Primjena triarilboranskog sustava u selektivnom prepoznavanju nukleinskih kiselina i fluorescentnom oslikavanju živih stanica

Maslać, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:420801

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Matea Maslać

PRIMJENA TRIARILBORANSKOG SUSTAVA U SELEKTIVNOM PREPOZNAVANJU NUKLEINSKIH KISELINA I FLUORESCENTNOM OSLIKAVANJU ŽIVIH STANICA

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistra(e) kemije

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za biomolekularne interakcije i spektroskopiju, Zavoda za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu pod mentorstvom dr.sc. Ive Crnolatca. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je doc.dr.sc. Jasmina Rokov Plavec.

Zahvale

Veliko hvala mentoru dr. sc. Ivi Crnolatcu na velikoj pomoći, prijateljskom pristupu, uloženom trudu i vremenu te na svim savjetima koje mi je udijelio.

Hvala svim članovima Laboratorija za biomolekularne interakcije i spektroskopiju Zavoda za organsku kemiju i biokemiju IRB-a na pristupačnosti, ugodnoj radnoj atmosferi i suradnji.

Zahvaljujem se profesorici doc. dr. sc. Jasmini Rokov Plavec na razumijevanju, konstruktivnim kritikama i ispravcima rada.

Hvala mojim prijateljima što su uvijek bili tu, hvala na svoj pomoći, savjetima i divnim trenutcima. Učinili ste ovo najljepšim životnim razdobljem.

I na kraju, posebno želim zahvaliti svojoj obitelji, sestri Mihaeli i roditeljima koji su mi omogućili školovanje, pružali mi podršku i bili uz mene cijelo vrijeme.

Sadržaj

SAŽETAK ..... **X**
ABSTRACT ..... **XII**
§ 1. UVOD **14**
§ 2. LITERATURNI PREGLED **15**
2.1. Strukture i svojstva nukleinskih kiselina **15**
2.2. Nekovalentne interakcije malih molekula s polinukleotidima **19**
2.3. Tri-koordinirani borani **20**
2.4. Metode ispitivanja nekovalentnih interakcija malih molekula s polinukleotidima **22**
2.4.1. UV/Vis spektrofotometrija *22*
2.4.2. Promjena temperature mekšanja dvolančanih polinukleotida *23*
2.4.3. Fluorescencijska spektroskopija *25*
2.4.4. Spektropolarimetrija cirkularnog dikroizma *27*
2.4.5. Izotermna titracijska kalorimetrija (ITC) *28*
2.4.6. Biološka ispitivanja *29*
2.4.7. Konfokalna mikroskopija *29*
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO **31**
3.1. Materijali **31**
3.2. UV/Vis spektroskopija **31**
3.2.1. Promjena temperature mekšanja polinukleotida *32*
3.3. Fluorescencijska spektroskopija **33**
3.4. CD spektroskopija **34**
3.5. ITC **34**
3.6. Biološka ispitivanja **35**
3.6.1. Stanične linije *35*
3.6.2. Stanične kulture *35*
3.6.3. Presađivanje stanica *35*
3.6.4. Test proliferacije *36*
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA **39**
4.1. Fizikalno-kemijska svojstva triarilborilnih boja SG224 i SG216 ..... **39**
4.1.1. Fizikalno-kemijska svojstva ispitivanih spojeva u vodenim otopinama *39*
4.1.2. UV/Vis spektri *39*

4.2. Interakcije spoja SG224 s jednolančanim i dvolančanim polinukleotidima u vodenom mediju....40
4.2.1. UV/Vis spektrofotometrijske titracije....40
4.2.2. Fluorescencijska spektrofotometrija....43
4.2.3. Promjena temperature mekšanja dvolančanih polinukleotida....46
4.2.4. CD titracije....48
4.2.5. ITC....52
4.3. Interakcije spoja SG216 s dvolančanim polinukleotidima u vodenom mediju....55
4.3.1. Fluorescencijska spektrofotometrija....55
4.4. Biološka ispitivanja....56
4.4.1. Učinak SG224 na rast stanica....56
§ 5. ZAKLJUČAK....60
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (PREMA POTREBI)....61
§ 7. LITERATURNI IZVORI....63
§ 8. DODATAK....XV
§ 9. ŽIVOTOPIS....XXVI

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

PRIMJENA TRIARILBORANSKOG SUSTAVA U SELEKTIVNOM PREPOZNAVANJU NUKLEINSKIH KISELINA I FLUORESCENTNOM OSLIKAVANJU ŽIVIH STANICA

Matea Maslać

Detekcijske metode se baziraju na fluorescencijskim biljezima koji se koriste za obilježavanje proteina, određenih DNA/RNA sekvenci i sl. Oni se na DNA/RNA sekvence mogu vezati u utor, interkalirati ili ostvarivati elektrostatske interakcije. U ovom istraživanju spektroskopski i kalorimetrijski su okarakterizirane interakcije dva triarilboranska derivata SG224 i SG216 s nizom jednolančanih i dvolančanih polinukleotida. Spoj SG216 se ne veže na polinukleotide. Spoj SG224 se veže na DNA/RNA strukture kombinacijom više različitih načina te nije selektivn prema jednolančanim ili dvolančanim polinukleotidima ni prema DNA ili RNA uzvojnicama. Istovremeno s procesom vezanja odvija se i neki drugi proces, vjerojatno agregacija spoja, te se zbog toga ne može preciznije odrediti način vezanja. Pretpostavlja se da je vezanje u utor najznačajniji način vezanja, što potvrđuje i činjenica da SG224 ne pokazuje afinitet k vezanju $p(dGdC)_2$ niza, čiji je utor sterički blokiran. Spoj se može koristiti kao spektropolarimetrijski biljeg za pdA sekvence, jer se prilikom vezanja spoja na pdA sekvence inducira jaki CD signal na 402 nm. Spoj nema značajan antiproliferativan učinak.

(47 stranica, 26 slika, 13 tablica, 34 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

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

Ključne riječi: biljeg za pdA sekvence, fluorimetrijski biljeg,SG216, SG224, triarilborani;

Mentor: dr. sc. Ivo Crnolatac, zn. sur. IRB
Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Ocjenitelji:
1. doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec
2. izv. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
3. izv. prof. dr. sc. Ines Primožić

Zamjena: doc. dr. sc. Morana Dulić

Datum diplomskog ispita: 20. veljače 2019.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

APPLICATION OF TRIARYLBORANE SYSTEM IN SELECTIVE READOUT OF NUCLEIC ACIDS AND LIVE CELL FLUORESCENCE IMAGING

Matea Maslać

Detection methods are based on fluorescence markers which are used for marking proteins, certain DNA/RNA sequences etc. They bind into the groove, intercalate or achive electrostatic interactions with DNA/RNA sequences. In this research we spectroscopically and calorimaterically characterize interactions between two three-aryl-borane derivatives SG224 and SG216 with series of single - and double-stranded polynucleotides. Compound SG216 does not bind to the polynucleotides. Compound SG224 binds to DNA/RNA structures in several different patterns. However, it´s not selective for neither single- nor double-stranded polynucleotides or to DNA/RNA helixes. Simultaneously with the binding process, another process also occurs – most likely aggregation of the compound. Therefore the binding method cannot be precisely defined. It´s however assumed that binding into the groove is most likely as it was confirmed by the fact SG224 does not show affinity to bind p(dGdC)2 string, whose groove is sterically blocked. Compound can be used as spectro-polarimetric marker for pdA sequences, due to big CD signal on 402 nm that is induced when SG224 binds pdA sequences. The compound does not have significant antiproliferative effect.

(47 pages, 26 figures, 13 tables, 34 references, original in Croatian language)

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

Keywords: marker for pdA sequence, fluorescence marker, SG216, SG224, three-aryl-borane;

Mentor: Dr. Ivo Crnolatac, Research Associate IRB
Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Jasmina Rokov Plavec
Reviewers:
1. Dr. Jasmina Rokov Plavec, Associate Professor
2. Dr. Iva Juranović Cindrić, Associate Professor
3. Dr. Ines Primožić, Associate Professor
Substitute: Dr. Morana Dulić, Associate Professor
Date of exam: 20th February 2019.

§ 1. UVOD

Detekcijske metode u molekularnoj i staničnoj biologiji uglavnom se baziraju na fluorescencijskim biljezima koji se koriste za obilježavanje proteina, staničnih organela, određenih DNA/RNA sekvenci i sl.[1] Fluorescencijska detekcija koristi se u velikom broju medicinskih istraživanja i DNA analiza. Tri su glavna načina nekovalentnog vezanja malih molekula, potencijalnih fluorescencijskih biljega na DNA/RNA, to su vezanje u utor, interkaliranje i elektrostatska interakcija pozitivno nabijenih molekula sa šećerno-fosfatnom okosnicom polinukleotidnog lanca.[2] Specifičnost vezanja malih molekula na DNA/RNA molekule omogućavaju, u prvom redu, slijed nukleotida, a zatim i strukturne razlike između malih utora kod DNA/RNA molekula, tj. dubina i širina utora te steričke smetnje.[3]

Borovi kompleksi dipirometena (BODIPY©) su poznati fluorofori koji se koriste za obilježavanje kovalentnim vezivanjem na različite biomakromolekule. Kompleksi koji će se u sklopu ovog diplomskog obrađivati su triarilborani, i još su neistraženi za primjenu u nekovalentnom flourescentnom obilježavanju biomakromolekula. U okviru ovog diplomskog rada istražiti će se i spektroskopski okarakterizirati dva takva novosintetizirana derivata kojima su dana trivijalna imena SG224, odnosno SG216. Sinteza i karakterizacija ovih spojeva bit će objavljena u znanstvenom radu koji je trenutno u pripravi.

Postoji velik broj metoda koje se koriste u istraživanju interakcija malih molekula s polinukleotidima.[4] Budući da se fluorescencijski biljezi primjenjuju u *in vitro/in vivo* eksperimentima ili dijagnostici, mjerodavnije su metode proučavanja interakcija u otopinama koje nalikuju fiziološkim uvjetima. Stoga će se u radu koristit UV/Vis spektroskopske titracije, studija promjene temperature mekšanja polinukleotida, fluorimetrijske titracije, spektroskopija cirkularnog dikroizma (CD) i izotermalna titracijska kalorimetrija (ITC). Zbog specifičnosti tercijarnih struktura, istraživanja će se provesti u nizu različitih sintetskih polinukleotida, DNA i RNA. Istražit će se utjecaj spojeva na proliferativnost humanih staničnih linija i sposobnost ulaska spojeva u stanicu te tako provjeriti njihova primjenjivost za fluorescencijsko označavanje DNA/RNA i za primjenu u konfokalnoj mikroskopiji.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Strukture i svojstva nukleinskih kiselina

Nukleinske kiseline DNA i RNA dugi su linearni polimeri izgrađeni od povezanih međusobno sličnih podjedinica, nukleotida. Svaki se nukleotid sastoji od tri komponente, šećera, fosfata i jedne od četiriju dušičnih baza.

Šećer u deoksiribonukleinskoj kiselini (DNA) je deoksiriboza, a u ribonukleinskoj kiselini (RNA) riboza. Prefiks deoksi- označava da na 2′-ugljikovom atomu nema kisikovog atoma, koji je tamo vezan u ribozi. Šećeri su međusobno povezani fosfodiesterskim mostovima, 3′-hidroksilna skupina jednog nukleotida esterificirana je fosfatnom skupinom, koja je vezana na 5′-hidroksilnu skupinu susjednog šećera. Niz šećera povezanih fosfodiesterskim mostovima čini okosnicu nukleinske kiseline koja ima strukturnu ulogu, dok redoslijed baza duž lanca nosi genetičku informaciju. Okosnica je nepromjenjiva duž lanca, a baze se mijenjaju od jednog do drugog monomera. Dvije baze u DNA derivati su purina - adenin (A) i gvanin (G), a dvije pirimidina – citozin (C) i timin (T). Pirimidinska baza timin prisutna je samo u DNA molekuli, dok je u RNA zamijenjena uracilom (U).

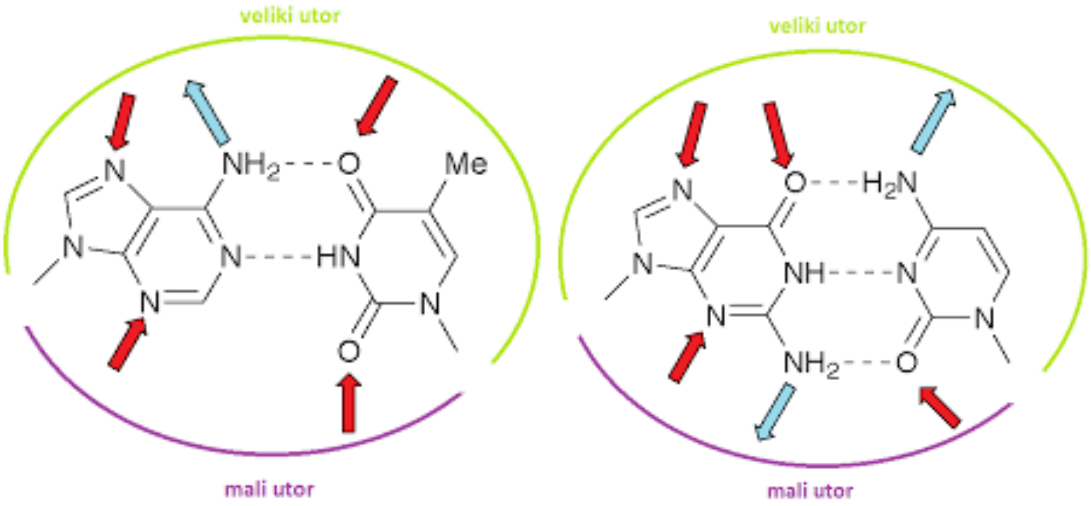
Jedinica koja se sastoji od baze vezane na šećer naziva se nukleozid. N-9 purina ili N-1 pirimidina vezan je na C-1′ šećera. Kada je struktura napisana na standardan način, baza leži izvan ravnine šećera, tj. konfiguracija N-glikozidne veze je β. Nukleotid je nukleozid povezan esterskom vezom s jednom ili vise fosfatnih skupina. Fosfatna skupina se veže na hidroksilnu skupinu na položaju C-5 šećera.

Lanac DNA ima svoj smjer. Jedan kraj lanca ima slobodnu 5′-OH skupinu, ili je na nju vezana fosfatna skupina, dok drugi kraj ima slobodnu 3′-OH skupinu, ni jedan od tih krajeva nije vezan na neki nukleotid. Po dogovoru redoslijed baza piše se u smjeru 5′ prema 3′.

Molekula DNA ima oblik desne dvostruke uzvojnice koju čine dva polinukleotidna isprepletena lanca, koji teku u suprotnim smjerovima i zamotani su oko zajedničke osi. Šećerno-fosfatne okosnice nalaze se na vanjskoj strani uzvojnice, a purinske i pirimidinske baze u unutrašnjosti. Ključna je značajka takve strukture stvaranje specifičnih parova baza (pb) povezanih vodikovim vezama. Adenin se povezuje s timinom s dvije, a citozin s gvaninom s tri vodikove veze. Vodikove veze su mnogo slabije od kovalentnih veza, ali su dovoljno jake da stabiliziraju dvostruku uzvojnicu. Dvostruku uzvojnicu stabilizira i hidrofobni efekt. Hidrofobne baze okupljaju se u unutrašnjosti uzvojnice, što dalje od okolne

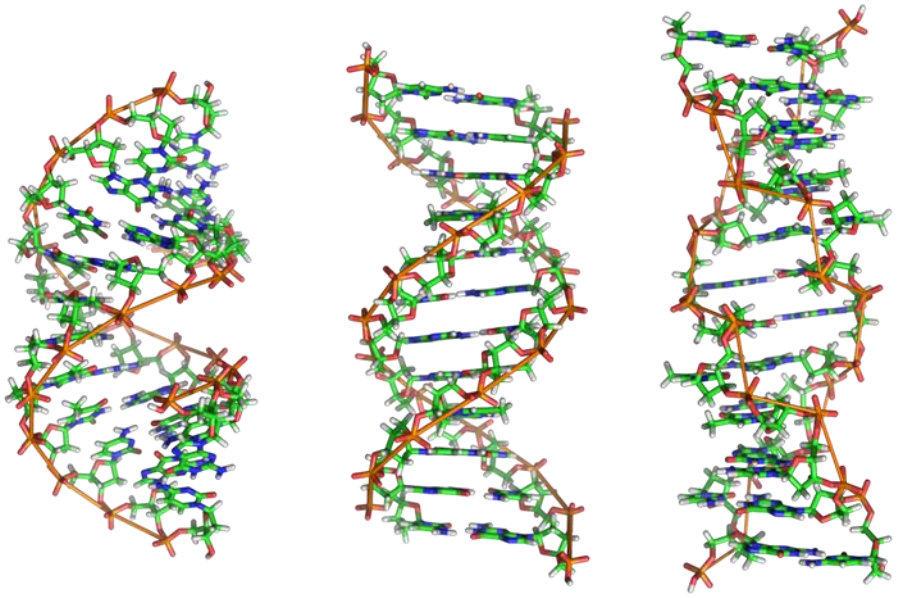
vode, dok su polarnije skupine izložene vodi. Zbog hidrofobnog efekta baze se slažu jedna na drugu, pa se među njima javljaju π–π interakcije slaganja i Van der Waalsove sile koje dodatno stabiliziraju uzvojnicu. Zbog sparivanja baza, slijed baza duž jednog lanca u potpunosti određuje slijed baza u drugom lancu, tj. oni su komplementarni.

Dvostruke uzvojnice molekula nukleinskih kiselina sadržavaju dva utora, koji se nazivaju mali i veliki utor. Utori se stvaraju jer glikozidne veze u jednom baznom paru nisu potpuno nasuprot jedna drugoj. Mali utor sadržava pirimidinski O-2 i purinski N-3 baznog para, a veliki je utor na suprotnoj strani para (slika 1.). Osim veličine utori se razlikuju po proton-donorima i proton-akceptorima koje posjeduju, a koji sudjeluju u specifičnim interakcijama s molekulama koje se vežu u utore nukleinske kiseline.[5]



Slika 1. Strane velikog i malog utora adenin-timin i gvanin-citozin parova baza.[6]

Rendgenskim istraživanjima potvrđeno je da postoje različiti oblici DNA koji se međusobno razlikuju u svojoj strukturi. Najpoznatiji među njima su A-DNA, B-DNA i Z-DNA (slika 2.).



Slika 2. Strukture redom A-DNA, B-DNA i Z-DNA.[7]

Model Watsona i Cricka, poznatiji kao B-DNA-uzvojnica je najučestaliji oblik u kojem se DNA nalazi u živim bićima. On se temelji na obrascima raspršenja rendgenskih zraka na jako hidratiziranim nitima DNA. B-DNA je dvostruka uzvojnica u kojoj su baze gotovo okomite na os uzvojnice, a međusobno su razmaknute 3,4 Å. Struktura se ponavlja svaka 34 Å, pa se u svakom okretu nalazi 10 parova baza. Postoji rotacija od 36˚ po parovima baza. Promjer uzvojnice je 20 Å. U B-DNA veliki utor je širok i dubok, a mali utor uzak i dubok.

Studij raspršenja rendgenskih zraka na manje hidratiziranim vlaknima DNA pokazali su drugačiji oblik DNA koji je nazvan A-DNA. A-DNA je kao i B-DNA desna uzvojnica i dvolančanu uzvojnicu čine antiparalelni lanci povezani Watson-Crickovim sparivanjem baza. Međutim A-DNA je šira i kraća od B-uzvojnice, a njezini parovi baza su nagnuti, a ne okomiti na os uzvojnice. Veliki utor je uzak i vrlo dubok, a mali jako širok i plitak. Osim dehidratiziranih DNA, oblik A-uzvojnice imaju i dvolančane regije RNA koje zbog steričke napetosti između kisika na 2′- položaju i fosfatne skupine ne mogu stvarati klasičnu B-uzvojnicu.

