup> pri  $\lambda_{exc}=298$  nm i 364 nm, pH = 7,0, kakodilatni pufer  $I=0,05$  mol dm<sup>-3</sup>



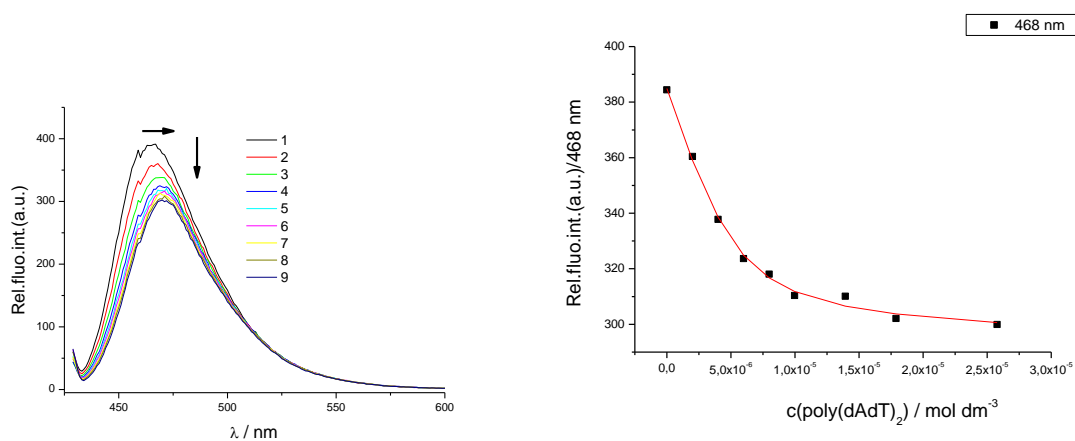
Slika D 12. Emisijski i ekscitacijski spektri spoja LB20 u koncentracijskom rasponu  $4,95 \times 10^{-7}$  –  $1,98 \times 10^{-6}$  mol dm<sup>-3</sup> pri  $\lambda_{exc}=295$  nm i 365 nm, pH = 7,0, kakodilatni pufer  $I=0,05$  mol dm<sup>-3</sup>



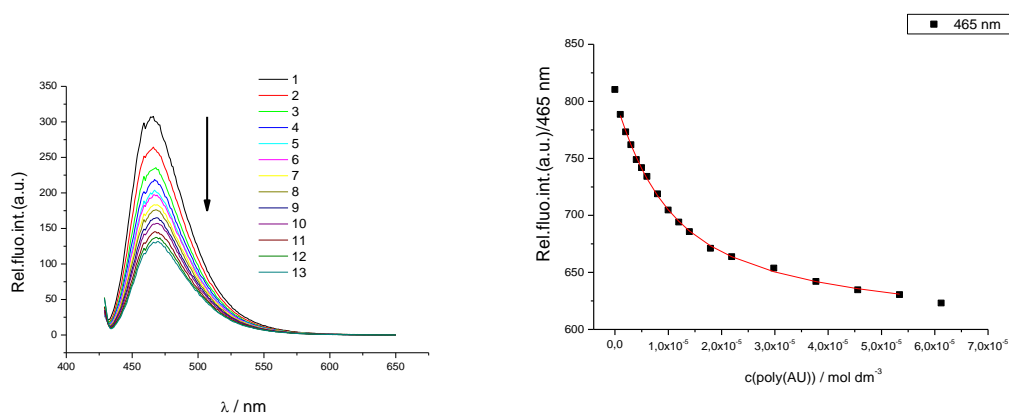
Slika D 13. Emisijski spektri od **LB3** ( $\lambda_{\text{exc}}=294\text{nm}$ ), **LB4** ( $\lambda_{\text{exc}}=294\text{nm}$ ), **LB15** ( $\lambda_{\text{exc}}=294\text{nm}$ ), **LB16** ( $\lambda_{\text{exc}}=291\text{nm}$ ), **LB19** ( $\lambda_{\text{exc}}=298\text{nm}$ ) i **LB20** ( $\lambda_{\text{exc}}=298\text{nm}$ ) pri koncentraciji,  $c = 2 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ; ( $S_{\text{exc}}=2.5, S_{\text{em}}=5$ ),  $\text{pH} = 7,0$ , kakodilatni pufer  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



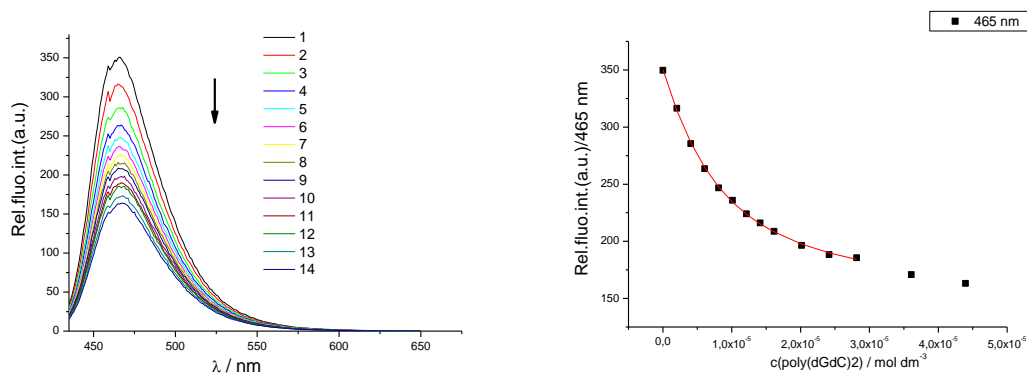
Slika D 14. lijevo: Fluorimetrijska titracija spoja **LB3** ( $c = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 428 \text{ nm}$ ) s ctDNA ( $c = 2,0 \times 10^{-6} - 8,1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); desno: Ovisnost apsorbancije **LB3** pri  $\lambda_{\text{max}} = 465 \text{ nm}$  o  $c(\text{ctDNA})$ ,  $\text{pH} = 7,0$ , kakodilatni pufer  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



