

Fino strukturno ugađanje heterocikličkih boja na bazi stirila za spektrofotometrijsko prepoznavanje različitih ds-DNA/RNA slijedova

Pečurlić, Ivona

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:809039>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-24**



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)





**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ**

Ivona Pečurlić

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2022.
SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Ivona Pečurlić

FINO STRUKTURNO UGAĐANJE HETEROCIKLIČKIH BOJA NA BAZI STIRILA ZA
SPEKTROFOTOMETRIJSKO PREPOZNAVANJE RAZLIČITIH ds-DNA/RNA
SLIJEDOVA

DIPLOMSKI RAD

Mentor rada: prof. dr. sc. Irena Škorić
Komentor rada: dr. sc. Ivo Piantanida

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Irena Škorić
dr.sc. Ivo Piantanida
doc. dr. sc. Željka Ujević Andrijić

Zagreb, rujan 2022.

Sažetak

U sklopu ovog diplomskog rada ispitivane su interakcije s molekulama DNA i RNA za četiri stirilne boje, različitih heterocikličkih jezgri te položaja supstituenata. Sve boje imaju strukturu koja sadržava konjugirani sustav te uz pozitivan naboj, pokazuju odlični potencijal za vezanje na polinukleotide. Svi spojevi su karakterizirani uz metode UV/Vis spektrofotometrije i spektrofluorimetrije te preliminarnim ispitivanjima vezanja na DNA, uočena je značajna promjena fluorescencijskog odziva kao naznaka vezanja. UV/Vis te fluorimetrijskim titracijama spojeva s polinukleotidima, ustanovljeno je kako svi spojevi pokazuju afinitet prema vezanju na RNA te ponešto viši afiniteti vidljivi su prema DNA, što je izraženo logaritmom konstante stabilnosti određenih prema Scatchardovoj jednadžbi. Opisujući način vezanja, sve boje pokazuju nespecifično vezanje u utore. Spojevi pokazuju slab stabilizacijski utjecaj na polinukleotide, u većoj mjeri na RNA nego na DNA molekulu.

Ključne riječi: stirilne boje, DNA, RNA, UV/Vis spektrofotometrija, spektrofluorimetrija, cirkularni dikroizam

Naslov rada: Fino strukturalno ugađanje heterocikličkih boja na bazi stirila za spektrofotometrijsko prepoznavanje različitih ds-DNA/RNA slijedova

Abstract

Within this Master's thesis, interactions with DNA and RNA molecules were investigated for four styryl dyes, with different heterocyclic cores and substituent positions. All dyes have a structure that contains a conjugated system and a positive charge, which shows excellent potential for binding to polynucleotides. All compounds were characterized with the UV/Vis spectrophotometry and spectrofluometry methods, and with preliminary DNA binding tests, a significant change in fluorescence response was observed as an indication of binding. By UV/Vis and fluorimetric titrations of compounds with polynucleotides, it was established that all compounds show affinity towards binding to RNA, and slightly higher affinities are visible towards DNA, which are expressed by the logarithm of the stability constant determined according to Scatchard's equation. Describing the mode of binding, all dyes show non-specific binding to the grooves. The compounds show a weak stabilizing effect on polynucleotides, to a greater extent on RNA than on DNA molecules.

Key words: styryl dyes, DNA, RNA, UV/Vis spectrophotometry, spectrofluorimetry, circular dichroism

Title: Fine structural tuning of heterocyclic dyes with a styryl base for spectrophotometric recognition of different ds-DNA/RNA sequences

Sadržaj

| | |
|---|----|
| 1. Uvod | 1 |
| 2. Teorijski dio | 3 |
| 2.1. Nukleinske kiseline..... | 3 |
| 2.1.1. DNA | 5 |
| 2.1.1. RNA | 9 |
| 2.2. Male molekule | 11 |
| 2.3. Mehanizmi vezanja malih molekula..... | 13 |
| 2.3.1. Kovalentno vezanje..... | 13 |
| 2.3.2. Interkalacija..... | 15 |
| 2.3.3. Vezanje u utore | 17 |
| 2.4. Stirilne boje..... | 21 |
| 2.5. Spektrofotometrijske metode za ispitivanje interakcija stirilnih boja i DNA..... | 24 |
| 2.5.1. UV/Vis | 24 |
| 2.5.2. Fluorimetrija | 27 |
| 2.5.4. Cirkularni dikroizam..... | 28 |
| 3. Eksperimentalni dio..... | 31 |
| 3.1. UV/Vis spektrofotometrija | 32 |
| 3.2. Spektrofluorimetrija..... | 32 |
| 3.5. Cirkularni dikroizam..... | 33 |
| 3.6. Termalna denaturacija | 33 |
| 4. Rezultati i rasprava..... | 34 |
| 4.1. Rezultati karakterizacije na UV-Vis | 34 |
| 4.2. Rezultati karakterizacije na spektrofluorimetru | 38 |
| 4.3. Rezultati titracija na UV-Vis spektrofotometru..... | 40 |
| 4.4. Rezultati titracije sa ctDNA na spektrofluorimetru | 43 |
| 4.6. Rezultati eksperimenta termalne denaturacije | 46 |
| 4.7. Rezultati cirkularnog dikroizma | 49 |
| 5. Zaključak | 50 |
| 6. Popis literature..... | 52 |
| 7. Prilog radu | 55 |

1. Uvod

Nukleinske kiseline, DNA i RNA, najvažnije su biološke molekule zbog njihove ključne uloge u pohrani te ekspresiji genetske informacije. Kompleksnost njihove strukture daje različite mogućnosti za vezanje malih molekula, što pobuđuje interes za istraživanje i razvoj terapeutika u svrhu liječenja različitih oblika karcinoma. Vezanje malih molekula na DNA narušava provođenje procesa transkripcije, a time i replikacije DNA tumorske stanice. (1,2)

Fluorescentne boje su spojevi koji imaju mogućnost vezanja na DNA i RNA te pokazuju veliki potencijal za primjenu u proučavanju staničnih procesa. To proizlazi iz činjenice kako pri vezanju fluorescentne boje na polinukleotid dolazi do promjene u emisiji fluorescencije. Postoji nekoliko nekovalentnih načina vezanja koji su mogući, a to su: interkalacija, vezanje u utore i elektrostatske interakcije. (3)

Stirilne boje pripadaju u kategoriju fluorescentnih boja koje pokazuju poželjna svojstva za primjenu u fluorescirajućim probama zbog fotostabilnosti te značajne fluorescencije. (4) Kationske stirilne boje pokazuju velik afinitet za vezanje na DNA te visoku razinu citotoksičnosti, a vežu se nekovalentnim načinima, odnosno interkalacijom ili vezanjem u utore. (5) Karakteristične su po prisutnom stiril-radikal, a varijacije u kemijskoj strukturi dovode do razlika u njihovim svojstvima te načinu vezanja, što je moguće pratiti i analizirati spektrofotometrijskim metodama.

Za stirilne boje ispitivane u ovome radu provedena je usporedba s dvije analogne stirilne boje iz literature. Botti i suradnici (5) koristili su spojeve kojima je heterociklička jezgra piridinska ili kinolinska uz metilnu skupinu kao supstituent. Nadalje, na benzen je vezana dimetilamino-skupina. Boje korištene u ovom radu imaju određene modifikacije što se tiče strukture. Na heterocikličke jezgre piridina i kinolina supstituirana je etilna skupina te su položaji supstitucije različiti za pojedine spojeve u usporedbi sa spojevima iz literature. Također, ispitivan je spoj s benzosenazolnom heterocikličkom jezgrom, što nije prisutno u usporednoj literaturi. Razlika prisutna kod svih spojeva ispitivanih u ovome radu je prisutnost piperazinskog prstena (uz supstituiranu metilnu skupinu) umjesto dimetilamino-skupine.

U ovom radu, koristeći prethodno opisane stirilne boje, provedena je karakterizacija navedenih boja. Potom su istražene interakcije stirilnih boja s polinukleotidima, odnosno

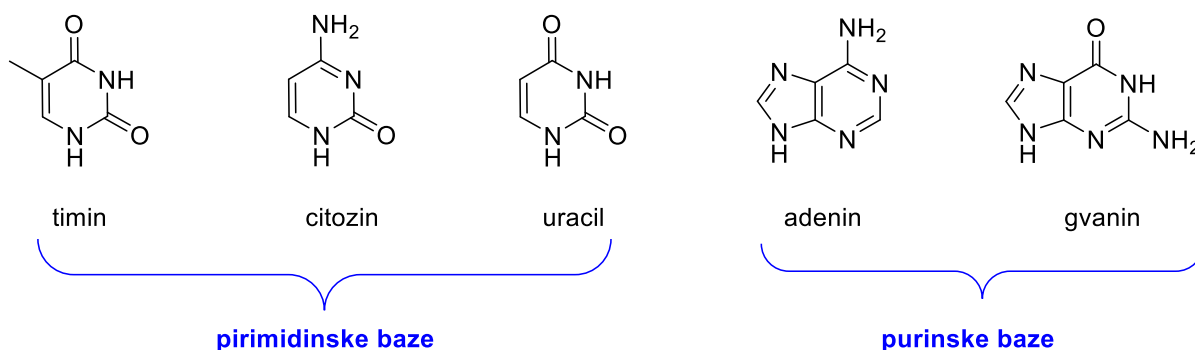
ctDNA i pApU u svrhu određivanja afiniteta ispitivanih boja prema DNA i RNA u smislu konstanti stabilnosti kompleksa male molekule i polinukleotida. Također, cilj ispitivanja je i utvrđivanje načina vezanja stirlnih boja na polinukleotid te proučavanje njihova stabilizacijskog utjecaja.

2. Teorijski dio

2.1. Nukleinske kiseline

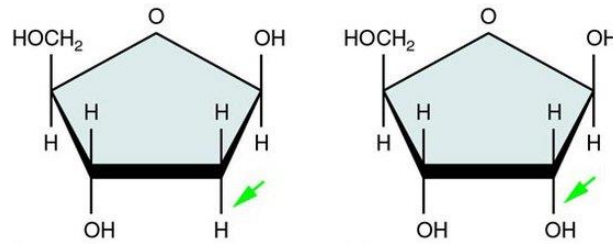
Nukleotidi su organske molekule koje obavljaju brojne važne funkcije staničnog metabolizma, kao što je transport energije unutar stanice u smislu molekule adenozin trifosfata (ATP). Nadalje, nukleotidi mogu biti strukturalne komponente u sastavu brojnih koenzima i metaboličkih intermedijara. Izuzev prethodno navedenih funkcija, također su izuzetno važni jer predstavljaju sastavni dio, tj. monomere u građi nukleinskih kiselina - deoksiribonukleinske (DNA) i ribonukleinske (RNA) kiseline, čija se važnost očituje u skladištenju i prijenosu genetičkih informacija. (6)

Nukleinske kiseline su linearni polimeri građeni od niza monomera povezanih prema genetski određenom redosljedu. Struktura pojedinog nukleotida sastoji se od tri dijela: dušične heterociklične baze, monosaharidnog šećera pentoze i fosfatne skupine. (1) Dušične baze mogu biti purinske (adenin i gvanin) ili pirimidinske (citozin te timin u DNA ili uracil u RNA). Strukture navedenih baza prikazane su na Slici 1.



Slika 1. Strukture pirimidinskih i purinskih dušičnih baza

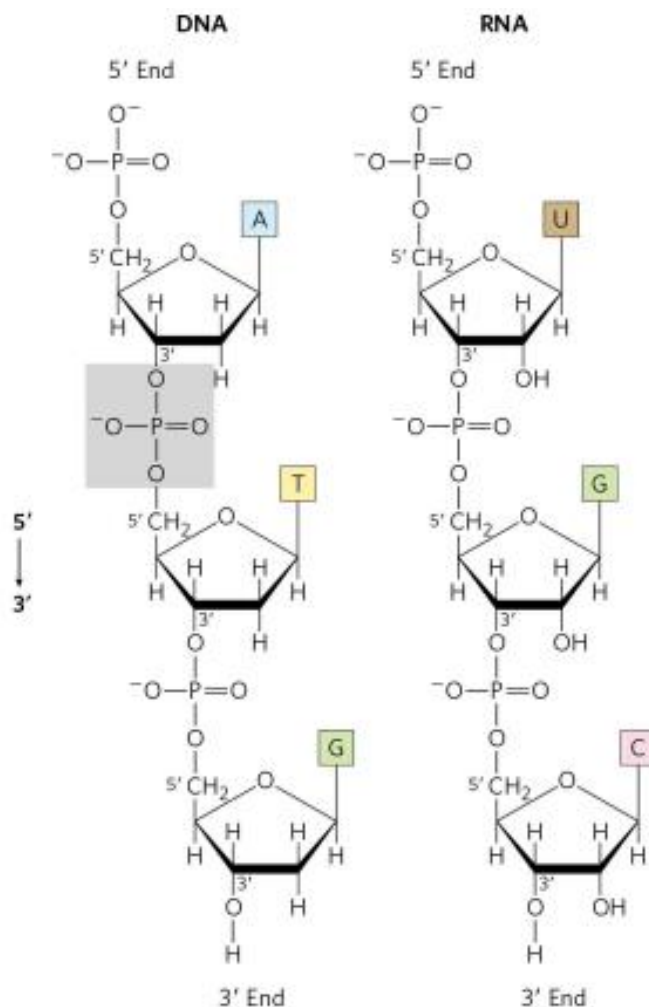
U strukturi nukleinskih kiselina, prethodno navedeni monosaharidni šećer pentozna javlja se u dva oblika: u nukleotidima koji izgrađuju DNA nalazi se 2'-deoksi-D-riboza, dok je u strukturi nukleotida koji sačinjavaju RNA prisutna D-riboza. (6) Razlike u strukturi između navedena dva šećera prikazane su Slikom 2, gdje se uočava kako riboza (desno) sadrži dodatnu hidroksilnu skupinu na 2' ugljiku u odnosu na deoksiriboza (lijevo).



Slika 2. Strukture šećera: deoksiriboza (lijevo) i riboza (desno) (7)

Dušična baza nukleotida se kovalentno veže (na N-1 poziciji kod pirimidinskih baza te N-9 kod purinskih baza) na C-1' ugljik pentoze pomoću N- β -glikozidne veze, pri čemu se uklanja molekula vode za čije je formiranje potrebna hidroksilna grupa pentoze i vodikov atom baze. Nadalje, fosfatna skupina vezana je za C-5' šećera pentoze fosfodieterskom vezom što je posljedica esterifikacije hidroksilne skupine fosfornom kiselinom. (6, 8)

Nukleinske kiseline, kao i drugi polimeri, nastaju povezivanjem monomernih jedinica. U slučaju nukleinskih kiselina, nukleotidi su kovalentno vezani na strani šećera i fosfatne skupine te njihovim alternirajućim povezivanjem nastaje šećerno – fosfatna okosnica. Način ovakvog povezivanja nukleotida u šećerno – fosfatnu okosnicu objašnjava se vezanjem iste fosfatne skupine na C-3' šećera jednog nukleotida i na C-5' šećera sljedećeg nukleotida fosfodieterskom vezom. (9) Formirana šećerno – fosfatna okosnica prikazana je Slikom 3, gdje je sivo sjenčana fosfodieterska veza.

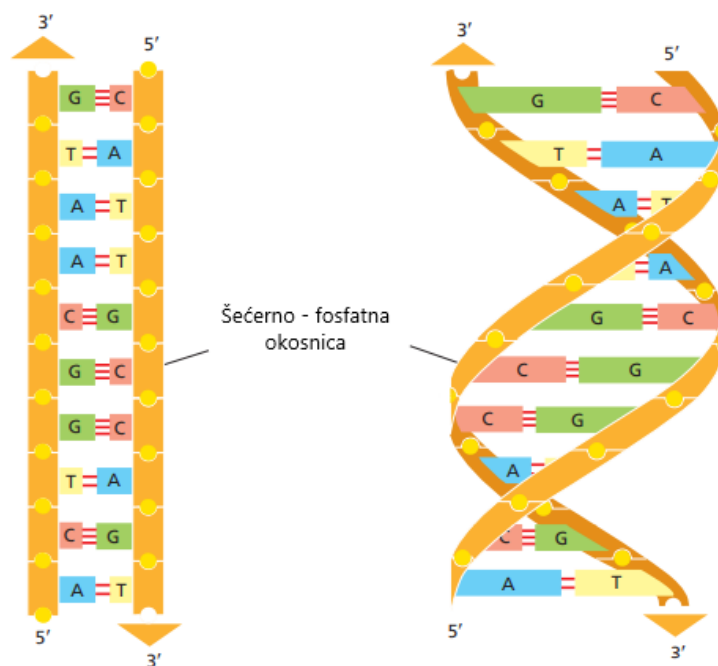


Slika 3. Šećerno – fosfatna okosnica nukleinskih kiselina (6)

2.1.1. DNA

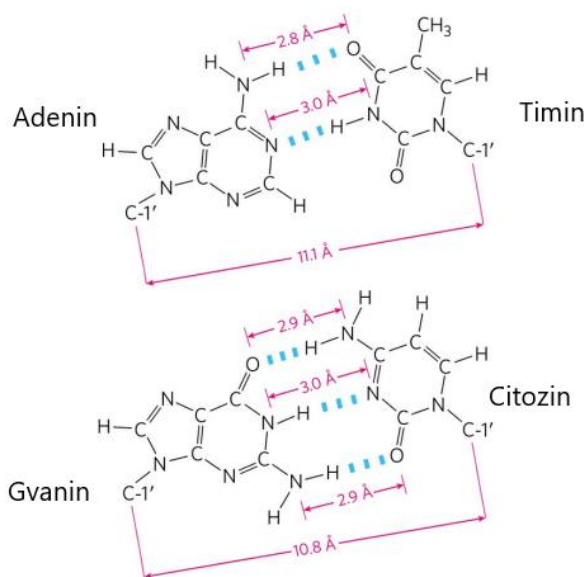
Slijed aminokiselina svakog proteina, kao i slijed nukleotida svake RNA, određeni su slijedom nukleotida stanične DNA, čije su uloge skladištenje i prijenos genetskih informacija. Dio DNA molekule u kojemu su sadržane informacije za sintezu biološkog produkta, proteina ili RNA, zove se gen. (6)

Molekula deoksiribonukleinske kiselina (DNA) sastoji se od dva duga komplementarna te antiparalelna lanca polinukleotida čije su dušične baze međusobno povezane vodikovim vezama. (10,9) Na Slici 4, lijevo, prikazana je DNA molekula u izravnom obliku, no desno na Slici 4 vidljiva je njena realna forma, oblik dvostruke zavojnice (eng. double helix). Strelice na Slici 4 ukazuju na polarnosti dvaju lanca. Trodimenzionalna struktura DNA zvana dvostruka zavojnica je posljedica kemijskih i strukturnih karakteristika dva polinukleotidna lanca gdje su dušične baze lanaca povezane vodikovim vezama u unutrašnjosti te strukture, dok je šećerno – fosfatna okosnica na vanjskoj strani.



Slika 4. Prikaz molekule DNA i oblika dvostruke zavojnice (9)

Način na koji su sparene različite baze im omogućuje najbolji energetski aranžman u unutrašnjosti dvostruke zavojnice, a logika povezivanja baza je sljedeća: purinske baze koje se sastoje od dva aromatska prstena uparene su uvijek s pirimidinskim bazama gdje je prisutan jedan aromatski prsten. Konkretno, to znači da se adenin (A) uvijek veže uz timin (T) pomoću dvije vodikove veze, a gvanin (G) formira tri vodikove veze s citozinom (C), što je vidljivo Slikom 5.



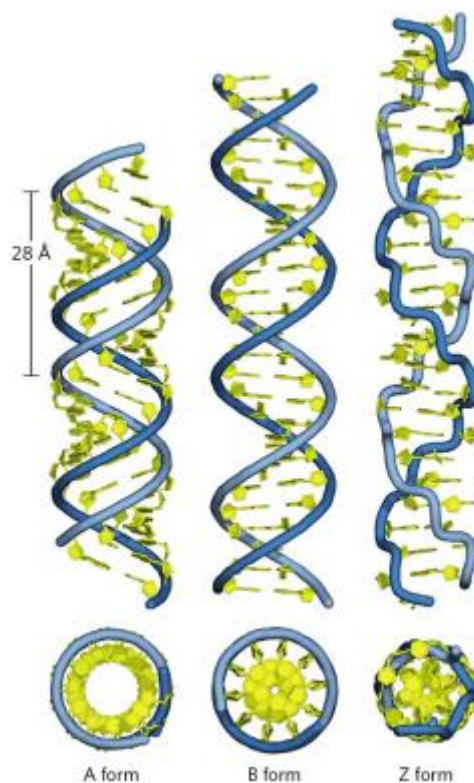
Slika 5. Prikaz parova baza gdje se adenin i timin vežu s dvije vodikove veze te gvanin i citozin s tri vodikove veze (6)

U sustavu ovakvog aranžmana, svi parovi baza su podjednake širine te samim time drže šećerno – fosfatnu okosnicu pri konstantnoj udaljenosti kroz cijelu DNA molekulu te spomenuta šećerno – fosfatna okosnica čini zavoj pri čemu formiraju desnosmjernu dvostruku zavojnicu, s potpunim okretom svakih 10 parova baza. Kako bi dvostruka zavojnica bila formirana, mora se zadovoljiti uvjet antiparalelnosti dvaju lanaca. Drugim riječima, polarnost jednog lanca mora uvijek biti orijentirana obrnuto u odnosu na drugi lanac. Posljedica zahtjeva koji trebaju biti zadovoljeni pri uparivanju baza je činjenica kako pojedini lanac svake DNA molekule sadrži slijed nukleotida koji je savršeno komplementaran slijedu nukleotida onog lanca s kojim čini zavojnicu. (9)

U širem smislu, DNA generalno može postojati u tri forme: A, B i Z forma u kojima se uočavaju razlike promatrajući nekoliko aspekata, kao što su: smjer zavoja, širina utora (eng. groove) te broj parova baza pri jednom kompletnom okretu. U Tablici 1. prikazane su konkretne vrijednosti koje objašnjavaju spomenute razlike između A, B i Z forme DNA molekule, te se na Slici 6 nalazi slikoviti prikaz njihovih razlika. (11) Razlike u formama ne utječu na temeljna svojstva DNA molekule kao što su komplementarnost, antiparalelnost te na sam način uparivanja baza. Postojanje različitih formi DNA molekule je prouzrokovano samom fleksibilnošću molekule jer su moguće rotacije oko različitih veza unutar molekule, tj. šećerno – fosfatne okosnice. Također, s promjenama temperature dolazi do promjena DNA molekule, tj. do njena razvlačenja, preklapanja ili razdvajanja lanaca. Ukoliko se DNA molekula nalazi u okruženju gdje nema mogućnost održavanja savršene linearnosti u B formi, dogodit će se prijelaz iz B forme u A formu ili Z formu. Varijacije u strukturi su uočljive u različiti konformacija šećera deoksiriboze, rotaciji oko veza u šećerno – fosfatnoj okosnici te o slobodnoj rotaciji oko glikozidne veze. (6) Najučestalija forma je B forma, koja je prisutna u neutralnom pH te fiziološkim koncentracijama soli. Uvjeti niske hidratacije pogoduju A formi, dok visoki udio soli pogoduje Z formi. Iako su navedene tri forme najučestalije, postoje još tri koje se ne pojavljuju često, a to su C, D i E forma. C forma nije stabilna, ne postoji u ljudskom organizmu no moguće ju je inducirati pri specifičnim uvjetima, dok E forma je izdužena forma DNA koja se ponaša kao međuprodukt pri prelasku B forme u A formu. (6,12)

Tablica 1. Razlike između A, B i Z forme (11)

| | A forma | B forma | Z forma |
|--|-----------------------|-------------------------|--------------------------|
| smjer zavoja | desni | desni | Lijevi |
| broj parova baza po okretu zavoja | 11 | 10,4 | 12 |
| "pitch" po okretu zavoja | 25,3 Å | 35,4 Å | 45,6 Å |
| glikozidna veza | anti | anti | alternirajuća anti i syn |
| "sugar pucker" | C3'-endo | C2'-endo | C:C2'-endo, G:C3'-endo |
| veliki utor | uzak i vrlo dubok | širok i plitak | Ravan |
| mali utor | jako raširen i plitak | uzak i poprilično dubok | jako uzak i dubok |



Slika 6. Razlike između A (lijevo), B (sredina) i Z (desno) forme DNA (6)

2.1.1. RNA

Ribonukleinske kiseline (RNA) posjeduju širi opseg funkcija u usporedbi s DNA te postoji nekoliko različitih klasa RNA unutar stanica. Ribosomske RNA (rRNA) su komponente ribosoma čija je uloga ključna u sintezi proteina. Glasnična RNA (mRNA) je intermedijar pri prijenosu informacija vezanih za sintezu proteina od jednog ili nekoliko gena do ribosoma. Transportna ili prijenosna RNA (tRNA) je adaptirajuća molekula čije se djelovanje očituje u točnom prevođenju informacija iz mRNA u specifični slijed aminokiselina. (6) Slikom 7 prikazan je izgled RNA, koja se sastoji najčešće od samo jednog lanca. U RNA molekuli prisutne su četiri dušične baze, no umjesto timina koji je prisutan u DNA molekuli, RNA sadrži uracil. U šećerno – fosfatnoj okosnici je prisutan šećer riboza, za koji je karakteristična dodatna hidroksilna grupa u odnosu na deoksiriboza prisutnu u DNA molekuli, te je razlika između navedenih šećera vidljiva Slikom 2. Šećer riboza tj. dodatna hidroksilna grupa je uzrok A forme RNA molekule. Prema geometriji A forme, karakteristike utora se razlikuju u odnosu na B formu. Veliki utor opisuje se kao dubok i uzak, dok je mali utor plitak te širok. (13) Prva istraživanja o vezanju malih molekula na RNA temeljila su se većinom na aminoglikozidima, a prvotni zaključci doneseni govore kako molekule koje se vežu na RNA trebaju biti isključivo bazične prirode, pozitivno nabijeni u fiziološkim uvjetima te kategorizirane kao planarne molekule koje interkaliraju te se mogu slagati s RNA bazama. Male molekule ovakvog opisa imaju veliki afinitet prema vezanju za RNA, no negativne strane ovakvog vezanja su niska selektivnost, visoka toksičnost te niska razina prijenosa u stanice. Iz navedenih razloga, ovakav pristup je daleko od idealnog, no doveo je do spoznaja kako se prepoznavanje RNA od strane malih molekula temelji na sekundarnoj strukturi RNA, a ne na slijedu nukleotida. Specifični oblik tj. sekundarna struktura je posljedica veličine nesporenog područja te vrsti dušičnih baza koje su nesparene. (14, 15)



Slika 7. RNA molekula (6)