Z-DNA je lijeva dvostruka uzvojnica s antiparalelnim lancima, u kojoj su fosfati okosnice u cik-cak liniji. Oblik Z-DNA uzvojnice poprimaju kratki oligonukleotidi u čijem se slijedu izmjenjuju purinski i pirimidinski nukleotidi. Za smanjenje elektrostatskih odbijanja između fosfata okosnice, koji su bliže jedan drugom nego u A-DNA i B-DNA, potrebna je velika

koncentracija soli. Veliki utor je plošan,a mali veoma uzak i dubok. U tablici 1. prikazani su neki od strukturnih parametara triju strukturnih oblika DNA. [5]

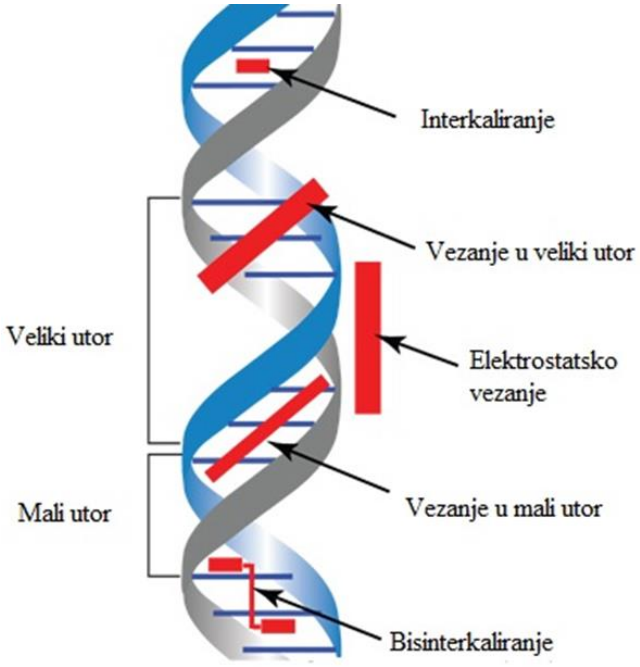
Tablica 1. Usporedba A-DNA, B-DNA i Z-DNA[5]

	TIP UZVOJNICE		
	A	B	Z
Oblik	najšira	srednja	najuža
Uspon između baznih parova	2,3 Å	3,4 Å	3,8 Å
Promjer uzvojnice	25,5 Å	23,7 Å	18,4 Å
Smjer navoja	desni	desni	lijevi
Glikozidna veza	*anti*	*anti*	*anti* i *syn*
Broj baznih parova po navoju	11	10,4	12
Visina navoja	25,3 Å	35,4 Å	45,6 Å
Nagib baznog para prema osi	19˚	1˚	9˚
Veliki utor	uzak, vrlo dubok	širok, prilično dubok	plošan
Mali utor	veoma širok, plitak	uzak, prilično dubok	veoma uzak, dubok

U istraživanju se koriste prirodni i sintetski polinukleotidi. Od prirodnih je korištena DNA izolirana iz teleće prsne žlijezde (eng. *calf thymus*, *ct*DNA) čiji redoslijed nukleotida nije detaljno poznat, ali sadrži 40% GC parova i 60% AT parova baza. Od sintetskih polinukleotida korišteni su alternirajući polinukleotidi osnovne strukture poli XY-poli XY (p(dAdT-dAdT), p(dGdC-dGdC)), homopolinukleotidi osnovne strukture poli X- poli Y (pApU) te jednolančani polinukleotidi poli X (A, G, C, U, dA i dT). Svaki od polinukleotida, osim pApU, ima oblik B-uzvojnice, ali su geometrije utora različite pa je različit i način vezanja malih molekula. pApU je dvolančana RNA koja ima oblik A-uzvojnice. Jednolančani polinukleotidi pogodni su za istraživanje osnovnog tipa interakcija spoja s određenim tipom baze, s puno manjim steričkim, elektrostatskim i hidrofobnim utjecanjem nego što je kod dvolančanih analoga.[4]

2.2. Nekovalentne interakcije malih molekula s polinukleotidima

Najzastupljeniji načini nekovalentnog vezanja malih molekula na polinukleotide su vezanje u utor, interkaliranje između parova baza i elektrostatske interakcije između pozitivno nabijene male molekule i negativno nabijenih fosfata polinukleotidne okosnice (slika 3).[4]

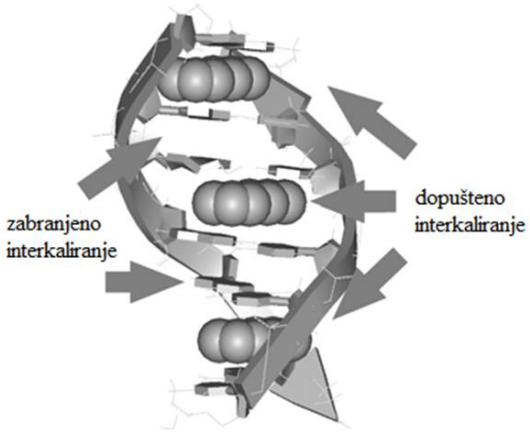


Slika 3. Shematski prikaz nekovalentnih interakcija malih molekula s polinukleotidima.[8]

Većina spojeva pokazuje selektivnost prema malom utoru dvolančane molekule DNA u odnosu na dvolančanu RNA. Mali utor RNA je bitno širi i plići te ne odgovara obliku i veličini molekula koje se vežu u utore, pa se, kada je RNA u pitanju, molekule vežu u veliki utor. Utor dvostruke uzvojnice ima konkavni oblik pa su molekule koje se vežu u njega polumjesečastog, konveksnog oblika. Specifičnost vezanja malih molekula za polinukleotide, osim strukturnih razlika između utora DNA i RNA, omogućavaju i nukleotidni sljedovi. Sljedovi bogati AT parovima baza pogodniji su za vezanje malih molekula, zbog toga što amino-skupina gvanina, kod GC parova baza, sterički ometa pristup u manji utor. Stoga kod sljedova bogatih GC parovima baza prevladava drugi način vezanja, interkaliranje.

Interkaliranje je umetanje planarnih aromatskih sustava između parova baza DNA. Nastajanje interkalativnih kompleksa stabilizira i ukrućuje polinukleotidni lanac, dovodi do produljenja uzvojnice, njenog odvijanja i deformacije. Interkaliranje se odvija po principu

„isključenja susjeda“, nakon umetanja jedne molekule između dva para baza onemogućava se umetanje druge između susjednog para (slika 4). Kompleks interkalatora i susjednih baza stabiliziran je π – π interakcijama između aromatskih površina interkalatora i dušičnih baza. Pri stvaraju kompleksa javljaju se i vodikove veze, Londonova disperzijska međudjelovanja i elektrostatske interakcije između polinukelotida i heterocikličkih atoma molekule, koje mogu stabilizirali, ali i destabilizirati kompleks. Upravo su te interakcije uzrok selektivnosti pojedinog interkalatora prema određenom tipu polinukleotida.[4]



Slika 4. Princip „isključenja susjeda“[4]

Elektrostatsko vezanje karakterizira direktna ovisnost afiniteta o broju pozitivnih naboja male molekule koji su u interakciji s negativno nabijenim fosfatnim skupinama nukleinskih kiselina. Takvi spojevi pokazuju malu ili nikakvu selektivnost vezanja s obzirom na slijed nukleotida u polinukleotidu. Molekule koje vrlo lako ostvaruju elektrostatske interakcije s polinukelotidima su alifatski poliamini, male molekule koje su u fiziološkim uvjetima pozitivno nabijene.[4]

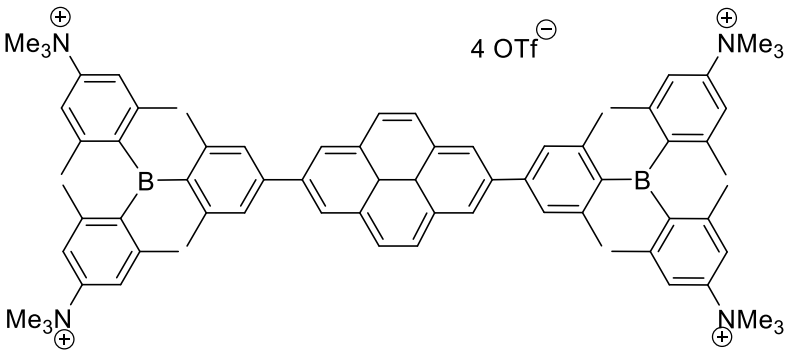
2.3. Tri-koordinirani borani

Tri-koordinirani borani su trigonske planarne geometrije, spadaju u Lewisove kiseline i imaju praznu p_z orbitalu, što ih čini snažnim elektron akceptorima kada su vezani na konjugirane π-sustave. Podložni su nukleofilnom napadu, čiji je rezulatat ili pucanje veze ili formacija četiri koordiniranih borana, u kojima bor nije više elektron-deficijentan. Da bi se spriječio napad

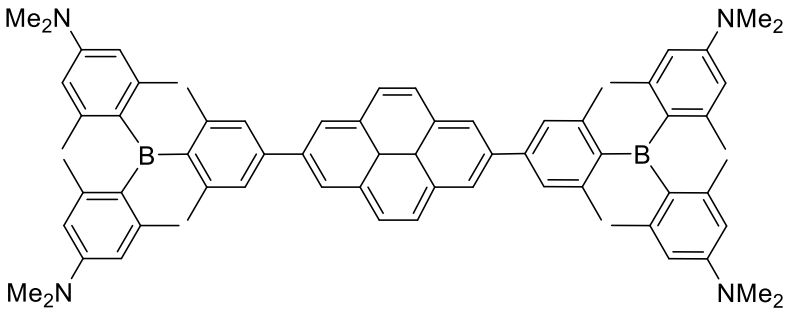
nukleofila, npr. vode, uvode se veliki supstituenti na bor koji sterički onemogućuju pristup nukleofila boru, ili se bor ugrađuje u rigidne planarne strukture.

Triarilborani su jako dobri kromofori, tokom njihove eksitacije dolazi do apsorpcije dva fotona svijetlosti, i dolazi do velike promjene u dipolnom momentu. Zbog toga su dobri kandidati za *two-photon excited flourescence* (TPEF) mikroskopiju živih stanica i tkiva. Problem je što oni nisu topljivi u vodi pa je otežana njihova primjena u *in vivo* i *in vitro* eksperimentima. Dodatni problem je što dolazi do agregacije spojeva koja otežava praćenje procesa vezanja.[23]

SG216 sastoji se od dva bis[4-(N,N-dimetilamino)-2,6-dimetilfenil]-2,6-dimetilfenilborana međusobno povezana pirenskim mostom. SG224 ima po jednu metilnu skupinu više na svakom dušiku pa je on pozitivno nabijen (slika 5.). Kvaternizirajući dušike na SG224 povećana je njegova topljivost u vodi, iako ona i dalje nije velika. Sinteza i karakterizacija ovih spojeva bit će objavljena u znanstvenom radu koji je trenutno u pripravi.



a)



b)

Slika 5. a) Struktura spoja SG224; b) Struktura spoja SG216

2.4. Metode ispitivanja nekovalentnih interakcija malih molekula s polinukleotidima

Za istraživanje interakcija malih molekula s polinukleotidima koristi se čitav niz metoda. Najčešće se primjenjuju metode optičke spektroskopije (apsorpcijska i fluorescencijska spektroskopija, spektroskopija linearnog i cirkularnog dikroizma), spektoskopija masa, spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije, metode vibracijske spektroskopije (infracrvena i Ramanova spektroskopija), kalorimetrija, viskozimetrija, difrakcija kristala x-zrakama, gel elektroforeza i mnoge druge.[4]

Vezanje malih molekula na polinukleotide često uzrokuje bitne promjene u njihovim spektroskopskim svojstvima koje mogu pružiti niz korisnih informacija. Budući da se fluorescencijski biljezi primjenjuju u *in vitro/in vivo* eksperimentima ili dijagnostici, mjerodavnije su metode proučavanja interakcija u otopinama koje nalikuju fiziološkim uvjetima. U daljem tekstu detaljnije su opisane metode korištene u ovom radu.

2.4.1. UV/Vis spektrofotometrija

Ultraljubičasta i vidljiva apsorpcijska spektroskopija temelji se na apsorpciji zračenja ultraljubičastog (*ultraviolet*, UV; 200-380 nm) i vidljivog (*visible*, VIS; 380-800 nm) dijela spektra. Apsorpcijom upadnog UV ili Vis zračenja pobuđuju se prijelazi između elektronskih stanja u molekuli, intenzitet propuštenog zračenja slabi i nastaju apsorpcijski spektri. Da bi došlo do apsorpcije mora biti zadovoljen Bohrov uvjet, tj. razlika u energiji između osnovnog i pobuđenog stanja mora odgovarati energiji apsorbiranog fotona. Funkcionalna skupina odgovorna za apsorpciju zračenja naziva se kromofor, najčešći kromofori su dvostruke i trostruke veze, konjugirani sustav i fenilni prstenovi. Valna duljina pri kojoj molekula apsorbira ovisi o jakosti kojom su vezani njezini podijeljeni i nepodijeljeni elektronski parovi.

Količinu apsorbiranog zračenja opisuje apsorbancija, *A*, koja je u odnosu sa transmitancijom, *T*, prema izrazu

$$A = - \log T = \log (I_0 / I) \qquad (1)$$

gdje je I_0 intenzitet upadnog zračenja, a I intenzitet propuštenog. Apsorpcija zračenja slijedi Beer-Lambertov zakon:

$$A = a \cdot b \cdot c \qquad (2)$$

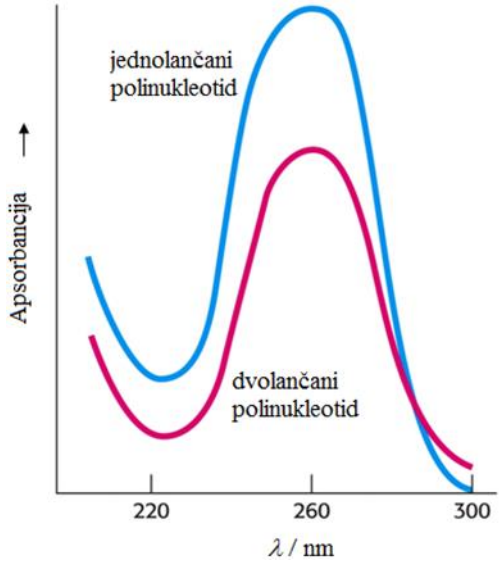
prema kojem je količina apsorbiranog zračenja proporcionalna koncentraciji spektralno aktivne vrste, *c*, i duljini puta zračenja, *b*, uz konstantu proporcionalnosti koja se zove apsorptivnost ili apsorpcijski koeficijent, *a*. Kada je koncentracija tvari izražena u mol L^{-1},

konstanta nosi naziv molarni apsorpcijski koeficijent, ε. Vrijednost molarnog apsorpcijskog koeficijenta karakteristična je za svaku spektralno aktivnu vrstu, a ovisi o valnoj duljini zračenja i izražava se u mol^{-1} dm^3 cm^{-1}. Titracijom spojeva koji sadrže kromofore s polinukleotidima, u spektru ispitivanih spojeva uočavaju se promjene. Moguće je uočiti hiperkromni ili hipokromni efekt u intenzitetu apsorbancije te batokromni pomak apsorpcijskog maksimuma prema većim valnim duljinama, odnosno hipsokromni pomak prema manjim. Ako se u spektru prilikom titracije spoja polinukleotidom javi izosbestična točka, to je valna duljina, frekvencija ili valni broj pri kojem je apsorbancija uzorka konstantna tijekom kemijske reakcije,[32] to znači da nastaje jedan tip kompleksa spoj-polinukleotid.[9, 19]

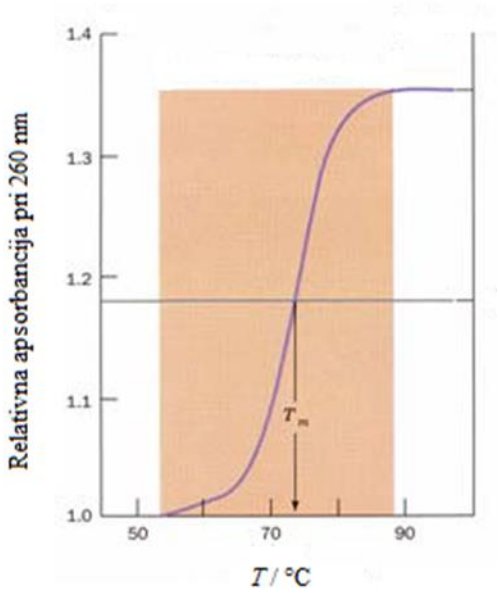
2.4.2. Promjena temperature mekšanja dvolančanih polinukleotida

Uređena sekundarna struktura DNA može se narušiti promjenom parametara sustava, poput temperature, ionske jakosti, vrijednosti pH i općenito uvođenjem novih komponenti u sustav. Tada se kidaju vodikove veze između parova baza i odvajaju se lanci DNA. Taj se proces naziva denaturacija.

Denaturacijom molekule DNA mijenja se njezina apsorpcija, stoga je UV/Vis spektroskopija pogodan način za praćenje procesa denaturacije. U ultraljubičastom području spektra apsorbiraju dušične baze, maksimum im je pri 260 nm. Njihova apsorpcija ovisi o okruženju u kojem se nalaze, pri denaturaciji baze iz gusto složene strukture postaju razmjerno pokretne i apsorpcija im poraste za oko 40% na svim valnim duljinama u ultraljubičastom dijelu spektra. Taj učinak denaturacije na apsorpcijski spektar zove se hiperkromizam (slika 6). Mjerenjem apsorpcije u ovisnosti o temperaturi dobije se krivulja denaturacije DNA (slika 7). Temperaturu u središnjoj točki krivulje nazivamo temperatura mekšanja, *Tm*. To je temperatura pri kojoj je 50% strukture denaturirano i daje informaciju o stabilnosti zavojnice. Budući da su GC parovi baza stabilizirani trima vodikovim vezama, a AT, tj. AU parovi dvjema, GC parovi baza su stabilniji i denaturacija se događa pri višim temperaturama.[5,10]



Slika 6. Hiperkromni efekt prilikom denaturacije polinukleotida.[5]



Slika 7. Krivulja denaturacije polinukleotida. Prikazana je relativna apsorbancija na 260 nm u ovisnosti o temperaturi.[5]

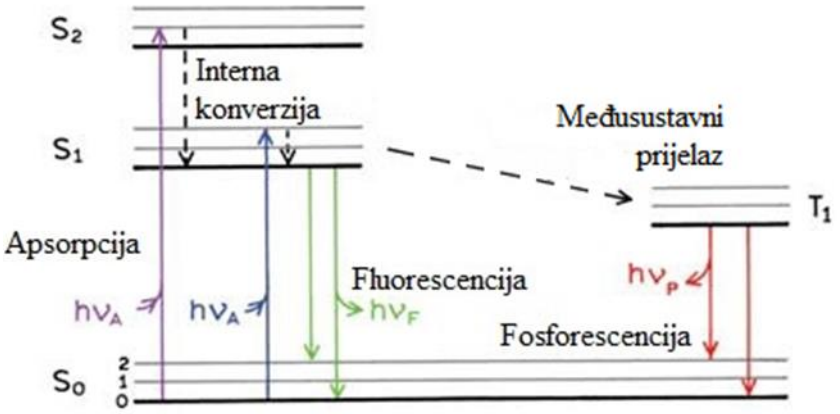
Bilo koja molekula koja može stvoriti neki tip interakcije (elektrostatske, aromatske interakcije, vodikove veze itd.) s funkcionalnim skupinama baza u DNA može doprinjeti denaturaciji zavojnice, tj. nekovalentim vezanjem malih molekula na DNA dolazi do promjene vrijednosti *Tm*. Ako je razlika između temperature mekšanja kompleksa polinukleotida s malom molekulom i čistog polinukleotida (ΔTm) pozitivna vrijednost,

prilikom vezanja male molekule na polinukleotid dolazi do njegove termičke stabilizacije. I obratno, ako je razlika Δ*Tm* negativna dolazi do termičke destabilizacije polinukleotida. Interkaliranjem dolazi do stabilizacije uzvojnice i dobivaju se pozitivne Δ*Tm* vrijednosti, a vezanje spojeva u utore DNA/RNA može stabilizirati ili destabilizirati uzvojnicu, tj. dati pozitivne ili negativne Δ*Tm* vrijednosti.

Ovom metodom može se istodobno ispitivati utjecaj vezanja jednog spoja na stabilizaciju dvostruke uzvojnice više različitih polinukleotida.[4]

2.4.3. Fluorescencijska spektroskopija

Fluorescencijska spektroskopija je metoda molekulske spektroskopije koja se temelji na emisiji zračenja ultraljubičastog i vidljivg dijela spektra. Nakon pobude molekule UV ili Vis zračenjem u više elektronsko stanje, molekula se procesima otpuštanja energije vraća u osnovno elektronsko stanje. Molekula u osnovno stanje može prijeći radijativnim (s emisijom zračenja) ili neradijativnim procesima (bez emisije zračenja). Od neradijativnih procesa moguć je prijelaz među stanjima istog multipliciteta kojeg nazivamo nutarnjom pretvorbom (eng. *internal conversion*, IC) i prijelaz među stanjima različitog multipliciteta kojeg nazivamo međususstavno križanje (eng. *inersystem crossing*, ISC). Dvije najvažnije vrste radijativnih procesa su fluorescencija i fosforescencija, koja će se od tih emisija događati ovisi o prirodi pobuđenih stanja i prijelazima među njima. Fluorescencija je proces u kojem se molekula iz prvog pobuđenog singletnog stanja emisijom fotona vraća u osnovno elektronsko stanje, a fosforescencija proces u kojem se molekula iz tripletnog stanja emisijom vraća u osnovno. Učestalost nutarnje pretvorbe razlog je što se fluorescencija javlja pri samo jednoj valnoj duljini, neovisno o valnoj duljini pobude. Fosforescencija je emisija veće valne duljine nego fluorescencija jer je tripletno stanje uvijek niže energije nego singletno, uz to prijelaz između različitih multipliciteta je zabranjen pa je fosforescencija za nekoliko redova veličine sporija. Procesi koji je odvijaju između apsorpcije i emisije svjetlosti najbolje se prikazuju pomoću dijagrama Jablonskog (slika 8).[11,12]



Slika 8. Dijagram Jablonskog. Radijativni prijelazi su prikazani punim strelicama, a neradijativni isprekidanim (S_0-osnovno singletno stanje, S_1 i S_2- pobuđena stanja istog multipliciteta, T_1- najniže tripletno stanje).[24]

Energija fluorescencijskog prijelaza je manja od apsorbirane energije jer se dio energije gubi vibracijskom relaksacijom, pa je valna duljina emitiranog zračenja pomaknuta prema većim valnim duljinama u usporedbi s valnom duljinom zračenja koja uzrokuje pobuđivanje. To nazivamo Stokesov pomak.