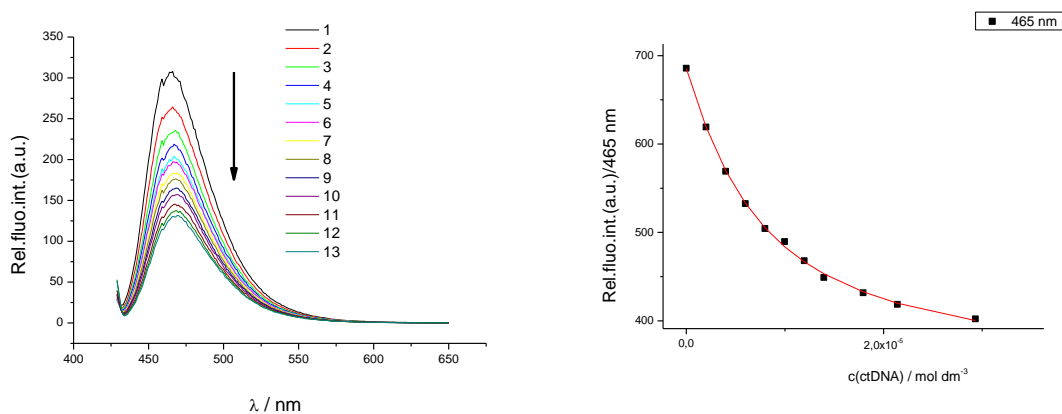
Slika D 15. lijevo: Fluorimetrijska titracija spoja **LB3** ( $c = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 428 \text{ nm}$ ) s  $\text{p(dAdT)}_2$  ( $c = 2,0 \times 10^{-6} - 2,6 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); desno: Ovisnost apsorbancije **LB3** pri  $\lambda_{\text{max}} = 465 \text{ nm}$  o  $c(\text{p(dAdT)}_2)$ ,  $\text{pH} = 7,0$ , kakodilatni pufer  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



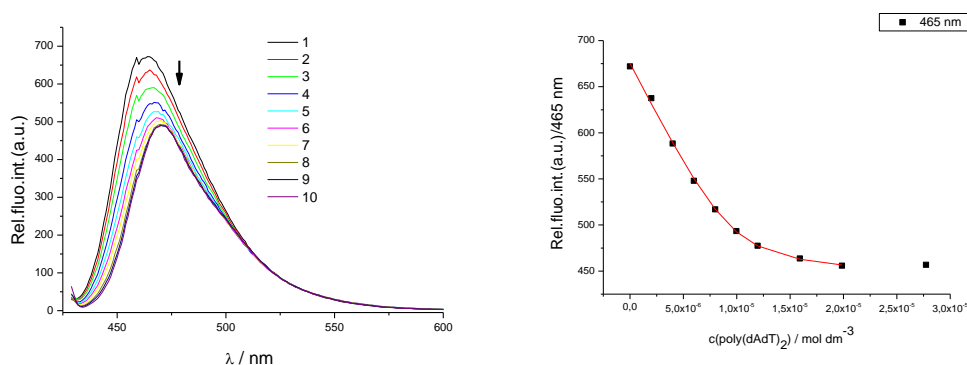
Slika D 16. lijevo: Fluorimetrijska titracija spoja **LB3** ( $c = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 428 \text{ nm}$ ) s  $\text{pApU}$  ( $c = 1,0 \times 10^{-6} - 6,1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); desno: Ovisnost apsorbancije **LB3** pri  $\lambda_{\text{max}} = 465 \text{ nm}$  o  $c(\text{pApU})$ ,  $\text{pH} = 7,0$ , kakodilatni pufer  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



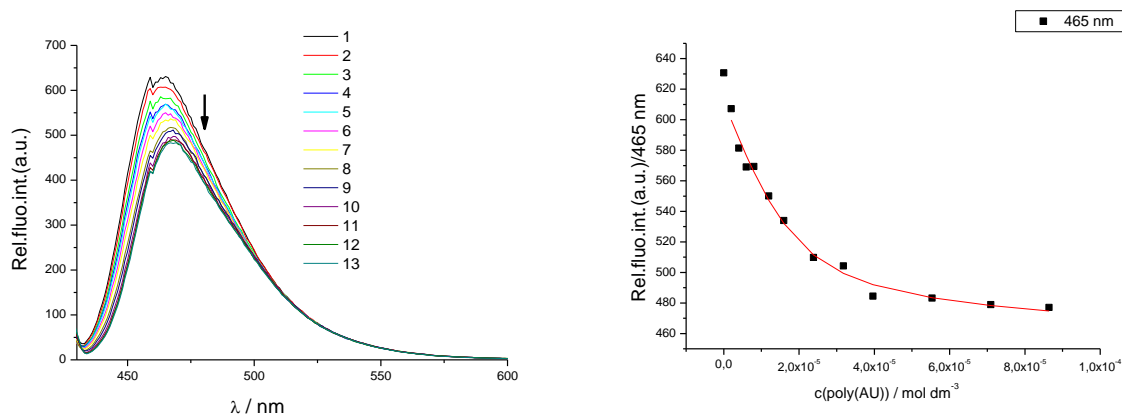
Slika D 17. lijevo: Fluorimetrijska titracija spoja **LB3** ( $c = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 428 \text{ nm}$ ) s  $\text{p(dGdC)}_2$  ( $c = 2,0 \times 10^{-6} - 4,4 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); desno: Ovisnost apsorpcije **LB3** pri  $\lambda_{\text{max}} = 465 \text{ nm}$  o  $c(\text{p(dGdC)}_2)$ ,  $\text{pH} = 7,0$ , kakovilatni pufer  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