2.2. Male molekule

Pojam liječenja raka na temelju napada na DNA molekulu bazira se na tri činjenice: DNA je dio stanice koji se smatra oštećenim (mutacija gena); životni ciklus DNA u stanicama tumora je različit od normalnih tj. zdravih stanica, te naposljetku, veća je vjerojatnost pojave dodatnog oštećenja DNA u stanicama tumora u usporedbi sa normalnim stanicama zbog većeg stupnja pojave oštećenja u kontroli promjene faza pri replikaciji te u mehanizmu popravka DNA. Većina lijekova kemoterapije koji se u današnjici koriste pri liječenju raka su spojevi koji oštećuju DNA, no takvo liječenje nije opcija bez mane. Spojevi koji uništavaju DNA dovode do nuspojava te postoji rizik od sekundarnog raka. (16)

Male molekule koje pokazuju afinitet prema vezanju na DNA i RNA izazvale su veliki interes u području medicine i biokemije, specifično za primjenu u molekularnom prepoznavanju, jer su male molekule sposobne prepoznati predodređeni slijed DNA te samim time i interpretirati ljudski genom. (5, 10) Nadalje, procesi replikacije stanice i ekspresije gena su regulirani brojnim interakcijama između DNA i proteina, a male molekule su u mogućnosti zaustaviti ili oponašati te procese te se u potonjoj činjenici vidi njihov potencijal za primjenu u terapiji raznih bolesti. (17, 18)

Većina molekula koje se vežu na DNA ili RNA su male aromatske molekule s pozitivnim nabojem. Brojne male molekule su klasificirane u kategoriju fluorescentnih boja, koje su definirane kao spojevi u mogućnosti apsorbirati svjetlost određene valne duljine te potom emitirati pri većim valnim duljinama pri čemu dolazi do fluorescencije, stoga je moguće spektroskopskim metodama odrediti specifičan slijed molekula DNA ili RNA. Volumen i pozicija terminalnih aromatskih supstituenata molekule imaju izravan utjecaj na način vezanja te molekule na DNA. Molekule koje se vežu na DNA često posjeduju svojstvo citotoksičnosti, na kojemu se temelji njihov način djelovanja u svrhu lijekova protiv raka, antibiotika i slično. (5)

Nedostatci malih molekula kao terapeutika za rak se prvenstveno pronalaze u činjenici da nisu učinkoviti koliko bi to bilo potrebno za potpuno liječenje te dovode do znatnih nepovoljnih nuspojava. Također, sekundarni rak je jedna od mogućih loših posljedica korištenja ovakve terapije te se on javlja 10 do 15 godina nakon uspješne eliminacije prvotnog raka. Učinak ovih loših posljedica prouzrokovan je oštećenjem DNA, jer u situaciji da DNA nije oštećena, nuspojave bi bile uvelike smanjene, a nedovoljna učinkovitost bi bila suzbijena intenzivnim liječenjem do potpunog izlječenja. (16)

Uz veliki potencijal koji se veže uz ovakve terapeutike, velika važnost leži u pronalasku poboljšanja primjene malih molekula i njihovom vezanju na DNA. Prvo, potrebna je veća selektivnost prema stanicama tumora u odnosu na normalne stanice, pri tome potrebno je iskoristiti činjenicu kako tumorske stanice pokazuju veću ovisnost o ponekim procesima vezanim uz DNA. Korištenje spojeva koji se vežu na DNA, no ne izazivaju oštećenja molekule, potrebni su u borbi protiv neželjenih nuspojava, uključujući i sekundarni rak. (16) Ključni faktor pri razumijevanju malih molekula te razvoja lijekova je karakterizacija njihova načina vezanja. (17)

2.3. Mehanizmi vezanja malih molekula

DNA prepoznavanje od strane malih molekula u širem smislu se dijeli na: kovalentno i nekovalentno. (11) Nekovalentno prepoznavanje se oslanja na jedan dominantni način vezanja, a to može biti interkalacija, vezanje na utore ili elektrostatsko vezanje na šećerno – fosfatnu okosnicu. (5)

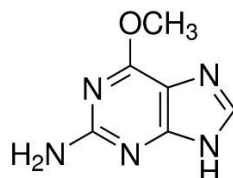
Posljedice interakcija između malih organskih molekula s DNA su retardacija ili inhibicija procesa transkripcije i replikacije, čime dolazi do mutacija stanica. (2) Te interakcije su moguće uz nekoliko načina vezanja (eng.binding modes). Molekula koja se veže na DNA može pridonositi određenom farmakološkom funkcijom te je određivanje i razumijevanje načina vezanja pojedine male molekule važno za pretpostavke posljedica do kojih dolazi pri vezanju iste na dvostruku zavojnicu DNA molekule. (17, 18, 16) Te posljedice su, uz ovisnost o načinu vezanja, također pod utjecajem tipa stanice i procesa koji se događaju unutar iste. Pri podjeli načina vezanja, moguće je definirati tri kategorije: interkalacija, vezanje na utore DNA i kovalentno vezanje. (16) Faktori koji opisuju molekularnu strukturu direktno utječu na način vezanja koji će biti zastupljen te kolika je razina afiniteta za vezanje. Molekule visoke planarnosti preferiraju vezanje na način interkalacije između parova baza, dok je vezanje na veliki utor prisutno kod fleksibilnih i velikih molekula koje pokazuju visoku razinu steričkih smetnji uzrokovanih voluminoznim supstituentima na aromatskom prstenu uz mogućnost formiranja vodikovih veza, van der Waalsovih ili elektrostatskih interakcija. (5, 2) Pri vezanju male molekule na DNA, vidljivi su strukturalni prijelazi kroz koje DNA prolazi pri svom širenju te svaki od načina vezanja pokazuje karakteristični utjecaj na spomenute prijelaze pri čemu je moguća njihova detekcija na razini individualne molekule. (17)

U proteklih dva desetljeća, provodila su se brojna istraživanja na temelju malih molekula koje se vežu kombinirajući dva ili više nekovalentna načina vezanja u svrhu pronalaska novih spojeva koji su u mogućnosti pružiti dobar uvid u razlike između sekundarnih struktura DNA i RNA. (5)

2.3.1. Kovalentno vezanje

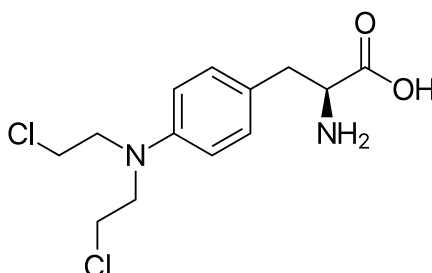
Kovalentno vezanje na DNA je nepovratni proces te uzrokuje trajni zastoj u transkripciji što dovodi do uništenja stanice. Primjer takvog vezanja je cis-platin na gvaninsku bazu. Alkilirajuća sredstva reagiraju s N-7 položajem gvanina i N-3 položajem adenina. Time je spriječeno uparivanje baza, te samim time potaknuto i pogrešno kodiranje DNA. Prvi mehanizam temelji se na vezanju alkilne skupine na dušičnu bazu DNA. Nakon toga, dolazi do

aktivacije enzima čija je zadaća zamijeniti alkilirane baze, što dovodi do razdvajanja DNA molekule. Primjer takvog kovalentnog vezanja alkilne skupine je vezanje metila na atom kisika na dušičnoj bazi gvaninu. Tim vezanjem nastaje 6-*O*-metilgvanin kao derivat gvanina, prikazan Slikom 8, te mehanizmom C na Slici 11. (30) Enzim 6-*O*-metilgvanin-DNA metiltransferaza popravlja ovakve mutacije uklanjajući metilnu skupinu. (19)



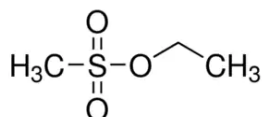
Slika 8. 6-*O*-metilgvanin (20)

Drugi mehanizam kojim alkilirajuća sredstva uništavaju DNA temelji se na stvaranju mostova između atoma u DNA. Primjer takvog spoja je melfalan, prikazan Slikom 9. Smisao toga je međusobno povezivanje dvaju baza preko alkilirajućeg sredstva koje sadrži dva vezna mjesta. Takvo mosno povezivanje baza sprječava razdvajanje DNA te samim time onemogućuje transkripciju. Mehanizam je prikazan kao mehanizam A na Slici 11.



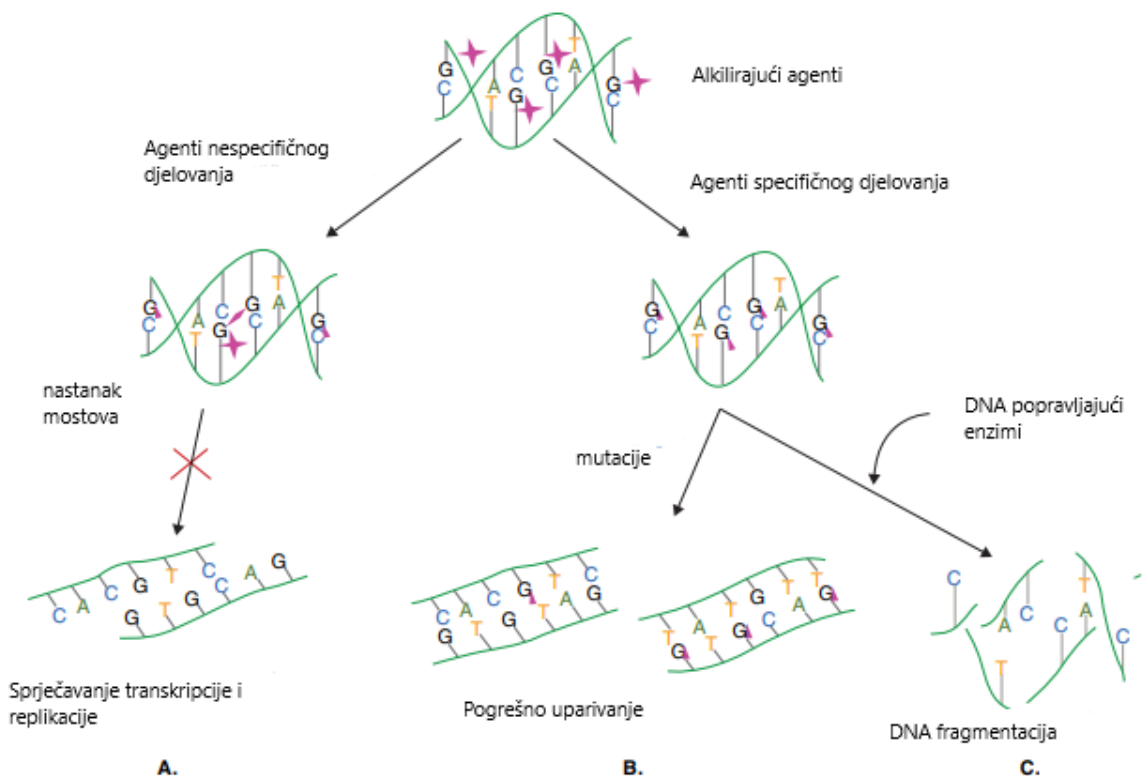
Slika 9. Melfalan (21)

Prema trećem mehanizmu (mehanizam B na Slici 11.), alkilirajuća sredstva kao npr. EMS (etil metansulfonat) prikazan Slikom 10. uzrokuju netočno uparivanje nukleotida što dovodi do mutacija. (10, 21)



Slika 10. Etil metansulfonat (49)

Navedena tri mehanizma ilustrirana su Slikom 11.



Slika 11. Mehanizmi alkilirajućih agenata pri čemu je mehanizam A stvaranje mostova, mehanizam B se odnosi na pogrešno uparivanje te mehanizam C uključuje djelovanje DNA popravljajućih enzima

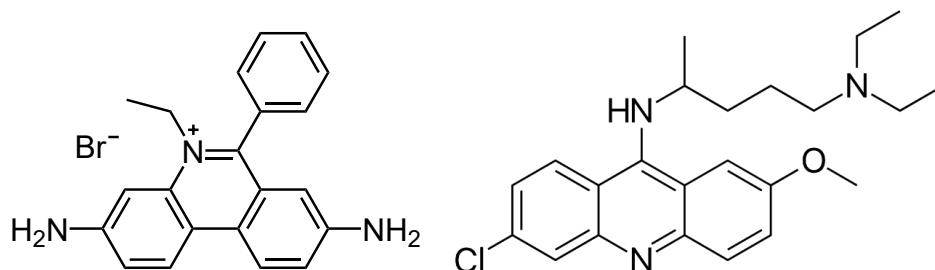
Prva alkilirajuća sredstva korištena za liječenje leukemija i limfoma bili su dušikovi iperiti – bendamustin, estramustin, melfalan, klormetin, klorambucil. (11)

2.3.2. Interkalacija

Interkalacija je jedan od nekoliko nekovalentnih načina vezanja čije glavno obilježje je umetanje planarnih prstena između parova baza DNA te je neovisna o njihovom slijedu. Preferencijalno mjesto za interkalaciju su sljedovi bogati G/C parovima baza jer lako dolazi do rasklapanja naslaganih parova baza. (10) Pri interkalaciji temelj vezanja je preklapanje elektronskih oblaka aromatskih struktura molekule s purinskim ili pirimidinskim bazama.

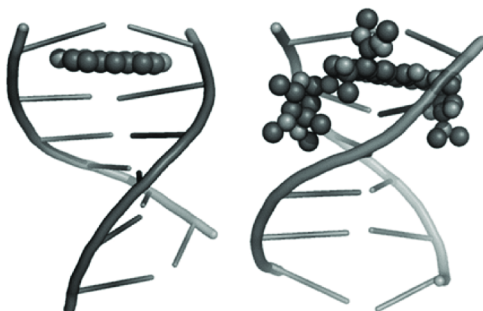
Postoje dva tipa: klasična te nitasta interkalacija. Karakteristični primjer interkalacije klasičnog tipa su etidijev bromid, prikazan Slikom 12 (22), koji je fluorescentna boja, te antimalarijski lijek kinakrin prikazan također Slikom 12. Klasična interkalacija je pojava pri kojoj se ligandi određene prirode te određenih dimenzija ubacuju između parova baza DNA, pri čemu se molekula DNA odmata. (23) Etidijev bromid je karakterističan primjer interkalatora koji pri svom vezanju ne prikazuje specifičnost za određeni slijed nukleotida. (17) Afinitet za vezanje

etidijeva bromida i kinakrina na DNA je pod utjecajem već spomenute interakcije slaganja heteroaromatskih prstena tih spojeva s parovima baza. (10) Umetanje jedne molekule etidijeva bromida odmota dvostruku zavojnici za 26 °. (17)



Slika 12. Etidijev bromid (lijevo) te kinakrin (desno) (22,24)

Nitasta interkalacija javlja se s molekulama koje imaju dva bočna lanca na suprotnim stranama planarnog aromatskog prstena. Kako bi se kompleks formirao, prvi korak je ulazak jednog od bočnih lanaca kroz interkalacijski prostor, potom dolazi do slaganja aromatskih prstena, dok dodatno vezanje bočnih lanaca na male i velike utore pridonose povećanju stabilnosti kompleksa. (10) Slika 13 prikazuje klasičnu i nitastu interkalaciju.



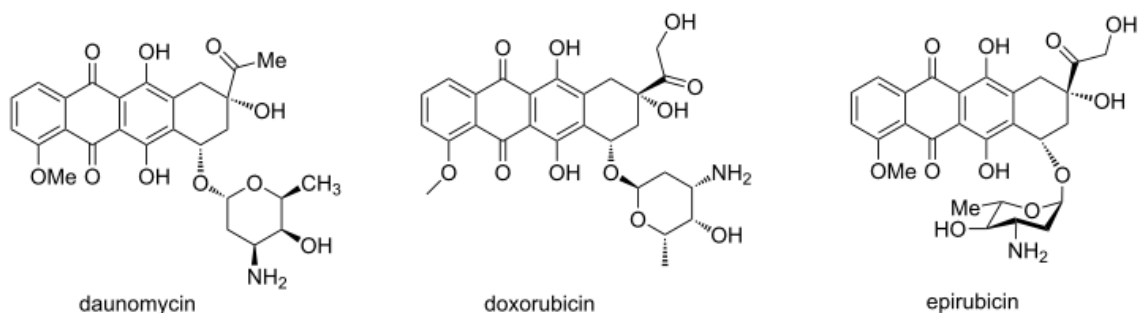
Slika 13. Klasična (lijevo) i nitasta interkalacija (desno) (1)

Interkalacija može promijeniti fizikalno-kemijska svojstva molekule DNA te pri tome utjecati na aktivnost enzima, poput topoizomeraze, kojima je supstrat upravo molekula DNA. (16)

U posljednje vrijeme, posebnu pažnju privlače bifunkcionalni ili polifunkcionalni interkalatori s namjerom povećanja selektivnosti, kao i konstante vezanja liganda i DNA te smanjenja brzine disocijacije. Uz navedeno, polifunkcionalnim interkalatorima postigla bi se jednaka razina citotoksičnosti s manjim dozama i manjim nuspojavama. (2)

Pri liječenju akutne leukemije, Hodgkinovog i Ne-Hodgkinovog limfoma, raka dojke te jajnika, raka pluća, želuca, testisa i drugih, koriste se antitumorski antibiotici zvani antraciklini koji imaju funkciju inhibitora enzima topoizomeraze II. Takvi primjeri su daunomicin i

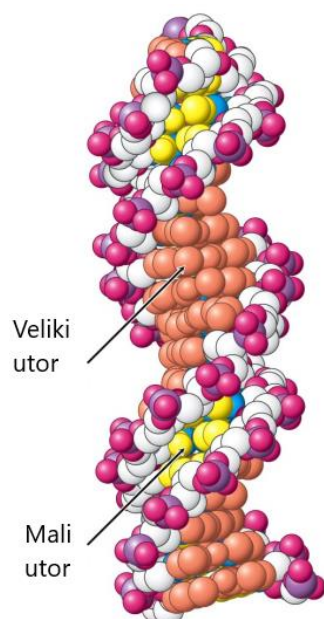
doksorubicin, koji posjeduju antrakinonsku jezgru, cikloheksan te amino šećernu skupinu. Između protonirane amino grupe na rezidualu ugljikohidrata i negativno nabijene DNA fosfatne okosnice dolazi do ionske interakcije koja drži molekulu u utoru, dok planarni aromatski prsten interkalira u GC područja. (11) Slika 14 prikazuje karakteristične primjere molekula koje se vežu interkalacijom.



Slika 14. Interkalatori – daunomicin (lijevo), doksorubicin (sredina) i epirubicin (desno)

2.3.3. Vežanje u utore

Jedan od mogućih načina vežanja malih molekula na DNA je i vežanje na utore te je to moguće kako na malim, tako i na velikim utorima. Pošto su dimenzije ta dva utora različite, kao što je vidljivo Slikom 15, oblici molekula koje se vežu za pojedini utor biti će različiti. (10) Kod vežanja na utor prisutne su elektrostatske interakcije, van der Waalove sile te vežanje vodikovim vezama sa krajevima parova baza. (18) Pri procesu transkripcije dolazi do prepisivanja slijeda DNA nukleotida te uz djelovanje enzima RNA polimeraze rezultira proizvodnjom komplementarnog te antiparalelnog mRNA lanca. Kako bi proces prepisivanja bio moguć te se odvio bez pogrešaka, ključne su interakcije između enzima i DNA. Potonja informacija dovodi do zaključka kako je malim molekulama koje se vežu na utore moguća manipulacija tih interakcija te potpuna inhibicija vežanja enzima. (11)

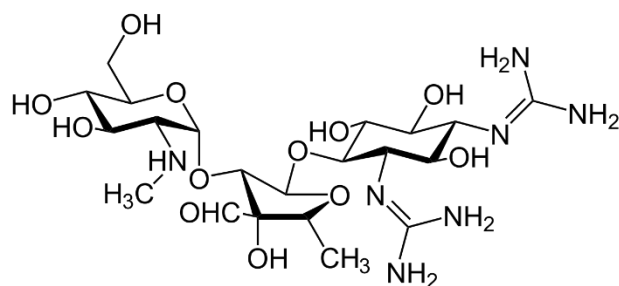


Slika 15. Prikaz malog i velikog utora DNA molekule (8)

2.3.3.1. *Vežanje na veliki utor*

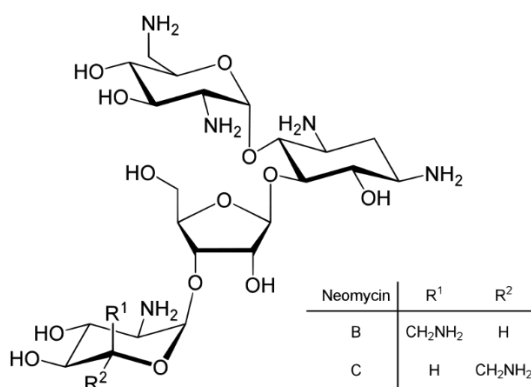
Gledajući usporedno mali i veliki utor, dimenzije velikog utora omogućavaju povoljno mjesto za vežanje proteina na DNA. (10) Izuzev toga što proteini selektivno prepoznaju veliki utor i vežu se na isti, također stvaraju veze sa individualnim bazama.(11) U drugu ruku, nepeptidni spojevi pokazuju obrnute preferencije, a to je da se vežu za mali utor. Ukoliko je moguće postići dostatan afinitet i selektivnost prema slijedu nukleotida, doći će do vežanja molekule koja preferira veliki utor te time blokira pristup ostalim proteinima koji prepoznaju isti utor. Oligomeri koji se vežu na veliki utor i stvaraju vodikove veze s purinskim bazama mogu prepoznavati slijed DNA dvostruke zavojnice te se nazivaju oligonukleotidi koji formiraju tripleks (eng. triplex-forming oligonucleotides) gdje orijentacija trećeg lanca uz dvostruku zavojnicu ovisi o slijedu nukleotida. (10)

Jedan od primjera spojeva koji se vežu na veliki utor su aminoglikozidi, primjer je dan Slikom 16 koji prikazuje streptomycin. Zbog njihove polikationske prirode, elektrostatskim interakcijama su vezani za fosfodietersku okosnicu nukleinskih kiselina. Zbog lošeg podudaranja u obliku aminoglikozida s B formom dvostruke zavojnice, teži se sintezi spojeva koji pokazuju veću komplementarnost obliku. (11)

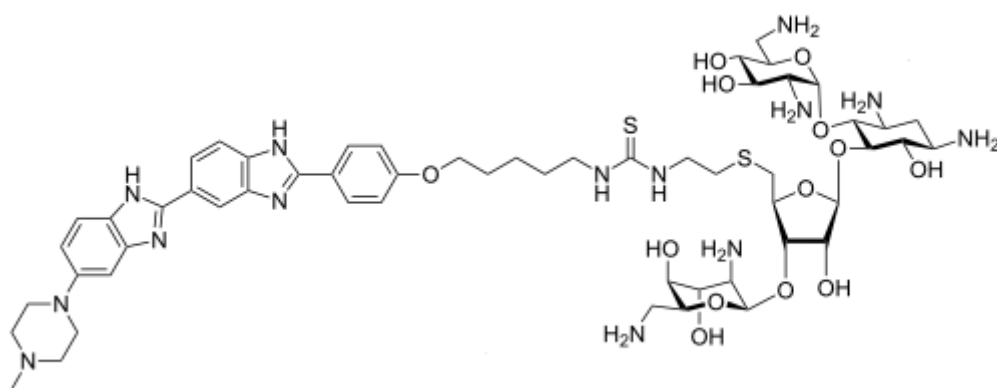


Sika 16. Streptomycin (25)

Neomicin, prikazan Slikom 17, pogodan je za vezanje na A formu dvostruke zavojnice zbog užeg utora uspoređujući s B formom, no derivat toga spoja je neomicin-Hoechst 33258 konjugat (Slika 18) stabilizira dvostruku zavojnicu pri čemu neomicin može postići dobro vezanje za veliki utor B forme. (11)



Slika 17. Neomicin (26)

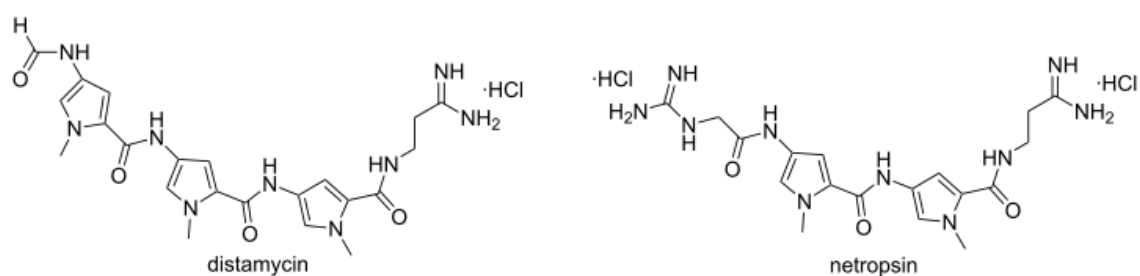


Slika 18. neomicin-Hoechst 33258 konjugat (11)

2.3.3.2. Vežanje na mali utor

Istraživanje te proizvodnja lijekova na temelju vežanja molekula u mali utor su u razvoju jer su dimenzije malog utora sukladne malim molekulama. Sile koje su prisutne pri ovakvom načinu vežanja su: elektrostatske, van der Waalsove, hidrofobne veze te vodikove veze. Uspoređujući s interkalacijom, vežanje za mali utor pokazuje višu specifičnost za slijed nukleotida koja se opisuje prisustvom određenih vodikovih veza između parova baza i malih molekula. Nerijetka pojava je da male molekule pokazuju selektivnost prema AT parovima baza iz raznih razloga. U utorima bogatim AT parovima baza uviđa se veći elektrostatski potencijal u usporedbi s utorima gdje dominiraju GC parovi baza. Uzimajući u obzir činjenicu da poneke bakterije posjeduju visoki udio AT parova baza, vežanjem malih molekula moguće je liječiti infekcije uzrokovane takvim bakterijama. Nadalje, razlike u ionskim interakcijama baza su direktan uzrok toga da su mjesta s AT parovima uža i dublja u odnosu na GC mjesta. Posljedica toga su jače djelovanje van der Waalsovih sila te lakše vežanje malih molekula u male uture. Oblik molekula je dodatni faktor koji omogućuje vežanje, gdje je poželjan oblik polumjeseca kao najkomplementarniji za mali utor. (10, 18)

Distamicin A i netropsin su najčešći i najstariji primjeri pri opisivanju vežanja malih molekula u mali utor DNA. Ti spojevi su selektivni na oblik, te kao što je vidljivo na Slici 19, konkavno pružanje aromatskih sustava je idealno za povezivanje s konveksnim oblikom malog utora. Navedene molekule sadrže ponavljajuće *N*-metilpirolne jedinice sa jednim ili više pozitivno nabijenih dušikovih atoma na krajevima. Interakcije sa DNA su selektivne prema AT područjima parova baza.