Fluorescencija se obično javlja kod aromatskih molekula. Najznačajnije karakteristike fluorofora su kvantno iskorištenje (Φ) i vrijeme života probuđenog stanja. Kvantno iskorištenje je omjer broja molekula koje fluoresciraju i ukupnog broja pobuđenih molekula. Vrijednosti kvantnog iskorištenja su od 0 do 1, a na njega utječu otapalo, temperatura, polarnost i prisutnost tvari koje gase fluorescenciju. Vrijeme života pobuđenog stanja je prosječno vrijeme koje fluorofor provede u pobuđenom stanju.[13]

Pri definiranim valnim duljinama pobude i emisije intenzitet emitiranog zračenja, I_f, proporcionalan je koncentraciji, c, prema izrazu

$$I_f = k \cdot c \qquad (3)$$

U kojem je k konstanta proporcionalnosti za odgovarajuću fluorescentnu vrstu i mjerni sustav. S obzirom da intenzitet fluorescencije ovisi o snazi pobudnog zračenja i jačini detektorskog signala, fluorescencijska spektroskopija osjetljivija je metoda od apsorpcijske spektroskopije te omogućava određivanje analita pri vrlo niskom koncentracijama (10^{-8} mol dm^{-3}).[12]

2.4.4. Spektropolarimetrija cirkularnog dikroizma

Kiralni spojevi, i njihove otopine, zakreću ravninu polarizirane svjetlosti. Veličina zakretanja ovisi o koncentraciji spoja, duljini optičkog puta, otapalu, temperaturi i valnoj duljini svjetlosti. Pri mjerenju specifičnog optičkog zakretanja uzorka (α), obavezno se mora navesti valna duljina pri kojoj je zakretanje mjereno. Obično se kao referentna valna duljina uzima 589 nm, natrijeva D-linija.[14]

Cirkularni dikroizam se temelji na različitoj apsorpciji lijevo i desno kružno polariziranog svjetla, što je posljedica strukture molekula. Molekula ima i različit indeks loma za dva oblika svjetlosti, što rezultira rotacijom ravnine polarizirane svjetlosti, a rotacija je ovisna o valnoj duljini pa tu pojavu zovemo optičkom rotacijskom disperzijom.[21] Spektar cirkularnog dikroizma (CD-spektar) je spektar koji prikazuje ovisnost razlike u apsorpciji lijevo i desno cirkularno polariziranog svjetla o valnoj duljini.[14]

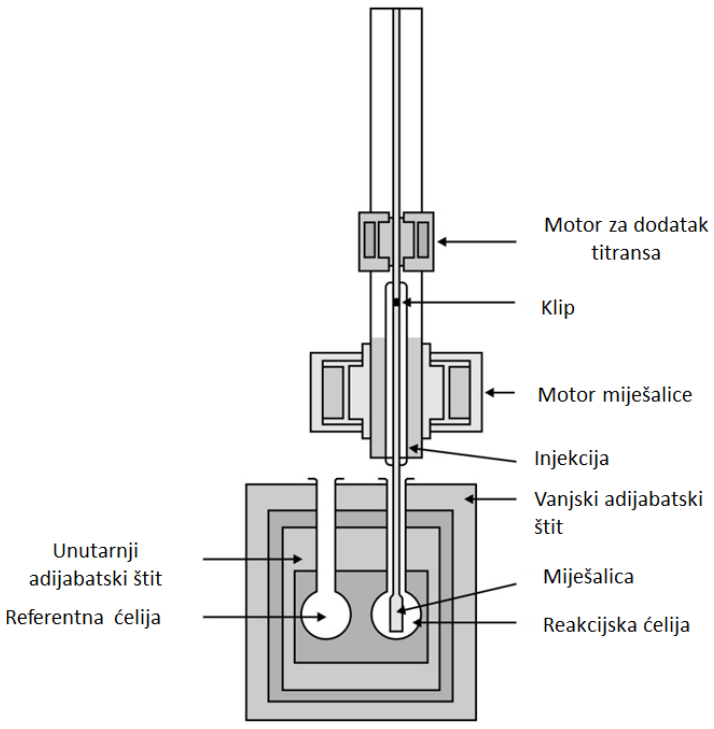
Cirkularno polarizirana svjetlost nastaje kada električni i magnetski vektori zračenja rotiraju oko osi duž koju se šire uz konstantnu magnitudu. Ako vektor električnog polja oscilira u smjeru kazaljke na satu, radi se o desno cirkularno polariziranom svjetlu, a ako oscilira suprotno od smjera kazaljke na satu o lijevo cirkularno polariziranom svjetlu.[21]

Heterocikličke baze nukleinskih kiselina same po sebi nisu kiralne, međutim stvaranjem helikalne sekundarne strukture nukleinske kiseline dobivaju izrazitu komponentu helikalne kiralnosti, te pokazuju CD signal u ultraljubičastom području do 300 nm. Mnoge male molekule koje se vežu na nukleinske kiseline su također akiralne i ne pokazuju CD signal u području u kojem se javlja njihova apsorpcijska vrpca. Vezanjem male akiralne molekule na nukleinsku kiselinu dolazi do sprege električnih prijelaznih momenata nukleinske kiseline i same molekule te nastaje rezultantni prijelazni moment koji je paralelan s vektorom električnog polja cirkularno polarizirane svjetlosti. Javlja se signal induciranog cirkularnog dikroizma (ICD) na valnoj duljini apsorpcije kromofora male molekule i dolazi do promjena u CD spektru nukleinske kiseline, što se pripisuje promjenama u sekundarnoj strukturi nukleinske kiseline pri nastanku kompleksa. Negativan ICD signal, u usporedbi s intenzitetom CD signala DNA/RNA, u većini slučajeva znači da se mala molekula interkalira u nukleinske kiseline. S druge strane, pozitivan predznak ICD signala većinom je znak da se mala molekula veže u utor polinukleotida. ICD signali osjetljivi su na položaj i orijentaciju liganda pa tako će mala molekula vezana u mali utor DNA, koja ima prijelazni moment orijentiran duž utora, imati jaki i pozitivni ICD signal.[25]

CD spektroskopija koristi se za proučavanje optički aktivnih spojeva i njihovih interakcija. Informacije koje CD spektar sadrži mogu se koristiti za identifikaciju kiralnih spojeva i njihove konfiguracije, predviđanje sekundarne strukture proteina i drugih bioloških makromolekula te praćenje procesa vezanja liganada.[13]

2.4.5. Izotermna titracijska kalorimetrija (ITC)

Izotermna titracijska kalorimetrija je kalorimetrijska metoda kod koje se direktno mjeri promjena entalpije prilikom dodatka titransa u titrand tijekom titracije. Na osnovi tih izmjerenih toplina tijekom titracije, moguće je termodinamički okarakterizirati reakciju između titransa i titranda. U reakcijskoj ćeliji nalazi se otopina titranda u koju se u određenim vremenskim intervalima dodaju alikvoti titransa pri čemu se mjeri toplina nakon svakog dodatka. U referentnoj ćeliji nalazi se ReH_2O ili otapalo u kojem su otopljeni reaktanti. Jedan takav instrument shematski je prikazan na slici 9.[15]



Slika 9. Shematski prikaz kalorimetra za ITC.[15]

ITC se često koristi za termodinamičku karakterizaciju reakciju kompleksiranja u otopini. Iz rezultata takvih titracija moguće je odrediti reakcijsku entalpiju kompleksiranja, konstantu ravnoteže vezanja i reakcijsku entropiju.

$$\Delta_r G^\circ = - R \cdot T \cdot \ln K^\circ \quad (4)$$

$$\Delta_r G^\circ = \Delta_r H^\circ - T \cdot \Delta_r S^\circ \quad (5)$$

odnosno

$$\Delta_r S^\circ = (\Delta_r H^\circ - \Delta_r G^\circ) / T \quad (6)$$

Na ITC krivulji površina ispod svakog signala odgovara toplini nakon *i*-tog dodatka, tj. sukcesivnoj promjeni entalpije između *i*-1 i *i*-tog dodatka otopine liganda. Tijekom titracije svakim dodatkom titransa smanjuje se sukcesivna promjena dosega, a time su promjene u toplini sve manje. U području titracije u kojem nema reakcije jedine promjene u toplini uzrokovane su toplinskim efektima razrjeđenja, miješanja i ostalim nereakcijskim učincima. Topline koje odgovaraju razrjeđenju i ostalim nespecifičnim efektima odrede se baždarnom titracijom liganda u puferskoj otopini.

Interpretacija termodinamičkih reakcijskih veličina dobivenih ITC eksperimentom nije uvijek jednostavna. Vrijednosti $\Delta_r G^\circ$, $\Delta_r H^\circ$ i $\Delta_r S^\circ$ nisu vezane isključivo za nastajanje interakcija između reaktanata u otopini, već uključuju i doprinose procesa kao što su konformacijske promjene molekula te desolvataciju reaktanata i solvataciju produkata.[15]

2.4.6. Biološka ispitivanja

In vitro ispitivanjem spojeva na stanicama tumora uzgojenim na hranjivim podlogama mogu se u manje od tjedan dana dobiti okvirni rezultati o djelovanju spoja. U sklopu ovog rada *in vitro* ispitivanjem provjerena je citotoksičnost, tj. anitproliferativni utjecaj ispitivanog spoja na stanice tumora pomoću MTT testa. MTT test je kolorimetrijski test koji detektira aktivnost mitohondrijske dehidrogenaze u živim stanicama. Kada se na stanice nanese MTT spoj (MTT- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-defeniltetrazol bromid)) u mitohondrijima živih stanica dolazi do njegove redukcije i nastaje formazan. To rezultira promjenom boje iz žute u ljubičastu, jer se stvaraju tamnoljubičasti kristalići formazana, koji se otapaju dimetilsulfoksidom. Nastala ljubičasta otopina spektrofotometrijski se kvantificira na čitaču za mikrotitarske pločice pri valnoj duljini od 570 nm. Količina nastalog formazana tj. intenzitet ljubičastog obojenja proporcionalan je broju živućih stanica.[16,17]

2.4.7. Konfokalna mikroskopija

Konfokalna laserska pretražna mikroskopija (eng. *confocal laser scanning microscopy*, CLSM) je metoda svjetlosne mikroskopije pomoću koje je moguće detektirati svjetlost

emitiranu iz vrlo tankog sloja u uzorku. U klasičnoj fluorescencijskoj mikroskopiji, poznatoj i pod nazivom mikroskopija širokog polja, izvor svjetlosti se koristi za istovremeno osvjetljavanje čitavog vidnog polja. A u pretražnoj mikroskopiji osvjetljava se točka po točka, zbog toga nije moguće vidjeti realnu sliku čitavog vidnog polja. Slika se formira tek u memoriji računala, bilježeći intenzitet emitirane svjetlosti točku po točku pomoću odgovarajućeg detektora. Izvori svjetlosti su plinski laseri ili laserske diode. Fokusirana laserska zraka prelazi preko uzorka točku po točku i pobuđuje fluorescente molekule.

Glavna prednost konfokalne mikroskopije, u odnosu na mikroskopiju širokog polja, je selektivnost, tj. mogućnost detekcije svjetlosti iz samo jedne fokalne ravnine te mogućnost detekcije svjetlosti emitirane iz vrlo malog volumena u uzorku. [22]

Konfokalna mikroskopija pruža mogućnost optičkog seciranja, tj. sekvencijalnog snimanja sloj po sloj u smjeru optičke osi mikroskopa. Te optičke sekcije mogu kasnije poslužiti za rekonstrukciju trodimenzionalne raspodjele fluorofora u uzorku. Isto tako moguće je snimati žive uzorke te pratiti lokalizaciju i dinamiku različitih proteina u živim stanicama koje se nalaze u određenom fiziološkom stanju, u tijeku odvijanja određenih procesa ili za vrijeme tretiranja stanica specifičnim agensima. [13]

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

Otapanjem 1,00 mg SG224 u 0,595 mL DMSO-a (dimetil-sulfoksida) i 1,07 mg SG216 u 1,04 mL DMSO-a, pripremljene su radne otopine spojeva koncentracija 10^{-3} mol dm^{-3}. Za potrebe ITC-a pripremljena je 10^{-2} mol dm^{-3} otopina spoja SG224 otapanjem 1,31 mg spoja u 7,8 x 10^{-2} mL DMSO-a.

Kakodilatni pufer (I = 0,05 mol dm^{-3}, pH = 7) pripremljen je miješanjem odgovarajućih volumena vodene otopine natrijevog kakodilata (c = 0,2 mol dm^{-3}) i klorovodične kiseline (c = 0,2 mol dm^{-3}) te razrjeđivanjem do odgovarajućeg volumena i namještanjem pH pomoću pH-metra, titracijom s klorovodičnom kiselinom.

Otopine polinukleotida dobivene su otapanjem polinukleotida u kakodilatnom puferu I = 0,05 mol dm^{-3}, pH = 7. Koncentracije radnih otopina polinukleotida spektrofotometrijski su određene pomoću nanodropa prema podacima proizvođača (Tablica 2.), te su izražene kao koncentracije fosfata.

Tablica 2. Molarni ekstincijski koeficijenti (ε) dvolančanih i jednolančanih polinukleotida i valne duljine maksimuma apsorpcije (λ_{max}).[29,31]

Polinukleotid	ε / dm^{-3} mol^{-1} cm^{-1}	λ_{max} / nm
*ct*DNA	6550	260
$p(dAdT)_2$	6650[30]	260
$p(dGdC)_2$	8400	254
pApU	7140	260
pA	9800	258
pG	10400	253
pC	6200	268
pU	9350	260

3.2. UV/Vis spektroskopija

UV/Vis spektri spoja SG224 snimani su na Cary 100 UV-Vis spektrofotometru, u programskom paketu Cary WinUV, modul Scan, u kvarcnoj kiveti s optičkim putem od 1,00

cm. Raspon valnih duljina u kojem su snimani spektri SG224 bio je od 250 nm do 450 nm, maksimum je praćen na 343 nm. Sva mjerenja rađena su pri 25 ˚C i pH 7, s brzinom snimanja 600 nm min^{-1} i korekcijom bazne linije.

U kivetu je dodan 1 mL kakodilatnog pufera i snimljena je bazna linija. Zatim je u pufer dodano 10 μL spoja SG224 (c = 10^{-3} mol dm^{-3}), tako da je konačna koncentracija spoja u reakcijskoj smjesi bila 10^{-5} mol dm^{-3}, te je snimljen spektar samog spoja. Zatim je uslijedila titracija s polinukleotidom. Titracija je provođena dodavanjem alikvota otopine polinukleotida u vodenu otopinu ispitivanog spoja SG224 (c = 10^{-5} mol dm^{-3}). Vrijeme potrebno da spoj i polinukleotid izreagiraju, tj. vrijeme postizanja ravnoteže bilo je 2 minute. Nakon svakog dodatka polinukleotida pričekano je 2 minute i zatim je snimljen spektar. Titracija je trajala do zasićenja, tj. dok više nije bilo promjena u UV/Vis spektru spoja po dodatku polinukleotida.

Dobiveni podaci obrađeni su u programu Origin 7 nelinearnom regresijskom analizom Scatchardove izoterme. Scatchardova jednadžba omogućava istovremeno računanje konstante stabilnosti kompleksa i omjera vezanja, n = [vezani spoj] / [polinukleotid]. Apsorbancija je dana izrazom:

$$A = \varepsilon_{\mathrm{k}} \cdot c_{\mathrm{k}} + \varepsilon \cdot (c - c_{\mathrm{k}}) + \varepsilon_{\mathrm{s}} \cdot (n \cdot c_{\mathrm{s}} - c_{\mathrm{k}}) \qquad (7)$$

a koncentracija kompleksa se računa prema jednadžbi:

$$c_k = (n \cdot c_s + c + 1 / K_s - ((n \cdot c_s + c + 1 / K_s)^2 - 4 \cdot n \cdot c_s \cdot c)^{1/2}) / 2 \qquad (8)$$

gdje je c_k koncentracija kompleksa, c koncentracija ispitivanog spoja u otopini, c_s koncentracija dodanog polinukleotida, n omjer molarne koncentracije vezanog spoja i koncentracije veznih mjesta, ε molarni apsorpcijski koeficijent ispitivanog spoja (računat), ε_k molarni apsorpcijski koeficijent kompleksa (računat), A apsorbancija te Ks konstanta stabilnosti kompleksa.[13,18]

Postupak je ponovljen za svaki od 10 polinukleotida.

3.2.1. Promjena temperature mekšanja polinukleotida

U 6 kiveta, s duljinom puta zračenja od 1 cm, dodano je po 1 mL kakodilatnog pufera i volumen otopine polinukleotida potreban da njegova koncentracija bude otprilike 2 x 10^{-5} mol dm^{-3}. Pomoću izmjerenih apsorbancija otopina polinukleotida pri valnoj duljini maksimuma apsorpcije i molarnih ekstinkcijskih koeficijenata (Tablica 2.) izračunata je stvarna

koncentracija polinukleotida u otopini i volumeni spojeva koje je potrebno dodati da bi se postigli omjeri spoj : polinukleotid 0,1 i 0,2. U dvije kivete nalazila se samo otopina polinukleotida u kakodilatnom puferu, u dvije spoj i polinukleotid u omjeru 0,1 i u dvije spoj i polinukleotid u omjeru 0,2. Mjerena je apsorbancije pri valnoj duljini karakterističnoj za svaki pojedini polinukleotid u ovisnosti o temperaturi otopine u intervalu od 25 do 98 ˚C. Dobivene su krivulje mekšanja polinukleotida i krivulje mekšanja kompleksa polinukleotida i spoja pomoću modula Thermal koji je dio programskog paketa Cary WinUV. Vrijednost temperature mekšanja određena je očitavanjem maksimuma prve derivacije krivulje mekšanja. Vrijednost Δ*Tm* je razlika između *Tm* vrijednosti kompleksa polinukleotida i spoja i *Tm* vrijednosti čistog polinukleotida. Sve vrijednosti Δ*Tm* su presjek dvaju mjerenja, a greška instrumenta, tj. greška u Δ*Tm* vrijednostima je ± 0,5˚C.

Određena je temperatura mekšanja samo za dvolančane polinukleotide, *ct*DNA, $p(dAdT)_2$ i pApU, za $p(dGdC)_2$ nije jer je njegova temperatura mekšanja visoka, a svaka stabilizacija polinukleotida dovodi do porasta temperature. Na UV/Vis uređaju se ne mogu pratiti tako viske temperature.

3.3. Fluorescencijska spektroskopija

Fluorescentni spektri spojeva snimani su na Cary Eclipse Flourescence spektrofotometru, u programskom paketu Cary Eclipse, modul Scan, u kiveti s optičkim putem od 1 cm. Spektri su snimani pri rasponu valnih duljina od 350 nm do 650 nm, a spoj SG224 je pobuđivan na 360 nm, pri titraciji s polinukleotidima *ct*DNA i $p(dAdT)_2$. Kod titracija s ostalim polinukleotidima spektri su snimani od 360 do 750 nm, a valna duljina pobude iznosila je 345 nm. Valna duljina pobude pri snimanju emisijskog spektra odgovarala je valnoj duljini maksimalne apsorpcije spoja. Širina i pobudne i emisijske pukotine za oba spoja iznosila je 5 nm. Ona je određena snimanjem emisijskog spektra samih spojeva i spojeva s polinukleotidima da bi se postigao najbolji odgovor instrumenta. Sva mjerenja rađena su pri 25 ˚C i pH 7. Spoj SG216 se pobuđivao na λ = 345 nm, a emisija se pratila od 250 do 370 nm, sa slitovima eksitacije i emisije 10 i 10.

U fluorimetrijsku kivetu dodana su 2 mL kakodilatnog pufera i 4 μL spoja SG224 ($c = 10^{-3}$ mol dm^{-3}), odnosno SG216 ($c = 10^{-3}$ mol dm^{-3}), tako da je konačna koncentracija spoja u reakcijskoj smjesi bila 2×10^{-6} mol dm^{-3} i snimljen je spektar samog spoja. Nakon toga je uslijedila titracija polinukleotidom. Dodavani su alikvoti vodene otopine polinukleotida dok

se nije postiglo zasićenje. Nakon svakog dodatka alikvota pričekano je 2 minute prije snimanja da bi se postigla ravnoteža u reakcijskog smjesi.

Dobiveni podaci obrađeni su u programu Origin 7 nelinearnom regresijskom analizom Scatchardove izoterme dobivene su konstante stabilnosti kompleksa (po formulama 7 i 8).[33,34]

Postupak je ponovljen za svaki od 10 polinukleotida.

3.4. CD spektroskopija

CD spektri spoja snimani su na Jasco J-815 CD spektrometru, u programu Spectra Manager, Spectrum Measurement, u kiveti s duljinom optičkog puta od 1 cm. Konačni spektar je prosjek 2 snimanja. Sva mjerenja rađena su pri 25 ˚C i pH 7, s brzinom skeniranja od 200 nm min^{-1}.

U kivetu je dodano 2 mL kakodilatnog pufera i snimljena je bazna linija, koja je oduzeta od svakog snimljenog spektra. Puferu je dodan alikvot vodene otopine nukleotida tako da je konačna koncentracija polinukleotida u reakcijskoj smjesi bila 2 x 10^{-5} mol dm^{-3}. Zatim je uslijedila titracija spojem SG224, dodavano je po 2 μL alikvota vodene otopine spoja tako da je omjer koncentracija polinukleotida i spoja bio 0.05-0.5. Nakon svakog dodatka snimljen je CD spektar i korigiran je za CD spektar pufera.

Dobiveni podaci obrađeni su u programu Origin 7.

Postupak je ponovljen za svaki od 10 polinukleotida.

3.5. ITC

ITC spektri spoja snimani su na MicroCal VP-ITC uređaju, rezultati su obrađeni pomoću MicroCal Analysis programskog paketa baziranog na Origin 7 programu. Volumen prve injekcije bio je 2 μL, a svih ostalih ostalih 10 μL, vrijeme injektiranja je bilo 20 sec, razmak između dvaju injekcija 360 sec. Sva mjerenja rađena su na 25 ˚C.

Pripremljeno je 500 μL otopine SG224 koncentracije 10^{-4} mol dm^{-3} i 2500 μL otopine polinukleotida koncentracije 30 x 10^{-6} mol dm^{-3}. Budući da je postotak DMSO-a u otopini SG224 bio 0,1%, iz otopine polinukleotida izvađeno je 25 μL smjese i dodano 25 μL DMSO-a, da postotak DMSO-a u obje otopine bude jednak. Prije stavljanja u uređaj obje otopine su odzračene pomoću vakuum pumpe 15 minuta. Otopina polinukloetida je stavljena u ćeliju uređaja, a otopina SG224 u špricu i s njom se titriralo, u referentnoj ćeliji nalazila se ultračista

voda. Prilikom stavljanja otopina u ćeliju i iglu treba se obratiti pozornost da nigdje ne uđe mjehurić zraka.

Obradom rezultata direktno se dobivaju: promjena reakcijske entalpije ($\Delta_r H$), konstanta vezanja (K_s) i stehiometrijski omjer (N) vezanja. Vrijednost reakcijske Gibbs-ove energije ($\Delta_r G$) izračunava se iz konstante vezanja ($\Delta_r G = -RT \ln K_s$), a reakcijska promjena entropije izračunava se iz vrijednosti promjene reakcijske slobodne energije Gibbs-a i i promjene reakcijske entalpije ($\Delta_r S = (\Delta_r H - \Delta_r G)/T$).

Postupak je ponovljen za sve polinukleotide osim za pC i pG, budući da se iz UV/Vis i fluorimetrijskih titracija pretpostavilo da se spoj SG224 ne veže na njih.

3.6. Biološka ispitivanja

Sve radnje izvedene na stanicama u kulturi izvođene su u sterilnom okruženju, laminaru s okomitim strujanjem zraka. Korištene su sterilne staklene pipete i sterilni plastični nastavci za mikropipete te sterilne epruvete, a rukavice su prethodno sterilizirane 96% etanolom.

3.6.1. Stanične linije

Djelovanje triarilborilnih derivata na rast stanica ispitan je na dvije različite humane tumorske stanične linije, karcinom dojke (MCF-7) i karcinom pluća (H 460).

3.6.2. Stanične kulture

MCF-7 i H 460 stanice su kultivirane kao monoslojevi u cjelovitom mediju koji se sastoji od: DMEM s visokom koncentracijom glukoze (eng. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium, high glucose*), 10% fetalnog goveđeg seruma (eng. *foetal bovine serum*, FBS), 2 mM L-glutamina, 100 U mL^{-1} penicilina i 100 μg mL^{-1} streptomicina te 5 mL otopine glukoze koncentracije 45 g/100 mL.