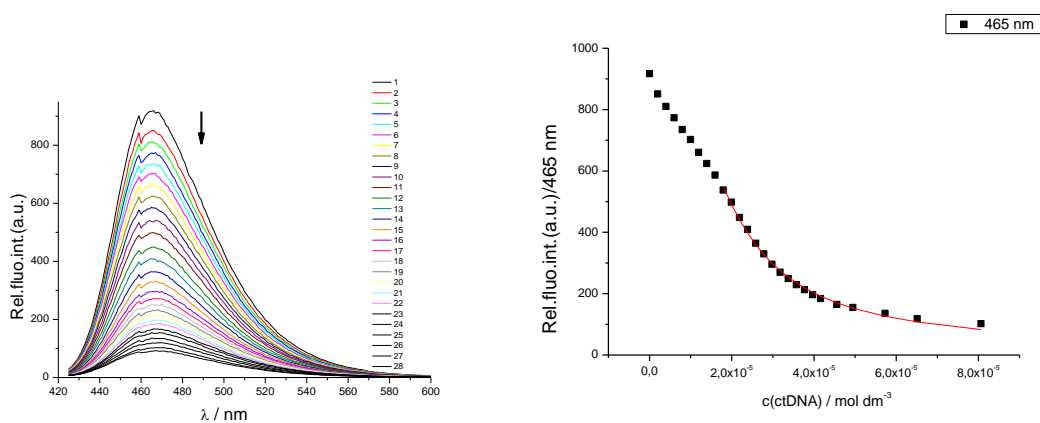
Slika D 18. lijevo: Fluorimetrijska titracija spoja **LB4** ( $c = 1,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 428 \text{ nm}$ ) s ctDNA ( $c = 2,0 \times 10^{-6} - 8,1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); desno: Ovisnost apsorpcije **LB4** pri  $\lambda_{\text{max}} = 465 \text{ nm}$  o  $c(\text{ctDNA})$ ,  $\text{pH} = 7,0$ , kakovilatni pufer  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



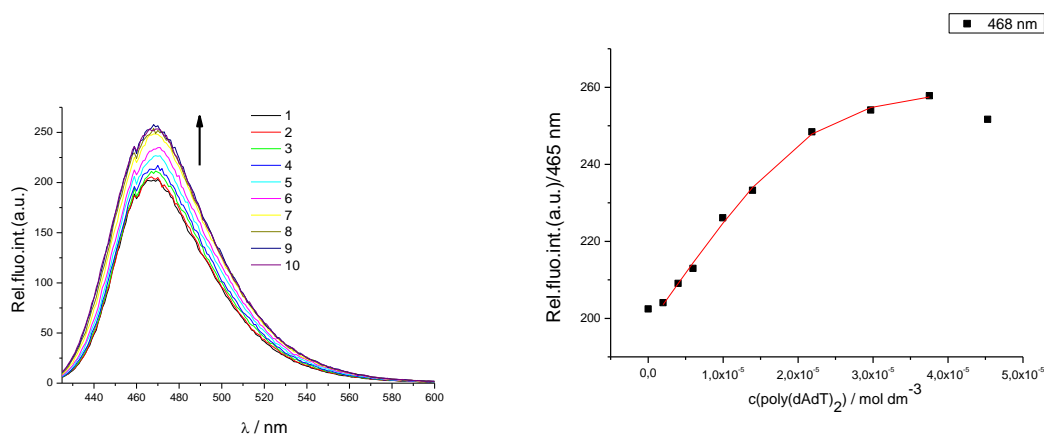
Slika D 19. lijevo: Fluorimetrijska titracija spoja **LB4** ( $c = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 428 \text{ nm}$ ) s  $\text{p(dAdT)}_2$  ( $c = 2,0 \times 10^{-6} - 2,8 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); desno: Ovisnost apsorbancije **LB4** pri  $\lambda_{\text{max}} = 465 \text{ nm}$  o  $c(\text{poly(dAdT)}_2)$ ,  $\text{pH} = 7,0$ , kakodilatni pufer  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



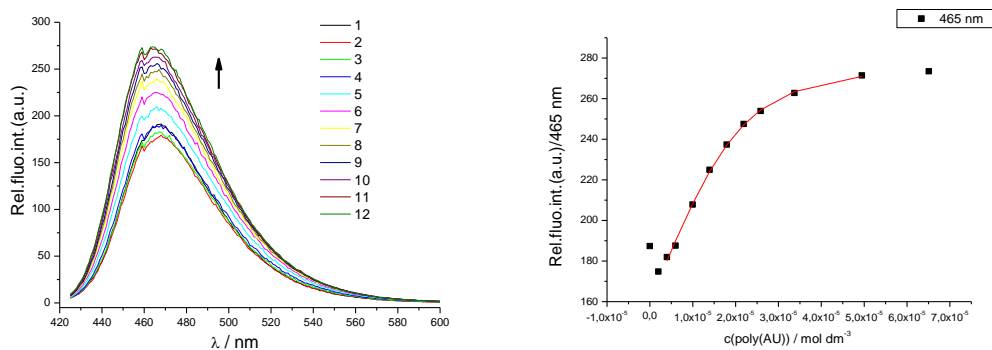
Slika D 20. lijevo: Fluorimetrijska titracija spoja **LB4** ( $c = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 428 \text{ nm}$ ) s  $\text{pApU}$  ( $c = 2,0 \times 10^{-6} - 8,6 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); desno: Ovisnost apsorbancije **LB4** pri  $\lambda_{\text{max}} = 465 \text{ nm}$  o  $c(\text{pApU})$ ,  $\text{pH} = 7,0$ , kakodilatni pufer  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