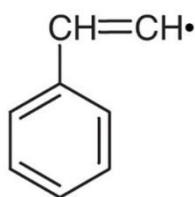
Slika 19. Distamicin i netropsin, male molekule koje se vežu u mali utor (11)

Navedeni načini vežanja mogu se pojaviti i u situacijama gdje nije zastupljen isključivo jedan mehanizam vežanja. Hibridne molekule pokazuju snažnije interakcije s DNA u usporedbi s molekulama koje se vežu samo na jedan od načina. (10)

2.4. Stirilne boje

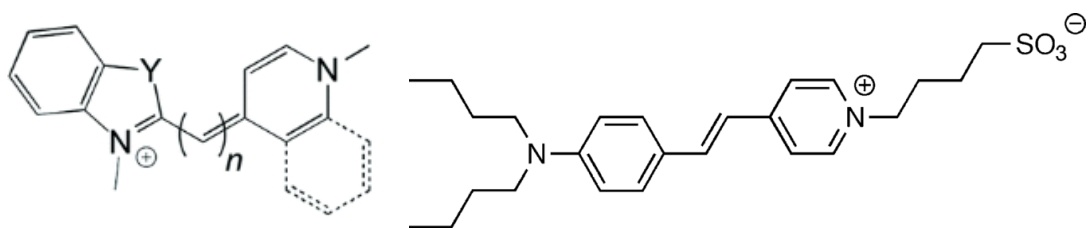
Interes za istraživanje sintetičkih boja proizlazi iz njihovih kemijskih i fizikalnih svojstava kao što su: emisija svjetlosti, fotoelektrična i fotokemijska aktivnost te "bio-labelling" i fotosenzibilizacija. (27) Jedna od široko korištenih grupa su cijaninske boje, a njihova znatna prednost leži u činjenici da se ponašaju kao svjetlosni prekidači ("light-switch"), čije značenje se objašnjava izostankom fluorescencije prije interakcije s nukleinskom kiselinom, dok pri promjeni toga stanja, tj. pri ulasku u strukturu nukleinske kiseline, dolazi do snažne fluorescencije. (5) Opisana pojava pruža mogućnost uporabe tih boja pri proučavanju mjesta vezanja na DNA, pogotovo zbog visokog afiniteta koji pokazuju prema vezanju za nukleinske kiseline. U slučaju DNA kao nukleinske kiseline, poznato je kako je moguće vezanje interkalacijom, kao i vezanje u utore te poneke boje pokazuju selektivnost prema određenom načinu vezanja, dok je mehanizam vezanja ostalih potpuno nasumičan. (18)

Osim cijaninskih, često je i korištenje stirilnih boja za fluorescencijske probe u svrhu biomedicinskih istraživanja. (28) Jednovalentni radikal $C_6H_5-CH=CH\cdot$ naziva se stiril (prikazan Slikom 20) i dobiven je iz stirena. Samim time, stirilne boje su one koje u sebi sadrže ovaj segment, a što se tiče naboja, mogu biti nabijene ili nenabijene.



Slika 20. Stirilni radikal

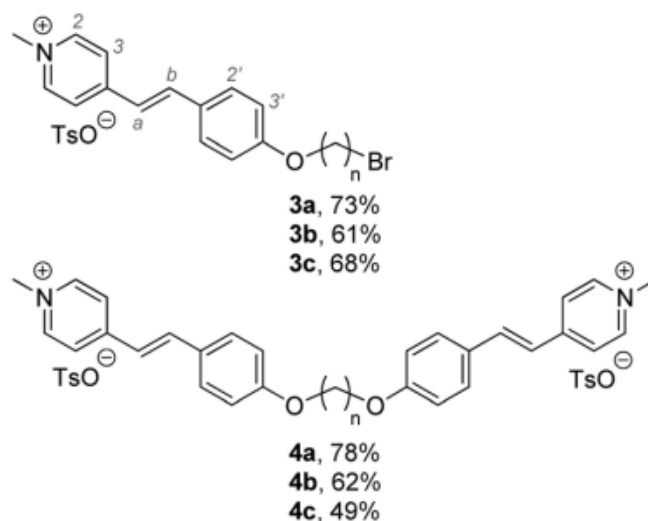
Uspoređujući s cijaninskim bojama, sličnosti su vidljive u dva dušikova atoma spojena lancem konjugiranih dvostrukih veza, no za razliku od cijaninskih, u strukturi stirilnih boja vidljivo je kako jedan atom dušika nije unutar heterocikličkog nukleusa, prikazano usporedbom cijaninske boje sa dibutilamino stilbazolij butilsulfonatom, koji je tipični primjer stirilne boje. Usporedba je dana Slikom 21. (27) U prijašnjim istraživanjima, doneseni su zaključci kako kationske stirilne boje pokazuju visok afinitet prema vezanju na razne tipove DNA te u ispitivanjima sa stanicama raka, visoku citotoksičnost. Načini vezanja stirilnih boja su nekovalentni odnosno mogu se interkalirati ili vezati u utore. (5)



Slika 21. Cijaninska boja (lijevo) i stilna boja (desno) (29,30)

Izuzev efekta svjetlosnog prekidača, stilne boje mogu se upotrijebiti kao optički mediji za snimanje, senzibilizatore i laserske boje. (2) Još jedna moguća primjena im je u svrhu probi za mapiranje promjena membranskog potencijala u pobuđenim stanicama, no ograničenja te primjene se nalaze u ograničenom području valnih duljina pobude tj. ekscitacije koje seže od 450 do 550 nm. (28)

Berdnikova i ostali (4) došli su do zaključka kako duljina alkilnog supstituenta direktno utječe na način vezanja ispitivanih boja za istu upotrijebljenu DNA. Mono- i bi-stirilni derivati u kojima je vidljivo prisustvo oksodecilmog lanca su neke od boja koje se vežu na veliki utor DNA te su prikazani Slikom 22. (4)



Slika 22. Stilne boje korištene u radu D.V. Berdnikove i suradnika (4)

Također, boje će stvoriti agregate ukoliko se nađu u prisustvu dvostruke zavojnice, izuzev monostirilnih boja sa brompropilnim supstituentom. Za monostirilne derivate, što je duži alkilbromidni supstituent, mijenja se i način vezanja, pri čemu se od interkalacije prelazi u vezanje u mali utor te potom vezanje u veliki utor. Uobičajeno je vezanje stilne boje u mali utor ukoliko se uvede još jedan kromofor, no ukoliko je prisutan C₁₀ linker, zastupljeno će biti

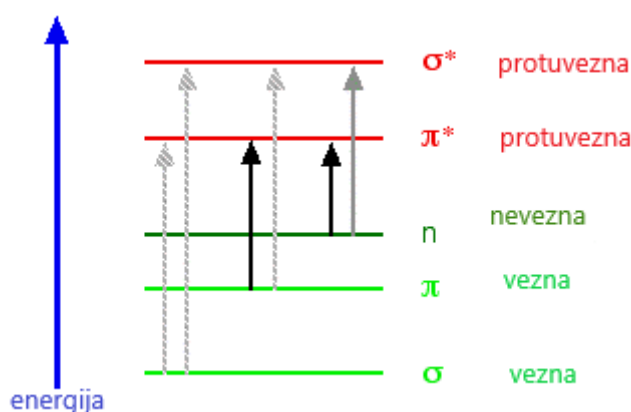
vezanje bis-stirilnog derivata u veliki utor. (4) Jedna od simetričnih dikationskih boja, 3,6-bis(1-metil-4-vinilpiridij)karbazol (BMVC), korištena je kao fluorescirajuća proba za nukleinske kiseline čijom uporabom je moguće razaznati između strukture dupleksa i kvadrupleksa prema različitim promjenama u emisijskom maksimumu te vremena trajanja fluorescencije pri vezanju. (28)

Uz sve navedeno, stirilne boje smatraju se dobrim kandidatima pri uporabi fluorescirajućih proba, pošto je evidentno kako pokazuju značajnu fotostabilnost, visoku razinu fluorescencije te su mogući brojni odzivi pri fluorescenciji ovisno o kemijskoj strukturi. (4)

2.5. Spektrofotometrijske metode za ispitivanje interakcija stirilnih boja i DNA

2.5.1. UV/Vis

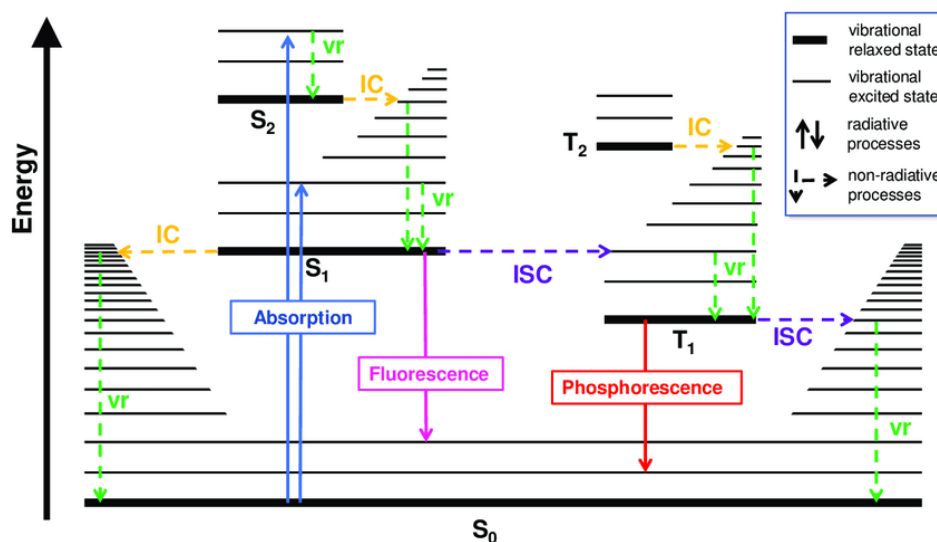
UV/Vis (eng. ultraviolet/visible) tj. ultraljubičasta i vidljiva spektrofotometrija je tehnika analize temeljena na apsorpciji u ultraljubičastom te vidljivom dijelu spektra. Smisao metode je mjerenje intenziteta svjetlosti koja je prošla kroz uzorak te usporedba sa intenzitetom slijepe probe ili referentnog uzorka. (31) Kromofor je dio molekule koji je u mogućnosti apsorbirati svjetlo, tj. oni su funkcijske skupine u molekuli te im je karakteristično prisustvo delokaliziranih pi-elektrona. Apsorpcija svjetlosti pobuđuje elektrone iz njihova osnovna stanja (stanje niže energije) u pobuđeno stanje (stanje više energije), tj. iz vezanih u protuvezne molekulske orbitale. Taj proces je kvantiziran jer razlika između osnovnog te pobuđenog stanja točno odgovara apsorbiranoj energiji pri prijelazu elektrona koji se odvija iz popunjene molekulske orbitale niže energije u nepopunjenu orbitalu više energije. Najčešći prijelaz između orbitala je prijelaz iz najviše popunjene molekulske orbitale (HOMO) u najnižu nepopunjenu molekulsku orbitalu (LUMO) što je prijelaz najniže razlike u energijama dva energetska stanja valentnih elektrona. (30,32,34) Pošto se mjerenje UV-Vis metodom vrši unutar intervala od 200 nm te 800 nm, samo prijelazi određenih energija su mogući te su prikazani Slikom 23. i označeni crnom bojom, dok su mogući, no manje važni prijelazi označeni sivom bojom, dok su isprekidano sivom bojom označeni prijelazi koji zahtijevaju energiju van ranga valnih duljina prethodno navedenih. (33)



Slika 23. Mogući prijelazi između molekulske orbitale (33)

Ukupnu energiju molekule možemo opisati kao zbroj elektronske energije te kinetičke energije jezgara tj. energiju rotacije i energiju vibracije. Elektronska energija je objašnjena promjenama u raspodjeli elektrona. Rotacijska energija opisuje se molekulskom rotacijom oko centra gravitacije, dok se vibracijska energija odnosi na gibanja jezgri pri čemu posljedično dolazi do

promjena duljina kemijskih veza te kutova među njima. Činjenica je da su gibanja jezgri mnogo sporija, pa se gibanja jezgri i gibanja elektrona opisuju različitim neovisnim valnim funkcijama. Prijelazi elektrona su jako brzi te jezgre u tom vremenu ostanu nepromijenjene što se tiče položaja. Razlike u rotacijskim energijama su vrlo male u usporedbi s vibracijskim, dok su vibracijske manje od elektronskih, potom je dovoljno uzeti u obzir elektronska i vibracijska stanja pri razmatranju. Svako elektronsko stanje sadrži brojne vibracijske razine, dok je pri sobnoj temperaturi najčešća razina većini molekula upravo najniža vibracijska razina osnovnog elektronskog stanja. Pri apsorpciji svjetla dolazi do prijelaza elektrona iz osnovnog u pobuđeno stanje, za koje je također karakteristično više vibracijskih razina te kako dolazi do promjene u elektronskom stanju, dolazi i do promjena u vibracijskoj razini. Slikom 24. prikazan je Jablonski dijagram koji prikazuje vibracijska stanja u osnovnom i pobuđenom elektronskom stanju. (34)



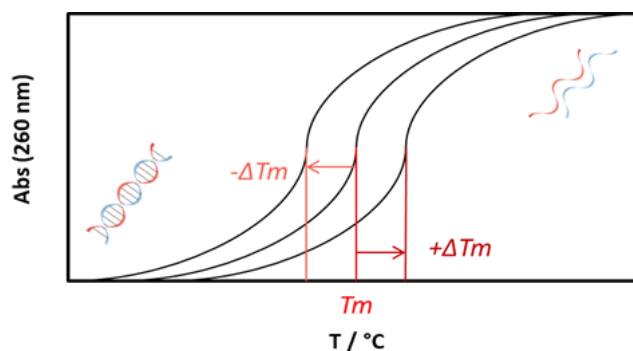
Slika 24. Jablonski dijagram (43)

Metoda UV-Vis spektrofotometrije koristi se za određivanje koncentracije, što je moguće koristeći Beer-Lambertov zakon čiji opis kazuje da je apsorbancija A direktno ovisna o prirodi određenog spoja (iskazano simbolom ϵ , molarnim ekstinkcijskim koeficijentom karakterističnim za pojedinu tvar), o udaljenosti kroz koju svjetlost prolazi, odnosno optičkom putu (L) te koncentraciji (c). Kao već dosad navedeno, moguće je apsorbanciju računati i kao promjenu između početnog intenziteta svjetlosti (I_0) te intenziteta nakon što svjetlost obasja uzorak (I). Ovisnosti su prikazane sljedećom jednadžbom te se najčešće grafički prikazuju kao ovisnosti apsorbancije o valnoj duljini: (35)

$$A = \epsilon c L = -\log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right)$$

Akridinske boje pokazuju tipičnu apsorpcijsku vrpцу u području od 400-500 nm, što je područje u kojemu nukleinske kiseline ne pokazuju apsorpciju. Ta činjenica osigurava promatranje promjena apsorbanije isključivo promatranog spoja pri dodatku nukleinskih kiselina. (36)

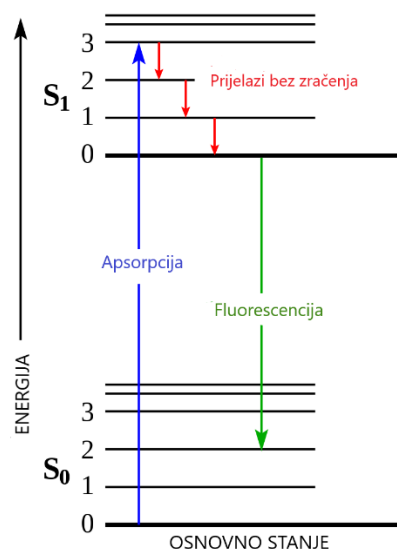
Termalna denaturacija je često korištena tehnika pri istraživanju proteina i nukleinskih kiselina, pri čemu je glavna zadaća određivanje stabilnosti dvostruke zavojnice DNA ili RNA te se provodi koristeći UV-Vis spektrofotometar (37). Eksperiment se provodi uz konstantnu promjenu temperature praćenjem promjena u apsorbaniji pri zadanoj valnoj duljini od 260 nm. Navedena točno određena valna duljina je uzeta kao konstantna za eksperimente zbog činjenice kako nukleinske kiseline s miješanim slijedom nukleotida pokazuju svoj maksimum apsorbanije pri toj vrijednosti. (38) Ukoliko je predmet proučavanja dvostruka zavojnica, denaturacijom dolazi do povećanja apsorbanije za 15-20 % te dobivena krivulja jest sigmoidalnog oblika. Maksimum prve derivacije krivulje apsorbanije pokazuje vrijednost temperature T_m , tj. temperature denaturacije. Vrijednost T_m definirana je temperaturom pri kojoj je 50 % nukleotida odmotano, a 50 % nije te glavni faktor o kojem ovisi je sastav polinukleotida. Za miješani slijed, vrijednost temperature denaturacije iznosi oko 70 °C, dok vrijednost iste prelazi 90 °C pri ispitivanju pGpC polinukleotida, koji je tip DNA s isključivo GC parovima baza. Značaj korištenja ove metode pri ispitivanju interakcija DNA s malim molekulama je u promjenama stabilnosti DNA nakon vezanja molekule u odnosu na prvotno stanje. Prisustvo male molekule može smanjiti ili povećati vrijednost temperature denaturacije, vidljivo Slikom 25. Ukoliko vrijednost raste, mala molekula ima preferenciju vezanja za strukturu dvostruke zavojnice pri čemu ju dodatno stabilizira. Ukoliko vrijednost opada, dolazi do destabilizacije dvostruke zavojnice. (37)



Slika 25. Negativna i pozitivna promjena temperature denaturacije (39)

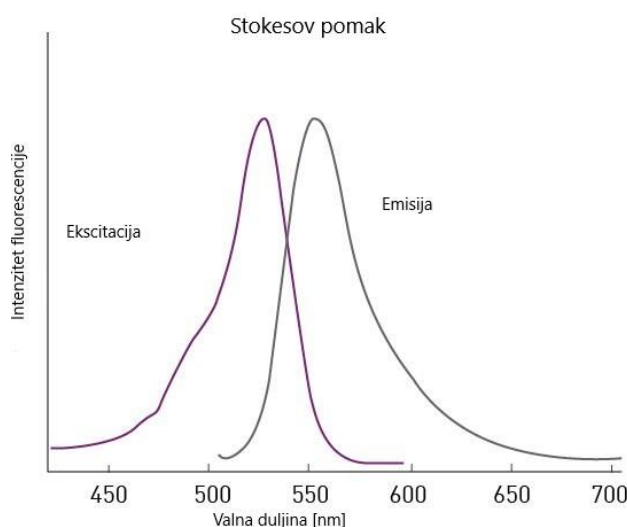
2.5.2. Fluorimetrija

Fluorescencija je tip fotoluminiscencije gdje pri obasjavanju svjetlosti elektron prelazi iz osnovnog singletnog stanja u pobuđeno singletno stanje. Spin pobuđenog elektrona je i dalje uparen s elektronom u osnovnom stanju, tj. suprotnog je spina. U pobuđenom stanju molekule ne ostaju dugo te se vraćaju u osnovno stanje pri čemu gube energiju u okoliš uz vibraciju te je emitiran foton, pri čemu dolazi do pojave fluorescencije. Pri fosforescenciji dolazi do promjene spina, te je pobuđeni elektron jednakog spina kao i elektron u osnovnom stanju. To stanje se naziva tripletno pobuđeno stanje. Razlike između pojava fluorescencije i fosforescencije moguće je objasniti korištenjem Jablonskog dijagrama prikazanog Slikom 26, jer prikazuje elektronska stanja molekule te prijelaze između tih stanja. Pri radijativnim prijelazima dolazi do apsorpcije fotona pri kojemu elektron prijelazi u više energetska stanje ili prijelaz pri kojemu se foton emitira pri prijelazu iz višeg u niže stanje. Prijelazi bez zračenja uključuju nekoliko različitih mehanizama. Pri vibracijskoj relaksaciji, elektron se u svom pobuđenom stanju relaksira do najnižeg vibracijskog stanja pri kojemu se energija gubi u okolinu. Unutarnja pretvorba (eng. Internal conversion, IC) se događa ukoliko se vibracijsko stanje elektronski pobuđenog stanja može upariti s vibracijskim stanjem nižeg elektronskog stanja, dok pri međusistematskom križanju (eng. Intersystem crossing, ISC) dolazi do prijelaza do stanja sa različitim spinom, nakon čega može slijediti fosforescencija. (40,41) Fosforescencija je pojava relaksacije koja rezultira dodatnim okretom spina i emisijom fotona, dok povratak u osnovno stanje se događa uz vremenski zaostatak. Pri fosforescenciji, veća količina energije je rasipana pri prijelazima bez zračenja nego kod pojave fluorescencije, pri čemu je i razlika između apsorbirane te emitirane energije veća te je promjena u valnoj duljini izraženija. (44)



Slika 26. Jablonski dijagram za fluorescenciju (42)

Postoje dva tipa spektara fluorescencije, a to su emisijski i ekscitacijski. Emisijski spektar se dobiva u slučaju postavljene fiksne ekscitacijske valne duljine, dok se u suprotnom slučaju pri snimanju ekscitacijskog spektra kao konstantna postavlja upravo emisijska valna duljina. (45) Razlike između dvaju spektara vidljive su na Slici 27. Na Slici 27 naznačen je i Stokesov pomak koji je razlika između položaja maksimuma linije apsorpcije te maksimuma linije emisije. Zbog razlike u tim valnim duljinama dolazi zbog gubitka energije pri emisiji. Svrha snimanja dvije vrste spektara je promatranje promjena u uzorku – intenzitet te valna duljina maksimuma su podložni promjenama u slučaju mijenjanja temperature, koncentracije te pri interakcijama s drugim molekulama. (45)

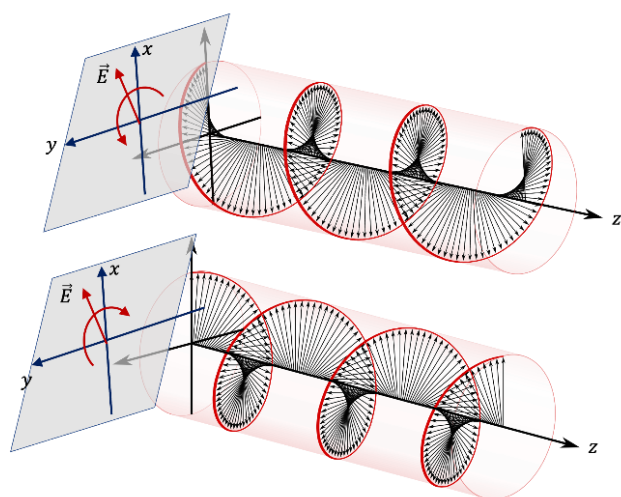


Slika 27. Usporedba emisijskog i ekscitacijskog spektra (46)

Williams i suradnici (18) opisivali su testove fluorescencije pri gašenju fluorescencije (eng. quenching) dodavajući ispitivani spoj u otopinu koja sadrži DNA i boju, pri čemu je primijećeno smanjenje intenziteta fluorescencije, što je pokazatelj vezanja dodavanog spoja koji pri vezanju istjeruje boje. To se događa jer boje pri vezanju uz DNA pokazuju jak intenzitet fluorescencije te je potom uz dodavanje ispitivane komponente moguće uvidjeti koliko je boje zamijenjeno ispitivanom komponentom. (18)

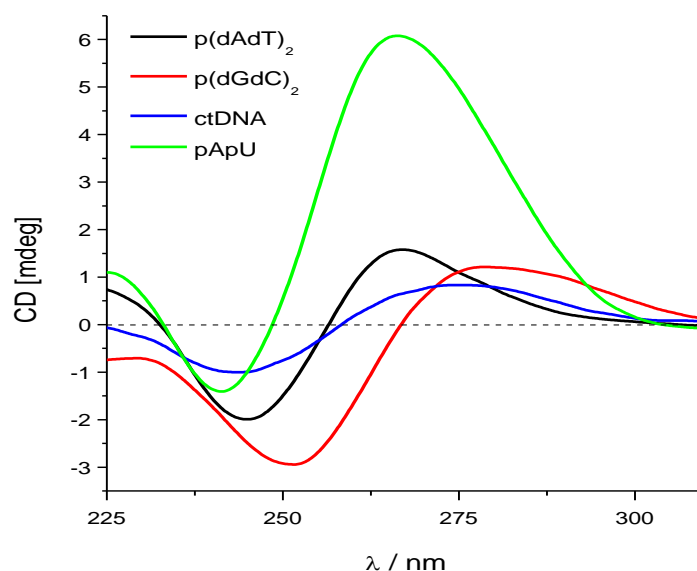
2.5.4. Cirkularni dikroizam

Polarizirana svjetlost je ona svjetlost čiji elektromagnetski valovi osciliraju u jednoj ravnini. Cirkularni dikroizam (CD) je tehnika koja mjeri razliku između apsorpcije lijevo polariziranog te desno polariziranog svjetla te je tu razliku moguće detektirati ukoliko postoji kromofor, tj. dio molekule koji apsorbira svjetlo. Na slici 28. vidi se desno i lijevo polarizirano svjetlo.



Slika 28. Desno i lijevo polarizirano svjetlo (47)

Kiralne molekule preferiraju apsorbirati jednu od dvije orijentacije (lijevo ili desno) polariziranog svjetla. Zbog navedene činjenice, moguće je dobiti informacije o kiralnosti promatranih struktura. Male molekule često ne posjeduju svojstvo kiralnosti ukoliko se promatraju zasebno, no pri vezanju za kiralnu DNA, dolazi do obrata te male molekule pokazuju odziv. Moguće je prikupiti i informacije o prirodi i jačini vezanja pošto male molekule imaju utjecaj na strukturu DNA pri vezanju. (36) Slika 29. daje prikaz u različite spektre ovisno o prirodi polinukleotida tj. njihovom slijedu.

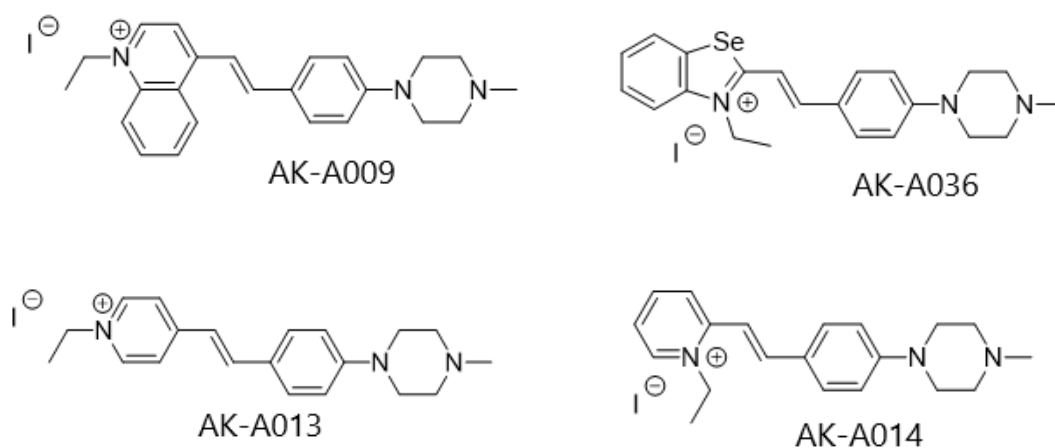


Slika 29. Spektar cirkularnog dikroizma za različite vrste polinukleotida (39)

Pri proučavanju vezanja liganda na DNA/RNA molekule, moguće je napraviti podjelu na dva područja valnih duljina. Između 200 i 300 nm je prvo područje unutar kojeg se detektiraju promjene vezane uz sekundarnu strukturu polinukleotida, jer ligand sam po sebi ne apsorbira u tom intervalu no uzrokuje promjene na polinukleotidu pri vezanju. Izrazit pad u spektru naznačuje remećenje kiralnosti zavojnice što je pristuno kod interkalacije. Za drugo područje, karakteristične su valne duljine iznad 300 nm te se promatraju promjene na ligandu, pošto polinukleotidi ne apsorbiraju pri tim valnim duljinama. U slučaju akiralnog liganda događa se pojava inducirane kiralnosti pri njegovu vezanju na kiralnu molekulu.