3.6.3. Presađivanje stanica

Stanice su rasle u plastičnim plosnatim bocama s filtrom na čepu (T175, Thermo Scientific) u inkubatoru pri 37 ˚C, 5% CO_2 i 100% vlažnosti. Iz boca sa stanicama izliven je medij i u boce je odpipetirano 5-6 mL PBS-a (eng. *phosphate buffer saline,* fosfatni pufer). Laganim okretanjem boca stanice su isprane PBS-om, te je on izliven iz boca. Postupak ispiranja ponovljen je još jednom. Zatim je u boce odpipetirano 5 mL Tripsina i inkubirano otprilike 5 minuta, dok se otopina ne zamuti. Trispin omogućava odvajanje stanica od podloge jer cijepa

peptidne lance aminokiselina s pozitivno nabijenim bočnim ogrankom. Otopina se odpipetirala u plastičnu 15 mL epruvetu (Falcon) u koju je predhodno odpipetirano oko 5 mL cjelovitog medija te centrifugirano na 1400 rpm-a 5 minuta pri 34 ˚C. Odliven je supernatant, a u kivetu je na talog odpipetirano oko 5 mL cjelovitog medija i resuspendirano. Od toga je odpipetirano od 3 do 5 mL u bocu u kojoj se nalazilo oko 8 mL DMEM medija. Gustoća stanica provjerena je na mikroskopu te je boca stavljena u inkubator (37 ˚C, 5% CO_2 i 100% vlažnost).

3.6.4. Test proliferacije

Medij iz boca u kojima su se nalazile stanice je odliven u otpad i na stanice je odpipetirano oko 8 mL PBS-a. Laganim okretanjem boca stanice su isprane od medija i PBS je izliven u otpad. Postupak ispiranja je ponovljen još jedanput. Zatim je na stanice odpipetirano oko 3 mL Tripsina i inkubirano oko 5 minuta, dok se otopina ne zamuti. Sadržaj boce je preliven u Falcon epruvetu u kojoj se nalazilo oko 8 mL DMEM medija. Nakon centrifugiranja od 5 minuta pri 1410 rpm-a i 37 ˚C, odliven je supernatant i dodano oko 8 mL DMEM medija na talog.

Budući da se u eksperimentu koristi jednak broj stanica kako bi rezultati bili usporedivi i reproducibilni, bilo je potrebno odrediti broj stanica, odnosno koncentraciju, stanica u uzorku. Plastična epruveta u kojoj se su se nalazile stanice u DMEM mediju je protresena kako bi se stanice ravnomjerno rasporedile i odpipetirano je 10 µL smjese u malu plastičnu kivetu te pomiješano s 10 µL boje Tripan-Blue. On boji mrtve stanice u plavo zbog oštećenja na njihovoj membrani, a žive stanice ostaju neobojane. 10 µL te smjese je naneseno između 2 stakalca i stavljeno u Cell Counter uređaj, koji izbacuje broj stanica u 1 mL.

Izračunat je volumen stanične suspenzije koji je potreban da bi se dobila odgovarajuća koncentracija stanica po jažici. Odpipetirano je 20 mL DMEM medija i 2 mL stanica H 460 u jednu plastičnu epruvetu te 20 mL DMEM medija i 2,2 mL stanica MCF-7 u drugu. U svaku jažicu na mikrotitarskoj pločici bio je potrebno staviti 10000 stanica. Na jednu pločicu s 96 jažica naneseno je po 150 µL u svaku jažicu stanica H 460, a na drugu pločicu 150 µL u svaku jažicu stanica MCF-7. Na jednoj pločici može se ispitati djelovanje 4 različita spoja, ali na samo jednoj staničnoj liniji. Pločice su inkubirane preko noći na 37 ˚C, 5% CO_2 i 100% vlažnosti.

Pripremljena je vodena otopina spoja SG224 koncentracije 4 x 10^{-4} mol dm^{-3} i od nje su rađena razrjeđenja da se dobiju koncentracije od 4 x 10^{-5}, 4 x 10^{-6}, 4 x 10^{-7} i 4 x 10^{-8} mol dm^{-3}. Od tih otopina redom je nanošeno je po 50 μL u jažice u kojima se već nalazilo 150 μL DMEM medija. Što znači da je konačna koncentracija spoja SG224 u jažicama bila: u prvom stupcu 1 x 10^{-4}, u drugom 1 x 10^{-5}, u trećem 1 x 10^{-6}, u četvrtom 1 x 10^{-7} i u petom 1 x 10^{-8} mol dm^{-3}. Kao kontrola u predzadnjem stupcu nalazio se 1% DMSO, a u zadnjem netretirane stanice H 460, odnosno MCF-7 (Tablica 3). Pločice su inkubirane pri 37 ˚C, 5% CO_2 i 100% vlažnosti 2 dana.

Tablica 3. Raspored otopina spoja SG224 različitih koncentracija po jažicama.

	1	2	3	4	5
A	1 x 10^{-4}	1 x 10^{-5}	1 x 10^{-6}	1 x 10^{-7}	1 x 10^{-8}
B	1 x 10^{-4}	1 x 10^{-5}	1 x 10^{-6}	1 x 10^{-7}	1 x 10^{-8}
C	1 x 10^{-4}	1 x 10^{-5}	1 x 10^{-6}	1 x 10^{-7}	1 x 10^{-8}
D	1 x 10^{-4}	1 x 10^{-5}	1 x 10^{-6}	1 x 10^{-7}	1 x 10^{-8}

Za određivanje anitproliferativnog učinka spoja SG224 korištena je otopina 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenilltetrazol bromida (MTT). MTT test je standardni kolorimetrijski test za evaluaciju metaboličke aktivnosti stanica. Mitohondrijski enzimski kompleksi viabilnih stanica reduciraju MTT (topiv u vodi i hranjivom mediju, otopina žutog obojenja), dolazi do pucanja tetrazolnog prstena i nakupljanja u vodi netopivog formazana, kristala ljubičastog obojenja.[27,28] Nakon 2 dana sa stanica je uklonjen medij naglim okretanjem pločica nad papirnatim ručnikom. Pomiješano je 20 mL DMEM medija i 2 mL MTT-a te dodano po 150 μL u svaku jažicu pločice. Budući da je MTT osjetljiv na svjetlo, sve radnje su se odvijale pri smanjenom osvjetljenju i pločice su prije inkubacije omotane aluminijskom folijom. Inkubacija je trajala 4 sata pri 37 ˚C, 5% CO_2 i 100% vlažnosti. Nakon 4 sata istrese se sadržaj iz jažica i doda se 100 μL DMSO-a te dolazi do oslobađanja boje. Pločice su stavljene na tresilicu 5 minuta da se smjesa u jažicama homogenizira. Apsorbancija je mjerena na čitaču mikrotitarskih pločica, Thermo Labsystems Multiskan EX, na 570 nm jer je to valna duljina maksimalne apsorpcije ljubičaste boje. Apsorbancija je direktno proporcionalna vijabilnosti stanica.

Nakon očitanja vrijednosti apsorbancije na spektrofotometru, postotak rasta (eng. *percentage of growth*, PG) izračunat je po formuli:

$$PG = 100 * (OD_1 - OD_{t0}) / (OD_{kont} - OD_{t0}) \quad (9)$$

gdje je OD_{t0} - srednja vrijednost apsorbancije prije izlaganja stanica testiranom spoju
OD_1 - srednja vrijednost apsorbancije nakon izlaganja stanica testiranom spoju u trajanju inkubacije od 72h
OD_{kont} - srednja vrijednost apsorbancije nakon 72h inkubacije, bez izlaganja stanica testiranom spoju, tzv. kontrola.[20]

Svako mjerenje provedeno je u tetraplikatu, u dva pojedinačna eksperimenta. Rezultati su izraženi kao IC_{50}, koncentracija potrebna za 50% inhibicije.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

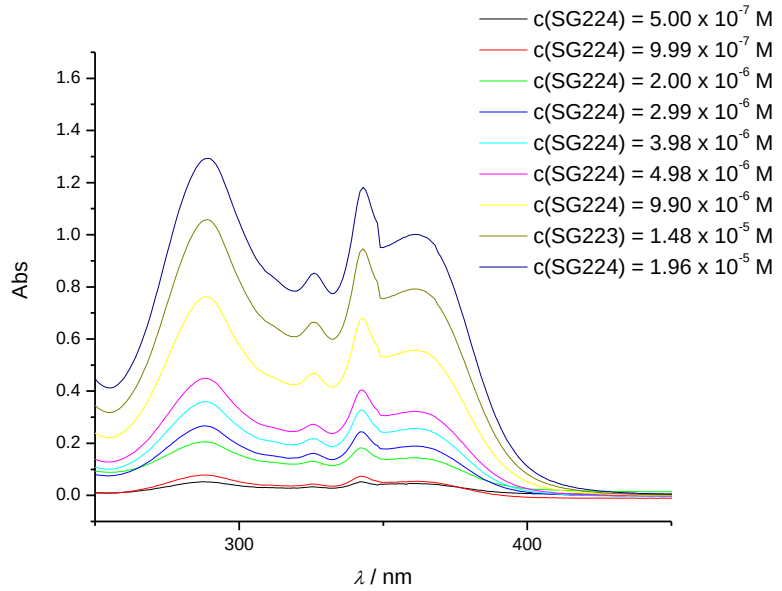
4.1. Fizikalno-kemijska svojstva triarilborilnih boja SG224 i SG216

4.1.1. Fizikalno-kemijska svojstva ispitivanih spojeva u vodenim otopinama

Spojevi SG224 i SG216 nisu topljivi u redestiliranoj vodi, ali su topljivi u DMSO-u i otopine su stabilne u vremenskom razdoblju od 5 mjeseci.

4.1.2. UV/Vis spektri

Pripremljena je DMSO stock otopina spoja SG224 koncentracije 1 x 10^{-3} mol dm^{-3} i snimljen je UV/Vis spektar u kakodilatnom puferu. Porastom koncentracije spoja linearno se povećavala i apsorpcija te se mogao primijeniti Beer-Lambertov zakon. UV/Vis spektri vodene otopine SG224 prikazani kao ovisnost apsorpcije o valnoj duljini, za različite koncentracije spoja (slika 10).



Slika 10. UV/Vis spektri spoja SG224 snimljeni u kakodilatnom puferu pH 7 za različite koncentracije spoja.

Valne duljine maksimuma apsorpcije spoja i pripadajući molarni ekstinkcijski koeficijenti dani su u Tablici 4.

Tablica 4. Valne duljine maksimalne apsorpcije i pripadajući molarni ekstinkcijski koeficijenti (ε) spoja SG224.

SG224	
λ_{max} / nm	ε / $dm^3mol^{-1}cm^{-1}$
289	65994
343	60294
360	51019

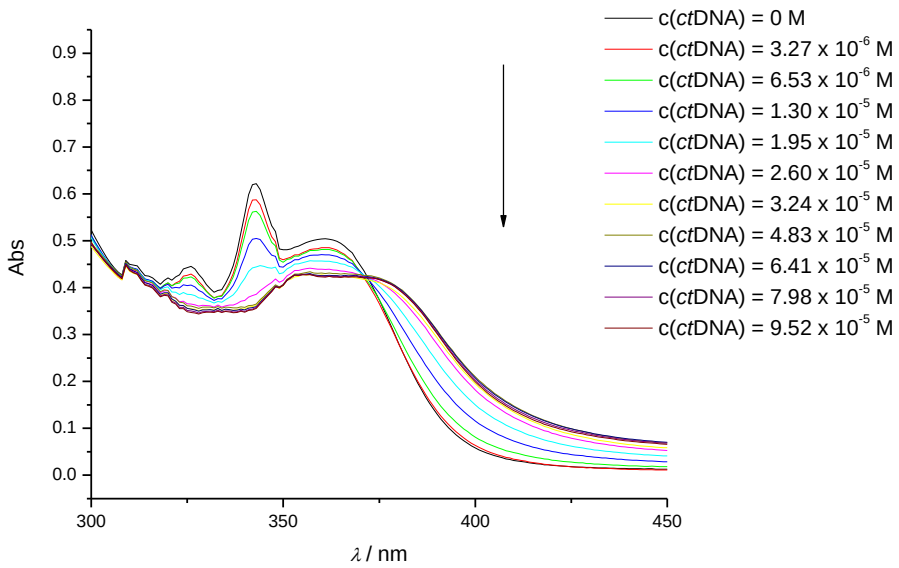
Apsorbancije vodenih otopina ispitivanog spoja proporcionalne su njihovim koncentracijama (u rasponu od 5 x 10^{-7} mol dm^{-3} do 2 x 10^{-5} mol dm^{-3}).

4.2. Interakcije spoja SG224 s jednolančanim i dvolančanim polinukleotidima u vodenom mediju

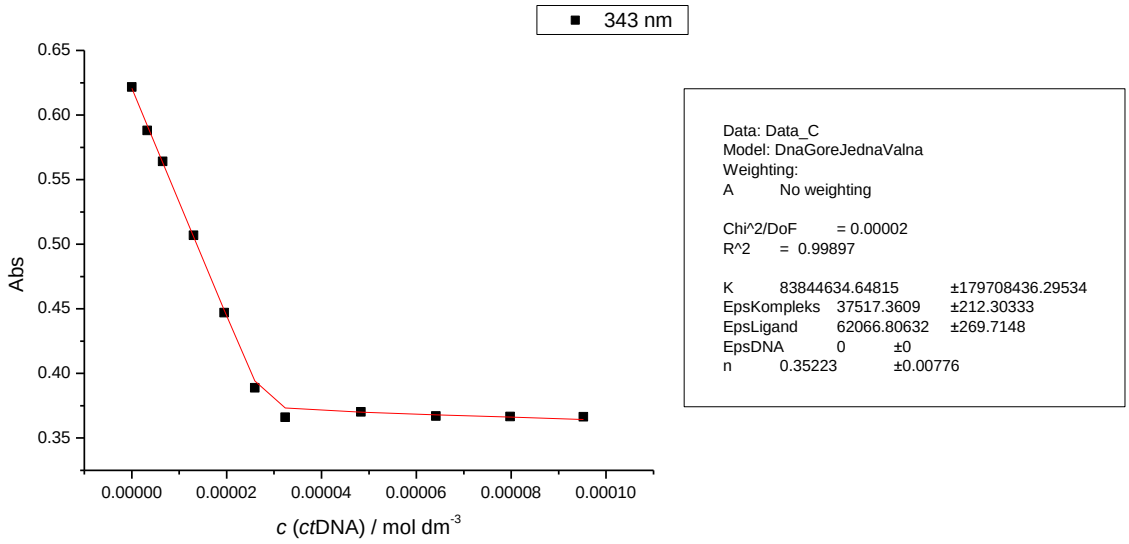
4.2.1. UV/Vis spektrofotometrijske titracije

UV/Vis spektofotometrijske titracije su izvedene u kakodilatnom puferu pH 7 s različitim tipovima jednolančanih (pA, pG, pC, pU, pdA i pdT) i dvolančanih (*ct*DNA, $p(dAdT)_2$, $p(dGdC)_2$ i pApU) polinukleotida. Koncentracija spoja bila je u području 10^{-6} mol dm^{-3}, a polinukleotida 10^{-5} mol dm^{-3}.

Titracijom vodene otopine spoja SG224 vodenim otopinama svakog od tipova polinukleotida došlo je do smanjenja intenziteta apsorpcije, tj. do hipokromnog pomaka UV/Vis vrpci. Pomaci vrpci prema većim ili manjim valnim duljinama, tj. batokromni i hipsokromni pomak, nisu uočeni. Jedino povećanja intenziteta signala vidi se pri valnim duljinama manjim od 270 nm, ali to se pripisuje apsorpciji samih polinukleotida. Na UV/Vis spektru također je uočena izosbestična točka na λ = 371 nm, točka u kojoj se križaju sve krivulje, što upućuje na jedan tip vezanja, ili interkalaciju ili vezanje u utor. UV/Vis spektri i spektralne promjene koje se događaju prilikom titracije SG224 s *ct*DNA te izračun *Ks* i *n* prikazani su na slikama 11. i 12. UV/Vis spektri titracija SG224 ostalim polinukleotidima prikazani su u dodatku (slika D1-D9).



Slika 11. Promjene u UV/Vis spektru SG224 prilikom titracije s *ct*DNA u kakodilatnom puferu pH 7.



Slika 12. Pad asporpcije spoja SG224 pri valnoj duljini maksimalne apsorpcije, λ_{max} = 343 nm, prilikom titracije spoja s *ct*DNA (kakodilatni pufer, pH 7) i izračun *Ks* i *n*.

Na temelju dobivenih eksperimentalih podataka UV/Vis spektrofotometrijom izračunate su konstante stabilnosti (*Ks*) kompleksa spoja sa svakim tipom polinukleotida te Scatchardove

omjere vezanja, koji je omjer molarne koncentracije vezanog spoja i molarne koncentracije polinukleotida, *n* (Tablica 5.). Za izračun konstante stabilnosti kompleksa, *Ks*, korištena je vrijednost apsorbancije izmjerena pri λ = 343 nm jer je samo tu bilo moguće pratiti samo vezanje *ct*DNA na SG224. Pri maksimumu apsorpcije λ = 289 nm dolazi do promjena u spektru zbog apsorpcije same *ct*DNA.

Tablica 5. Konstante stabilnosti *Ks* i omjeri vezanja *n* = [vezani spoj]/[polinukleotid] dobiveni UV/Vis mjerenjima u kakodilatnom puferu, pH 7 (*c* (SG224) = 10^{-5} mol dm^{-3}, λ = 250 – 450 nm).

	polinukleotidi	log *Ks*	*n*
SG224	*ct*DNA	7,92	0,35
	$p(dAdT)_2$	6,79	0,25
	$p(dGdC)_2$	7,12	1,47
	pApU	9,60	0,40
	pA	7,95	0,53
	pG	7,52	1,97
	pC	7,08	0,66
	pU	4,79	1,34
	pdA	7,04	0,42
	pdT	7,56	0,41

Stvoreni kompleksi pokazuju visoke vrijednosti konstante stabilnosti, uz iznimku kompleksa SG224 s pU, iz čega se zaključuje da ispitivani spoj nije selektivan prema jednolančanim ili dvolančanim polinukleotidima. Omjeri vezanja su veći od 0,25 što je maksimalan omjer vezanja prilikom interkalacije, osim kod $p(dAdT)_2$ gdje je točno 0,25. U Tablici 6. prikazane su vrijednosti konstante stabilnosti za komplekse SG224 i polinukleotida pri zadanom omjeru vezanja, *n*. Vrijednost *n* je fiksirana kako bi se mogle usporediti vrijednosti konstanti stabilnosti, a ona iznosi oko *n* = 0,2 za dvolančane, odnosno *n* = 0,5 za jednolančane polinukleotide.

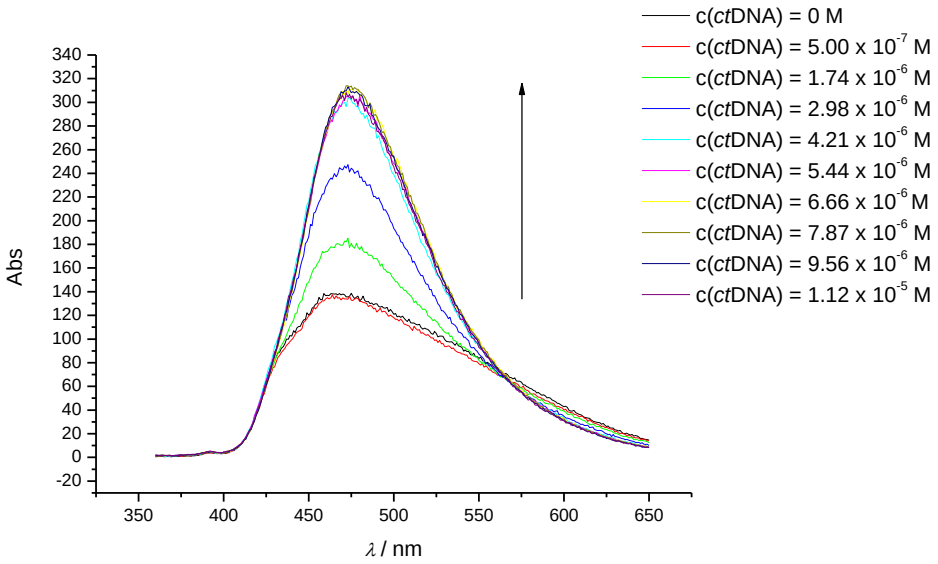
Tablica 6. Konstante stabilnosti *Ks* dobivene UV/Vis mjerenjima u kakodilatnom puferu, pH 7 pri zadanom omjeru vezanja *n* (*c* (SG224) = 10^{-5} mol dm^{-3}, λ = 250 – 450 nm).

	polinukleotidi	log *Ks*	*N*
SG224	*ct*DNA	7,24	0,2
	$p(dAdT)_2$	6,82	0,2
	$p(dGdC)_2$	-	-
	pApU	6,37	0,2
	pA	9,89	0,5
	pG	-	-
	pC	5,94	0,5
	pU	5,57	0,5
	pdA	6,13	0,5
	pdT	6,14	0,5

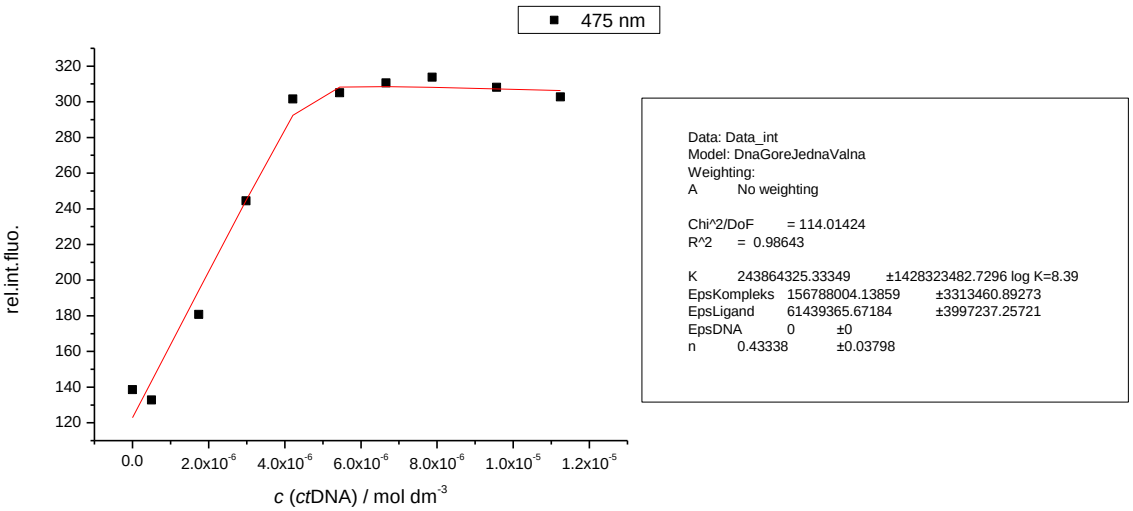
4.2.2. Fluorescencijska spektrofotometrija

Fluorimetrijske titracije su izvedene u kakodilatnom puferu pH 7 s različitim tipovima jednolančanih (pA, pG, pC, pU, pdA i pdT) i dvolančanih (*ct*DNA, $p(dAdT)_2$, $p(dGdC)_2$ i pApU) polinukleotida. Spoj se pobuđivao na λ = 345 nm, a emisija se pratila od 360 do 750 nm, sa slitovima ekscitacije i emisije 10 nm.