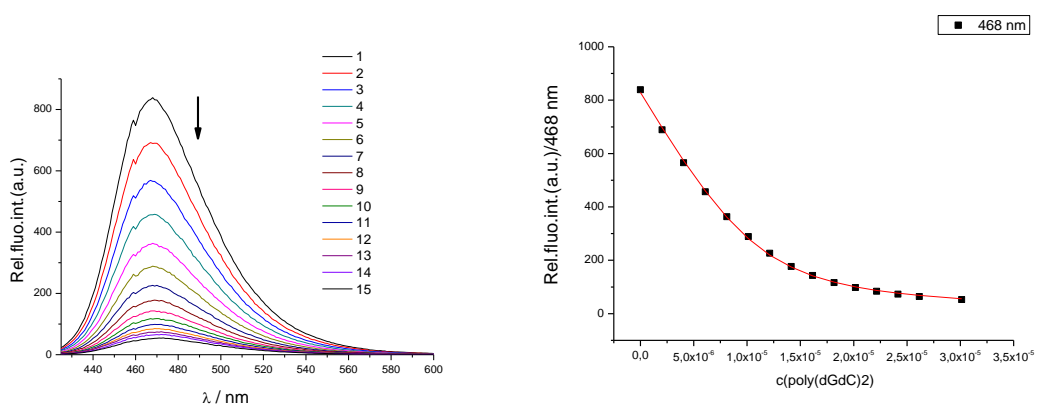
Slika D 21. lijevo: Fluorimetrijska titracija spoja **LB15** ( $c = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}}=408 \text{ nm}$ ) s ctDNA ( $c = 2,0 \times 10^{-6} - 9,6 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); desno: Ovisnost apsorbancije **LB15** pri  $\lambda_{\text{max}} = 465 \text{ nm}$  o  $c(\text{ctDNA})$ ,  $\text{pH} = 7,0$ , kakodilatni pufer  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



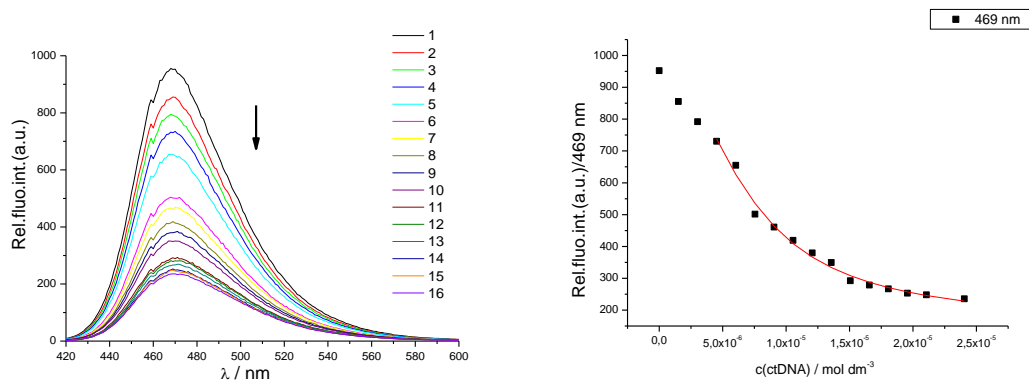
Slika D 22. lijevo: Fluorimetrijska titracija spoja **LB15** ( $c = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}}=408 \text{ nm}$ ) s  $\text{p}(\text{dAdT})_2$  ( $c = 2,0 \times 10^{-6} - 3,8 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); desno: Ovisnost apsorbancije **LB15** pri  $\lambda_{\text{max}} = 465 \text{ nm}$  o  $c(\text{p}(\text{dAdT})_2)$ ,  $\text{pH} = 7,0$ , kakodilatni pufer  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



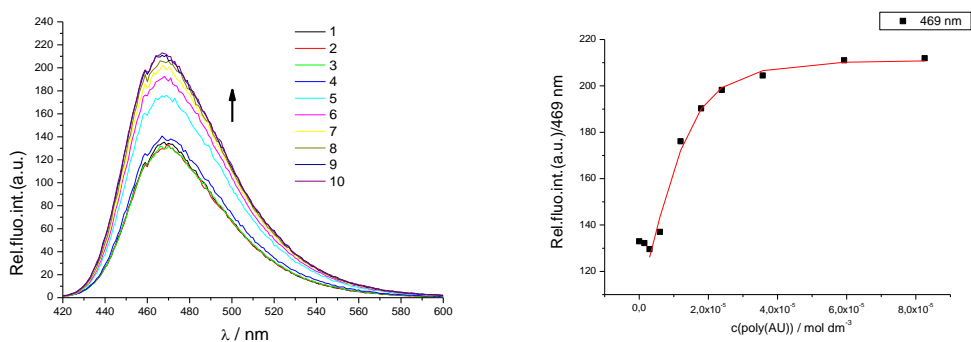
Slika D 23. lijevo: Fluorimetrijska titracija spoja **LB15** ( $c = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 408 \text{ nm}$ ) s pApU ( $c = 2,0 \times 10^{-6} - 6,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); desno: Ovisnost apsorbancije **LB15** pri  $\lambda_{\text{max}} = 465 \text{ nm}$  o  $c(\text{pApU})$ , pH = 7,0, kakodilatni pufer  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



Slika D 24. lijevo: Fluorimetrijska titracija spoja **LB15** ( $c = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 408 \text{ nm}$ ) s p(dGdC)<sub>2</sub> ( $c = 2,0 \times 10^{-6} - 6,5 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); desno: Ovisnost apsorbancije **LB15** pri  $\lambda_{\text{max}} = 468 \text{ nm}$  o  $c(\text{p(dGdC)}_2)$ , pH = 7,0, kakodilatni pufer  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$