3. Eksperimentalni dio

Eksperimentalni dio rada sastoji se od spektrofotometrijske karakterizacije spojeva: (*E*)-1-etil-4-(4-(4-metilpiperazin-1-il)stiril)kinolin-1-ijev jodid, **AK-A009**, (*E*)-3-etil-2-(4-(4-metilpiperazin-1-il)stiril)benzo[*d*][1,3]selenazol-3-ijev jodid, **AK-A036**, (*E*)-1-etil-4-(4-(4-metilpiperazin-1-il)stiril)piridin-1-ijev jodid **AK-A013** i (*E*)-1-etil-2-(4-(4-metilpiperazin-1-il)stiril)piridin-1-ijev jodid **AK-A014**, koji su sintetizirani u grupi dr. sc. Atanasa Kurutosa na Institute of Organic Chemistry with Center for Phytochemistry (Bugarska), a potom i određivanja interakcija navedenih boja s biomolekulama. Strukture spomenutih boja prikazane su Slici 30.



Slika 30. Strukture korištenih stirilnih boja

Za potrebe eksperimentalnih mjerenja priređene su otopine spojeva pri koncentraciji 1×10^{-3} M u DMSO-u iz odvage 1 mg. Otopine su skladištene na $+4$ °C i razrjeđivane prethodno mjerenjima.

Korišteni polinukleotidi (calf thymus DNA i poly A – poly U) otopljeni su prema uputi proizvođača (Sigma Aldrich, SAD) u natrij-kakodilatnom puferu (pH = 7, I = 0,05 M). Mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 260 nm i izračunom preko molarnog ekstinkcijskog koeficijenta definiranog od proizvođača ($\epsilon = 6600$ za ct-DNA i $\epsilon = 6000$ za poly A – poly U), određena je koncentracija polinukleotida. Otopine polinukleotida pohranjene su pri temperaturi od -20 °C.

Analize svih podataka obavljene su u programu OriginPro 7.5.

3.1. UV/Vis spektrofotometrija

UV/Vis spektrofotometrijom određeno je područje linearnosti za ispitivane spojeve, a iz dijagrama maksimuma apsorbancije određeni su molarni ekstinkcijski koeficijenti. Sva mjerenja provedena su na Varian Cary 100 Bio spektrofotometru. Mjerenja su provedena u kvarcnim kivetama optičkog puta 1 cm, dodavanjem alikvota ispitivanog spoja u 1 mL milliQ vode. Mjerenja su provedena u rasponu koncentracija 1×10^{-6} M do 1×10^{-5} M pri konstantnoj temperaturi od 25 °C. Ovisnost apsorbancije o promjeni temperature određena je zagrijavanjem uzorka koncentracije 1×10^{-5} M od 25 °C do 90 °C. Nakon hlađenja otopine ponovno je snimljen spektar pri 25 °C. Kako bi se preliminarno ispitalo vezanje spojeva na polinukleotid, otopini spoja u vodi dodano je 5 ekvivalenata ctDNA.

UV/Vis titracije provedene su u kakodilatnom puferu, $I=0,05$ M, $pH = 7$, u kvarcnim kivetama optičkog puta 1 cm. Titracije su provedene dodavanjem određenog volumena polinukleotida (ct-DNA ili pApU) u otopinu spoja koncentracije 5×10^{-6} M. Primijećeno je da je kinetika vezanja brza, stoga je vrijeme inkubacije iznosilo 60 s, a sva mjerenja provedena su pri konstantnoj temperaturi od 25 °C. Dobiveni rezultati su grafovi ovisnosti apsorbancije pri valnim duljinama od 250 do 700 nm o koncentraciji polinukleotida, te je pri maksimumu apsorbancije napravljen dijagram za određivanje konstante stabilnosti korištenjem Scatchardove jednadžbe, koja daje informaciju o konstanti stabilnosti (K_s) te njenom logaritmu ($\log(K_s)$).

3.2. Spektrofluorimetrija

Za spektrofluorimetrijska ispitivanja korišten je instrument Agilent Cary Eclipse. Cilj ispitivanja bio je odrediti linearnu ovisnost relativnog fluorimetrijskog intenziteta o koncentraciji spojeva. Za vrijednost valne duljine ekscitacije pri snimanju emisijskog dijagrama odabrana je vrijednost maksimuma apsorbancije dobivena iz UV-Vis koncentracijskog spektra te početne i krajnje vrijednosti valnih duljina iznose 450 nm, odnosno 800 nm. Početna koncentracija spoja u kiveti treba iznositi $c = 5 \times 10^{-7}$ M, što je u skladu s uvjetom da apsorbancija spoja pri početnoj koncentraciji iznosi manje od 0,05. Mjerenja su provedena u kvarcnim kivetama, dodavanjem alikvota spoja u 2 mL miliQ vode, te su koncentracije u rasponu od 5×10^{-7} M do 2×10^{-6} M pri konstantnoj temperaturi od 25 °C. Analogno karakterizaciji na UV-Vis spektrofotometru, u ovisnosti o različitim temperaturama, snimljen je temperaturni dijagram, pri kojemu je vrijednost koncentracije konstantna te ona iznosi $c = 2 \times 10^{-6}$ M. Mjerenja se provode pri temperaturama od 25, 50, 75 te 90 °C, a potom nakon hlađenja snimljen je ponovno spektar pri 25 °C. Pri valnoj duljini koja odgovara emisijskom maksimumu snimljen

je ekscitacijski spektar. Sljedeći korak je dodatak 5 ekvivalenata ctDNA otopini spoja koncentracije 2×10^{-6} M u svrhu preliminarnog ispitivanja vezanja spoja za DNA, nakon čega je snimljen i ekscitacijski spektar kompleksa DNA i male molekule.

Proces eksperimenta fluorimetrijske titracije slijedi isti postupak kao i UV-Vis titracija. Također je korištena otopina kakodilatnog pufera ($I = 0,05$ M, $\text{pH} = 7$), čiji je spektar snimljen kao bazna linija odnosno slijepa proba titracije. Početna koncentracija spoja iznosi $c = 5 \times 10^{-7}$ M, kao i početna koncentracija polinukleotida. Emisijski spektri snimljeni su pri rastućim koncentracijama polinukleotida u rasponu od 5×10^{-7} M do 5×10^{-5} M. Titracija se provodi pri pobudnoj valnoj duljini koja odgovara maksimumu apsorbancije ispitivanog spoja, pri 25 °C te kraj titracije jest kad više ne dolazi do promjena dodatkom polinukleotida što je uočljivo na krivulji ovisnosti intenziteta o koncentraciji polinukleotida jer ona doseže plato. Podaci su obrađeni na jednak način kao i pri UV-Vis titraciji. Dobiveni su grafovi ovisnosti relativnog fluorimetrijskog intenziteta o koncentraciji polinukleotida pri različitim valnim duljinama te je pri maksimumu intenziteta napravljen dijagram uporabom Scatchardove jednadžbe, iz koje je dobiven podatak o logaritmu konstante stabilnosti ($\log(K_s)$).

3.5. Cirkularni dikroizam

Za provođenje ispitivanja cirkularnog dikroizma korišten je uređaj JASCO J-815. U kivetu je dodano 2 mL istog kakodilatnog pufera te je početna koncentracija polinukleotida iznosila $c_1 = 2 \times 10^{-5}$ M, a nadalje dodaci su morali zadovoljavati omjer r , $r = c(\text{spoj}):c(\text{polinukleotid})$ u iznosima od 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 te 0,5.

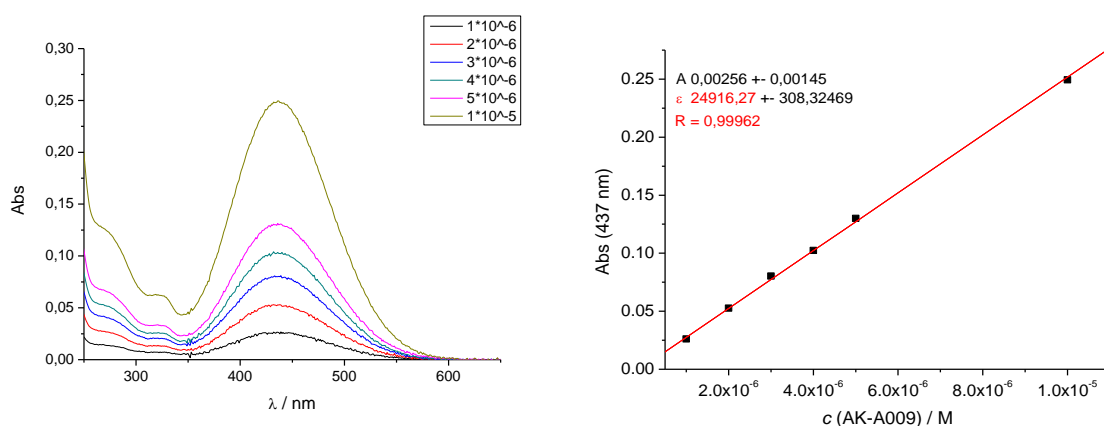
3.6. Termalna denaturacija

Kao prethodno spomenuto u poglavlju koje teorijski opisuje korištene metode, spomenuto je kako je moguće odrediti temperature taljenja ili temperature denaturacije za polinukleotide. Eksperimenti termalne denaturacije provedeni su pri koncentraciji polinukleotida 2×10^{-5} M, pri čemu su sva mjerenja provedena barem dva puta. Kako bi se točno odredila temperatura mekšanja samih polinukleotida i utjecaj dodanog spoja na polinukleotid, priređeni su uzorci samog polinukleotida te uzorci spoja i polinukleotida ($r = c(\text{spoj}):c(\text{polinukleotid})$) u omjerima $r = 0,2$ i $r = 0,3$. Rezultati su prikazani grafički kao krivulje ovisnosti apsorbancije pri 260 nm o temperaturi. Točka infleksije na krivuljama odgovara temperaturi mekšanja (T_m). Temperature mekšanja određene su iz prve derivacije krivulje. Vrijednosti ΔT_m izračunate su oduzimanjem T_m vrijednosti kompleksa male molekule i polinukleotida od T_m samog polinukleotida. Sve vrijednosti prosjek su dva mjerenja, a greška mjerenja iznosi $\pm 0,5$ °C.

4. Rezultati i rasprava

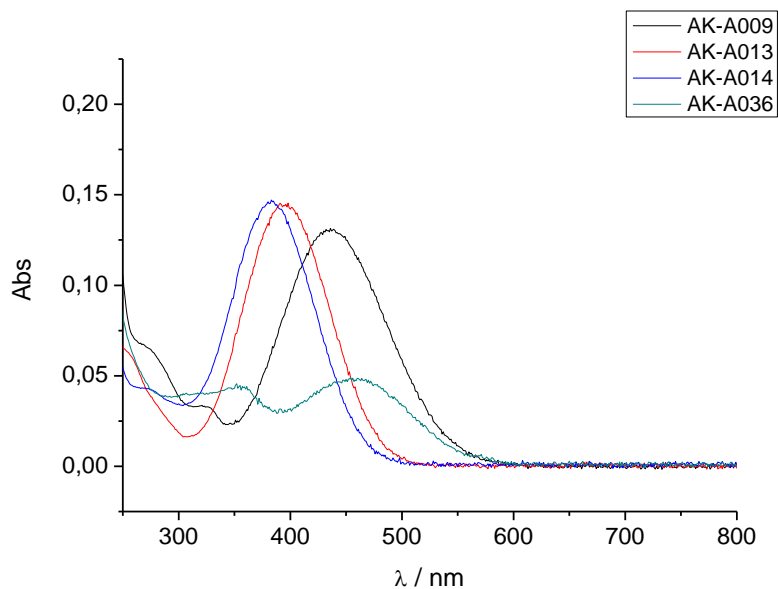
4.1. Rezultati karakterizacije na UV-Vis

Prvi korak pri karakterizaciji boja na UV-Vis spektrofotometru bila je izrada koncentracijskog dijagrama, što je vidljivo na Slici 31 (lijevo) za spoj **AK-A009**, dok se desno nalazi dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji za spoj **AK-A009** pri 437 nm što odgovara apsorpcijskom maksimumu. Iz dijagrama pronađen je odnos linearne ovisnosti apsorbancije o koncentraciji, gdje parametar B kao nagib pravca predstavlja molarni ekstinkcijski koeficijent.



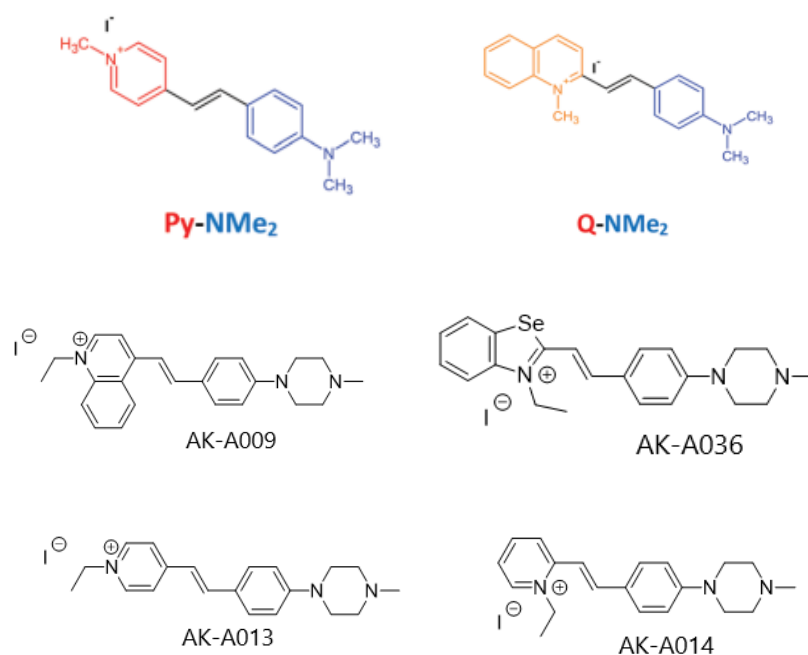
Slika 31. Ovisnost apsorbancije o koncentraciji spoja **AK-A009** (lijevo) te pripadajući dijagram maksimuma apsorbancije na 437 nm (desno)

Pri povećanju koncentracije spojeva dolazi do povećanja apsorbancije. Za sve ispitivane spojeve uočavaju se isti trendovi (Prilog, Slika 49.a, 50.a, 51.a), dok su općenite vrijednosti apsorbancije za **AK-A036** znatno manje od ostalih spojeva. Svi spojevi pokazuju linearnost u ispitivanom koncentracijskom području tj. linearnu ovisnost apsorbancije o koncentraciji (Prilog, Slika 48, 49, 50 i 51). Slikom 32 prikazana je usporedba sva četiri spoja pri istoj koncentraciji od 1×10^{-5} M. Vidljivo je da spoj **AK-A009** prikazuje veće vrijednosti valne duljine maksimuma apsorbancije u usporedbi sa spojevima **AK-A013** te **AK-A014**, što je očekivano zbog činjenice kako se maksimumi povećavaju s rastom broja aromatskih prstena u strukturi. Spoj **AK-A013**, u usporedbi sa spojem **AK-A014**, pokazuje veći batokromni pomak.



Slika 32. Usporedba apsorbancije za sve spojeve pri istoj koncentraciji

Botti i suradnici (5) proveli su ispitivanje UV-Vis karakterizacije te su za analogne spojeve dobivene valne duljine maksimuma 450 nm te 500 nm, dok su molarni ekstinkcijski koeficijenti iznosili 34400 i 43500 $M^{-1} cm^{-1}$. Na slici 33 prikazane su strukture spojeva korištenih u navedenom istraživanju (Py-NMe₂, Q-NMe₂) u usporedbi sa spojevima korištenim u ovom radu. Spojevi iz literature (5) sadrže sitirilnu skupinu na koju je vezana dimetilamino-skupina, dok je na stirilnu skupinu spojeva korištenih u ovom radu vezan piperazinski prsten. Heterociklička jezgra sadrži dušik za sve spojeve, ali heterociklički sustavi se razlikuju, posebice spoj **AK-A036** po atomu selenija u benzoselenazolnom derivatu. Također, supstituenti vezani na heterociklički dušik su metilne skupine za spojeve iz literature, dok su za spojeve u ovom radu to etilni supstituenti.



Slika 33. Usporedba struktura analognih spojeva iz literature (referenca na rad)

Tablica 2. i Slike 48.a, 48.b, 49.b, 49.c, 50.b, 51.b i 51.c (Prilog) prikazuju pripadajuće vrijednosti molarnog ekstinkcijskog koeficijenta ϵ za sve ispitivane spojeve. Koeficijent korelacije (R^2) veći je od 0,99 za sve ispitivane spojeve. Po vrijednostima koeficijenta ϵ , moguće je zaključiti manju mogućnost apsorpcije svjetla za spoj **AK-A036** (Prilog, Slika 49.b, 49.c), pošto mu je najveći koeficijent otprilike 2,8 puta manji od ostalih, tj. u odnosu na ostale dolazi do smanjenja za 64 %.

Tablica 2. Prikaz valnih duljina maksimuma apsorpcije te molarne ekstinkcijske koeficijente

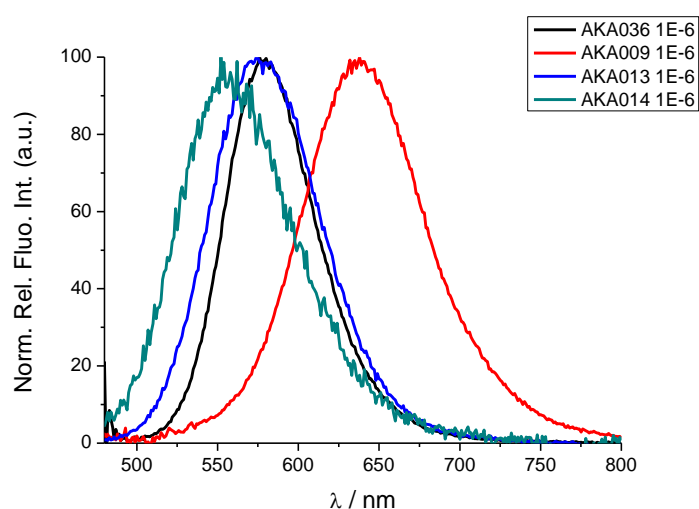
| spoj | λ / nm | ϵ / M ⁻¹ cm ⁻¹ |
|----------------|----------------|---|
| AK-A009 | 437 | 24916,27 |
| | 328 | 6015,11 |
| | 273 | 12305,85 |
| AK-A036 | 458 | 9052,93 |
| | 354 | 8420,29 |
| AK-A013 | 395 | 25778,01 |
| AK-A014 | 383 | 25573,60 |
| | 273 | 7347,09 |

UV-Vis spektrofotometrom ispitana je ovisnost apsorbancije spojeva pri promjeni temperature snimajući spektre pri 25, 50, 75 te 90 °C, a potom ponovno na 25 °C u svrhu detektiranja mogućih promjena apsorbancije spojeva nakon izlaganja visokim temperaturama te je provedena usporedba u odnosu na početni odziv pri 25 °C. Prema temperaturnom dijagramu za boju **AK-A009** (Prilog, Slika 48.c) vidljiv je hipokromni pomak apsorpcijskog maksimuma s povećanjem temperature, no također dolazi i do batokromnog pomaka. Temperaturni dijagram spoja **AK-A036** (Prilog, Slika 49.d) također pokazuje batokromni pomak pri povećanju temperature, no u odnosu na **AK-A009**, nema pomaka u intenzitetu tj. apsorbancija ostaje pri otprilike istim vrijednostima. Temperaturni dijagram za spoj **AK-A013** (Prilog, Slika 50.c) prikazuje hipokromni te batokromni pomak u apsorpcijskom maksimumu. Za sve ispitivane spojeve početni spektar pri 25 °C ne pokazuje znatne razlike u odnosu na spektar snimljen nakon zagrijavanja te ponovnog hlađenja na 25 °C, što ukazuje na stabilnost spojeva i njihove apsorbancije prema zagrijavanju.

Nadalje, prema grafičkim prikazima preliminarnog ispitivanja interakcije spoja sa ctDNA moguće je odrediti dolazi li do vezanja, što se očituje promjenom apsorbancije. Stirilne boje pokazuju visoki afinitet prema DNA i RNA zbog aromatske strukture uz prisutnost konjugiranog sustava te zbog pozitivnog naboja. (5). Vidljiv je hipokromni te batokromni pomak za svaku od boja (Prilog, Slike 48.d, 49.e, 50.d, 51.e).

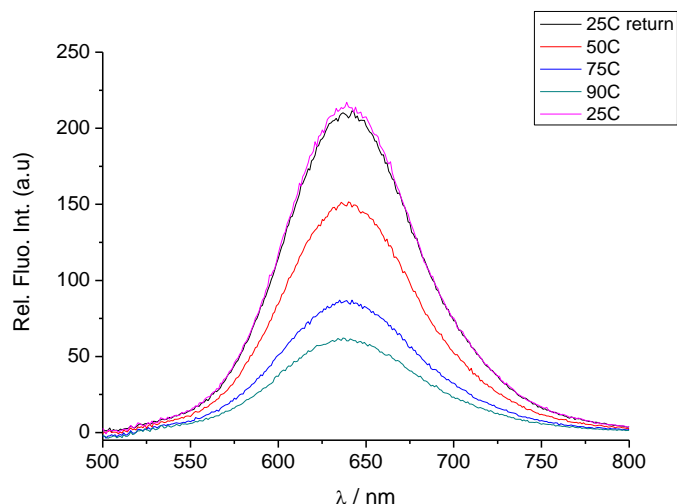
4.2. Rezultati karakterizacije na spektrofotometru

Karakterizacija spojeva provodila se analogno na spektrofotometru kao i na UV-Vis spektrofotometru. Prvo su snimljeni spektri uz postupno povećavanje koncentracije (Prilog, Slike 52.a, 53.a, 54.a, 55.a). Slika 34 prikazuje usporedbu ispitivanih spojeva pri istoj koncentraciji. Svi spojevi pokazuju jednako linearno ponašanje - rastom koncentracije raste i relativni intenzitet fluorescencije. Valne duljine maksimuma emisije iznose 640, 580, 577 te 556 nm za boje **AK-A009**, **AK-A036**, **AK-A013** te **AK-A014**. Botti i suradnici (5) ispitivali su fluorimetrijska svojstva stirlnih boja te spojevi s kojima se vrši usporedba (Py-NMe₂ i Q-NMe₂) pokazuju maksimume intenziteta nešto većih valnih duljina, tj. 615 nm te 630 nm.



Slika 34. Usporedba normaliziranog relativnog fluorimetrijskog intenziteta pri $c = 1 \times 10^{-6}$ M

Izrađeni su grafički prikazi ovisnosti intenziteta fluorescencije o promjeni temperature pri čemu su sva mjerenja provedena pri koncentraciji spojeva $c = 2 \times 10^{-6}$ M. Provedeno je postupno zagrijavanje krenuvši od 25 °C, te na 50 °C, 75 °C i 90 °C. Svi spojevi pokazuju temperaturnu stabilnost. Generalno razmatrajući grafičke prikaze, primjerice Slika 35 koja prikazuje temperaturni dijagram spoja **AK-A009**, vidljivo je kako porastom temperature dolazi do smanjenja intenziteta fluorescencije zbog povećanog broja sudara između molekula. Ostali spojevi pokazuju jednako ponašanje kao i spoj **AK-A009** (Prilog, Slike 53.c, 54.c, 55.c)



Slika 35. Ovisnost relativnog fluorimetrijskog intenziteta o temperaturi za spoja **AK-A009**

Pri snimanju ekscitacijskog spektra (koncentracija za sve spojeve iznosi $c = 2 \times 10^{-6}$ M) na isti grafički prikaz postavljen je i emisijski spektar, kako bi se uvidjelo koliki je Stokesov pomak (Prilog, Slike 52.d, 53.d, 54.d, 55.d), do kojeg dolazi zbog gubitka energije pri vibracijskoj relaksaciji povratka molekule iz pobuđenog stanja do najniže vibracijske razine pobuđenog stanja. Zato emisijski spektar pokazuje maksimum pomaknut u desno u odnosu na ekscitacijski spektar, jer su veće valne duljine pokazatelj manje energije. Pri snimanju ekscitacijskog spektra, spoj se pobuđuje pri svim valnim duljinama, no odziv se prati pri valnoj duljini maksimuma emisije. Tablicom 3. prikazane su valne duljine odziva pri snimanju ekscitacijskih dijagrama.

Tablica 3. Valne duljine emisijskog i apsorpcijskog maksimuma te Stokesov pomak

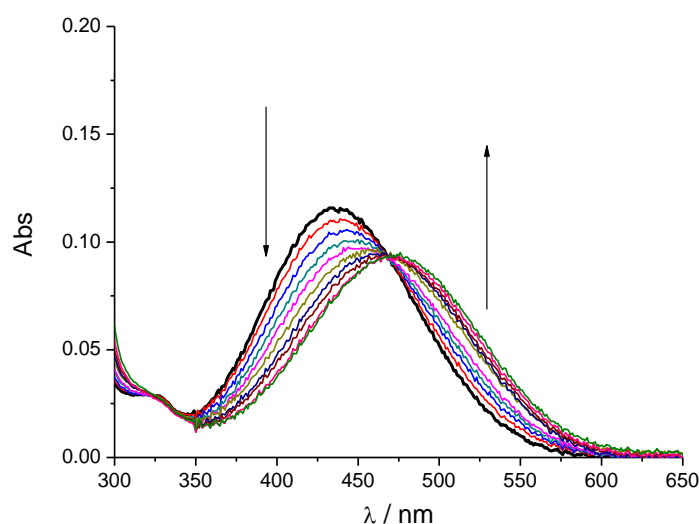
| Spoj | Valna duljina maksimuma emisije / nm | Valna duljina maksimuma apsorpcije / nm | Stokesov pomak / nm |
|----------------|--------------------------------------|---|---------------------|
| AK-A009 | 639 | 437 | 202 |
| AK-A036 | 578 | 458 | 120 |
| AK-A013 | 576 | 395 | 181 |
| AK-A014 | 555 | 383 | 172 |

Nadalje, svakom od spojeva dodana je ctDNA u 5 puta većoj koncentraciji od spoja, pri čemu je koncentracija spojeva iznosila $c = 2 \times 10^{-6}$ M. Za sve spojeve došlo je do znatnog porasta u intenzitetu (Prilog, Slike 52.e, 53.e, 55.e).