Spoj SG224 slabo fluorescira, ali mu se fluorescencija značajno povećava dodatkom polinukleotida. Fluorimetrijski spektri i spektralne promjene koje se događaju prilikom titracije SG224 s *ct*DNA te izračun *Ks* i *n* prikazani su na slikama 13. i 14., fluorimetrijski spektri titracija SG224 ostalim polinukleotidima prikazani su u dodatku (slika D9-D18).



Slika 13. Promjene u fluorimetrijskom spektru SG224 prilikom titracije s *ct*DNA u kakodilatnom puferu. Valna duljina pobude iznosila je λ = 345 nm.



Slika 14. Promjene intenziteta fluorescencije SG224 prilikom titracije s *ct*DNA (pH=7, kakodilatni pufer), na valnoj duljini maksimalne emisije, λ = 475 nm i izračun *Ks* i *n*.

Jaka fluorescencija kompleksa SG224 i polinukleotida omogućuje praćenje procesa vezanja fluorimetrijskim titracijama te izračun konstanti stabilnosti, *Ks*, i omjera vezanja, *n*, čije su vrijednosti dane u Tablici 7.

Tablica 7. Konstante stabilnosti *Ks* i omjeri *n* = [vezani spoj]/[polinukleotid] kao rezultat izvedenih fluorimetrijskih titracija u kakodilatnom puferu, pH 7 (c(SG224) = 1 x 10^{-6} mol dm^{-3}); slit ekscitacije 10 nm, slit emisije 10 nm.

	polinukleotidi	log*Ks*	*N*
SG224	*ct*DNA	8,39	0,43
	$p(dAdT)_2$	6,38	0,49
	$p(dGdC)_2$	8,91	0,10
	pApU	-	-
	pA	13,10	0,30
	pG	8,14	0,25
	pC	-	-
	pU	6,01	0,48
	pdA	11,0	0,32
	pdT	-	-

Vezanje SG224 s pApU i pC nije se moglo dovoljno točno opisati modelom koji smo koristili, pa su dobivene vrijednosti izostavljene. Odmah po prvom dodatku polinukleotida intenzitet signala je jako skočio, tj. postiglo se zasićenje (slika D12. i slika D15.), moguće je da SG224 ne tvori komplekse s njima u korištenom rasponu koncentracijskih vrijednosti. Tijekom titracije s pdT intenzitet fluorescencijskog odgovora se nepravilno mijenjao (slika D18., (b)) što upućuje na to da se SG224 ne veže na pdT. Konstante stabilnosti za komplekse SG224 s ostalim polinukleotidima su submikromolarne, kao i omjeri vezanja.

U Tablici 8. prikazane su vrijednosti konstante stabilnosti za komplekse SG224 i polinukleotida pri zadanom omjeru vezanja, *n* = 0,2 za dvolančane i *n* = 0,5 za jednolančane polinukleotide, radi lakše usporedbe konstanti stabilnosti dobivenih kompleksa.

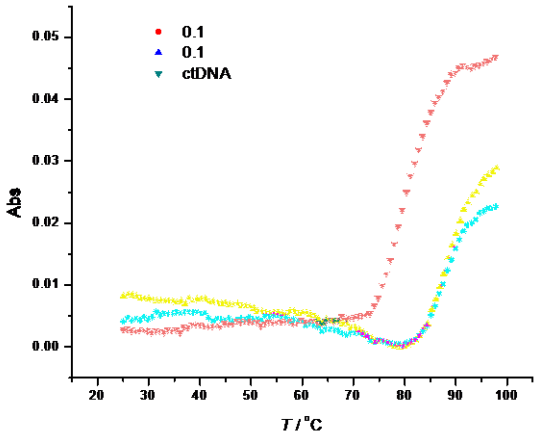
Tablica 8. Konstante stabilnosti *Ks* dobivene fluorimetrijskim mjerenjima u kakodilatnom puferu, pH 7 pri zadanom omjeru vezanja, *n* (*c*(SG224) = 1 x 10^{-6} mol dm^{-3}); pri slit eks 10 nm, slit em 10 nm.

	Polinukleotid	log*Ks*	*N*
SG224	*ct*DNA	6,42	0,2
	$p(dAdT)_2$	7,78	0,2
	$p(dGdC)_2$	5,52	0,2
	pApU	-	-
	pA	5,71	0,5
	pG	5,51	0,5
	pC	7,34	0,5
	pU	5,98	0,5
	pdA	5,99	0,5
	pdT	-	-

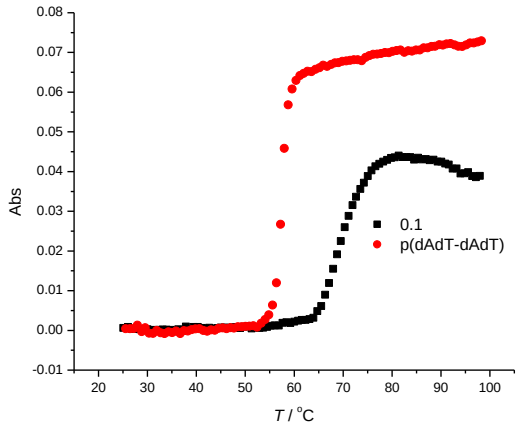
Za komplekse SG224 s pApU i pdT nije bilo moguće izračunati konstante stabilnosti, zadanim modelom.

4.2.3. Promjena temperature mekšanja dvolančanih polinukleotida

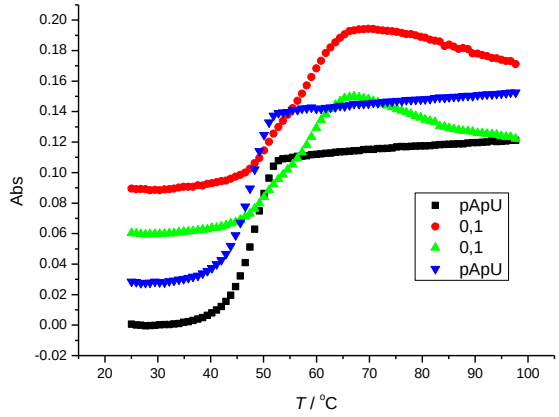
Krivulje mekšanja kompleksa SG224 i polinukleotida te samih dvolančanih polinukleotida određene su mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini maksimalne apsorpcije, λ_{max} = 260 nm za *ct*DNA i pApU, a λ_{max} = 262 nm za $p(dAdT)_2$ u ovisnosti o temperaturi. Promjene apsorpcije pri valnoj duljini karakterističnoj za pojedini polinukleotid u ovisnosti o temperaturi otopine, pri omjeru *r* = 0,1 (*r* = [spoj] / [polinukleotid]), prikazane su na slici 15. U Tablici 9. dane su dobivene vrijednosti promjene temperature mekšanja, Δ*Tm*, uslijed nastanka kompleksa.



(a)



(b)



(c)

Slika 15. (a) Promjena apsorbancije na 260 nm u ovisnosti o temperaturi otopine spoja SG224 i omjeru *r* = 0,1; (b) promjena apsorbancije na 262 nm u ovisnosti o temperaturi otopine spoja SG224 i $p(dAdT)_2$ pri omjeru *r* = 0,1; promjena apsorbancije na 262 nm u ovisnosti o temperaturi otopine spoja SG224 i pApU pri omjeru *r* = 0,1;*ct*DNA pri

Tablica 9. Δ*Tm* vrijednosti (˚C) dvolančanih polinukleotida prilikom dodatka spoja SG224 pri omjeru *r* = 0,1.

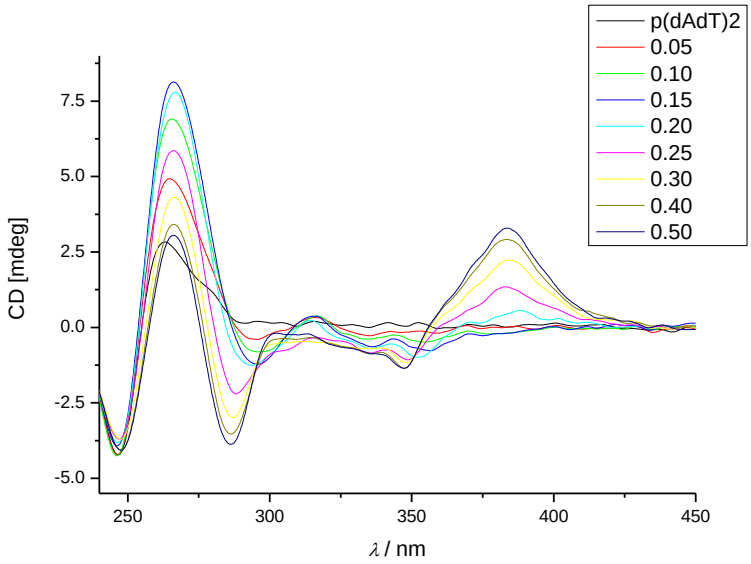
Polinukleotid *R*	ctDNA 0,1	p(dAdT)2 0,1	pApU 0,1
Δ*Tm* / °C	8	9,6	7,4

Dodatak spoja SG224 rezultira stabilizacijom sve tri dvostruke uzvojnice. Budući da su sve Δ*Tm* vrijednosti, koje predstavljaju razliku u *Tm* vrijednostima kompleksa i čistog polinukleotida, približno jednake (7-9 ˚C) zaključujemo da SG224 ne pokazuje selektivnost prema DNA ili RNA. Δ*Tm* kompleksa SG224 i *ct*DNA iznosi 8, a kompleksa SG224 i $p(dAdT)_2$ 9,6, što znači da je veća stabilizacija $p(dAdT)_2$ spojem SG224. Budući da se *ct*DNA sastoji od 40% GC parova baza i 60% AT parova baza, zaključujemo da SG224 vise stabilizira AT parove baza od GC.

4.2.4. CD titracije

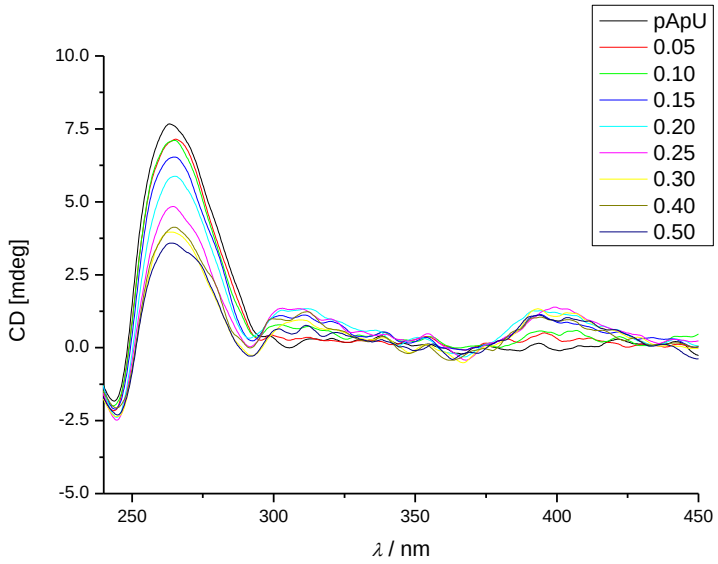
Budući da sekundarna struktura polinukleotida pokazuje CD signal u ultraljubičastom području od 300 nm, CD spektrofotometrija je dobra metoda za praćenje konformacijskih promjena u sekundarnoj strukturi nukleinskih kiselina prilikom vezanja male molekule. Vezanjem male molekule na polinukleotide može se pojaviti inducirani CD signal koji daje informacije o načinu vezanja spoja na polinukleotide. Dodatkom spoja u otopine polinukleotida, $p(dAdT)_2$, pApU, pdA i pdT uočene su promjene u CD spektru, znači da dolazi do promjena u sekundarnoj strukturi. Dodatkom spoja u otopine *ct*DNA, $p(dGdC)_2$, pA, pC, pG i pU nisu uočene promjene (slika D19.)

Na spektru CD titracija $p(dAdT)_2$ spojem SG224 (slika 16.) može se uočiti pozitivna ICD vrpca koja ukazuje na to da se spoj veže kao monomer u mali utor $p(dAdT)_2$. Pri većim omjerima *r*, ICD vrpce su pozitivnog pa negativnog predznaka, takav signal se javlja kao posljedica sprege dvije susjedne kromofore. Takav signal znači nastajanje dimera, tj. spoj se kao dimer veže u mali utor.[25]



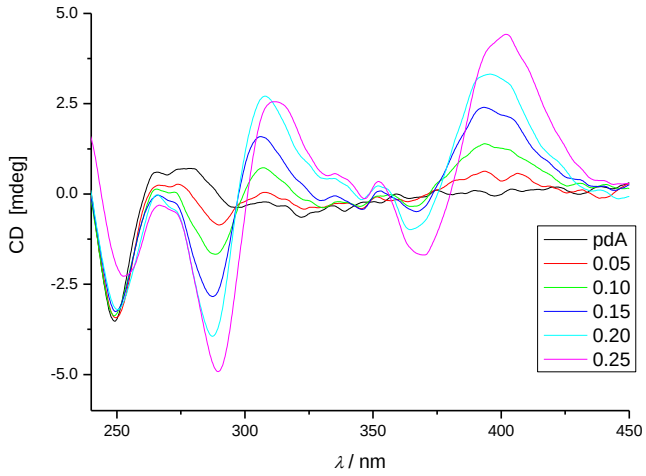
Slika 16. Promjene u CD spektru polinukleotida $p(dAdT)_2$ (c ($p(dAdT)_2$ = 2 x 10^{-5} mol dm^{-3}) prilikom dodatka spoja SG224 u kakodilatnom puferu pH 7, pri različitim omjerima r.

Na slici 17. prikazan je CD spektar nastao titracijom pApU spojem SG224. Na spektru se može uočiti samo pozitivni ICD koji se povećava kako se povećava omjer r. Znači da se SG224 veže kao monomer u utor pApU.[25]



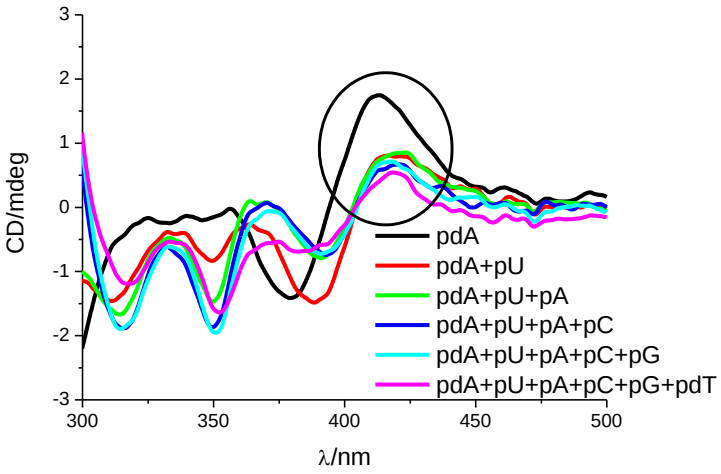
Slika 17. Promjene u CD spektru polinukleotida pApU (c (pApU) = 2 x 10^{-5} mol dm^{-3}) prilikom dodatka spoja SG224 u kakodilatnom puferu pH 7, pri različitim omjerima r.

U CD spektru titracije pdA spojem SG224 (slika 18.) uočavaju se bisignatne ICD vrpce visokog intenziteta što ukazuje da se spoj veže uz jednolančanu uzvojnicu pdA.



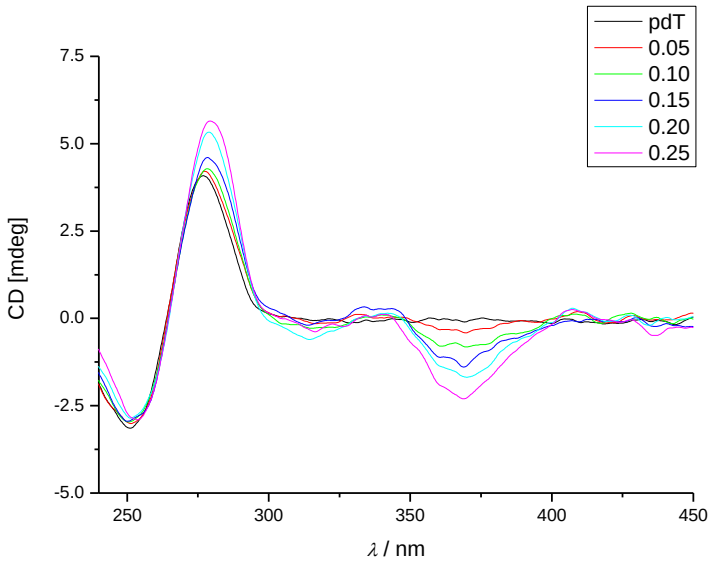
Slika 18. Promjene u CD spektru polinukleotida pdA (c (pdA) = 2 x 10^{-5} mol dm^{-3}) prilikom dodatka spoja SG224 u kakodilatnom puferu pH 7, pri različitim omjerima r.

Titracija spoja s pdA je ponovljena i nastavilo se titrirati sve dok se ICD signal mijenjao (na 400 nm je rastao, a na 370 nm padao), tj. do zasićenja. Nakon toga uslijedila je titracija s ostalim jednolančanim polinukleotidima (slika 19.). Na grafu se lako može prepoznati signal kompleksa spoja SG224 s pdA, što znači da SG224 može poslužiti za prepoznavanje dA sekvenci.



Slika 19. Promjene u CD spektru polinukleotida pdA (c = 1 x 10^{-5} mol dm^{-3}) prilikom dodatka spoja SG224 (c = 2.5 x 10^{-6} mol dm^{-3}) i titracije s ostalim jednolančanim polinukleotidima (pU, pA, pC, pG i pdT; c = 1 x 10^{-5} mol dm^{-3}).

Na slici 20. prikazan je CD spektar titracije pdT s SG224. Uočava se negativni ICD signal koji se povećava kako raste r.



Slika 20. Promjene u CD spektru polinukleotida pdT (c (pdT) = 2 x 10^{-5} mol dm^{-3}) prilikom dodatka spoja SG224 u kakodilatnom puferu pH 7, pri različitim omjerima r.

U Tablici 10. prikazani su načini vezanja SG224 na dvolančane polinukleotide dobiveni prema podacima spektropolarimetrijskih CD titracija. Kod jednolančanih polinukleotida

nema ni interkaliranja ni utora, spoj se može vezati samo elektrostatskim interakcijama uz lanac ili oko njega.

Tablica 10. Načini vezanja spoja SG224 na dvolančane polinukeotide ($p(dAdT)_2$, pApU), prema podacima spektropolarimetrijskih CD titracija.

	Polinukleotid	način vezanja
SG224	$p(dAdT)_2$	vezanje u mali utor kao dimer
	pApU	vezanje u utor kao monomer

4.2.5. ITC

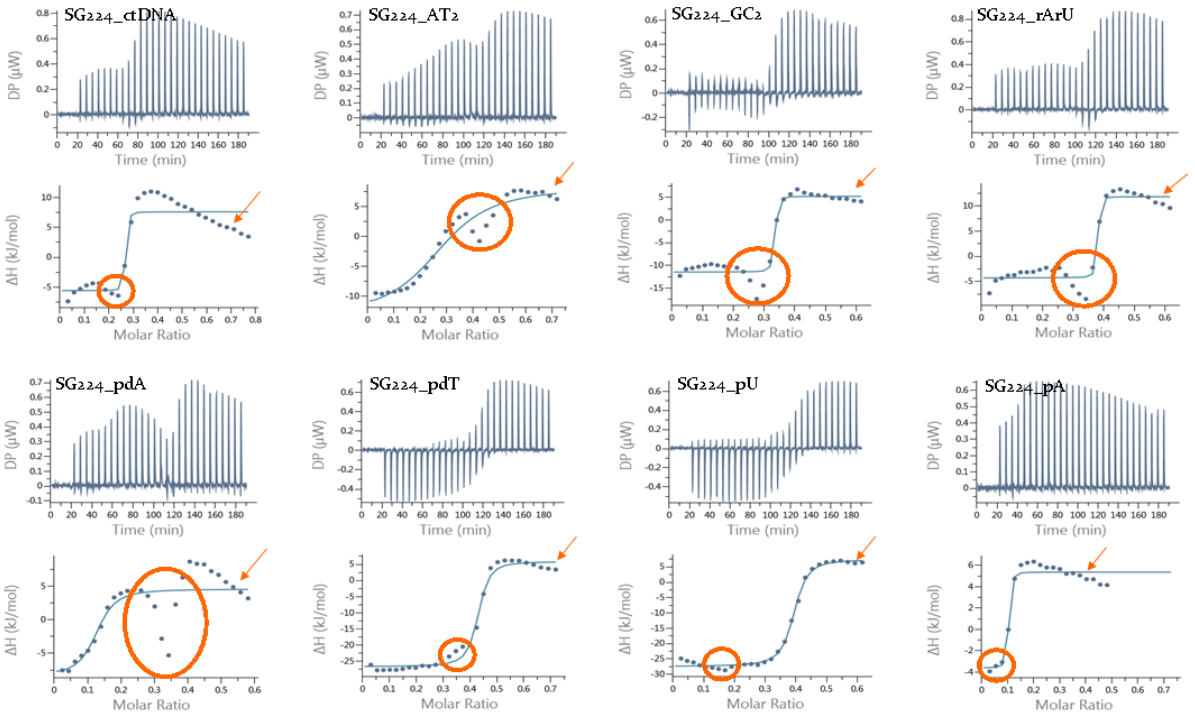
Iako se konstanta stabilnosti, *Ks*, i omjer vezanja, *n*, mogu izračunati iz podataka dobivenih fluorimetrijskim titracijama, koristili smo i kalorimetrijsku titraciju, ITC, kako bismo proučili vezanje boje SG224 na polinukleotide. Osim spomenutih parametara ITC se koristi za termodinamsku karakterizaciju reakcije kompleksiranja, tj. moguće je odrediti reakcijsku entalpiju kompleksiranja (ΔrH°) i reakcijsku entropiju (ΔrS°) te izračunati Gibbsovu slobodnu energiju procesa (ΔrG°) (Tablica 11.).