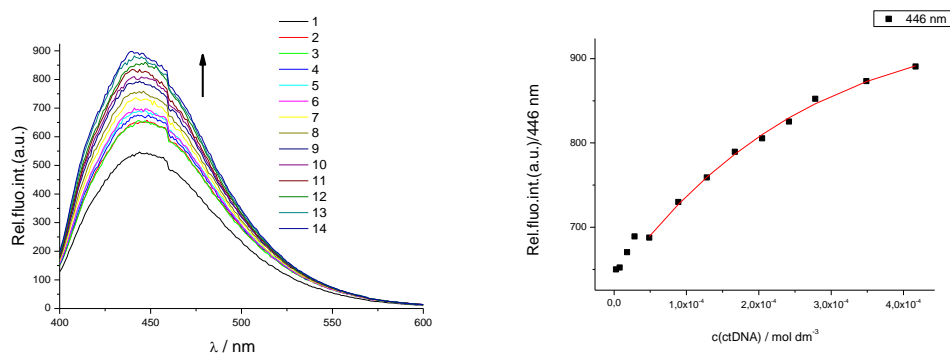


Slika D 25. lijevo: Fluorimetrijska titracija spoja **LB16** ( $c = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}}=397 \text{ nm}$ ) s ctDNA ( $c = 1,5 \times 10^{-6} - 2,4 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); desno: Ovisnost apsorbancije **LB16** pri  $\lambda_{\text{max}} = 469 \text{ nm}$  o  $c(\text{ctDNA})$ , pH = 7,0, kakodilatni pufer  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$

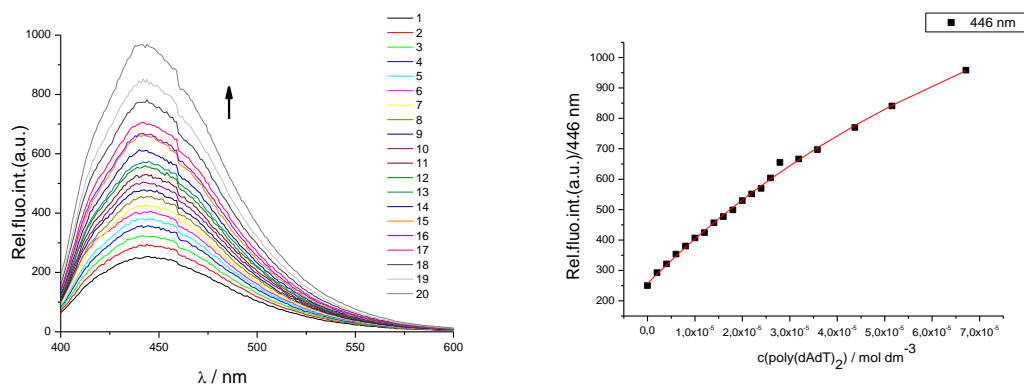


Slika D 26. lijevo: Fluorimetrijska titracija spoja **LB16** ( $c = 1,5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}}=397 \text{ nm}$ ) s pApU ( $c = 1,5 \times 10^{-6} - 8,3 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); desno: Ovisnost apsorbancije **LB16** pri  $\lambda_{\text{max}} = 469 \text{ nm}$  o  $c(\text{pApU})$ , pH = 7,0, kakodilatni pufer  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$

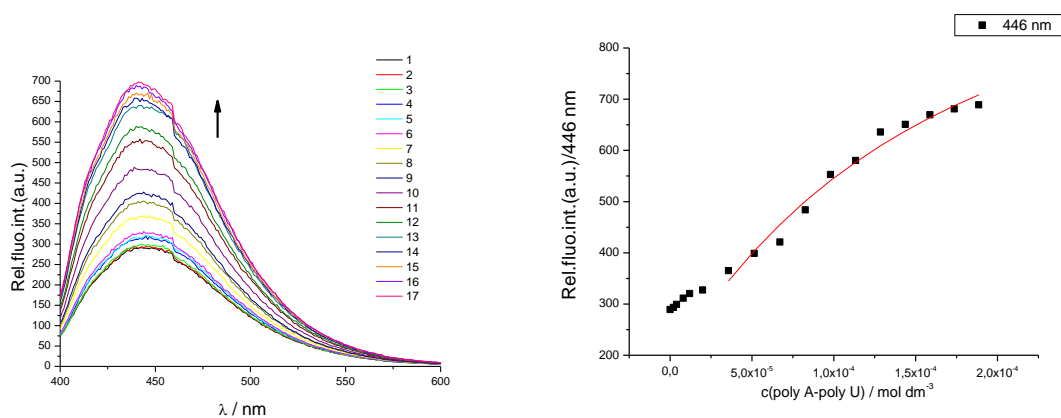




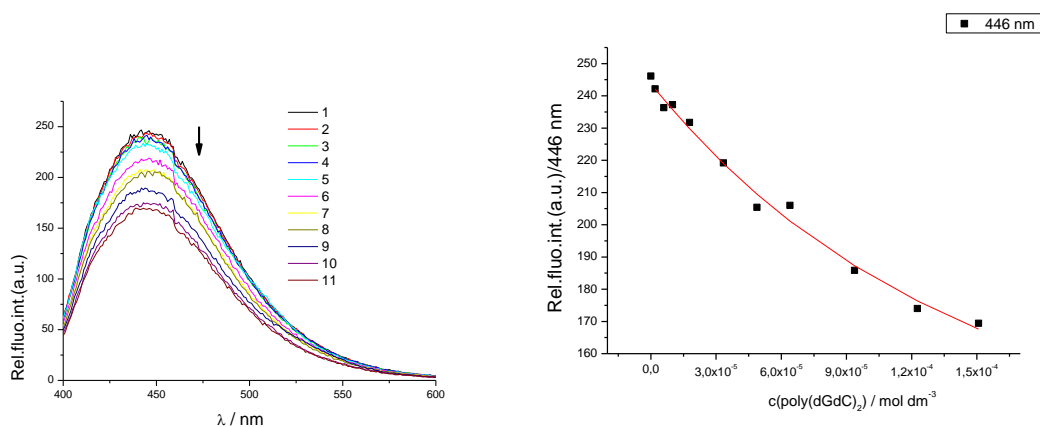
Slika D 27. lijevo: Fluorimetrijska titracija spoja **LB19** ( $c = 2,6 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}}=364 \text{ nm}$ ) s ctDNA ( $c = 2,6 \times 10^{-6} - 4,2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ); desno: Ovisnost apsorbancije **LB19** pri  $\lambda_{\text{max}} = 446 \text{ nm}$  o  $c(\text{ctDNA})$ , pH = 7,0, kakodilatni pufer  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