4.3. Rezultati titracija na UV-Vis spektrofotometru

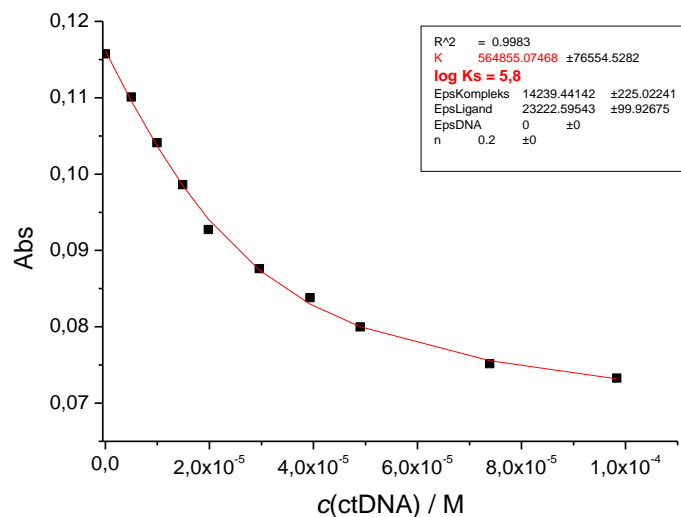
UV-Vis titracije provedene su za **AK-A009**, **AK-A013** te **AK-A014**. Rezultati nisu prikazani za **AK-A036** zbog malog odziva na UV-Vis spektrofotometru, pošto taj spoj, kao što je već napomenuto, pokazuje poprilično nisku vrijednost molarnog ekstinkcijskog koeficijenta.

Slika 36. je grafički prikaz UV-Vis titracije, tj. ovisnosti apsorbancije o koncentraciji za spoj **AK-A009** pri početnoj koncentraciji spoja $c = 5 \times 10^{-6}$ M. Vidljiv je batokromni te hipokromni pomak pri povećanju koncentracije ctDNA. Izozbestička točka nalazi se na 468 nm. Sama pojava izozbestičke točke daje do znanja kako dolazi do formiranja ravnoteže između slobodnog kromofora i dobivenog kompleksa s DNA. Kako se izozbestička točka ne pomiče te ima jednu vrijednost valne duljine, znači kako je prisutan samo jedan način vezanja. (5)



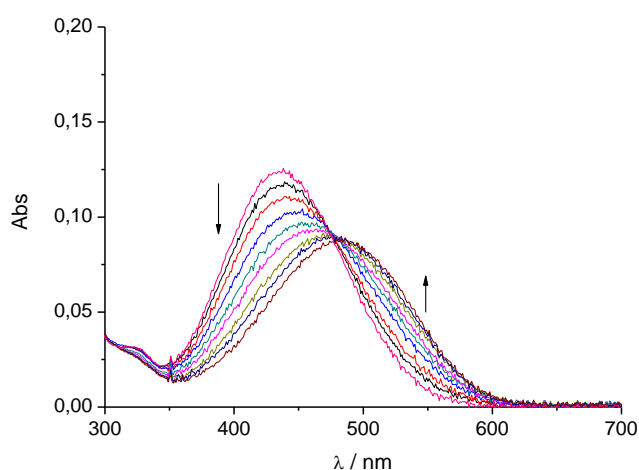
Slika 36. Grafički prikaz UV-Vis titracije spoja **AK-A009** sa ctDNA

Pri analizi korištena je Scatchardova jednačba (48) za određivanje konstanti stabilnosti. Dijagram ovisnosti maksimuma apsorbancije o koncentraciji polinukleotida prikazan je Slikom 37 i Slikama 56.b i 57.b (Prilog) te se konstante stabilnosti nalaze u Tablici 4.



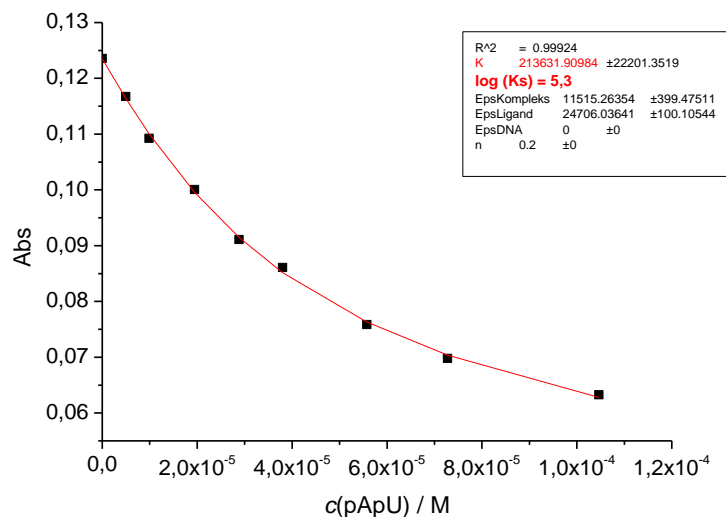
Slika 37. Određivanje konstante stabilnosti kompleksa DNA i male molekule putem Scatchardove jednadžbe za spoj **AK-A009**

Nakon potvrde vezanja ispitivanih spojeva na DNA, ispitivano je i vezanje na RNA molekulu tj. poly A - poly U (pApU). Proces titracije je potpuno analogan UV-Vis titracijama uz ctDNA. Slika 38 je grafički prikaz ovisnosti apsorbancije pri povećavanju koncentracije pApU pri korištenju spoja **AK-A009** te za spoj **AK-A013** i **AK-A014** Slike 56.c i 57.c (Prilog). Izobestička točka iznosi 477 nm za **AK-A009**, 446 nm za **AK-A013** te 426 nm za **AK-A014**.



Slika 38. Ovisnost apsorbancije o koncentraciji pri titraciji spoja **AK-A009** s pApU

Napravljena je analiza pomoću Scatchardove jednadžbe što je prikazano Slikom 39 te Slikama 56.d i 57.d. (Prilog).



Slika 39. Određivanje konstante stabilnosti kompleksa RNA i male molekule putem Scatchardove jednadžbe za spoj **AK-A009**

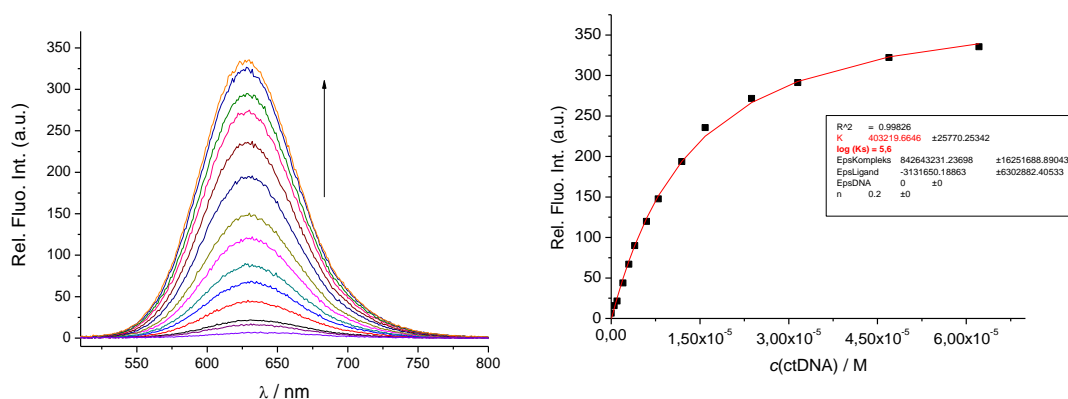
Za ovisnost apsorbancije spoja o promjeni koncentracije ctDNA pri titraciji moguće je uvidjeti iste trendove te doći do jednakih zaključaka za **AK-A013**, kao i za **AK-A014** u smislu batokromnog i hipokromnog pomaka (Prilog, Slike 56.a, 57.a). Izobestička točka za **AK-A013**, odnosno **AK-A014** iznosi 432 nm, odnosno 420 nm. Spoj **AK-A013** pokazuje samo pojavu hipokromnog pomaka. Pri određivanju konstante stabilnosti kompleksa RNA i male molekule **AK-A013** vidljivo je kako su promjene previše linearne za pravilno određivanje konstante (Prilog, Slika 56.d). Razlike u strukturama su vidljive prema heterocikličkim jezgrama spojeva. Spoj **AK-A009** sadrži kinolin, spoj **AK-A036** benzoselenazol, dok **AK-A013** i **AK-A014** sadrže piridinsku jezgru no potonja dva se razlikuju prema položaju supstituenta. **AK-A013** ima etilnu skupinu u *para* položaju dok **AK-A014** u *ortho*. **AK-A036** zbog svoje strukture pokazuje jako loš odziv na UV-Vis spektrofotometru.

Tablica 4. Vrijednosti logaritama konstanti stabilnosti za UV-Vis titracije s ctDNA

| spoj | log(Ks) – Scatchardova jednadžba (ctDNA) | log(Ks) – Scatchardova jednadžba (pApU) |
|----------------|--|---|
| AK-A009 | 5,8 | 5,3 |
| AK-A013 | 4,8 | - |
| AK-A014 | 4,5 | 5,0 |

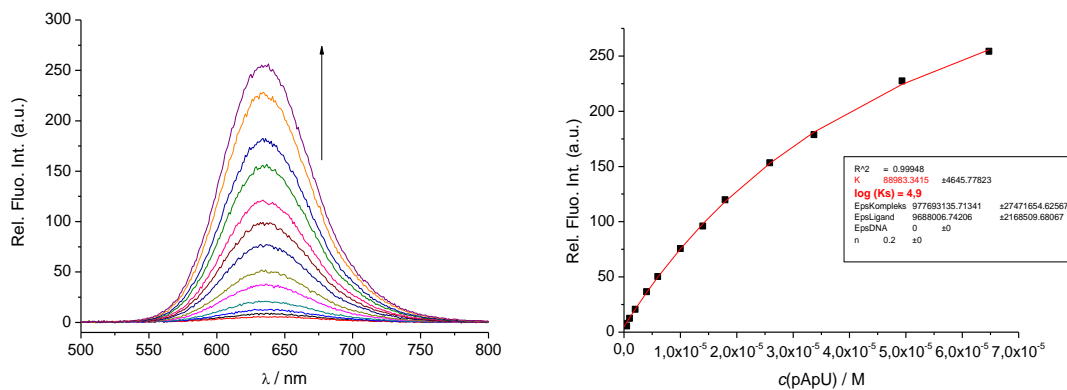
4.4. Rezultati titracije sa ctDNA na spektrofotometru

S obzirom da su ispitivani spojevi pokazali svojstvo vezanja na biomolekule UV/Vis spektrofotometrijom, a također posjeduju i fluorescencijska svojstva te su u preliminarnim ispitivanjima pokazali značajan porast fluorescencije prilikom vezanja na biomolekule, provedene su i fluorimetrijske titracije, analogno UV/Vis titracijama, ali pri nižim koncentracijama. Slika 40 prikazuje pripadajući grafički prikaz titracije za spoj **AK-A009** (lijevo) te dijagram određivanja logaritma konstante stabilnosti kompleksa DNA i male molekule putem Scatchardove jednadžbe (desno). Grafički prikazi titracija ostalih spojeva s ctDNA prikazani su Slikama 58., 59., 60. (Prilog). Logaritmi konstanti stabilnosti za sve spojeve dani su Tablicom 5. Maksimumi intenziteta iznose 627 nm za **AK-A009**, 580 nm za **AK-A036**, 567 nm za **AK-A013** te 548 nm za **AK-A014**.

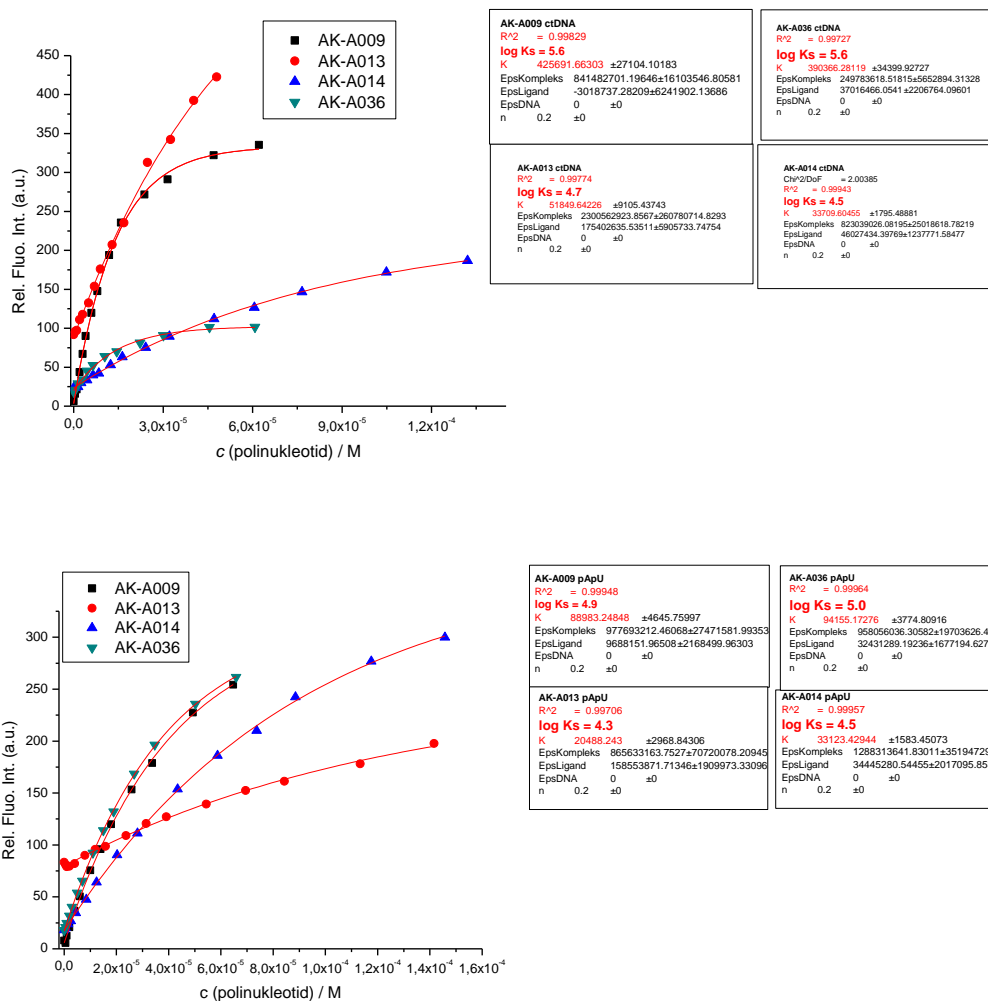


Slika 40. Ovisnost relativnog fluorimetrijskog intenziteta o koncentraciji pri titraciji s ctDNA za spoj **AK-A009** pri ekscitacijskim i emisijskim pukotinama od 10 nm, 10 nm (lijevo) i određivanje konstante stabilnosti kompleksa DNA i male molekule **AK-A009** (desno)

Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije spoja **AK-A009** o koncentraciji pApU dana je Slikom 41 (lijevo). Grafički prikaz određivanja konstante stabilnosti kompleksa RNA i male molekule putem Scatchardove jednadžbe za **AK-A009** pri titracijama sa pApU prikazan je Slikom 41 (desno). Maksimumi intenziteta su: za **AK-A009** 635 nm, za **AK-A036** 588 nm, dok maksimumi za **AK-A013** iznose 577 nm te za **AK-A014** 548 nm. Slikom 42 prikazana je ovisnost relativnog fluorimetrijskog intenziteta svih spojeva o koncentraciji polinukleotida te dolazi do rasta intenziteta pri povećanju koncentracije oba ispitivana polinukleotida.



Slika 41. Ovisnost relativnog intenziteta fluorescencije o koncentraciji pApU za **AK-A009** pri ekscitacijskim i emisijskim pukotinama od 10 nm, 10 nm (lijevo) te određivanje konstante stabilnosti kompleksa RNA i male molekule **AK-A009** (desno)



Slika 42. Usporedbe svih spojeva u ovisnosti relativnog fluorimetrijskog intenziteta o koncentraciji polinukleotida (gore – ctDNA, dolje – pApU)

Za spoj **AK-A009** vidljiv je porast relativnog fluorimetrijskog intenziteta pri titracijama tj. pri povećanju koncentracije ctDNA. Analogno tome, pri titracijama s pApU, također dolazi do porasta relativnog fluorimetrijskog intenziteta povećanjem koncentracije pApU. Isti trendovi vidljivi su i za spojeve **AK-A036**, **AK-A013** te **AK-A014** (Slika 42. i Slike 58.c, 59.c, 60.c, Prilog). Do znatnog porasta fluorescencije pri vezanju dolazi zbog onemogućene relaksacije iz pobuđenog stanja mehanizmima bez zračenja jer spoj pri vezanju za polinukleotid ne može pokazivati cis/trans izomeriju. Usporedno s radom iz literature (5), za fluorimetrijske titracije logaritmi konstanta stabilnosti pri ctDNA titraciji je 4,6 za spoj Q-NMe₂, koji je po strukturi heterocikličkog sustava najbližnji spoju **AK-A009**, koji ima nešto veću konstantu te iznosi 5,6. Za titracije s RNA, spoj Q-NMe₂ ima logaritam konstante 4,2, što je također manje od svih konstanti stabilnosti spojeva u ovome radu.

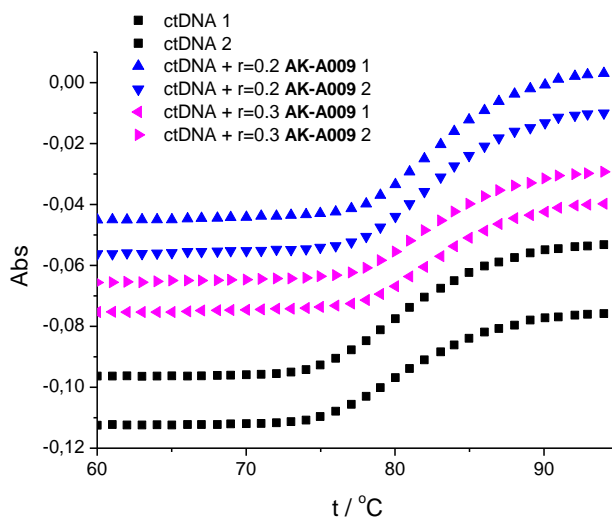
Tablica 5. Vrijednosti logaritama konstanti stabilnosti za fluorimetrijske titracije

| spoj | log(Ks) – Scatchardova jednadžba (ctDNA) | log(Ks) – Scatchardova jednadžba (pApU) |
|----------------|---|--|
| AK-A009 | 5,6 | 4,9 |
| AK-A036 | 5,6 | 5,0 |
| AK-A013 | 4,7 | 4,3 |
| AK-A014 | 4,5 | 4,5 |

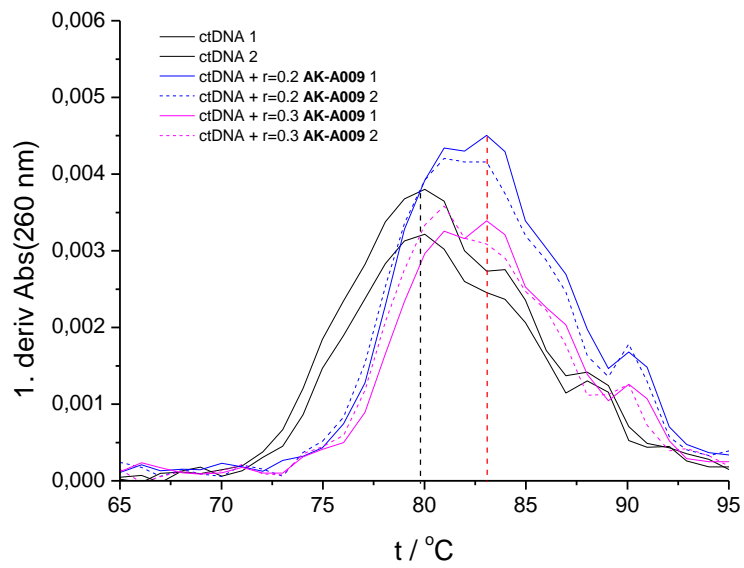
4.6. Rezultati eksperimenta termalne denaturacije

Ispitivanje temperature taljenja tj. termalne denaturacije je provedeno i za ctDNA i za pApU, uz sve spojeve. Slika 43 prikazuje krivulju taljenja za spoj **AK-A009** u omjerima 0,2 te 0,3 naspram ctDNA. Krivulje su sigmoidalnog oblika te točka infleksije na x-osi pokazuje temperaturu taljenja. Maksimum prve derivacije koristi se za očitavanje točke temperature taljenja, te se pri tome može vidjeti razlika u temperaturama taljenja prije i nakon vezanja spoja za ctDNA. Slika 44 prikazuje prvu derivaciju spoja **AK-A009** te označene pomake u temperaturama, dok su sumarno vrijednosti ΔT_m prikazane Tablicom 6 i Slikama 61, 62, 63 (Prilog) (uključujući i rezultate dobivene pri korištenju pApU). Za **AK-A009** vidljiv je porast temperature pri dodatku spoja u odnosu na temperaturu taljenja sa 80 °C na 83 °C, što znači kako dodatak spoja povećava stabilnost polinukleotida tj. ctDNA. Za ostale spojeve nije uočena razlika, pa su očitane temperature 80 °C prije i poslije interakcije spojeva s ctDNA.

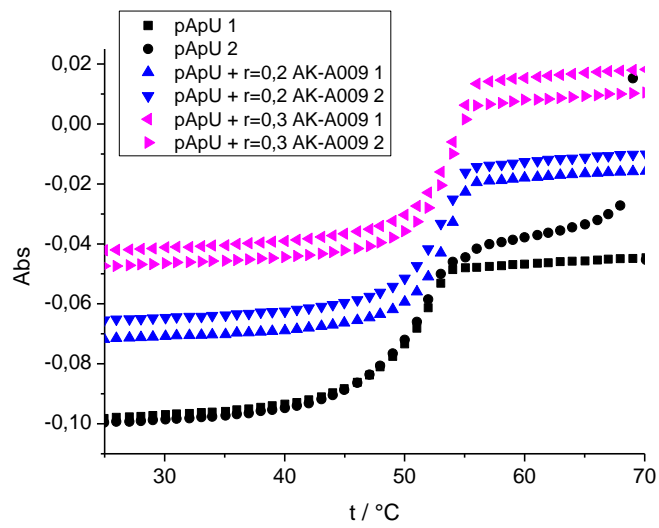
Slika 44. prikazuje prve derivacije krivulja denaturacije sa Slike 43. Temperatura taljenja se očitava prema maksimumu, po istom principu kao i pri korištenju ctDNA, pa se prema razlici u temperaturama prije i nakon dodavanja spoja određuje ΔT_m vrijednost. Za spoj **AK-A009** vidljiv je porast s 52 °C na 54 °C, prema čemu je $\Delta T_m = +2$.



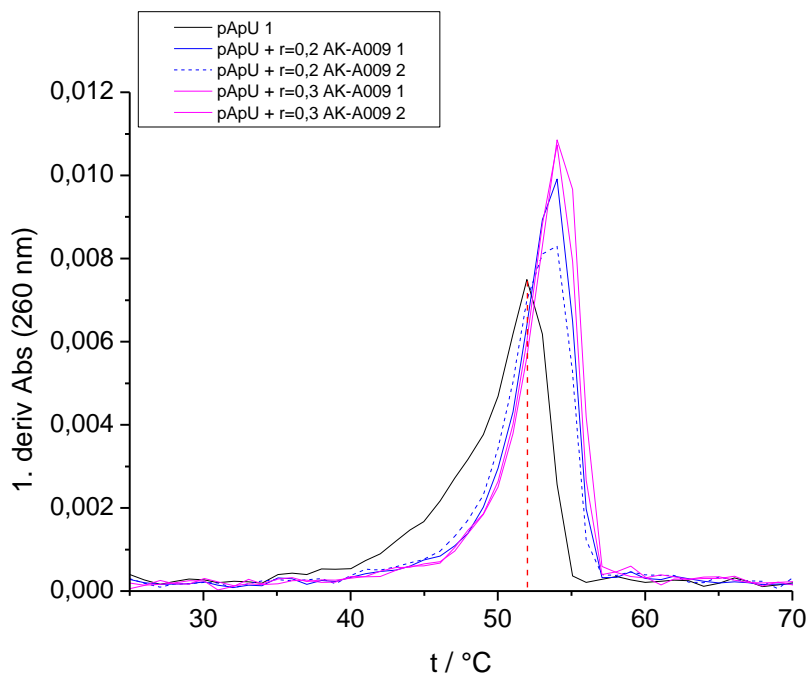
Slika 43. Krivulje termalne denaturacije za spoj **AK-A009** s ctDNA



Slika 44. Prva derivacija krivulja termalne denaturacije za spoj **AK-A009** s ctDNA



Slika 45. Krivulje termalne denaturacije za spoj **AK-A009** s pApU



Slika 46. Prva derivacija krivulja termalne denaturacije za spoj **AK-A009** sa pApU

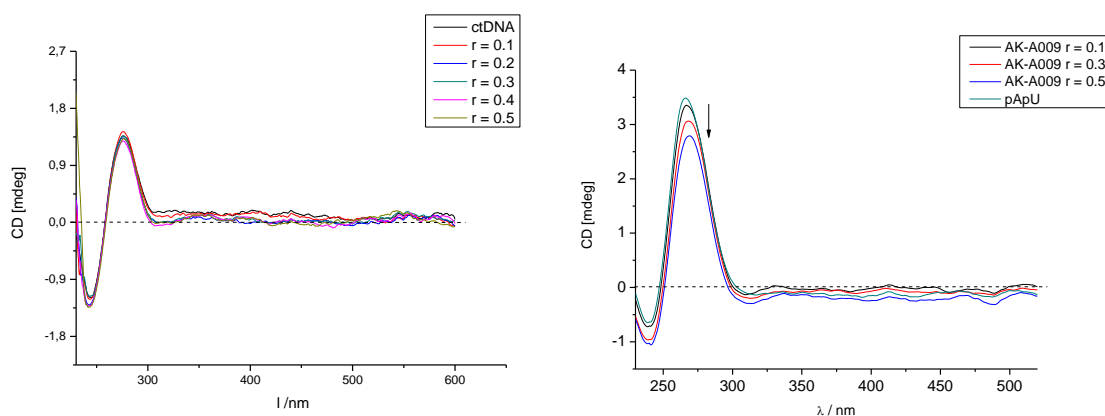
Tablica 6 prikazuje vrijednosti ΔT_m za sve ispitivane spojeve. Ta vrijednost dobiva se oduzimanjem temperature taljenja polinukleotida prije dodatka spoja od temperature taljenja nakon dodatka spoja. Pozitivne vrijednosti ΔT_m ukazuju na blagi stabilizacijski utjecaj spojeva na polinukleotid, ponešto više na RNA nego na DNA.