Tablica 11. Konstante stabilnosti *Ks*, omjeri *n* = [vezani spoj]/[polinukleotid] i termodinamički parametri (ΔrH°, ΔrG°, i ΔrS°) dobiveni iz rezultata izvedenih kalorimetrijskih titracija u kakodilatnom puferu, pH 7 (c(SG224) = 1 x 10^{-4} mol dm^{-3}, c(polinukleotida) = 30 x 10^{-6} mol dm^{-3});

Polinukleotidi	T / ˚C	Vez.	[SG224] (M)	[poli] (M)	*n*	*Kd* (M)	ΔH (kJ/mol)	ΔG (kJ/mol)	$-T\Delta S$ (kJ/mol)
*ct*DNA	25	Da	1,00E-04	2,80E-05	0,255	1,38E-09	-13,2	-50,6	-37,4
$p(dGdC)_2$	25,2	Da	1,00E-04	3,50E-05	0,323	1,46E-09	-16,7	-50,5	-33,8
pA	25,2	Da	1,00E-04	2,97E-05	9,10E-02	6,04E-09	-8,98	-47	-38
pApU	25,1	Da	1,00E-04	3,50E-05	0,367	7,95E-10	-16,1	-52	-35,8
pU	25	Da	1,00E-04	3,50E-05	0,383	3,88E-08	-34,8	-42,3	-7,51
pdA	25,1	Da	1,00E-04	3,72E-05	0,123	2,56E-07	-13	-37,7	-24,7
pdT	25,1	Da	1,00E-04	3,00E-05	0,417	2,71E-08	-32,5	-43,2	-10,8
$p(dAdT)_2$	25,2	Da	1,00E-04	3,00E-05	0,296	1,16E-06	-21,6	-33,9	-12,3
razrijeđenje SG224	25,2	Kont.	1,00E-04	3,00E-05	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Na slici 21. prikazani su konačni rezultati ITC titracija, u gornjem dijelu grafičkog prikaza su sirovi podaci, a u donjem obrađeni. Na obrađenim rezultatima vidi se da se prije ili za vrijeme procesa vezanja (označeno crvenom kružnicom) počinje događati i neki dodatni proces (vjerojatno agregacija spoja) koji traje za vrijeme procesa vezanja i nakon njega. Za vrijeme vezanja, toplina procesa vezanja je znatno izraženija od te agregacije pa se ona ne vidi na izotermi, ali se vidi nakon procesa vezanja, "klizanje bazne linije" (označeno strelicom).

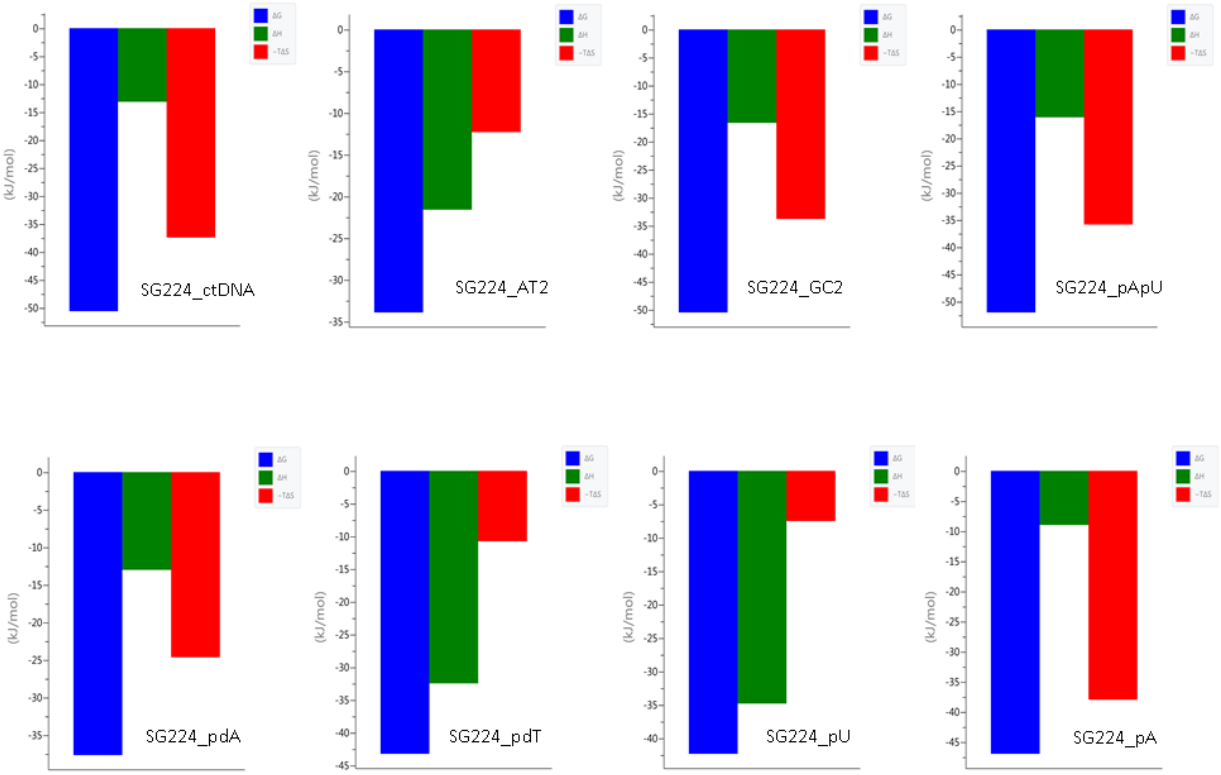
Sve krivulje su sigmoidalne što znači da postoji samo jedno mjesto vezanja spoja na polinukleotide.



Slika 21. Konačni rezultati ITC titracija polinukleotida (c(polinukleotida) = 30 x 10^{-6} mol dm^{-3}) s bojom SG224 (c(SG224) = 1 x 10^{-4} mol dm^{-3}) u kakodilatnom puferu pH 7, pri 25 °C. Gornji graf su sirovi, a donji obrađeni podaci.

Termodinamske karakteristike procesa vezanja mogu dosta toga razjasniti o procesu vezanja. Ako je Gibbsova slobodna energija negativna onda je proces spontan, tj. događa se vezanje. Ovisno o tome što značajnije pridonosi u procesu vezanja, entalpija ili entropija, možemo zaključiti kakav tip nekovalentne interakcije između polinukleotida i spoja prevladava, a prema tome se može procijeniti i način vezanja, interkaliranje ili vezanje u utor. Entalpijski

doprinos slobodnoj energiji odgovara π-π interakcijama, vodikovim vezama ili Van der Waalsovim interakcijama, što je izraženije kod interkaliranja. Veliki entropijski doprinos slobodnoj energiji odgovara hidrofobnim interakcijama i značajka je vezanja u utor.[26] Međutim u ovom sustavu zbog više procesa koji se odvijaju u pozadini samog vezanja ne možemo na taj način evaluirati dobivene rezultate (slika 22).



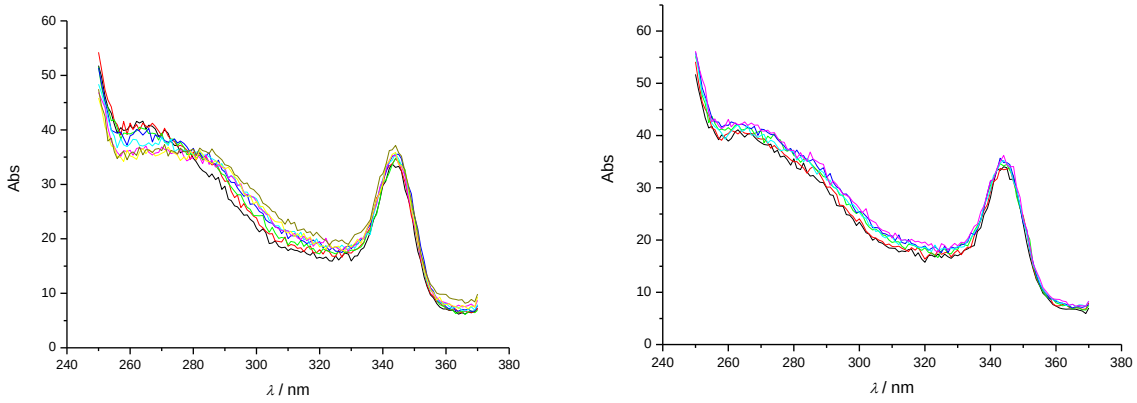
Slika 22. Termodinamički parametri, *ΔrG* (plavo), *ΔrH* (zeleno) i *ΔrS* (crveno) dobiveni ITC titracijama polinukleotida (*c*(polinukleotida) = 30 x 10^{-6} mol dm^{-3}) s bojom SG224 (*c*(SG224) = 1 x 10^{-4} mol dm^{-3}) u kakodilatnom puferu pH 7, pri 25 ˚C

4.3. Interakcije spoja SG216 s dvolančanim polinukleotidima u vodenom mediju

4.3.1. Fluorescencijska spektrofotometrija

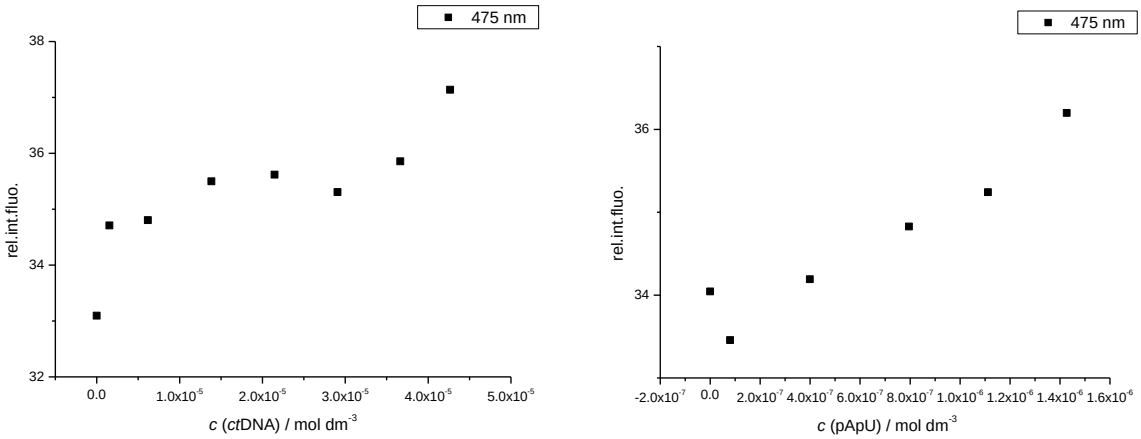
Fluorimetrijske titracije su izvedene u kakodilatnom puferu pH 7 s *ct*DNA i pApU. Spoj se pobuđivao na λ = 345 nm, a emisija se pratila od 250 do 370 nm, sa slitovima eksitacije i emisije 10 i 10.

Titracijom vodene otopine spoja SG216 vodenim otopina *ct*DNA i pApU nije došlo do nikakvih promjena u fluorimetrijskom spektru spoja, tj. intenzitet je ostao potpuno isti (slika 23. i slika 24.) što znači da se spoj ne veže na polinukleotide. Budući da se ne veže na *ct*DNA i na pApU, na ostalim polinukleotidima nisu rađeni testovi.



(a) (b)

Slika 23. (a) Promjene u fluorimetrijskom spektru SG216 (c (SG216) = 2 x 10^{-6} mol dm^{-3} prilikom titracije s *ct*DNA; (b) Promjene u fluorimetrijskom spektru SG216 prilikom titracije s pApU. Valna duljina pobude iznosila je λ = 345 nm.



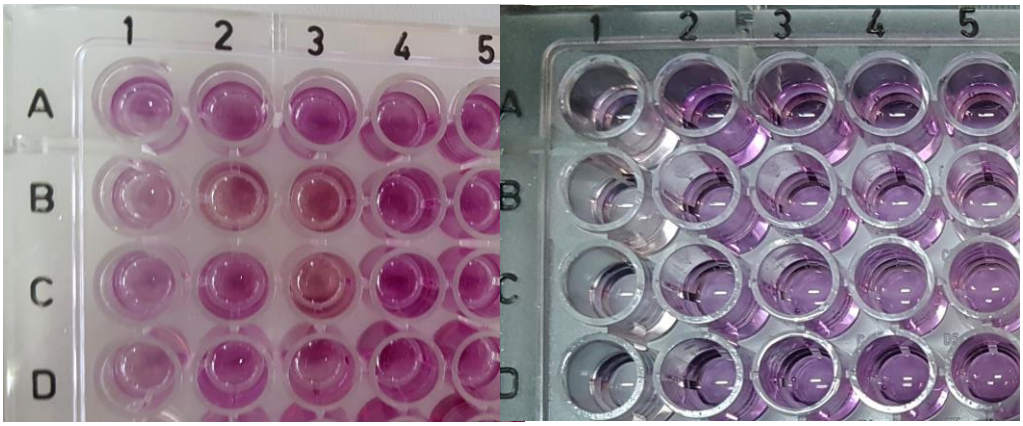
(a) (b)

Slika 24. (a) Promjene u fluorescencijskom spektru SG216 (c (SG216) = 2 x 10^{-6} mol dm^{-3}) pri valnoj duljini maksimalne emisije, λ = 475 nm, prilikom titracije s *ct*DNA (pH=7, kakodilatni pufer); (b) Promjene u fluorescencijskom spektru SG216 pri valnoj duljini maksimalne emisije, λ = 475 nm, prilikom titracije s pApU (pH=7, kakodilatni pufer). Valna duljina pobzde iznosila je λ = 345 nm.

4.4. Biološka ispitivanja

4.4.1. Učinak SG224 na rast stanica

U svrhu određivanja djelovanja spoja na rast stanica, provedena su biološka ispitivanja. SG224 ispitna je na dvije različite humane tumorske stanične linije, karcinom dojke (MCF-7) i karcinom pluća (H 460). Rezultati su prikazani na slici 25.



(a) (b)

Slika 25. (a) Izgled otopine stanica H460 i različitih koncentracija spoja SG224 nakon inkubacije od 72h (koncentracija SG224 u jažicama: u prvom stupcu 1 x 10^{-4}, u drugom 1 x 10^{-5}, u trećem 1 x 10^{-6}, u četvrtom 1 x 10^{-7} i u petom 1 x 10^{-8} mol dm^{-3}); (b) Izgled otopine stanica MCF-7 i različitih koncentracija spoja SG224 izmjerene nakon inkubacije od 72h (koncentracija SG224 u jažicama: u prvom stupcu 1 x 10^{-4}, u drugom 1 x 10^{-5}, u trećem 1 x 10^{-6}, u četvrtom 1 x 10^{-7} i u petom 1 x 10^{-8} mol dm^{-3}).

Budući da je intenzitet ljubičaste boje u svim jažicama podjednak i sličan kao kod kontrole, zaključilo se da SG224 nije citotoksičan za stanice karcinoma dojke i karcinoma pluća. Da SG224 ima antiproliferativno djelovanje, boja u jažicama ne bi bila ljubičasta već bezbojna. Postotak živih stanica nakon izlaganja stanica H460, odnosno MCF-7, različitim koncentracijama spoja SG224, u trajanju inkubacije od 72h prikazan je u Tablici 12, odnosno Tablici 13.

Tablica 12. Postotak živih stanica H460 nakon izlaganja stanica različitim koncentracijama spoja SG224, u trajanju inkubacije od 72h (koncentracija SG224 u jažicama: u prvom stupcu 1 x 10^{-4}, drugom 1 x 10^{-5}, trećem 1 x 10^{-6}, četvrtom 1 x 10^{-7} i u petom 1 x 10^{-8} mol dm^{-3}).

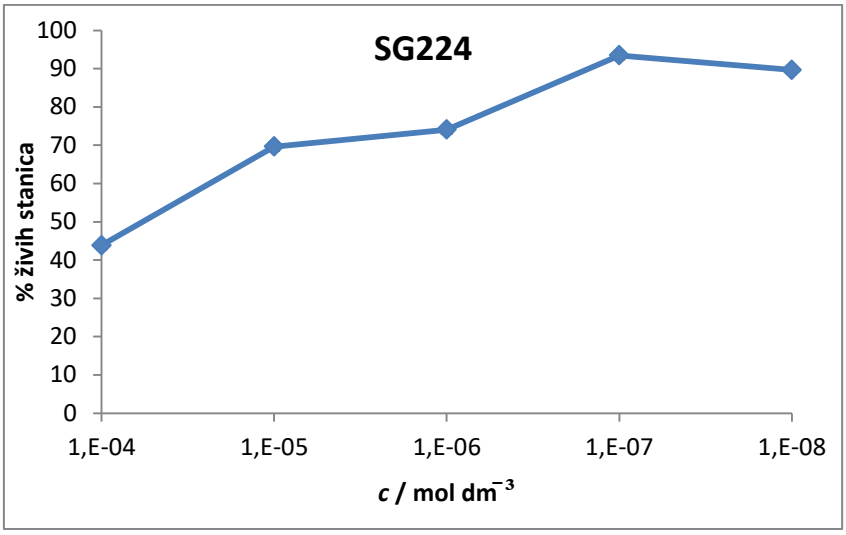
	1	2	3	4	5
A	45,48	68,69	74,29	76,38	80,47
B	41,05	64,49	72,89	90,49	89,68
C	42,10	71,95	72,07	96,33	86,88
D	46,65	73,35	76,97	110,67	101,69
srednja vrijednost	43,82	69,62	74,05	93,47	89,68

Tablica 13. Postotak živih stanica MCF-7 nakon izlaganja stanica različitim koncentracijama spoja SG224, u trajanju inkubacije od 72h (koncentracija SG224 u jažicama: u prvom stupcu 1 x 10^{-4}, drugom 1 x 10^{-5}, trećem 1 x 10^{-6}, četvrtom 1 x 10^{-7} i u petom 1 x 10^{-8} mol dm^{-3}).

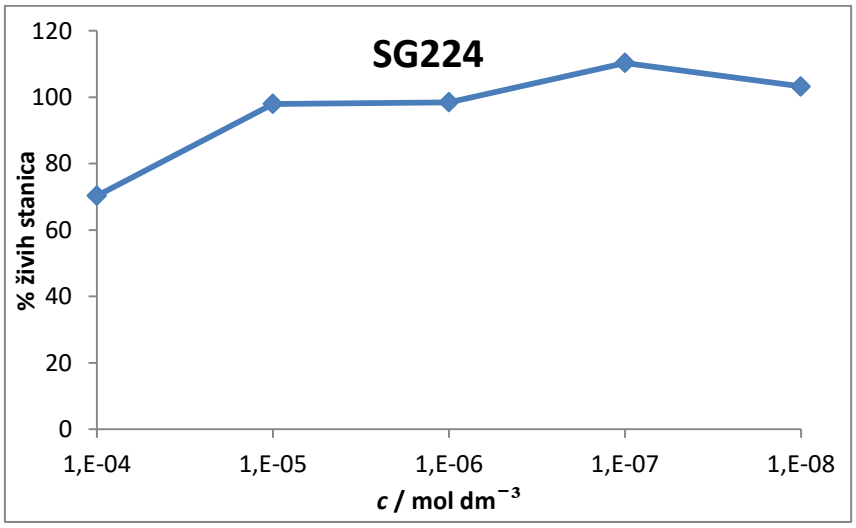
	1	2	3	4	5
A	63,38	91,08	88	93,54	88,62
B	76,31	102,15	113,23	108,92	105,23
C	62,77	91,69	89,85	94,15	98,46
D	78,77	107,08	102,77	144,62	120,62
srednja vrijednost	70,31	98	98,46	110,31	103,23

Iz tablica se vidi da su vrijednosti postotka živih stanica podjednake za sve koncentracije SG224, što potvrđuje da spoj ima relativno mali anitproliferativni utjecaj. Veći je utjecaj spoja na H460 stanice nego na MCF-7 stanice, iako je i utjecaj na H460 stanice značajniji tek pri većim koncentracijama, 1 x 10^{-4} mol dm^{-3}.

Ovisnost postotka rasta živih stanica u jažicama, PG, o množinskoj koncentraciji spoja SG224 prikazana je na slici 26. Uzeto je da je postotak rasta u kontrolnom uzorku 100%. IC_{50} je koncentracija pri kojoj je broj vijabilnih stanica upola mani u odnosu na kontrolu (50%) tj koncentracija koja pripada točki gdje linija prelazi 50%, interpolacijom se može odrediti da je IC_{50} = 7,84 x 10^{-5} mol dm^{-3} za stanice H460, odnosno ekstrapolacijom IC_{50} = 1,66 x 10^{-4} mol dm^{-3} za stanice MCF-7.



a)



b)

Slika 26. a) Ovisnost postotka rasta, PG, stanica H460 o množinskoj koncentraciji spoja SG224; b) ovisnost postotka rasta, PG, stanica MCF-7 o množinskoj koncentraciji spoja SG224.

§ 5. ZAKLJUČAK

U sklopu ovog diplomskog rada spektroskopski i kalorimetrijski su okarakterizirane interakcije dva triarilboranska derivata SG224 i SG216 s nizom jednolančanih i dvolančanih polinukleotida.