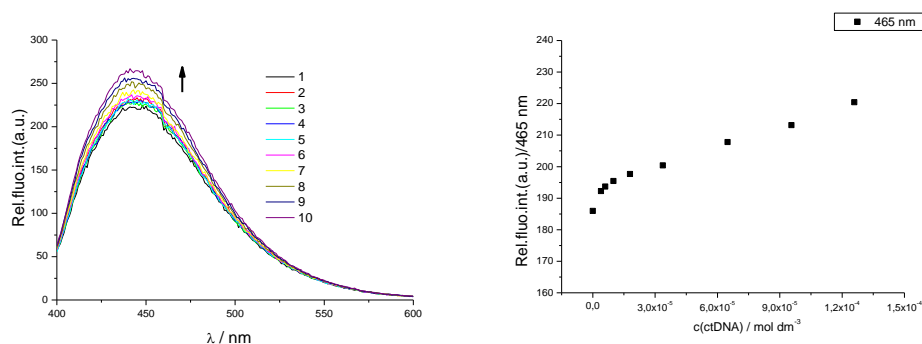
Slika D 28. lijevo: Fluorimetrijska titracija spoja **LB19** ( $c = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 364 \text{ nm}$ ) s p(dAdT)<sub>2</sub> ( $c = 2,0 \times 10^{-6} - 6,7 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); desno: Ovisnost apsorbancije **LB19** pri  $\lambda_{\text{max}} = 446 \text{ nm}$  o  $c(\text{p(dAdT)}_2)$ , pH = 7,0, kakodilatni pufer  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



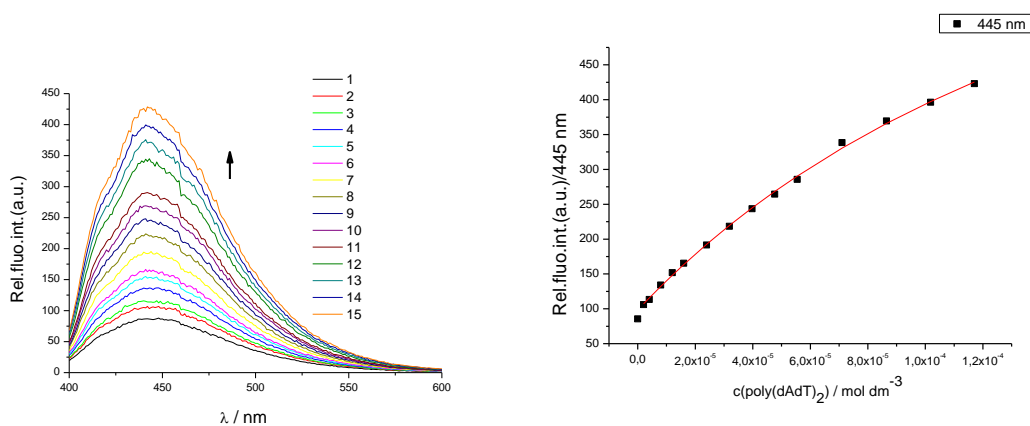
Slika D 29. lijevo: Fluorimetrijska titracija spoja **LB19** ( $c = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 364 \text{ nm}$ ) s pApU ( $c = 2,0 \times 10^{-6} - 1,9 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ); desno: Ovisnost apsorbancije **LB19** pri  $\lambda_{\text{max}} = 446 \text{ nm}$  o  $c(\text{pApU})$ , pH = 7,0, kakodilatni pufer  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



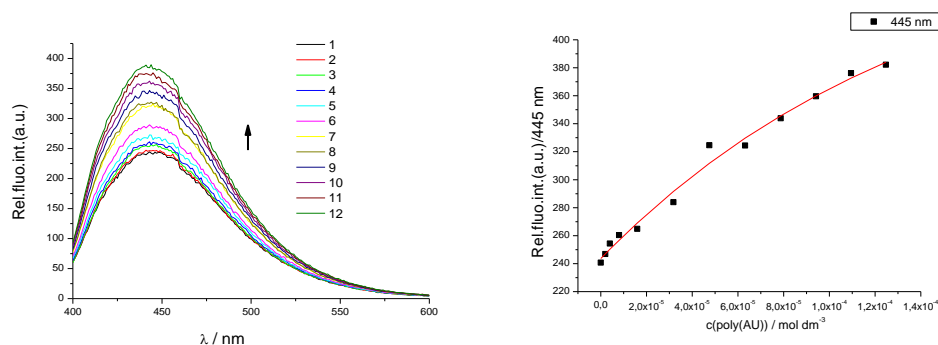
Slika D 30. lijevo: Fluorimetrijska titracija spoja **LB19** ( $c = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 364 \text{ nm}$ ) s p(dGdC)<sub>2</sub> ( $c = 2,0 \times 10^{-6} - 1,5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ); desno: Ovisnost apsorbancije **LB19** pri  $\lambda_{\text{max}} = 446 \text{ nm}$  o  $c(\text{p(dGdC)}_2)$ , pH = 7,0, kakodilatni pufer  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