Tablica 6. Vrijednosti ΔT_m za spojeve **AK-A009**, **AK-A036**, **AK-A013** te **AK-A014** pri vezanju za ctDNA te pri vezanju za pApU

| spoj | ΔT_m (ctDNA) / °C | ΔT_m (pApU)/ °C |
|----------------|---------------------------------|-------------------------------|
| AK-A009 | +3 | +2 |
| AK-A036 | 0 | +1 |
| AK-A013 | 0 | 0 |
| AK-A014 | 0 | +1 |

4.7. Rezultati cirkularnog dikroizma

Slika 47. prikazuje ovisnost cirkularnog dikroizma o promjeni koncentracije spoja pri čemu su korišteni omjeri spoja **AK-A009** i polinukleotida od 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 te 0,5. Na grafičkom prikazu lijevo je prikaz mjerenja uz korištenu ctDNA, dok desna slika prikazuje spektre kod korištenja pApU. Dolazi do promjena samo u području apsorpcije polinukleotida (260 nm) te se zaključuje da je vezanje nespecifično. Grafički prikazi za spojeve **AK-A036**, **AK-A013** te **AK-A014** dani su Slikama 64, 65, 66 (Prilog).



Slika 47. Ovisnost cirkularnog dikroizma o promjeni omjera spoja i polinukleotida, gdje slike lijevo prikazuju spektre za ctDNA, dok desno za pApU

5. Zaključak

Stirilne boje ispitivane u ovom radu pokazuju velik potencijal za vezanje na polinukleotide jer im je struktura usporediva sa stirilnim bojama iz literature. Sve boje sadržavaju piperazinski prsten, no razlike su u heterocikličkoj jezgri koja je piridinska (**AK-A013** i **AK-A014**), kinolna (**AK-A009**) ili benzoselenazolna (**AK-A036**). Spojevi su karakterizirani tehnikom UV/Vis spektrofotometrije te dobiveni molarni ekstinkcijski koeficijenti za **AK-A009**, **AK-A036**, **AK-A013**, odnosno **AK-A014** iznose $24916,27 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $9052,93 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $25778,01 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, odnosno $25573,60 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Izrađeni su dijagrami ovisnosti apsorbancije o koncentraciji te je za sve spojeve vidljiva linearna ovisnost apsorbancije o koncentraciji u ispitivanom koncentracijskom području spojeva. Također, karakterizacijom na spektrofluorimetru doneseni su jednaki zaključci. Nadalje, zagrijavanjem te ponovnim hlađenjem na UV/Vis spektrofotometru, potom i na spektrofluorimetru, utvrđeno je kako svi spojevi i njihove apsorbancije pokazuju stabilnost prema zagrijavanju. Koristeći fluorescencijsku spektroskopiju, uspoređeni su ekscitacijski i emisijski spektri spojeva. Emisijski spektar pokazuje batokromni pomak u odnosu na ekscitacijski zbog gubitka energije pri vibracijskoj relaksaciji. Izračunate su vrijednosti Stokesovih pomaka te za sve spojeve vrijednost je velika, što je poželjna pojava jer velik Stokesov pomak eliminira mogućnost preklapanja ekscitacijskog i emisijskog spektra te je osiguran minimum interferencije pri mjerenju fluorescencije. Postupkom titracija spoja s ctDNA praćenih na UV/Vis spektrofotometru vidljiva je promjena u odzivu, čime je potvrđeno vezanje svih spojeva na molekulu DNA. Uz porast koncentracije vidljiv je batokromni i hipokromni pomak za sve ispitivane spojeve te prisustvo izobestičke točke koja ukazuje na jedan način vezanja. Sve boje rade komplekse s DNA različitih afiniteta koje je moguće izraziti vrijednostima logaritma konstante stabilnosti koje iznose: 5,8 za **AK-A009**, 4,8 za **AK-A013** i 4,5 za **AK-A014**. Konstante su dobivene korištenjem Scatchardove jednadžbe. Za ispitivanje vezanja spojeva na RNA molekulu, upotrijebljena je pApU molekula za titraciju praćenu UV/Vis spektrofotometrom te su vidljivi isti trendovi vezanja kao i pri DNA titracijama. Logaritmi konstante stabilnosti kompleksa spojeva i RNA molekule iznose 5,3 za **AK-A009** te 5,0 za **AK-A014**, dok su za spoj **AK-A013** vidljive izuzetno linearne promjene što dovodi do eliminacije mogućnosti pravilnog određivanja konstante stabilnosti. Značajan fluorescencijski odziv uočen je već preliminarnim ispitivanjima vezanja spojeva na DNA te su potom provedene titracije spojeva polinukleotidima čime je vidljiv rast relativnog fluorimetrijskog intenziteta povećanjem koncentracije polinukleotida. Logaritmi konstante

stabilnosti pri fluorimetrijskoj titraciji s ctDNA iznose: 5,6 za **AK-A009**, 5,6 za **AK-A036**, 4,7 za **AK-A013** te 4,5 za **AK-A014**. Pri fluorimetrijskoj titraciji s pApU, logaritmi konstanti stabilnosti iznose: 4,9 za **AK-A009**, 5,0 za **AK-A036**, 4,3 za **AK-A013** te 4,5 za **AK-A014**. Prema navedenim vrijednostima konstanti stabilnosti, zaključuje se kako spojevi pokazuju veći afinitet prema vezanju za molekulu DNA u odnosu na RNA. Provedena su ispitivanja ovisnosti cirkularnog dikroizma o promjeni koncentracije spoja te je uočeno kako dolazi do promjena odziva u području apsorpcije polinukleotida tj. pri 260 nm. Naposljetku, ispitivanja stabilizacijskog utjecaja svih spojeva na polinukleotide provedena su metodom termalne denaturacije. Izračunate razlike temperatura taljenja polinukleotida prije i nakon dodatka spoja ukazuju na blagi stabilizacijski utjecaj ispitivanih spojeva. Uspoređujući međusobno polinukleotide, vidljiv je ponešto veći utjecaj na molekulu RNA. Navedenim metodama dokazano je vezanje ispitivanih spojeva na polinukleotide uz stvaranje kompleksa te se, uspoređujući prikupljene podatke, dolazi do zaključka kako se način vezanja može definirati kao nespecifično vezanje u utore.

6. Popis literature

1. El-Adl. K., El-Helby A.G.A., Sakr H., Elwan A., [1,2,4]Triazolo[4,3-a]quinoxaline and [1,2,4]triazolo[4,3-a]quinoxaline-1-thiol derived DNA intercalators: Design, synthesis, molecular docking, In silico ADMET profile and anti-proliferative evaluations, *New Journal of Chemistry* 45(10), 2020
2. Mazzoli A., Carlotti B., Consiglio G., Fortuna G.C, Miolo G., Spalletti A., Photobehaviour of methyl-pyridinium and quinolinium iodides derivatives, free and complexed with DNA. A case of bisintercalation, *The Royal Society of Chemistry*, 2013.
3. Orehovec I., Nove spektroskopski i fotokemijski aktivne male molekule koje ciljaju DNA i RNA, *Doktorska disertacija, Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci, Rijeka*, 2021.
4. Berdnikova D.V., SoSnin N.I., Federova O.A., Ihmels H., Governing the DNA-binding mode of styryl dyes by the length of their alkyl substituents – from intercalation to major groove binding, *The Royal Society of Chemistry, Org, Biomol. Chem.*, 16, 2018., 545-554
5. Botti V., Cesaretti A., Ban Ž., Crnolatac I., Consiglio G., Elisei F., Piantanida I., Fine structural tuning of styryl-based dyes for fluorescence and CD-based sensing of various ds-DNA/RNA sequences, *The Royal Society of Chemistry, Org. Biomol. Chem.*, 17, 2019., 8243-8258
6. Nelson L.D. Cox M.M., *Lehninger Principles of Biochemistry*, 7.izdanje, w.h.freeman (2017)
7. <https://www.easybiologyclass.com/wp-content/uploads/2017/03/difference-between-ribose-and-deoxyribose.jpg> (17.8.2022.)
8. D. M. Perrin, u *Polymer Science: A Comprehensive Reference*, ed. M. Moeller, K. Matyjaszewski, Elsevier Science, 1st edition, 2012
9. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K., Walter P., *Molecular Biology of the Cell*, 6.izdanje, Garland Science, SAD, 2008.
10. Ananya P., Santanu B., *Chemistry and biology of DNA-binding small molecules*, *Current Science*, Vol 102., No. 2, 2012.
11. Bhaduri S., Nihar R., An overview of recent advances in duplex DNA recognition by small molecules, *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 14, 2018., 1051-1086
12. <https://microbenotes.com/different-forms-of-dna-b-form-a-form-z-form/> (17.8.2022.)
13. Salazar M., Fedoroff O.Y., Miller J.M., The DNA strand in DNAoRNA hybrid duplexes is neither B-form nor A-form in solution, *Biochemistry* 32, 1992., 4207-4215
14. Juru A.U., Hargrove A.E., Frameworks for targeting RNA with small molecules, *Journal of Biological Chemistry*, Volume 296, 2021.
15. Warner K., Hajdin C., Weeks K., Principles for targeting RNA with drug-like small molecules, *Nat Rev Drug Discovery*, 17, 2018., 547-558
16. Gurova K., New hopes from old drugs: revisiting DNA-binding small molecules as anticancer agents, *Future Oncol.* 5(10), 2009., 1685-1704
17. Krautbauer R., Pope H.L., Schrader E.T., Allen S., Gaub E.H., Discriminating small molecule DNA binding modes by single molecule force spectroscopy, *FESB Letters* 510, 2002., 154-158

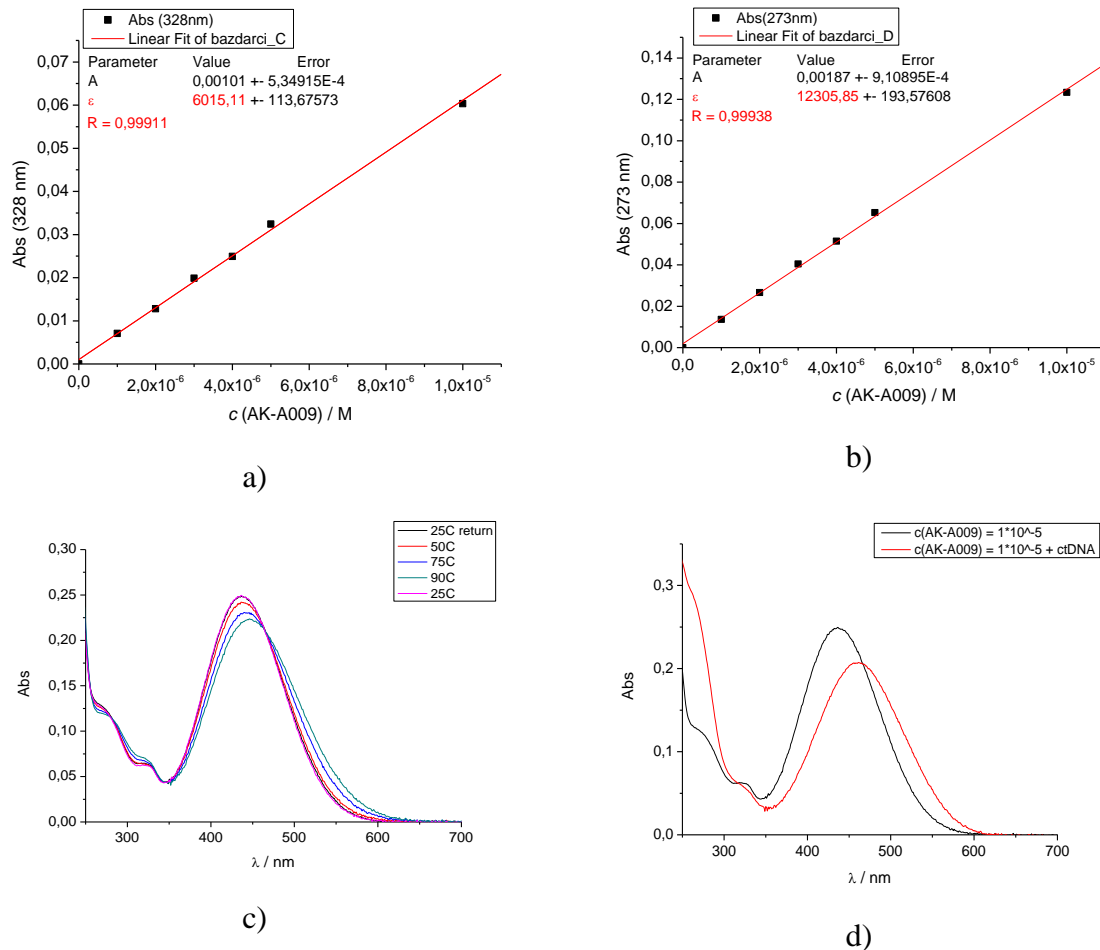
18. Williams K.A., Dasilva C.S., Bhatta A., Rawal B., Liu M., Korobkova A.E., Determination of the drug-DNA binding modes using fluorescence-based assays, *Analytical Biochemistry* 422, 2012., 66-73
19. Drabløs F, Feyzi E, Aas PA, Alkylation damage in DNA and RNA - repair mechanisms and medical significance, *DNA Repair (Amst)*. 2004., 1389-1407
20. <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/aldrich/363057> (17.8.2022.)
21. <https://en.wikipedia.org/wiki/Melphalan#/media/File:Melphalan.svg> (17.8.2022.)
22. https://en.wikipedia.org/wiki/File:Ethidium_bromide.svg (17.8.2022.)
23. Schatzschneider U. Metallointercalators and Metalloinsertors: Structural Requirements for DNA Recognition and Anticancer Activity, *Metallo-Drugs: Development and Action of Anticancer Agents. Metal Ions in Life Sciences. Vol. 18.* Berlin, 2018., 387–435
24. <https://en.wiktionary.org/wiki/quinacrine#/media/File:Quinacrine.svg> (17.8.2022.)
25. <https://en.wikipedia.org/wiki/Streptomycin#/media/File:Streptomycin2.svg> (17.8.2022.)
26. https://en.wikipedia.org/wiki/Neomycin#/media/File:Neomycin_B_C.svg (17.8.2022.)
27. Deligeorgiev T., Vasilev A., Kaloyanova S, Vaquero J.J., Styryl dyes – synthesis and applications during the last 15 years, *Society of Dyers and Colourists, Color. Technol.*, 126., 2010., 55-80
28. Xie X., Choi B., Largy E., Guillot R., Granzhan A., Teulade-Fichou M-P., Asymmetric Distyrylpyridinium Dyes as Red-Emitting Fluorescent Probes for Quadruplex DNA, *Chem. Eur. J.*, 19, 2013., 1214-1226
29. Rastede E.E., Tanha M., Yaron D., Watkins S.C., Waggoner A.S., Armitage B.A., Spectral fine tuning of cyanine dyes: electron donor-acceptor substituted analogues of thiazole orange, *Photochemical and Photobiological Sciences*, 9, 2015., 1703-1712
30. https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-the-styryl-dye-dibutylamino-stilbazolium-butylsulfonate_fig7_226597329 (17.8.2022.)
31. <https://www.edinst.com/techniques/uv-vis-spectroscopy/> (17.8.2022.)
32. Pavia D.L., Lampman G.M., Kriz G.S., *Introduction to Spectroscopy, A Guide for students of Organic Chemistry*, Department of Chemistry, Western Washington University, Third Edition, Thomas Learning, 2001.
33. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy_Basics/What_Causes_Molecules_to_Absorb_UV_and_Visible_Light](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy_Basics/What_Causes_Molecules_to_Absorb_UV_and_Visible_Light) (17.8.2022.)
34. Škorić I., Molekulska spektroskopija, Nastavni tekst
35. <https://pharmaxchange.info/2012/04/ultraviolet-visible-uv-vis-spectroscopy-%e2%80%93-derivation-of-beer-lambert-law/> (17.8.2022.)
36. Biver T., Use of UV-Vis Spectrometry to Gain Information on the Mode of Binding of Small Molecules to DNAs and RNAs, *Chemistry and Industrial Chemistry Department, University of Pisa, Via Risorgimento, 35, 56126, Pisa, Italy*, 2012.
37. J.-L. Mergny and L. Lacroix, *Oligonucleotides*, 2003, 13, 515–537
38. Aufdembrink L.M., Hoog T.G., Pawlak M.R., Bachan B.F., Heili J.M., Engelhart A.E., Methods for thermal denaturation studies of nucleic acids in complex with fluorogenic dyes, *Methods in Enzymology*, Vol. 623., 2019.

39. Šmidlehner T., Multifunctional molecular recognition of DNA/RNA secondary structure by molecular sensors, Doctoral thesis, Department of biotechnology, University of Rijeka, Rijeka, 2018.
40. Atkins P., de Paula J., Atkins' Physical Chemistry, 8th edition, Oxford University Press., 2016.
41. Jablonski A., Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes. Nature. Vol. 131
42. https://en.wikipedia.org/wiki/Jablonski_diagram#/media/File:Jablonski_Diagram_of_Fluorescence_Only-en.svg (17.8.2022.)
43. https://www.researchgate.net/figure/The-Jablonski-diagram-42-48-Schematic-drawing-of-the-electronic-ground-state-the_fig6_339366853 (17.8.2022.)
44. <https://www.enzolifesciences.com/science-center/technotes/2019/december/what-is-the-difference-between-fluorescence-phosphorescence-and-luminescence?/> (17.8.2022.)
45. <https://www.horiba.com/ind/scientific/technologies/fluorescence-spectroscopy/what-is-fluorescence-spectroscopy/> (17.8.2022.)
46. <https://www.bmglabtech.com/en/fluorescence-intensity/> (17.8.2022.)
47. <http://www.physicsbootcamp.org/section-polarization-of-light.html> (17.8.2022.)
48. McGhee, J. D., and Hippel, P. H. V. Theoretical Aspects of DNA-Protein Interactions - Cooperative and Non-Cooperative Binding of Large Ligands to a One-Dimensional Homogeneous Lattice, J Mol Biol (1974) 86, 469-489
49. <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/substance/ethylmethanesulfonate1241662500> (17.8.2022.)

7. Prilog radu

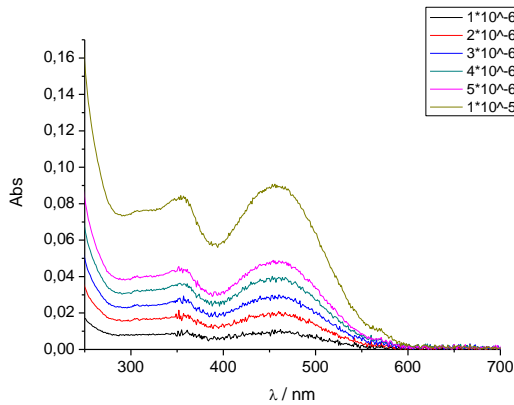
UV/Vis karakterizacija

AK-A009

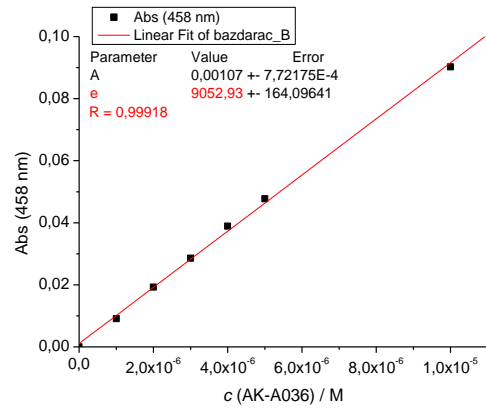


Slika 48. **AK-A009**: a) dijagram maksimuma apsorbancije za 328 nm, b) dijagram maksimuma apsorbancije za 273 nm, c) temperaturni dijagram, d) prikaz razlike apsorbancije prije i poslije dodatka ctDNA u koncentraciji 5 puta većoj od spoja

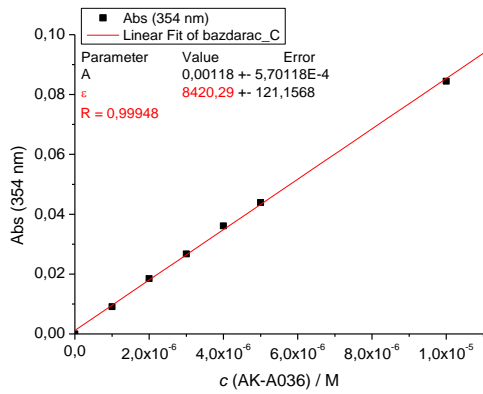
AK-A036



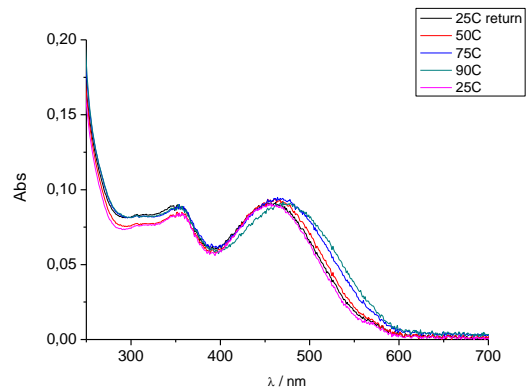
a)



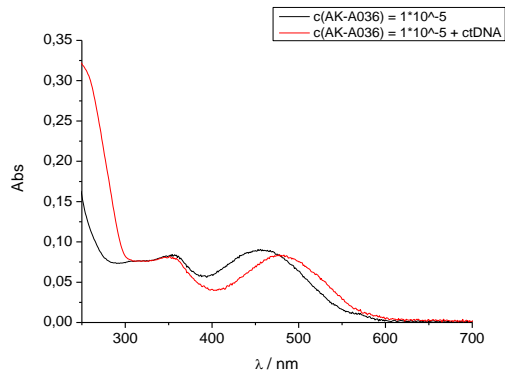
b)



c)



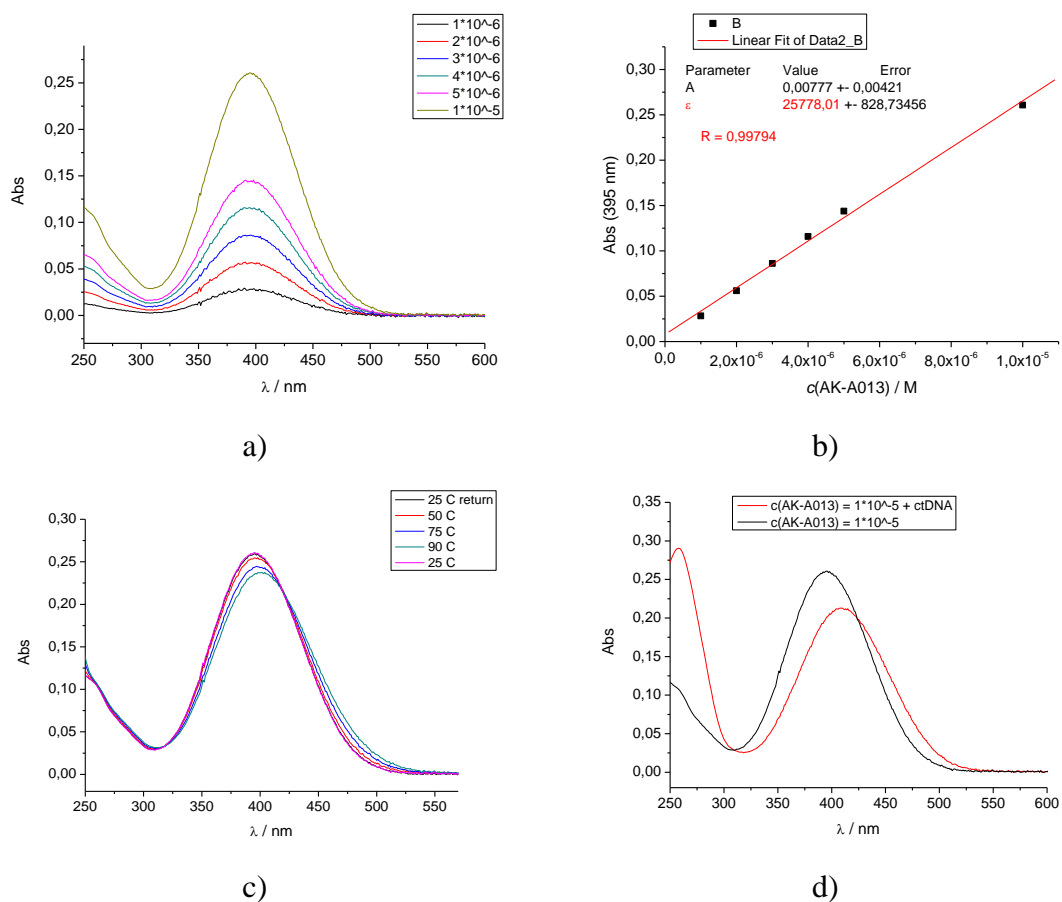
d)



e)

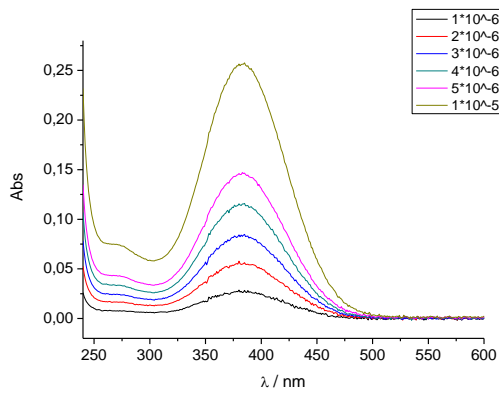
Slika 49. **AK-A036**: a) UV-Vis koncentracijski dijagram, b) dijagram maksimuma apsorpcije za 458 nm, c) dijagram maksimuma apsorpcije za 354 nm, d) temperaturni dijagram, e) prikaz razlike apsorpcije prije i poslije dodatka ctDNA u koncentraciji 5 puta većoj od spoja

AK-A013

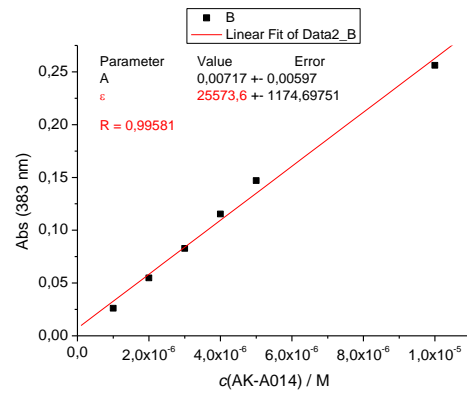


Slika 50. **AK-A013**: a) UV-Vis koncentracijski dijagram, b) dijagram maksimuma apsorbancije za 395 nm, c) temperaturni dijagram, d) prikaz razlike apsorbancije prije i poslije dodatka ctDNA u koncentraciji 5 puta većoj od spoja