Spoj SG224 se veže na DNA/RNA strukure kombinacijom više različitih načina te nije selektivan prema jednolančanim ili dvolančanim polinukleotidima. Konstante stabilnosti nastalih kompleksa su dosta velike i biološki relevantne. Sustav je kompleksan jer se istovremeno s procesom vezanja odvija i neki drugi proces, vjerojatno agregacija spoja, te se zbog toga ne može preciznije odrediti način vezanja. Iz provedenih CD titracija, imajući u vidu i druga spektroskopska mjerenja, možemo pretpostaviti vezanje u utor kao najznačajniji način vezanja. Osim izgleda induciranih CD spektara, na vezanje u utor kao primarni vid vezanja ukazuje i činjenica da SG224 ne pokazuje afinitet k vezanju $p(dGdC)_2$ niza, čiji utor je sterički blokiran dvjema amino skupinama (gvanin). Ono što je značajno je to što se spoj može koristiti kao spektropolarimetrijski biljeg za pdA sekvence, jer se prilikom vezanja spoja na pdA sekvence inducira jaki CD signal na 402 nm. Dodatkom spoja dolazi do termičke stabilizacije dvostrukih uzvojnica (*ct*DNA, $p(dAdT)_2$ i pApU), budući da su ΔTm vrijednosti za sva tri polinukleotida u rasponu od 2 $^{\circ}C$, spoj ne pokazuje selektivnost prema dvostrukim uzvojnicama DNA ili RNA. Nešto je veća stabilizacija $p(dAdT)_2$ u odnosu na *ct*DNA što znači da spoj više stabilizira AT parove baza od GC. Spoj je relativno neškodljiv za stanice, tj. nema značajan antiproliferativan učinak. To je neočekivan rezultat budući da spoj stvara jake interakcije s DNA pa je bilo za očekivati da će smetati prilikom replikacije DNA. Tek kod većih koncentracija 1 x 10^{-4} mol dm^{-3} i kod dužih izlaganja stanica spoju, 3 dana, dolazi do značajnijeg antipoliferaivnog utjecaja. Moguće je da je razlog tomu slab ulazak spoja u stanice, što bi trebalo utvrditi primjenom konfokalne mikroskopije.

Spoj SG216 se ne veže na polinukleotide.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA (prema potrebi)

CD - cirkularni dikroizam

CLSM – eng. *confocal laser scanning microscopy,* konfokalna laserska pretražna mikroskopija

*ct*DNA - *calf timus* deoskiribonukleinska kiselina

DMEM - Dulbecco modificirani Eagleov medij, medij za rast stanica

DMSO - dimetil-sulfoksid

DNA - deoksiribonukleinska kiselina

IC – nutranja pretvorba

ICD – inducirani cirkularni dikroizam

ISC – međusustavno križanje

ITC - izotermna titracijska kalorimetrija

*K*s - konstanta stabilnosti kompleksa

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolijev bromid

pA- jednolančani homopolinukleotid adeninske kiseline

pApU - dvolančani homopolinukleotid adeninske i uracilne kiseline

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

pdA - jednolančani homopolinukleotid adeninske kiseline

$p(dAdT)_2$ - dvolančani alternirajući polinukleotid adeninske i timinske kiseline

pdT - jednolančani homopolinukleotid timinske kiseline

pC - jednolančani homopolinukleotid citozinske kiseline

$p(dGdC)_2$ - dvolančani alternirajući polinukleotid gvaninske i citozinske kiseline

pG - jednolančani homopolinukleotid gvaninske kiseline

PG - eng. *percentage of growth,* postotak rasta

pU - jednolančani homopolinukleotid uracilne kiseline

ReH_2O – redestilirana voda

RNA – ribonukleinska kiselina

rpm – eng. *rotation per minute*

SG216

SG224

UV/Vis – ultraljubičasta i vidljiva spektroskopija

*T*m – temperatura mekšanja

Δ*Tm* - promjena temperature mekšanja

ΔrG° - standardna Gibbsova reakcijska energija

ΔrH° - standardna reakcijska entalpija

ΔrS° - standardna reakcijska entropija

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. E. Trinquet i G. Mathis, Mol. Bio. Syst. 2 (2006) 381–387.
2. M. Demeunynck, C. Bailly i W. Wilson, DNA and RNA Binders, Wiley-VCH, Weinheim, 2002.
3. C. R. Cantor i P. R. Schimmel, Biophysical Chemistry, WH Freeman and Co, San Francisco, 1980.
4. I. Piantanida, Kem. Ind. **52** (2003) 545–552.
5. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, ŠKOLSKA KNJIGA, Zagreb, 2013, str. 4-8., 107-112., 784-787.
6. A. Dijanošić, *Istraživanje interakcija malih molekula s polinukleotidima spektroskopijom površinski pojačanog ramanovog raspršenja*, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2013, str. 9.
7. https://www.google.com/search?client=firefox-b&biw=1366&bih=654&tbm=isch&sa=1&ei=Xt_qW7f1AYXlkgXQzrm4Bg&q=A+B+i+Z+dna&oq=A+B+i+Z+dna&gs_l=img.3...2676.6703.0.6861.19.15.0.0.0.0.146.1270.9j5.14.0....0...1c.1.64.img..7.7.730.0..0j0i67k1j0i30k1j35i39k1j0i19k1j0i8i30i19k1.0.ePw2-q25ZWw#imgrc=8b5U_bm9cihv1M: (datum pristupa 13. studenog 2018.)
8. M. G. Branilović, *Eksperimentalno utemeljeno modeliranje interakcija nukleinskih kiselina i malih molekula*, Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2014, str. 6.
9. Viši praktikum analitičke kemije, *Propis_UV/Vis apsorpcijska spektroskopija*
10. *Interna skripta za praktikum iz biokemije*, Zagreb, 2016, str. 41-43.
11. H. Vančik, *Molekularna fotokemija*, Zagreb, 2011, str. 11-14.
12. Viši praktikum analitičke kemije, *Propis_Fluorescencijska spektroskopija*
13. S.Siročić, *Nekovalentne interakcije 1,4-diazabiciklo[2.2.2]oktanskih derivata monometinskih cijaninskih boja s nukleinskim kiselinama*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2013. str.
14. http://eskola.chem.pmf.hr/odgovori/odgovor.php3?sif=5395 (datum pristupa 30. listopada 2018.)

15. T. Rinkovec, *Primjena kalorimetrije u termodinamičkoj karakterizaciji kemijskih i fizikalnih procesa u supramolekulskim i biokemijskim sustavima,* Završni rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2016, str. 9-11.
16. I. Spudić, *Ispitivanje protutumorske aktivnosti novosintetiziranih derivata rodanina in vitro*, Završni rad, Medicinski fakultet, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 2017, str. 14, 19.
17. I. R. Redovniković, M. C. Bubalo, V. G. Srček, K. Radošević, Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition **11** (2016) 169-175
18. A. Kodžman, *Kompleksi lantana s nekim strukturno srodnim flavonoidima u interakciji s nukleinskim kiselinama*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2008, str. 16-18.
19. http://eskola.chem.pmf.hr/odgovori/odgovor.php3?sif=3078 (datum pristupa 28. listopada 2018.)
20. J. Jurlin, *Protutumorski učinak apoptina na različitim staničnim modelima,* Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2013, str. 37.
21. T.Šmidlehner, I.Piantanida, G.Pescitelli, Beilstein J. Org. Chem. **14** (2018) 84–105.
22. https://www.irb.hr/users/iweber/fluovis/konfokalna.htm (datum pristupa 10. siječnja 2019.)
23. S. Griesbeck, Z. Zhang, M. Gutmann, T. Luhmann, R.M. Edkins, G. Clermont, A.N. Lazar, M. Haehnel, K. Edkins, A. Eichhorn, M. Blanchard-Desce, L. Meinel, T.B. Marder, Chem. Eur. J. **22** (2016) 1-7
24. https://www.google.com/search?q=dijagram+jablonskog&client=firefox-b&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiaz6ConfLfAhUFLewKHdbJC3kQ_AUIDigB&biw=1366&bih=654#imgdii=KQld4Y8HYqOYTM:&imgrc=9XkvzPtMdpVWbM: (datum pristupa 16. siječnja 2019.)
25. N. Berova, K. Nakanishi, R.W. Woody, *Circular dichroism. Principles and Applications*, WILEY-VCH, New York, 2000, str. 747-754.
26. J.B. Chaires, Annu. Rev. Biophys. **37** (2008) 135-51
27. T. Mosmann, Journal of lmmunological Methods **65** (1983) 55-63.
28. M. V. Berridge, A. S. Tan, ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS **303** (1993) 474-482.
29. J. L. Bresloff, D. M. Crothers, Biochemistry **20** (1981) 3547-3553.

30. L. A. Marky, J. G. Snyder, K. J. Breslauer, *Calonmettic and spectoscopic investigation of drug- DNA interactions: H. Dipyrandium binding to poly d(AT),* Nucleic acids research **11 (16)** (1983) 5701-5715.

31. T. V. Chalikian, J. Völker, G. E. Plum,K. J. Breslauer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96** (1999) 7853-7858.

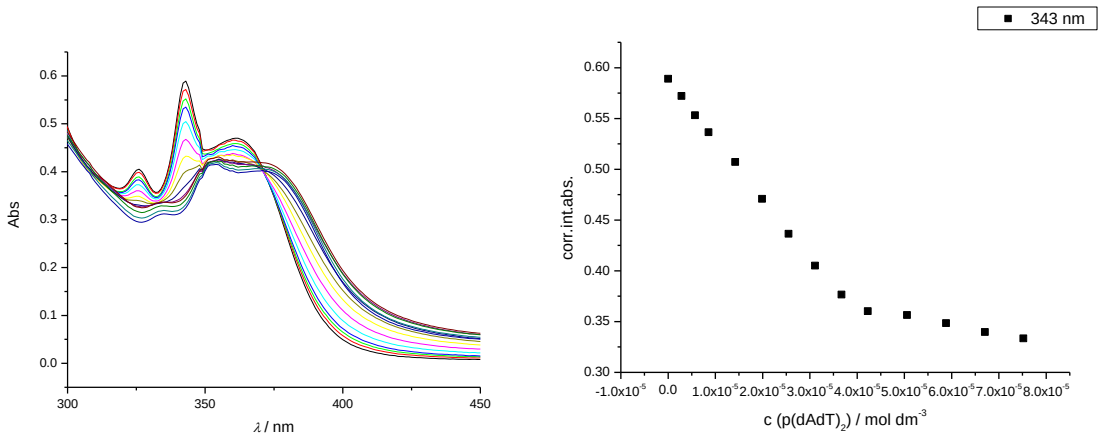
32. https://goldbook.iupac.org/html/I/I03310.html (datum pristupa: 5. veljače 2019.)

33. G. Scatchard, *The attractions of proteins for small molecules and ions,* Ann NY Acad Sci **51** (1949) 660-672.

34. J.D. Mc Ghee, P.H. von Hippel, *Theoretical aspects of DNA-protein interactions: Co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice,* J Mol Biol **86** (1974) 469-489.

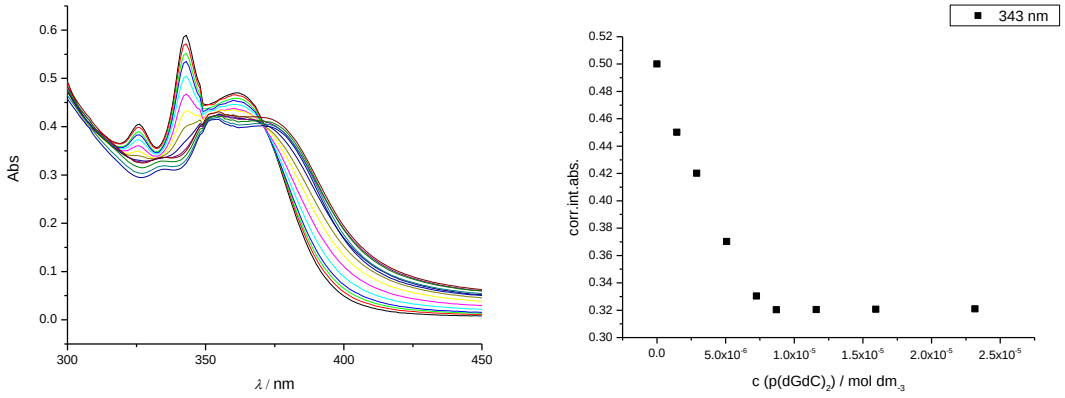
§ 8. DODATAK

UV/Vis spektri i spektralne promjene koje se događaju prilikom titracije SG224 s polinukleotidima ($p(dAdT)_2$, $p(dGdC)_2$, pApU, pA, pG, pC, pU, pdA i pdT) prikazane su na slikama D1-D9.



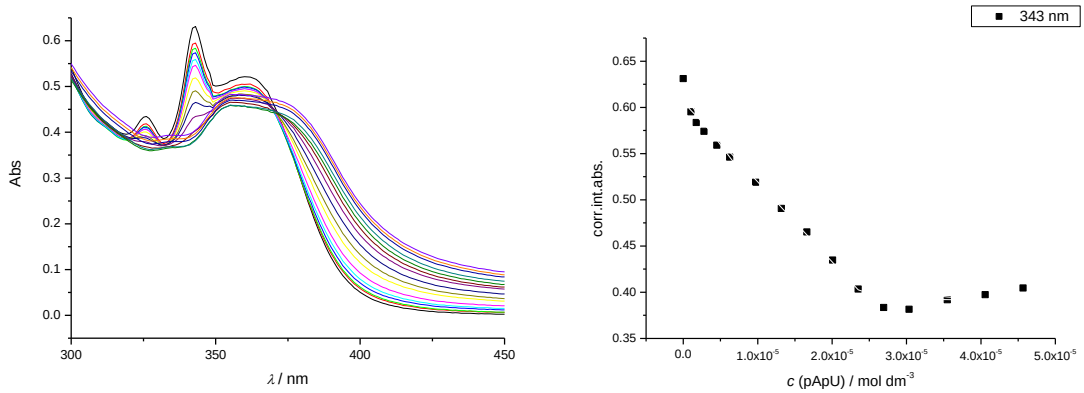
(a) (b)

Slika D1. (a) Promjene u UV/Vis spektru SG224 prikom titracije s $p(dAdT)_2$; (b) Pad apsorpcije spoja SG224 pri valnoj duljini maksimalne apsorpcije, λ_{max} = 343 nm, prilikom titracije spoja s $p(dAdT)_2$ (kakodilatni pufer, pH 7).



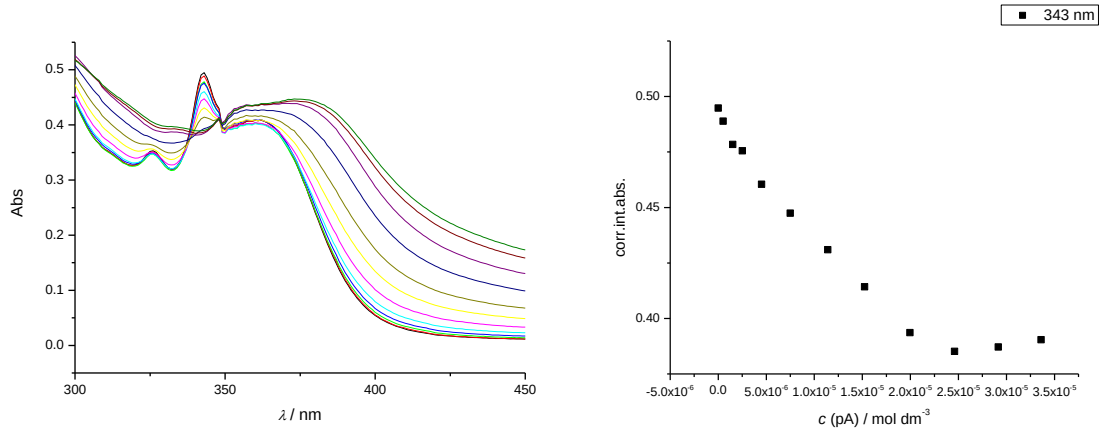
(a) (b)

Slika D2. (a) Promjene u UV/Vis spektru SG224 prikom titracije s $p(dGdC)_2$; (b) Pad apsorpcije spoja SG224 pri valnoj duljini maksimalne apsorpcije, λ_{max} = 343 nm, prilikom titracije spoja s $p(dGdC)_2$ (kakodilatni pufer, pH 7).



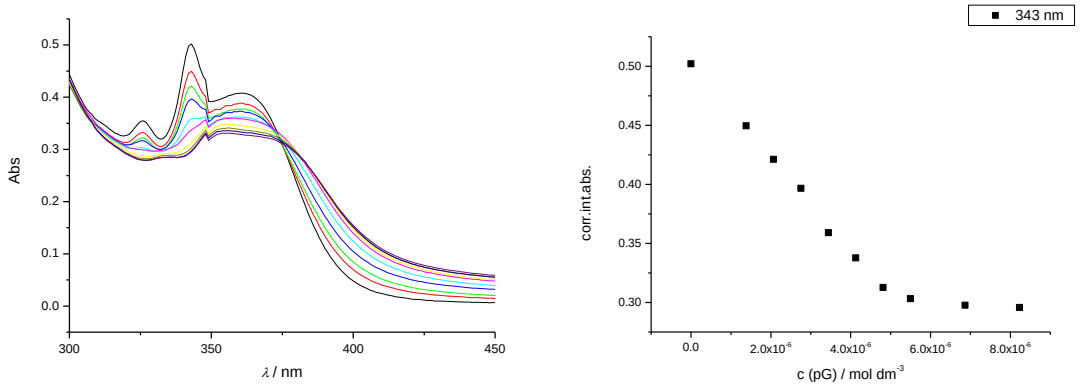
(a) (b)

Slika D3. (a) Promjene u UV/Vis spektru SG224 prikom titracije s pApU; (b) Pad apsorpcije spoja SG224 pri valnoj duljini maksimalne apsorpcije, λ_{max} = 343 nm, prilikom titracije spoja s pApU (kakodilatni pufer, pH 7).



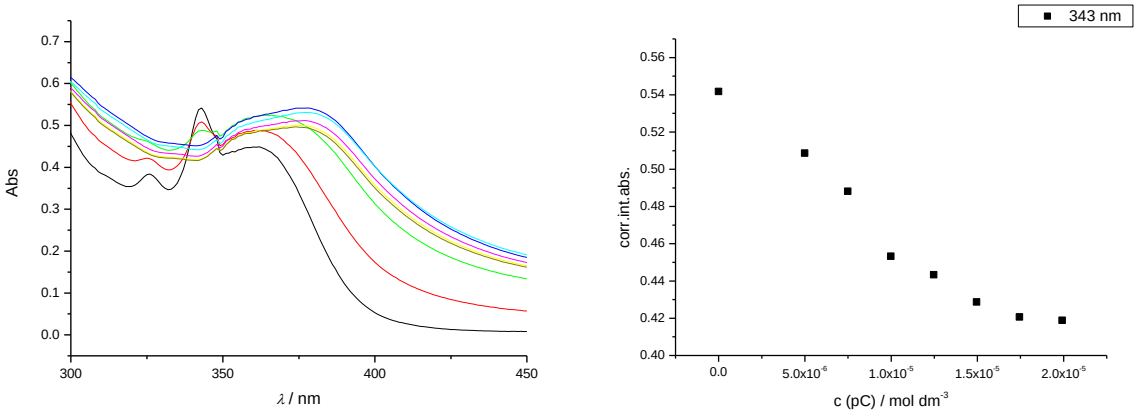
(a) (b)

Slika D4. (a) Promjene u UV/Vis spektru SG224 prikom titracije s pA; (b) Pad apsorpcije spoja SG224 pri valnoj duljini maksimalne apsorpcije, λ_{max} = 343 nm, prilikom titracije spoja s pA (kakodilatni pufer, pH 7).



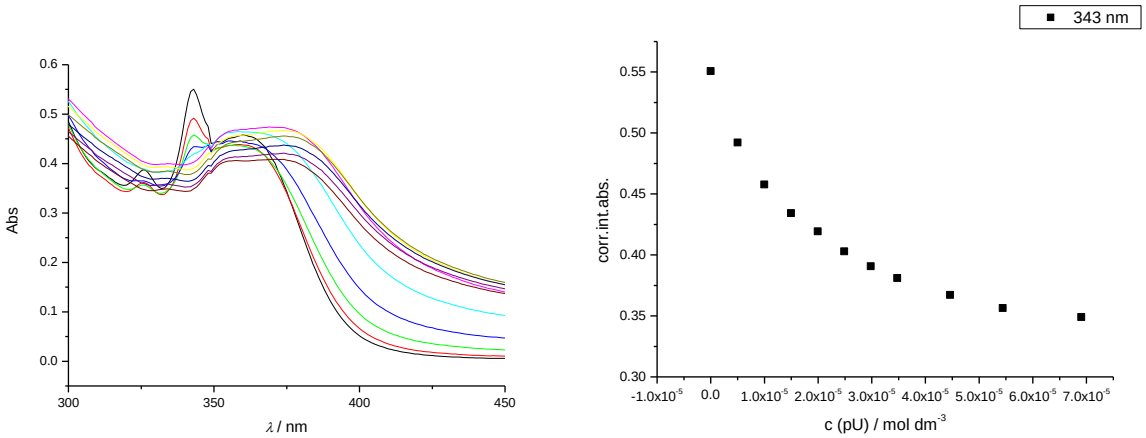
(a) (b)

Slika D5. (a) Promjene u UV/Vis spektru SG224 prikom titracije s pG; (b) Pad apsorpcije spoja SG224 pri valnoj duljini maksimalne apsorpcije, λ_{max} = 343 nm, prilikom titracije spoja s pG (kakodilatni pufer, pH 7).



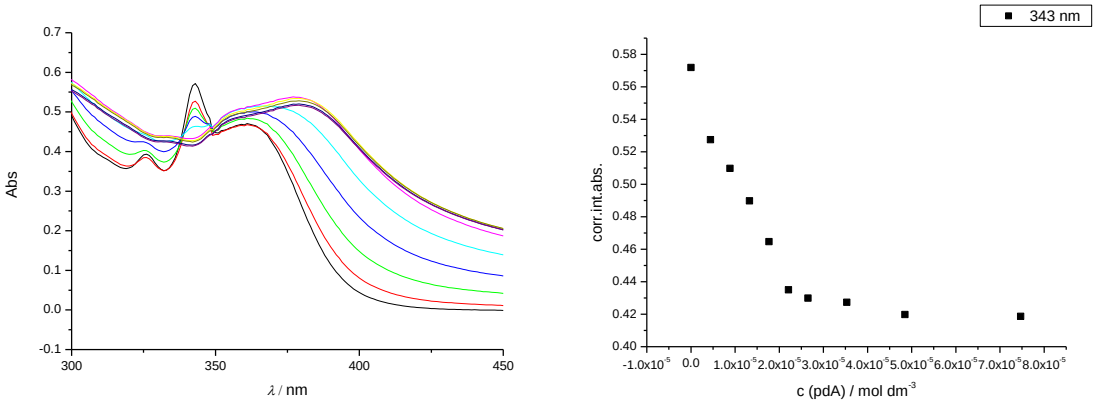
(a) (b)

Slika D6. (a) Promjene u UV/Vis spektru SG224 prikom titracije s pC; (b) Pad apsorpcije spoja SG224 pri valnoj duljini maksimalne apsorpcije, λ_{max} = 343 nm, prilikom titracije spoja s pC (kakodilatni pufer, pH 7).