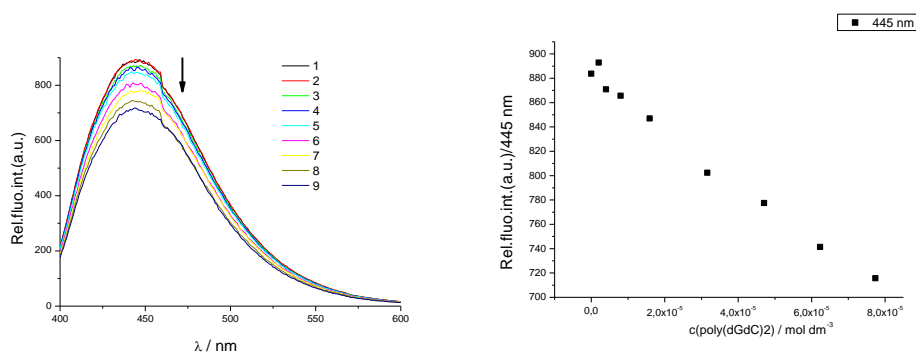
Slika D 31. lijevo: Fluorimetrijska titracija spoja **LB20** ( $c = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$ ) s ctDNA ( $c = 2,0 \times 10^{-6} - 1,3 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ); desno: Ovisnost apsorbancije **LB20** pri  $\lambda_{\text{max}} = 445 \text{ nm}$  o  $c(\text{ctDNA})$ , pH = 7,0, kakodilatni pufer  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



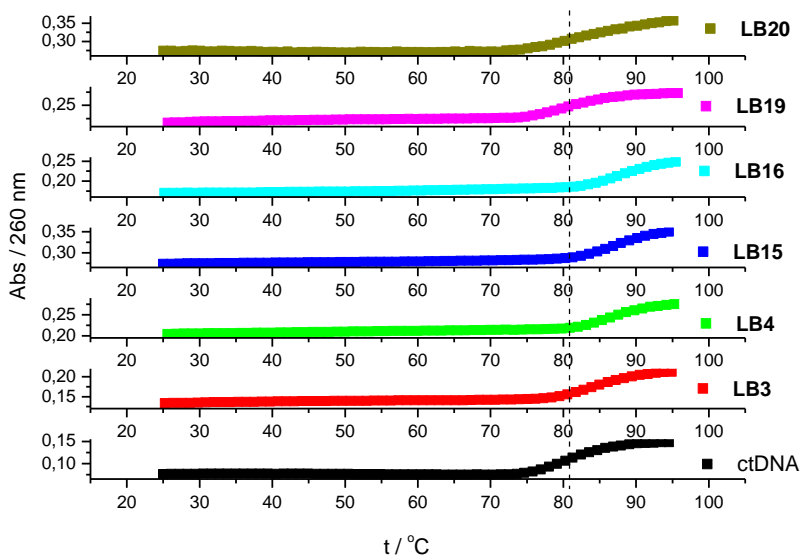
Slika D 32. lijevo: Fluorimetrijska titracija spoja **LB20** ( $c = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$ ) s  $\text{p}(\text{dAdT})_2$  ( $c = 2,0 \times 10^{-6} - 1,2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ); desno: Ovisnost apsorbancije **LB20** pri  $\lambda_{\text{max}} = 445 \text{ nm}$  o  $c(\text{poly}(\text{dAdT})_2)$ , pH = 7,0, kakodilatni pufer  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



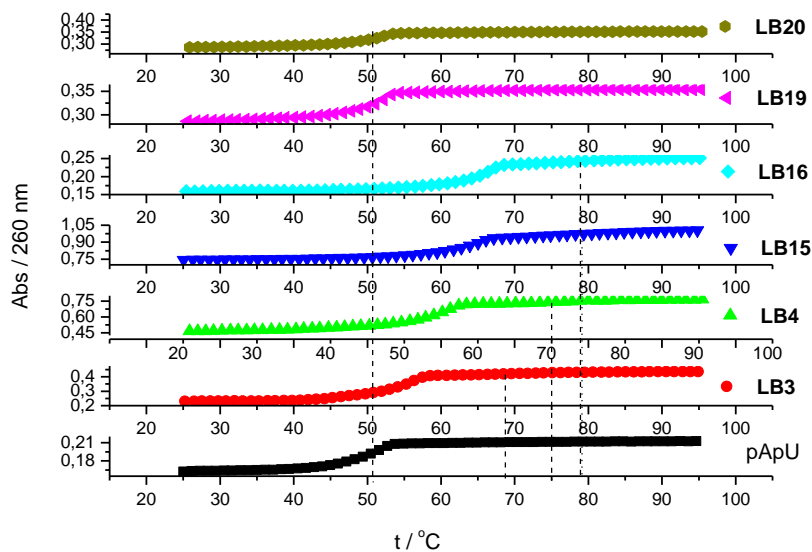
Slika D 33. lijevo: Fluorimetrijska titracija spoja **LB20** ( $c = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$ ) s pApU ( $c = 2,0 \times 10^{-6} - 1,3 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ); desno: Ovisnost apsorbancije **LB20** pri  $\lambda_{\text{max}} = 445 \text{ nm}$  o  $c(\text{pApU})$ , pH = 7,0, kakodilatni pufer  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