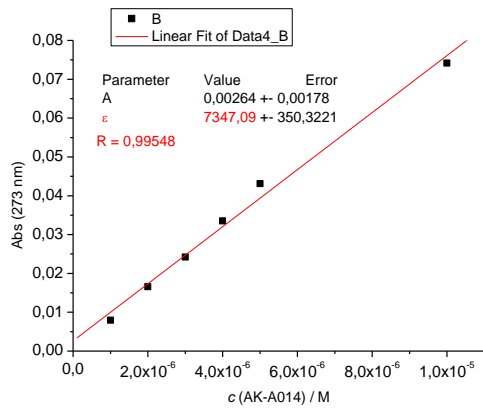
AK-A014



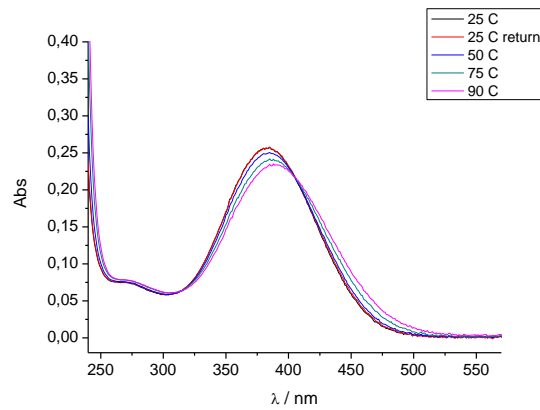
a)



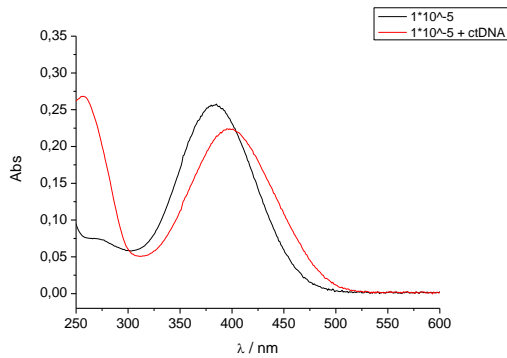
b)



c)



d)

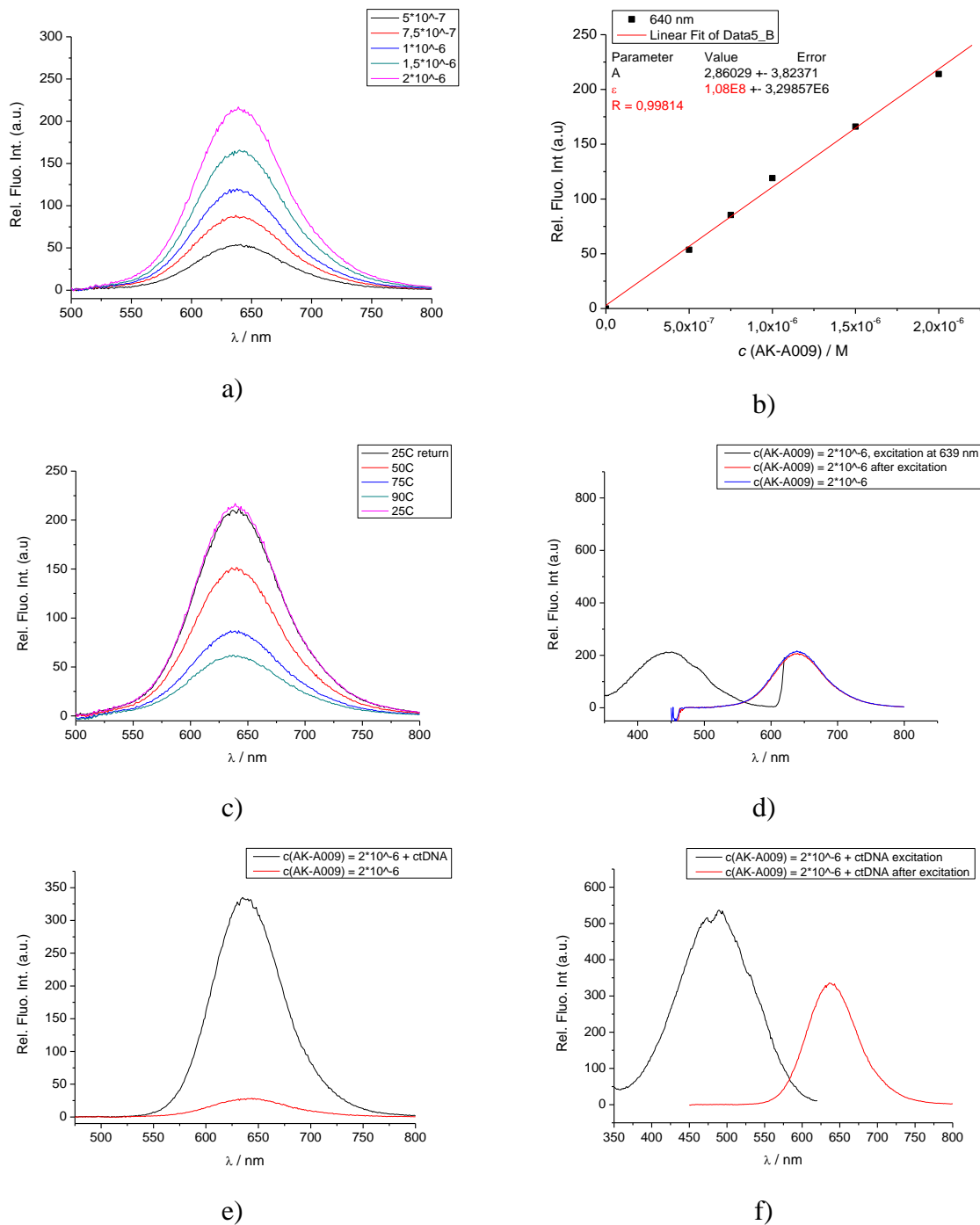


e)

Slika 51. **AK-A014**: a) UV-Vis koncentracijski dijagram, b) dijagram maksimuma apsorbancije za 383 nm, c) dijagram maksimuma apsorbancije za 273 nm, d) temperaturni dijagram, e) prikaz razlike apsorbancije prije i poslije dodatka ctDNA u koncentraciji 5 puta većoj od spoja

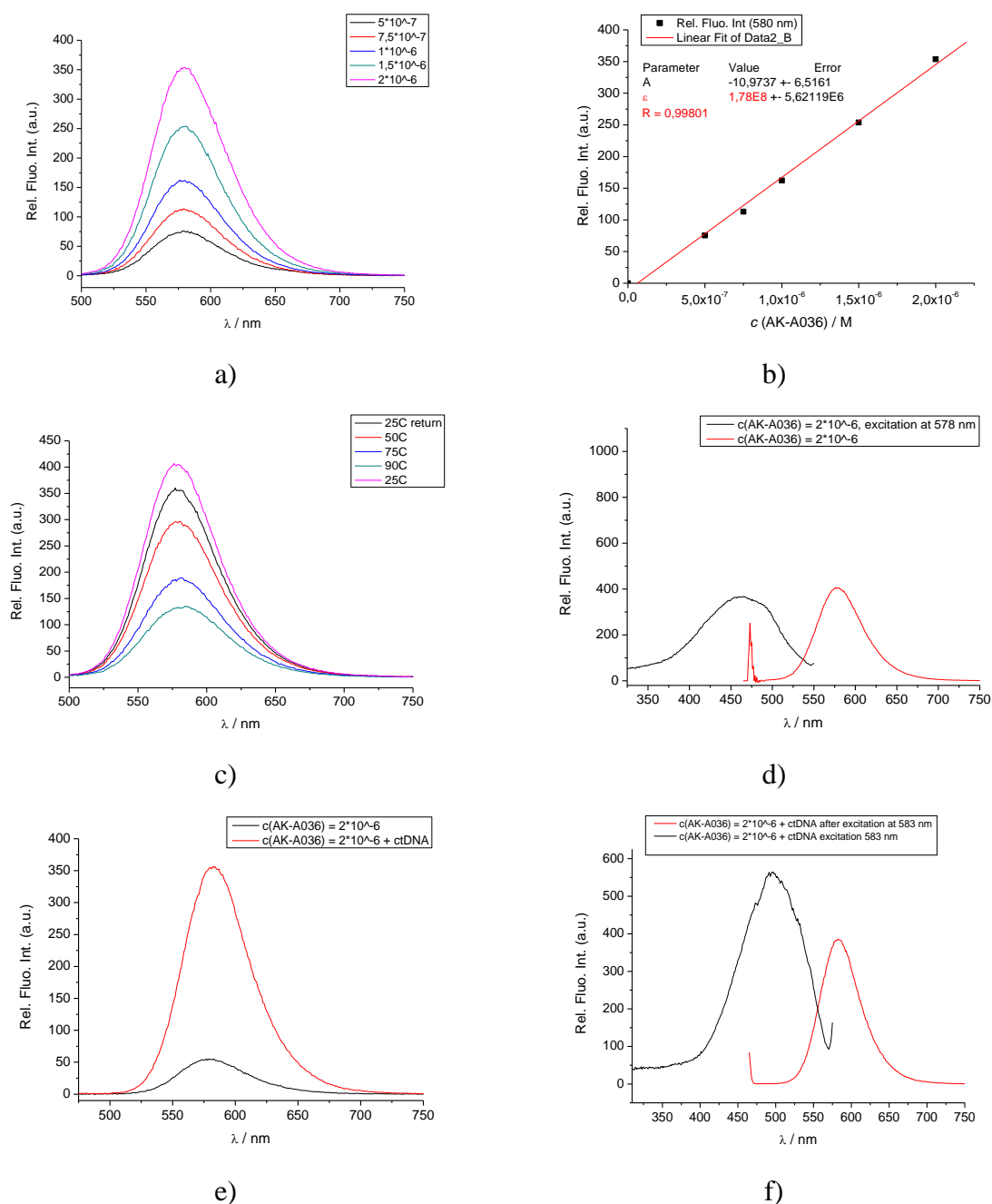
Fluorimetrijska karakterizacija

AK-A009



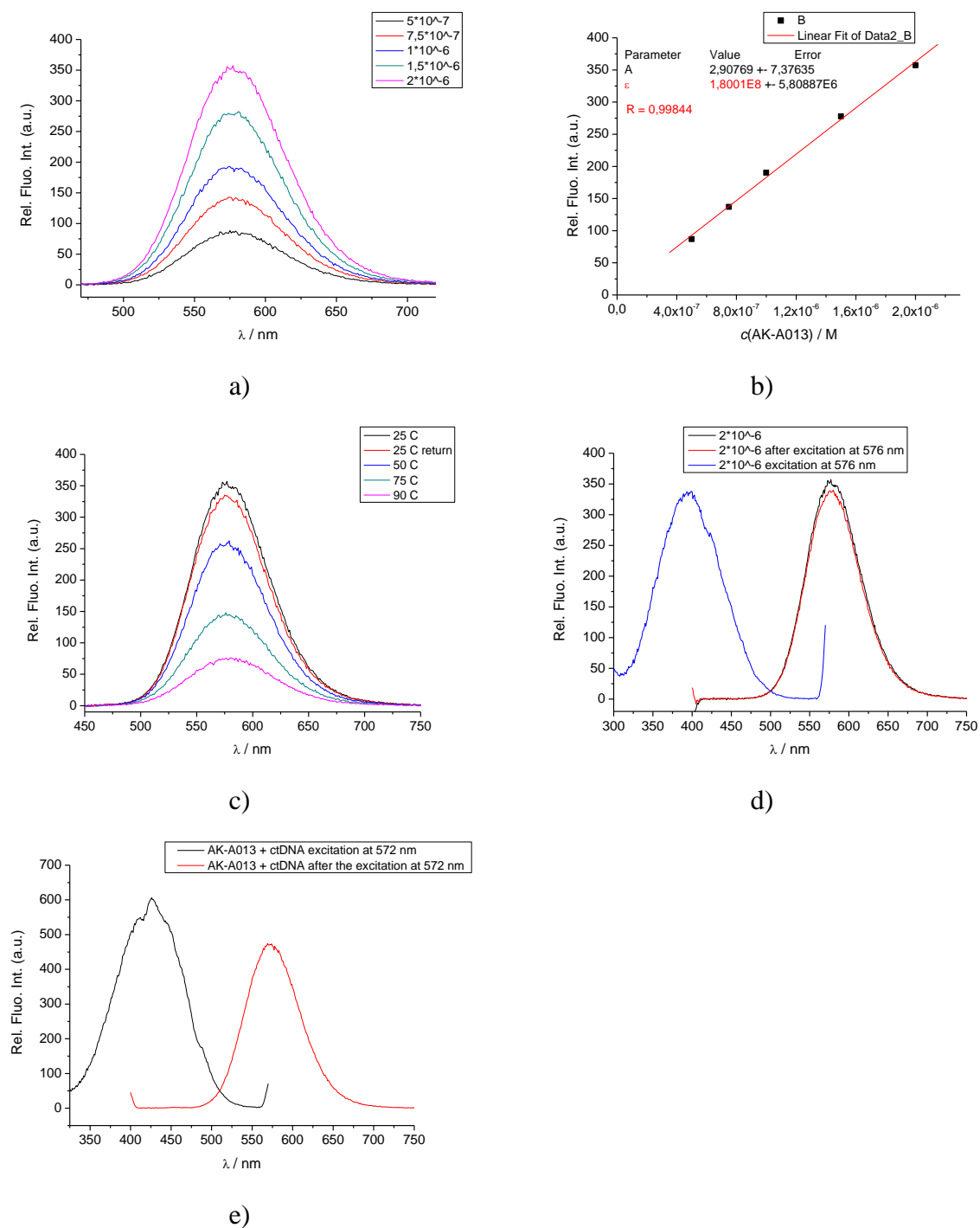
Slika 52. **AK-A009**: a) grafički prikaz ovisnosti relativnog intenziteta fluorescencije o koncentraciji pri ekscitacijskoj i emisijskoj pokutini od 20, 20 nm, b) dijagram maksimuma fluorimetrijskog intenziteta, c) temperaturni dijagram pri ekscitacijskoj i emisijskoj pokutini od 20, 20 nm, d) ekscitacijski spektar (20, 20 nm), e) usporedba relativnog intenziteta fluorescencije prije i nakon dodatka ctDNA (10, 10 nm), f) ekscitacijski spektar nakon dodatka ctDNA (10, 10 nm)

AK-A036



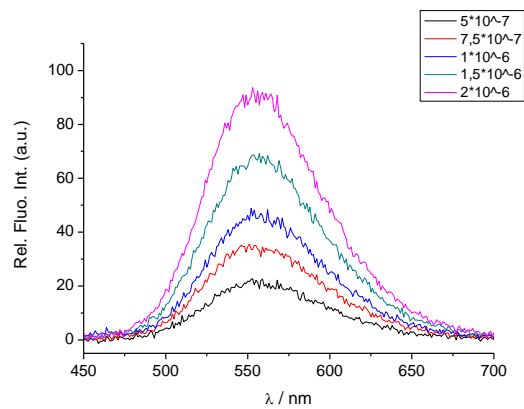
Slika 53. **AK-A036**: a) grafički prikaz ovisnosti relativnog intenziteta fluorescencije o koncentraciji pri ekscitacijskoj i emisijskoj pokutini od 20, 20 nm, b) dijagram maksimuma fluorimetrijskog intenziteta, c) temperaturni dijagram pri ekscitacijskoj i emisijskoj pukotini od 20 20 nm, d) ekscitacijski spektar (20, 20 nm), e) usporedba relativnog intenziteta fluorescencije prije i nakon dodatka ctDNA (10, 10 nm), f) ekscitacijski spektar nakon dodaktka ctDNA (10, 10 nm)

AK-A013

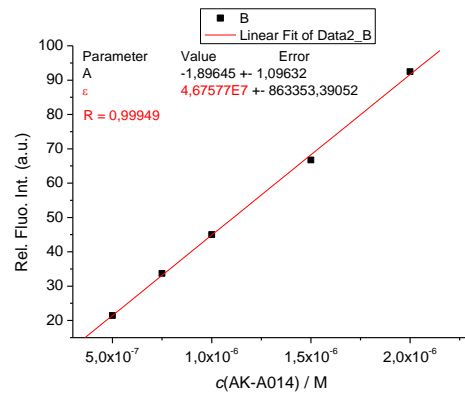


Slika 54. **AK-A013**: a) grafički prikaz ovisnosti relativnog intenziteta fluorescencije o koncentraciji pri ekscitacijskoj i emisijskoj pokutini od 10, 10 nm, b) dijagram maksimuma fluorimetrijskog intenziteta, c) temperaturni dijagram pri ekscitacijskoj i emisijskoj pukotini od 10, 10 nm, d) ekscitacijski spektar (10, 10 nm), e) ekscitacijski spektar nakon dodataka ctDNA (10, 5 nm)

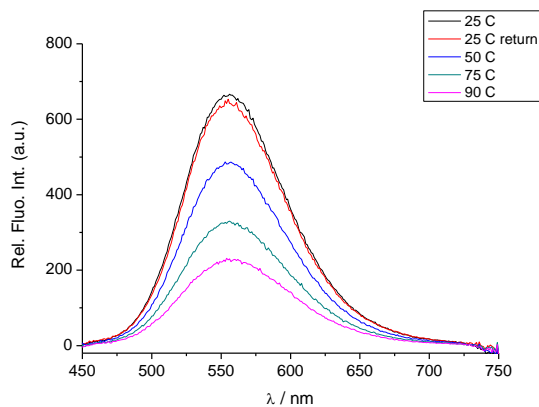
AK-A014



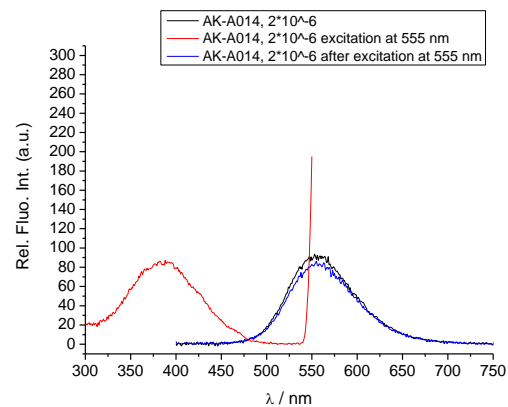
a)



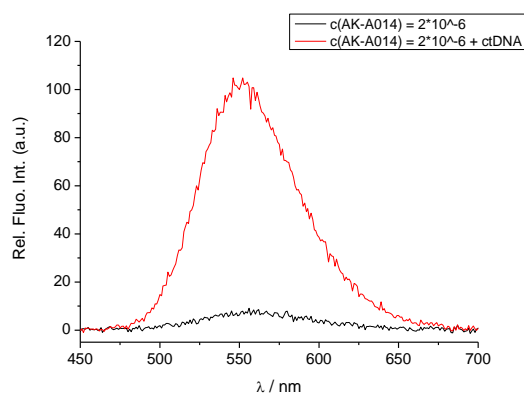
b)



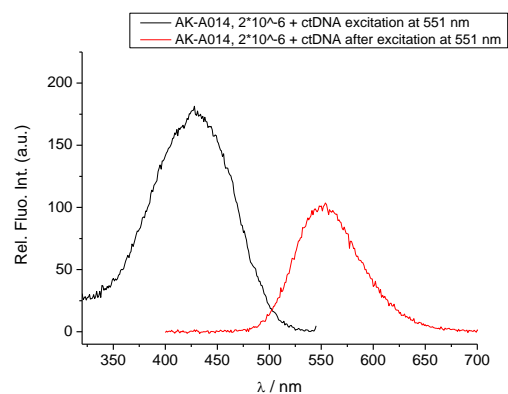
c)



d)



e)

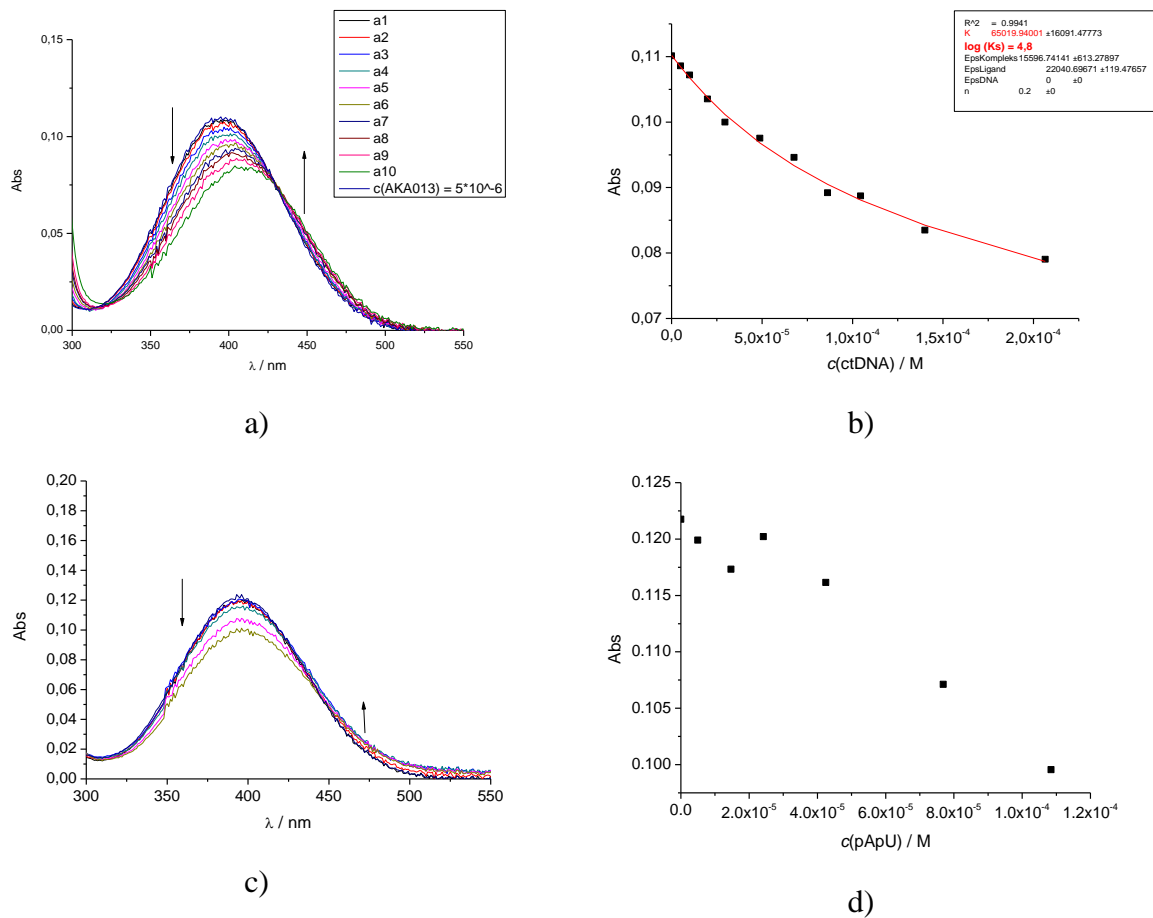


f)

Slika 55. **AK-A014**: a) grafički prikaz ovisnosti relativnog intenziteta fluorescencije o koncentraciji pri ekscitacijskoj i emisijskoj pokutini od 10, 10 nm, b) dijagram maksimuma fluorimetrijskog intenziteta, c) temperaturni dijagram pri ekscitacijskoj i emisijskoj pokutini od 20, 20 nm, d) ekscitacijski spektar (10, 10 nm), e) usporedba relativnog intenziteta fluorescencije prije i nakon dodatka ctDNA (5, 5 nm), f) ekscitacijski spektar nakon dodatka ctDNA (5, 5 nm)

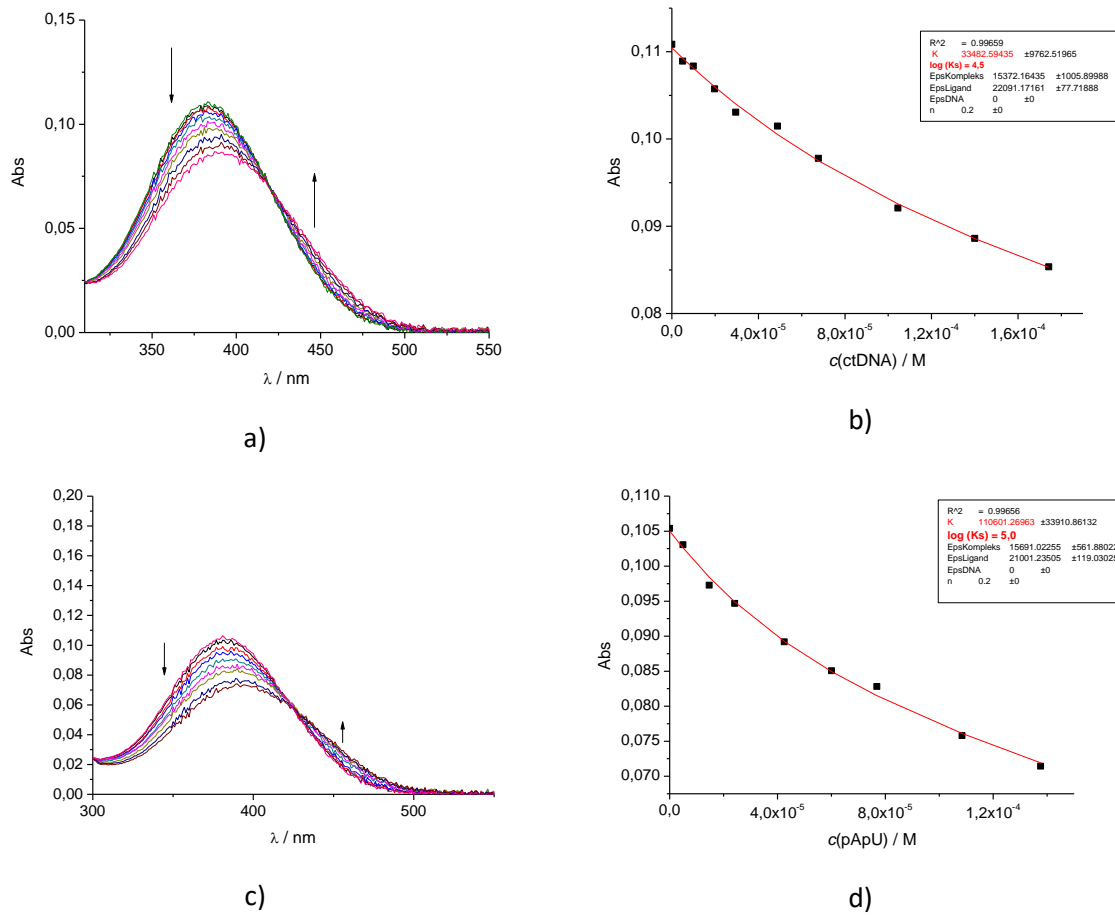
UV-Vis titracija

AK-A013



Slika 56. **AK-A013**: a) ovisnost apsorbancije o koncentraciji pri titraciji spoja s ctDNA, b) određivanje konstante stabilnosti kompleksa DNA i male molekule putem Scatchardove jednačbe, c) ovisnost apsorbancije o koncentraciji pri titraciji spoja s pApU, d) određivanje konstante stabilnosti kompleksa RNA i male molekule putem Scatchardove jednačbe