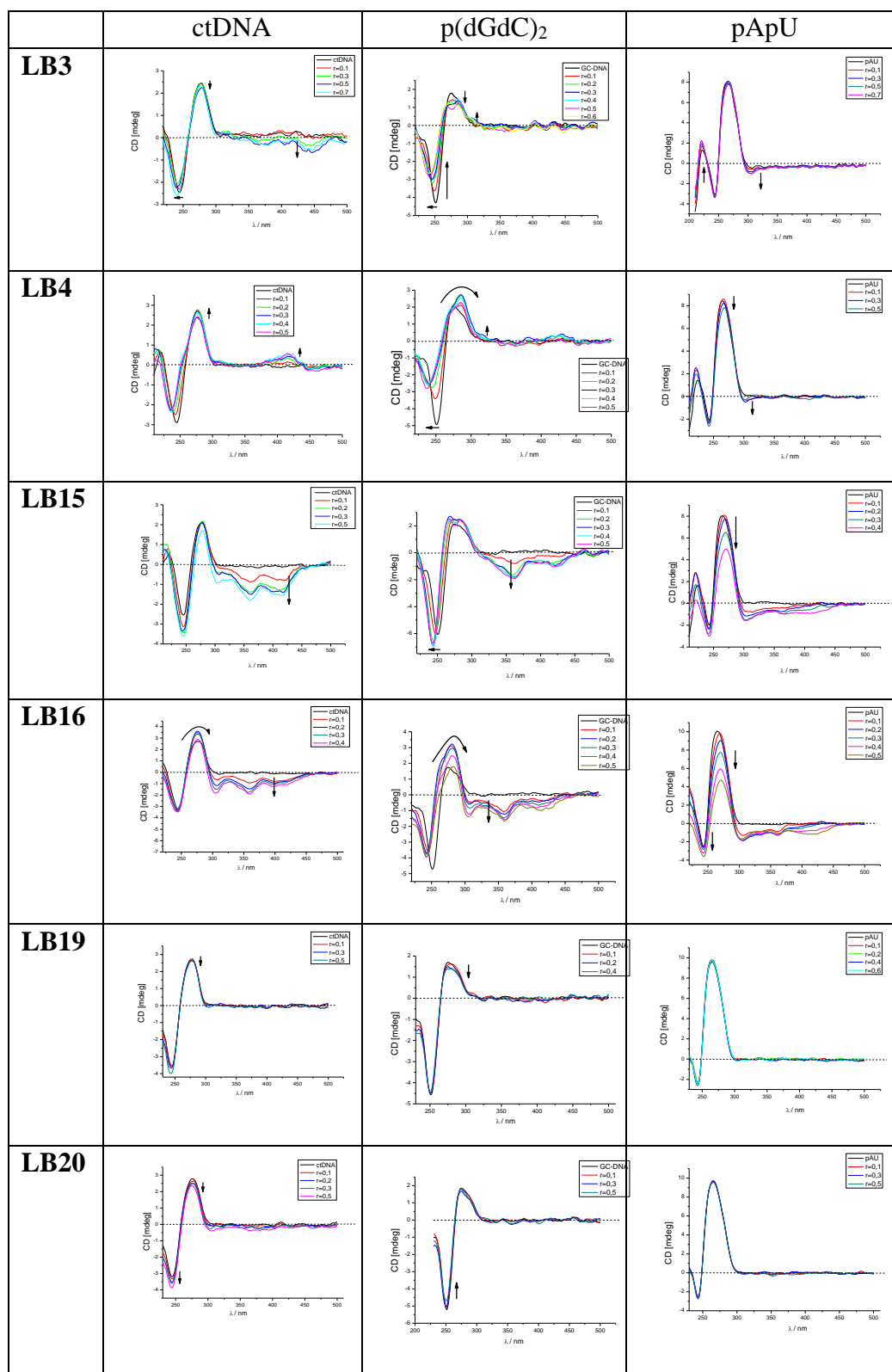
Slika D 34. lijevo: Fluorimetrijska titracija spoja **LB20** ( $c = 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\lambda_{\text{exc}} = 365 \text{ nm}$ ) s p(dGdC)<sub>2</sub> ( $c = 2,0 \times 10^{-6} - 7,7 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ); desno: Ovisnost apsorbancije **LB20** pri  $\lambda_{\text{max}} = 445 \text{ nm}$  o  $c(\text{p(dGdC)}_2)$ , pH = 7,0, kakodilatni pufer  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



Slika D 35. Krivulja taljenja **ctDNA** nakon dodavanja spojeva **LB3**, **LB4**, **LB15**, **LB16**, **LB19** i **LB20** u omjeru,  $r$  ( $[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]$ ) = 0,3, pH = 7,0, kakodilatni pufer  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



Slika D 36. Krivulja taljenja **pApU** nakon dodavanja spojeva **LB3**, **LB4**, **LB15**, **LB16**, **LB19** i **LB20** u omjeru,  $r$  ( $[\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]$ ) = 0,3, pH = 7,0, kakodilatni pufer  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$



Slika D 37. CD titracije ctDNA, p(dGdC)<sub>2</sub> i pApU ( $c = 3,0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) sa spojevima LB3, LB4, LB15, LB16, LB19 i LB20, različitim molarim omjerima  $r = [\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]$  (pH = 7,0, kakodilatni pufer,  $I = 0,05 \text{ mol dm}^{-3}$ )

## § 9. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Lea Grgić

Datum rođenja: 1. travnja 1995.

Mjesto rođenja: Osijek

### Obrazovanje

2001. – 2009. Osnovna škola Vladimira Becića, Osijek

2009. – 2013. I. gimnazija Osijek, Osijek

2013. – 2017. Preddiplomski sveučilišni studij kemije, Odjel za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Osijek

2017. – 2021. Diplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

### Publikacije

1. B. Lončar, N. Perin, M. Mioč, I. Boček, L. Grgić, M. Kralj, S. Tomić, M. Radić Stojković, M. Hranjec, *Novel amino substituted tetracyclic imidazo[4,5-b] pyridine derivatives: Design, synthesis, antiproliferative activity and DNA/RNA binding study*, *Eur. J. Med. Chem.* **217** (2021) 113342.