AK-A014

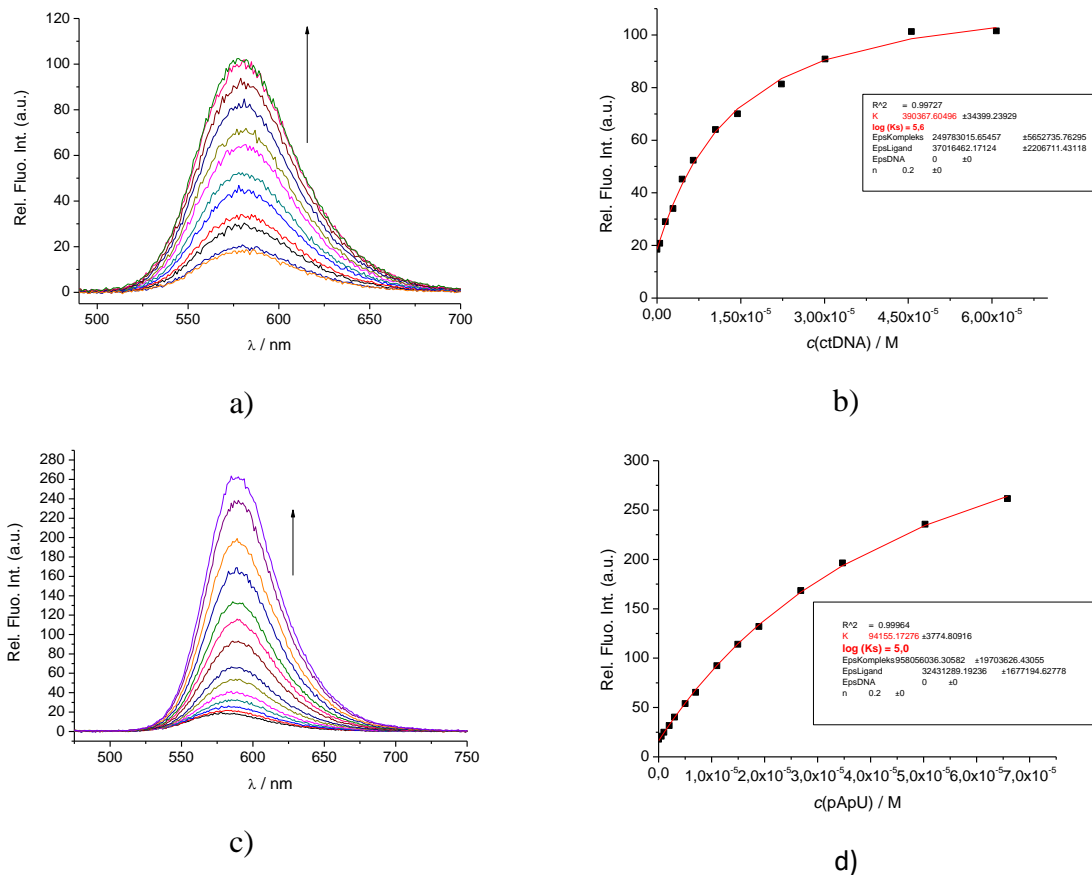


Slika 57. **AK-A014**: a) ovisnost apsorbancije o koncentraciji pri titraciji spoja s ctDNA, b) određivanje konstante stabilnosti kompleksa DNA i male molekule putem Scatchardove jednačbe, c) ovisnost apsorbancije o koncentraciji pri titraciji spoja s pApU, d) određivanje konstante stabilnosti kompleksa RNA i male molekule putem Scatchardove jednačbe

Fluorimetrijske titracije

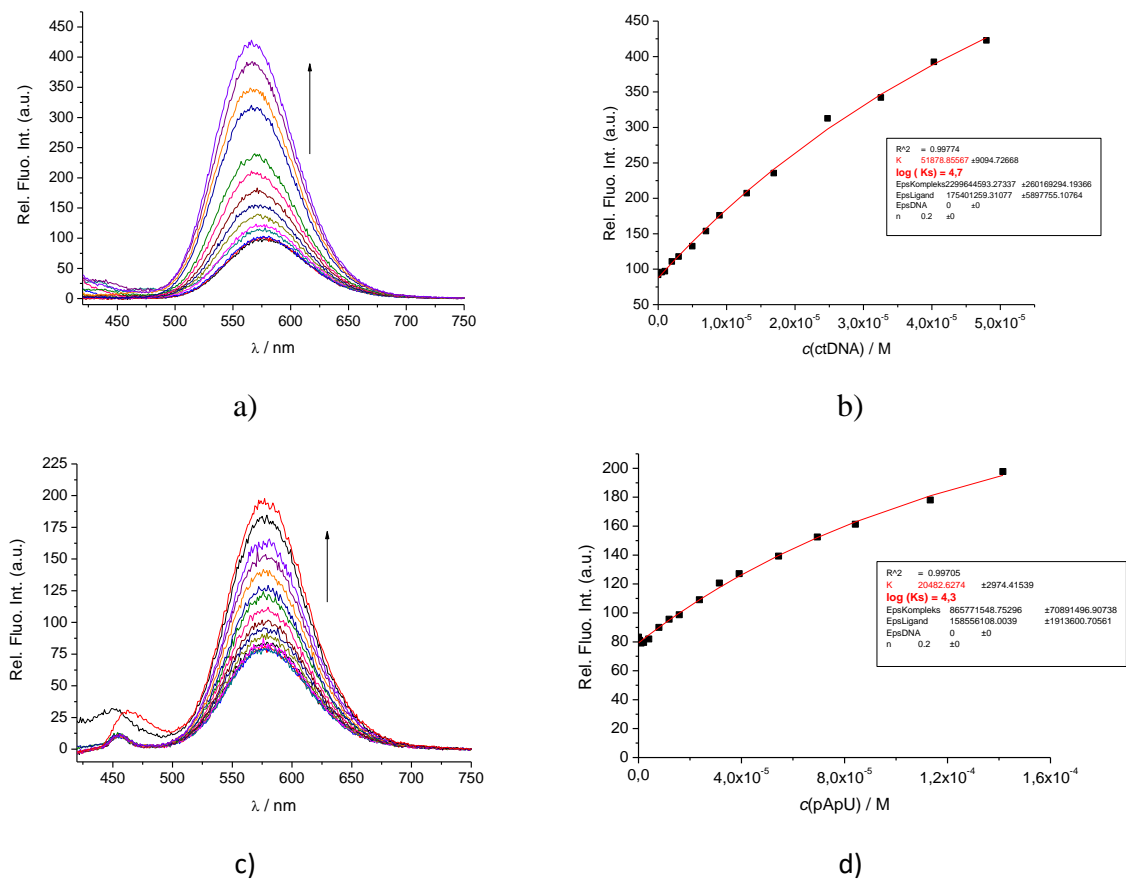
Sve fluorimetrijske titracije uz ctDNA i uz pApU provedene su pri ekscitacijskim i emisijskim pukotinama od 10 nm, 10 nm.

AK-A036



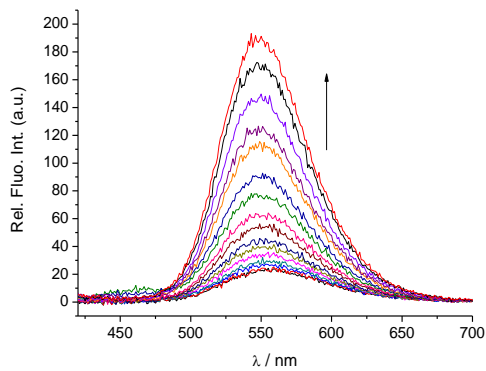
Slika 58. **AK-A036**: a) ovisnost relativnog fluorimetrijskog intenziteta o koncentraciji pri titraciji s ctDNA, b) određivanje konstante stabilnosti kompleksa DNA i male molekule putem Scatchardove jednadžbe, c) ovisnost relativnog fluorimetrijskog intenziteta o koncentraciji pri titraciji s pApU d) određivanje konstante stabilnosti kompleksa RNA i male molekule putem Scatchardove jednadžbe pri titracijama sa pApU

AK-A013

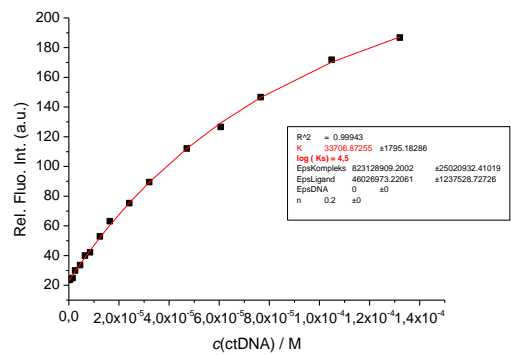


Slika 59. **AK-A013**: a) ovisnost relativnog fluorimetrijskog intenziteta o koncentraciji pri titraciji s ctDNA, b) određivanje konstante stabilnosti kompleksa DNA i male molekule putem Scatchardove jednadžbe, c) ovisnost relativnog fluorimetrijskog intenziteta o koncentraciji pri titraciji s pApU, d) određivanje konstante stabilnosti kompleksa RNA i male molekule putem Scatchardove jednadžbe pri titracijama sa pApU

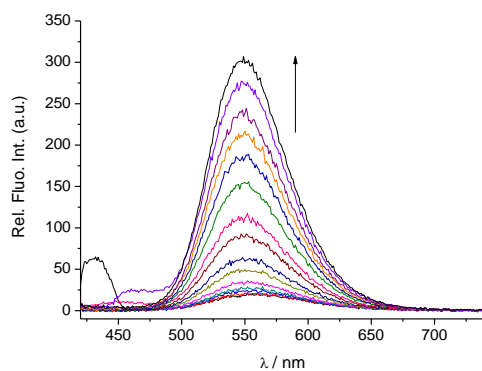
AK-A014



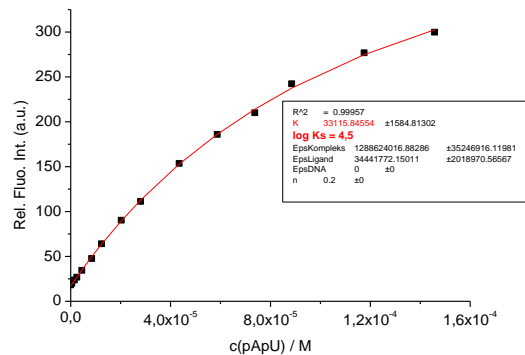
a)



b)



c)

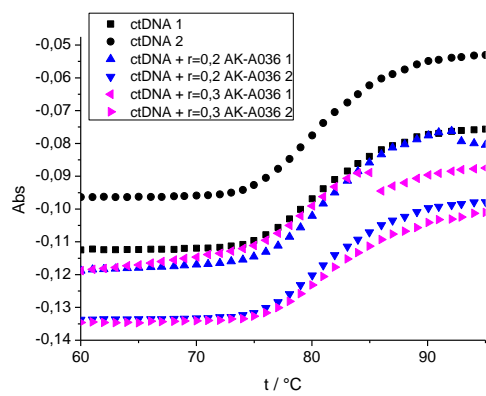


d)

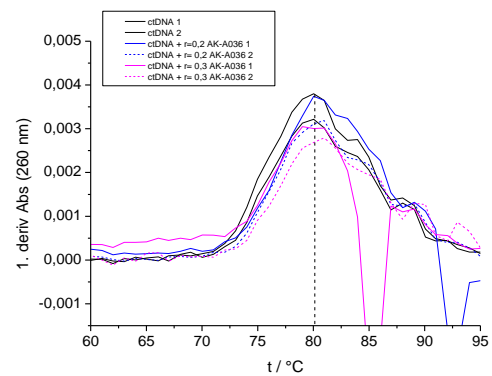
Slika 60. **AK-A014**: a) ovisnost relativnog fluorimetrijskog intenziteta o koncentraciji pri titraciji s ctDNA, b) određivanje konstante stabilnosti kompleksa DNA i male molekule putem Scatchardove jednadžbe, c) ovisnost relativnog fluorimetrijskog intenziteta o koncentraciji pri titraciji s pApU, d) određivanje konstante stabilnosti kompleksa RNA i male molekule putem Scatchardove jednadžbe pri titracijama sa pApU

Termalna denaturacija

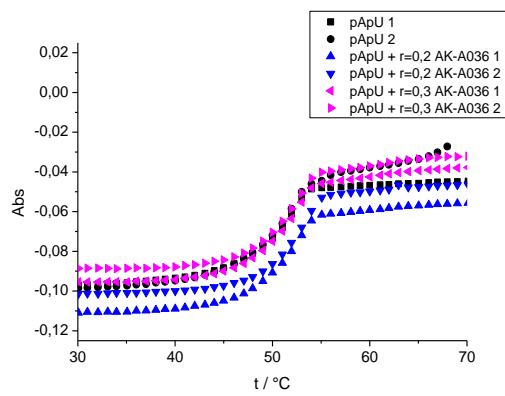
AK-A036



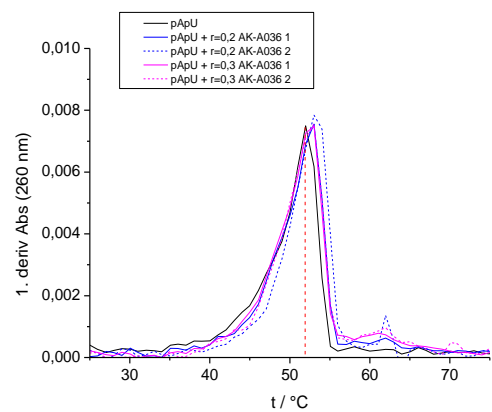
a)



b)



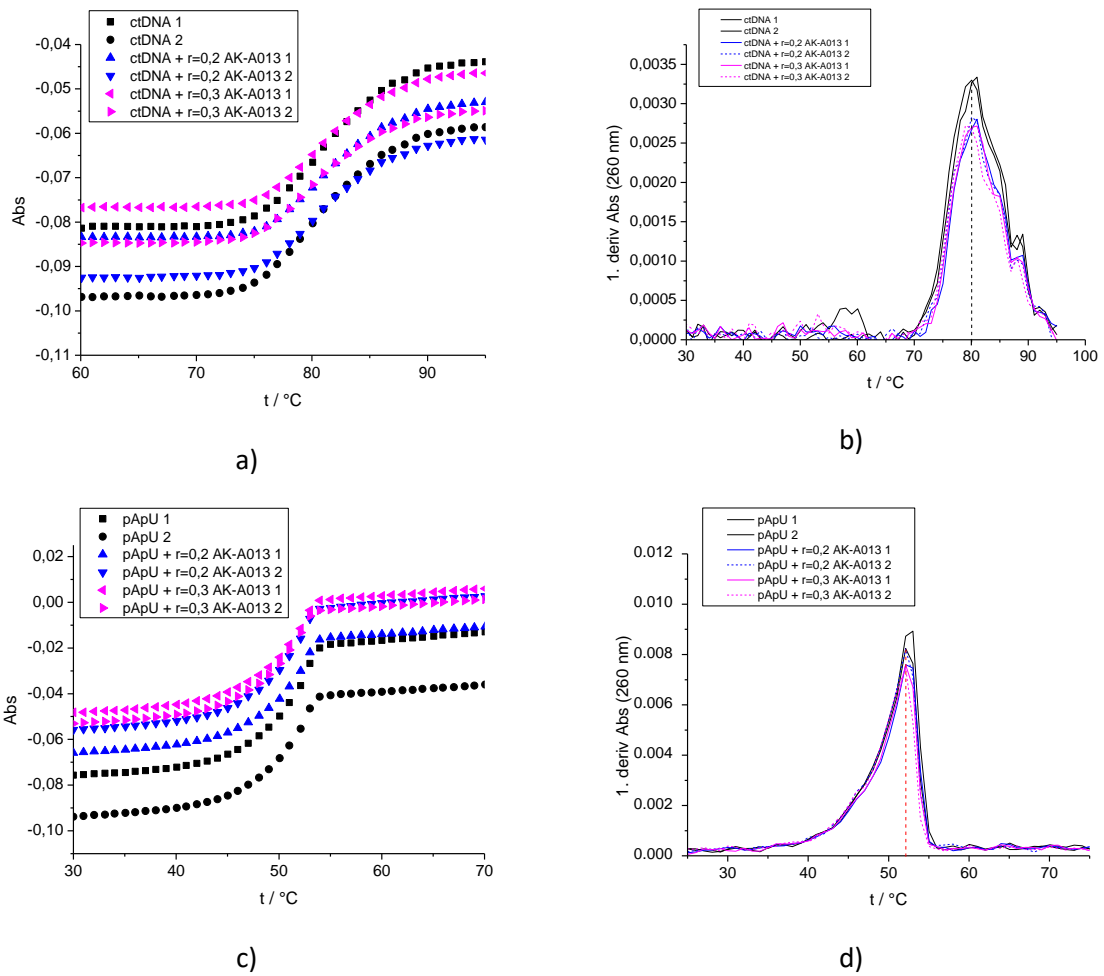
c)



d)

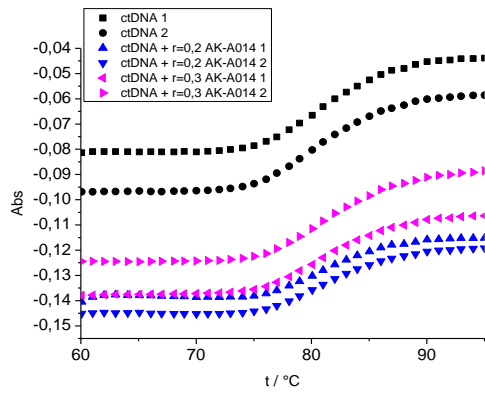
Slika 61. **AK-A036**: a) krivulje termalne denaturacije s ctDNA, b) prve derivacije krivulje termalne denaturacije s ctDNA, c) krivulje termalne denaturacije s pApU, d) prve derivacije krivulje termalne denaturacije s pApU

AK-A013

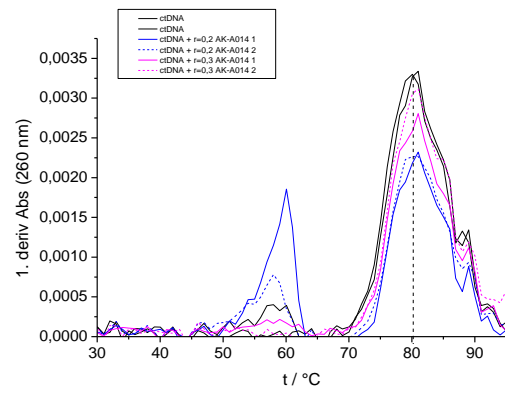


Slika 62. **AK-A013**: a) krivulje termalne denaturacije s ctDNA, b) prve derivacije krivulje termalne denaturacije s ctDNA, c) krivulje termalne denaturacije s pApU, d) prve derivacije krivulje termalne denaturacije s pApU

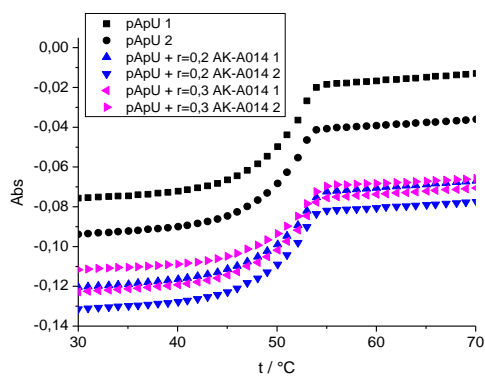
AK-A014



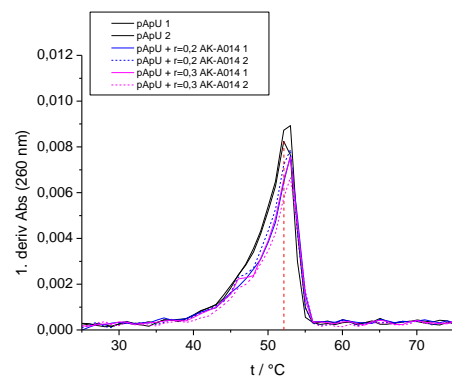
a)



b)



c)

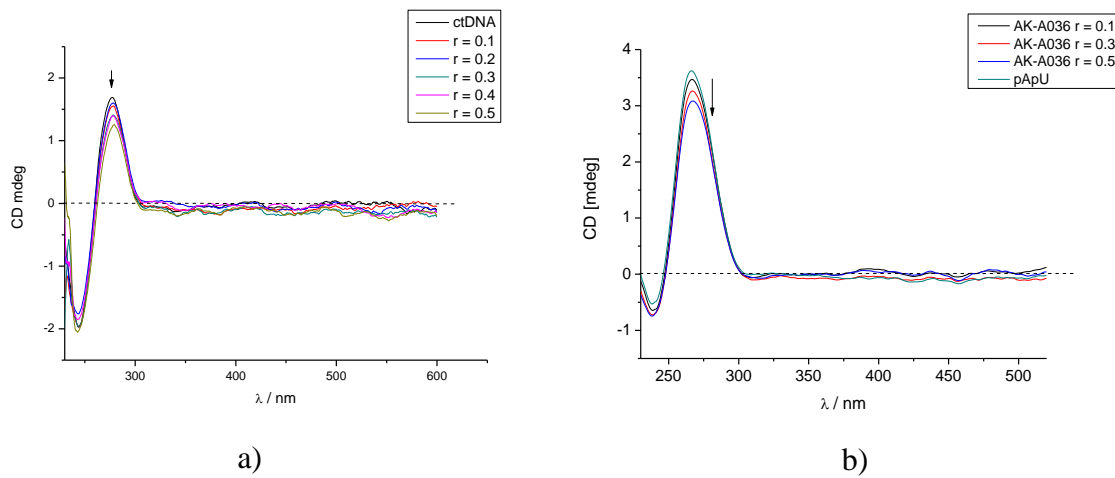


d)

Slika 63. **AK-A014**: a) krivulje termalne denaturacije s ctDNA, b) prve derivacije krivulje termalne denaturacije s ctDNA, c) krivulje termalne denaturacije s pApU, d) prve derivacije krivulje termalne denaturacije s pApU

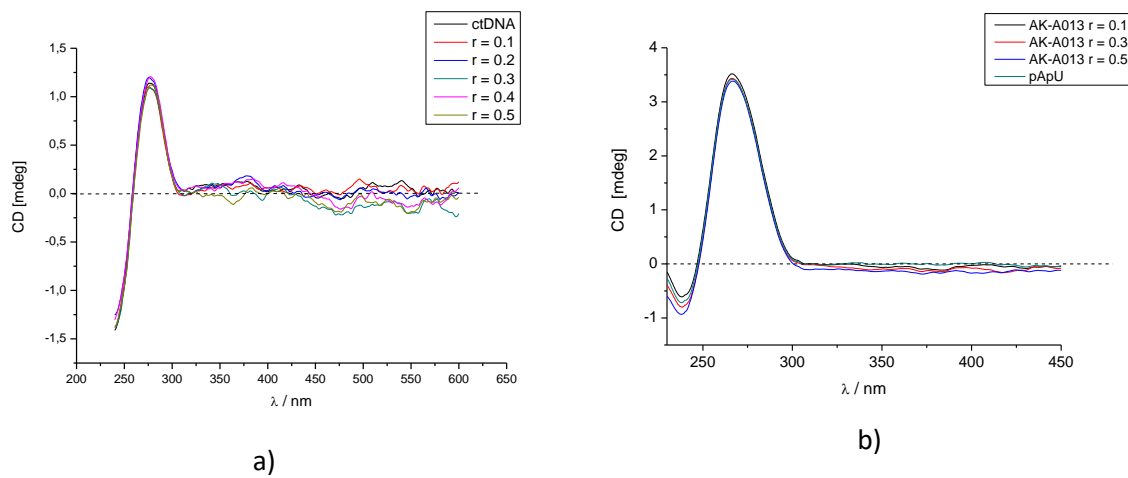
Cirkularni dikroizam

AK-A036



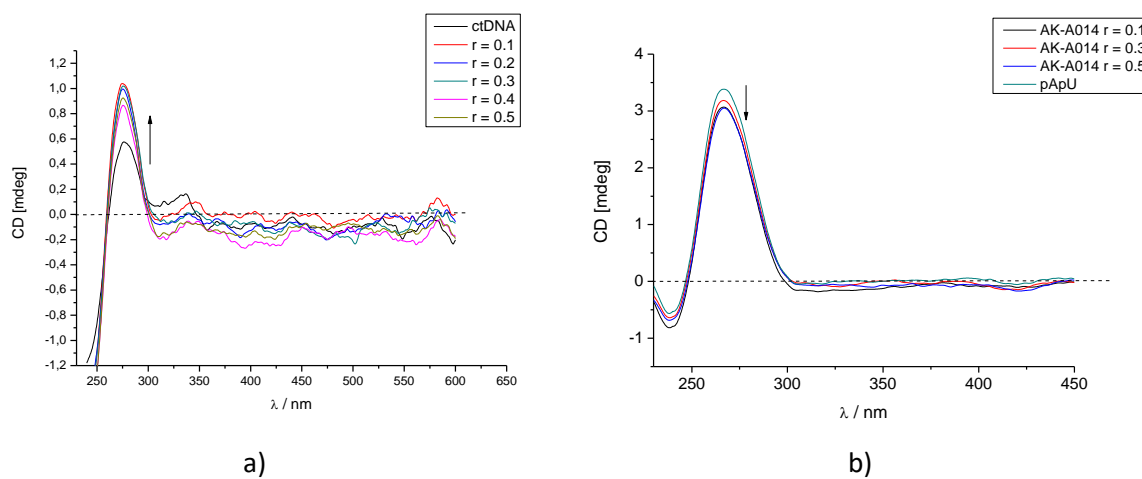
Slika 64. **AK-A036**: a) Ovisnost cirkularnog dikroizma o promjeni omjera spoja AK-A036 i polinukleotida, a) ctDNA, b) pApU

AK-A013



Slika 65. **AK-A013**: a) Ovisnost cirkularnog dikroizma o promjeni omjera spoja AK-A013 i polinukleotida, a) ctDNA, b) pApU

AK-A014



Slika 66. **AK-A014**: a) Ovisnost cirkularnog dikroizma o promjeni omjera spoja AK-A014 i polinukleotida, a) ctDNA, b) pApU