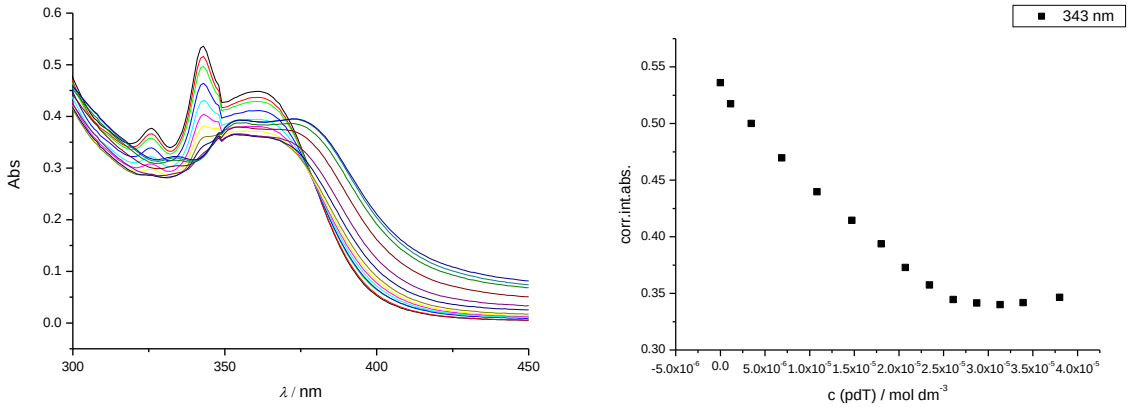
(a) (b)

Slika D7. (a) Promjene u UV/Vis spektru SG224 prikom titracije s pU; (b) Pad apsorpcije spoja SG224 pri valnoj duljini maksimalne apsorpcije, λ_{max} = 343 nm, prilikom titracije spoja s pU (kakodilatni pufer, pH 7).



(a) (b)

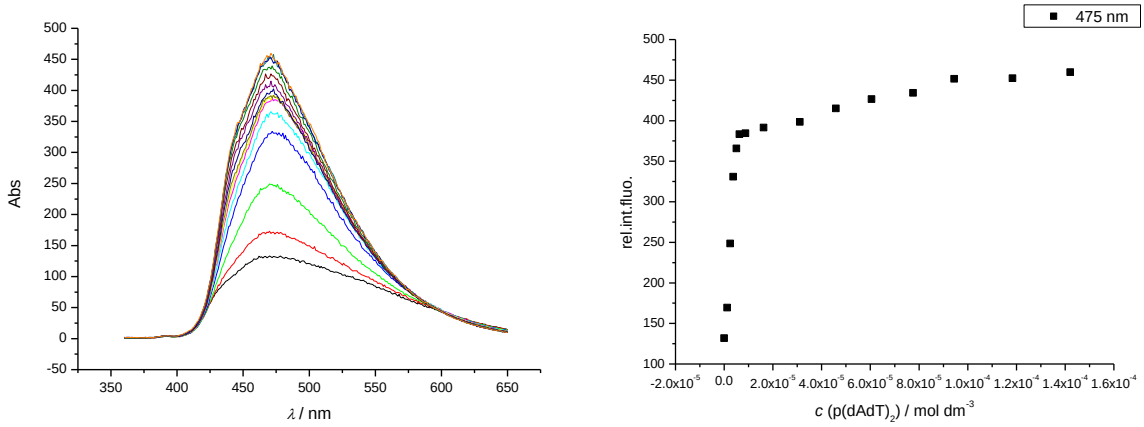
Slika D8. (a) Promjene u UV/Vis spektru SG224 prikom titracije s pdA; (b) Pad apsorpcije spoja SG224 pri valnoj duljini maksimalne apsorpcije, λ_{max} = 343 nm, prilikom titracije spoja s pdA (kakodilatni pufer, pH 7).



(a) (b)

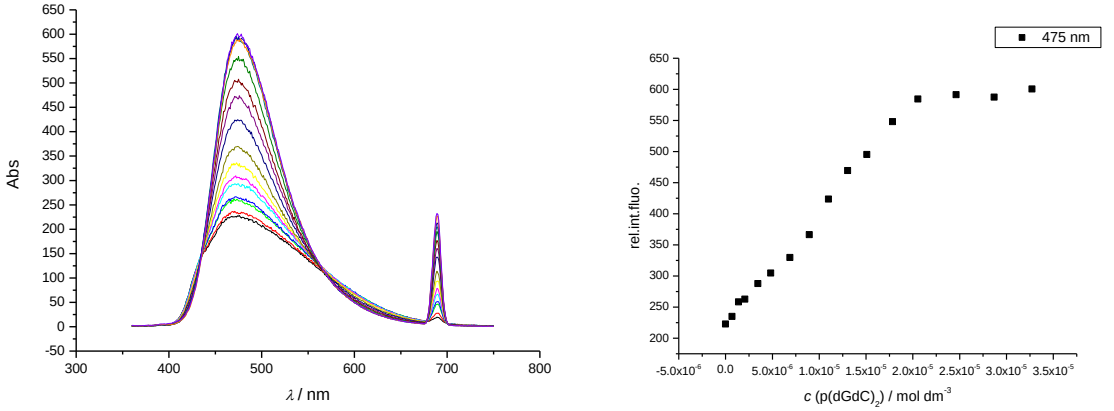
Slika D9. (a) Promjene u UV/Vis spektru SG224 prikom titracije s pdT; (b) Pad apsorpcije spoja SG224 pri valnoj duljini maksimalne apsorpcije, λ_{max} = 343 nm, prilikom titracije spoja s pdT (kakodilatni pufer, pH 7).

Fluorimetrijski spektri i spektralne promjene koje se događaju prilikom titracije SG224 s polinukleotidima ($p(dAdT)_2$, $p(dGdC)_2$, pApU, pA, pG, pC, pU, pdA i pdT) prikazane su na slikama D10-D18.



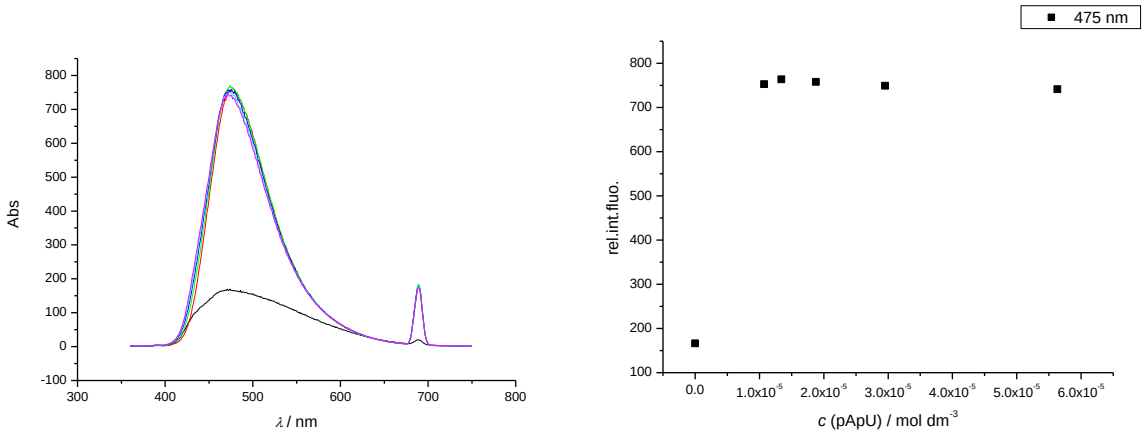
(a) (b)

Slika D10. (a) Promjene u fluorimetrijskom spektru SG224 prilikom titracije s $p(dAdT)_2$; (b) Pad apsorpcije spoja SG224 pri valnoj duljini maksimalne apsorpcije, λ_{max} = 475 nm, prilikom titracije spoja s $p(dAdT)_2$ (kakodilatni pufer, pH 7).



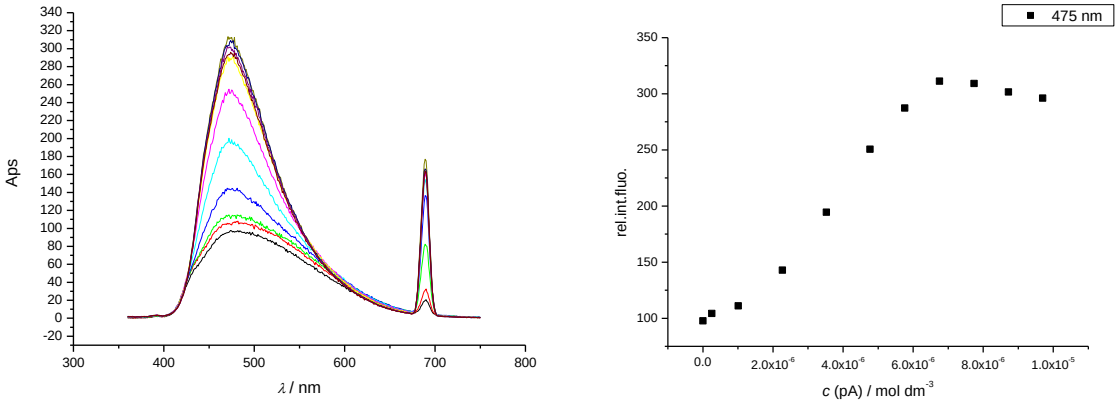
(a) (b)

Slika D11. (a) Promjene u fluorimetrijskom spektru SG224 prilikom titracije s $p(dGdC)_2$; (b) Pad apsorpcije spoja SG224 pri valnoj duljini maksimalne apsorpcije, λ_{max} = 475 nm, prilikom titracije spoja s $p(dGdC)_2$ (kakodilatni pufer, pH 7).



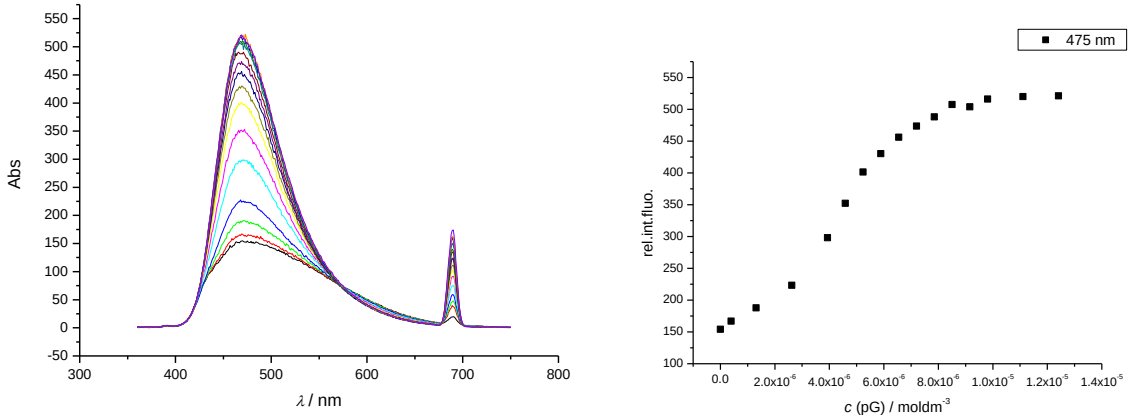
(a) (b)

Slika D12. (a) Promjene u fluorimetrijskom spektru SG224 prilikom titracije s pApU; (b) Pad apsorpcije spoja SG224 pri valnoj duljini maksimalne apsorpcije, λ_{max} = 475 nm, prilikom titracije spoja s pApU (kakodilatni pufer, pH 7).



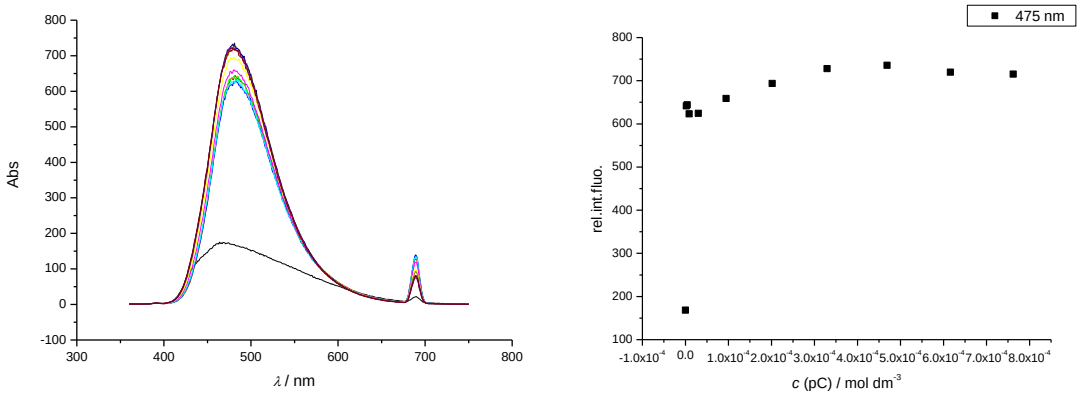
(a) (b)

Slika D13. (a) Promjene u fluorimetrijskom spektru SG224 prilikom titracije s pA; (b) Pad apsorpcije spoja SG224 pri valnoj duljini maksimalne apsorpcije, λ_{max} = 475 nm, prilikom titracije spoja s pA (kakodilatni pufer, pH 7).



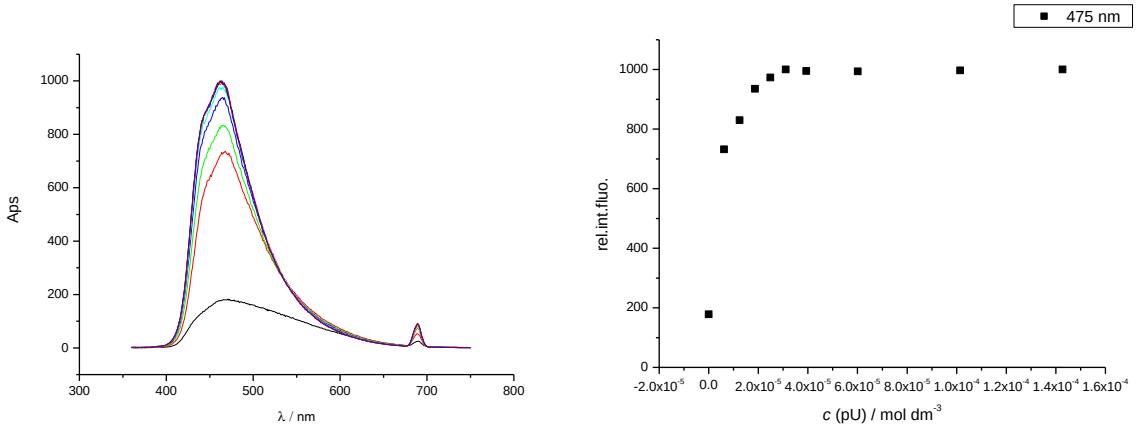
(a) (b)

Slika D14. (a) Promjene u fluorimetrijskom spektru SG224 prilikom titracije s pG; (b) Pad apsorpcije spoja SG224 pri valnoj duljini maksimalne apsorpcije, λ_{max} = 475 nm, prilikom titracije spoja s pG (kakodilatni pufer, pH 7).



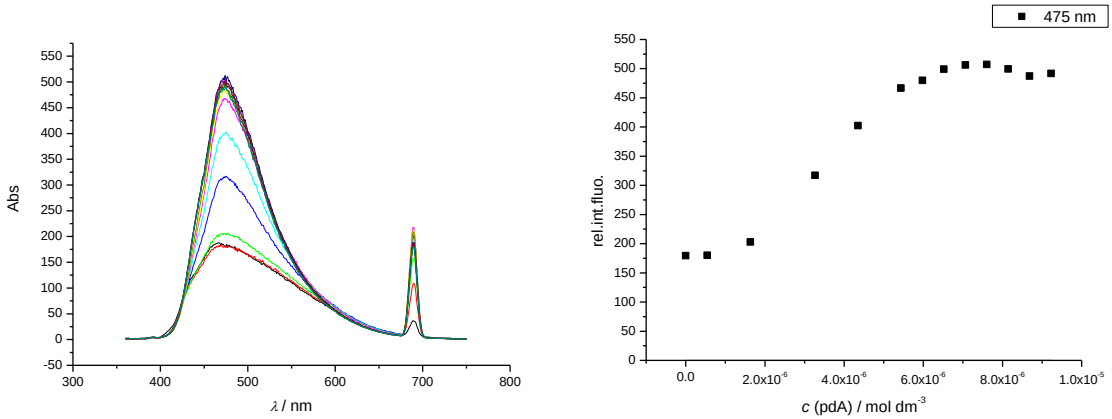
(a) (b)

Slika D15. (a) Promjene u fluorimetrijskom spektru SG224 prilikom titracije s pC; (b) Pad apsorpcije spoja SG224 pri valnoj duljini maksimalne apsorpcije, λ_{max} = 475 nm, prilikom titracije spoja s pC (kakodilatni pufer, pH 7).



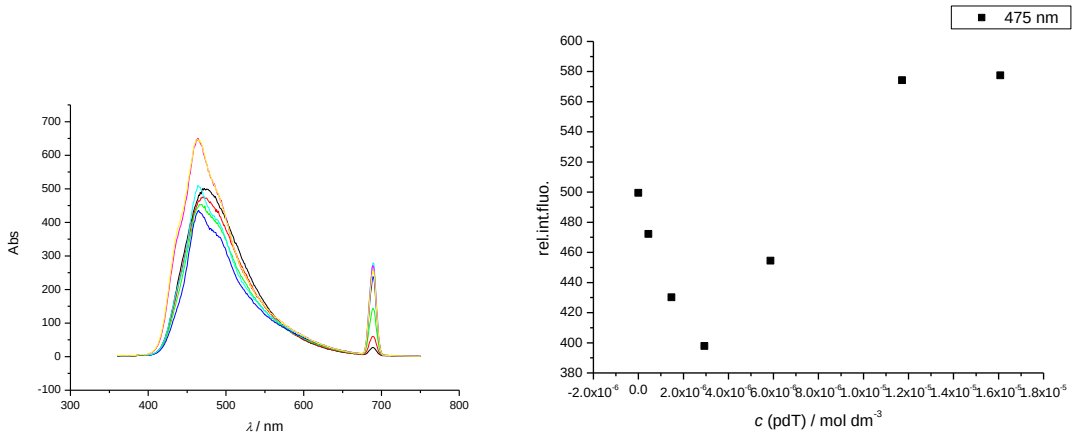
(a) (b)

Slika D16. (a) Promjene u fluorimetrijskom spektru SG224 prilikom titracije s pU; (b) Pad apsorpcije spoja SG224 pri valnoj duljini maksimalne apsorpcije, λ_{max} = 475 nm, prilikom titracije spoja s pU (kakodilatni pufer, pH 7).



(a) (b)

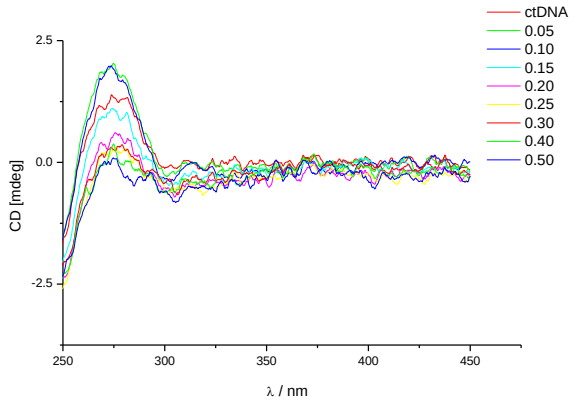
Slika D17. (a) Promjene u fluorimetrijskom spektru SG224 prilikom titracije s pdA; (b) Pad apsorpcije spoja SG224 pri valnoj duljini maksimalne apsorpcije, λ_{max} = 475 nm, prilikom titracije spoja s pdA (kakodilatni pufer, pH 7).



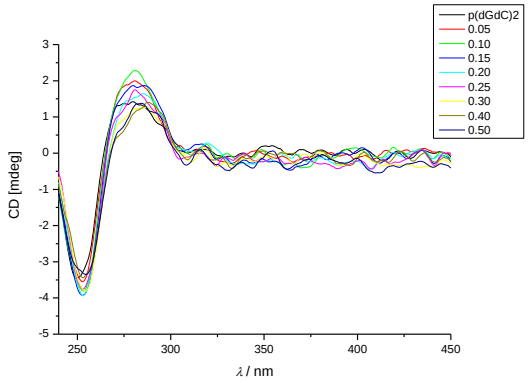
(a) (b)

Slika D18. (a) Promjene u fluorimetrijskom spektru SG224 prilikom titracije s pdT; (b) Pad apsorpcije spoja SG224 pri valnoj duljini maksimalne apsorpcije, λ_{max} = 475 nm, prilikom titracije spoja s pdT (kakodilatni pufer, pH 7).

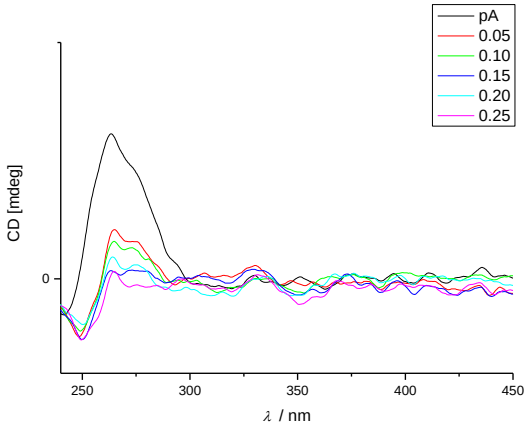
CD spektri dobiveni titracijom polinukleotida, *ct*DNA, $p(dGdC)_2$, pA, pC, pG i pU spojem SG224 u kakodilatnom puferu, pH 7, prikazani su na slici D19.



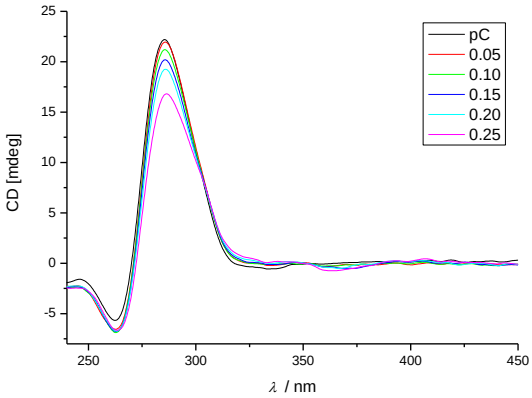
(a)



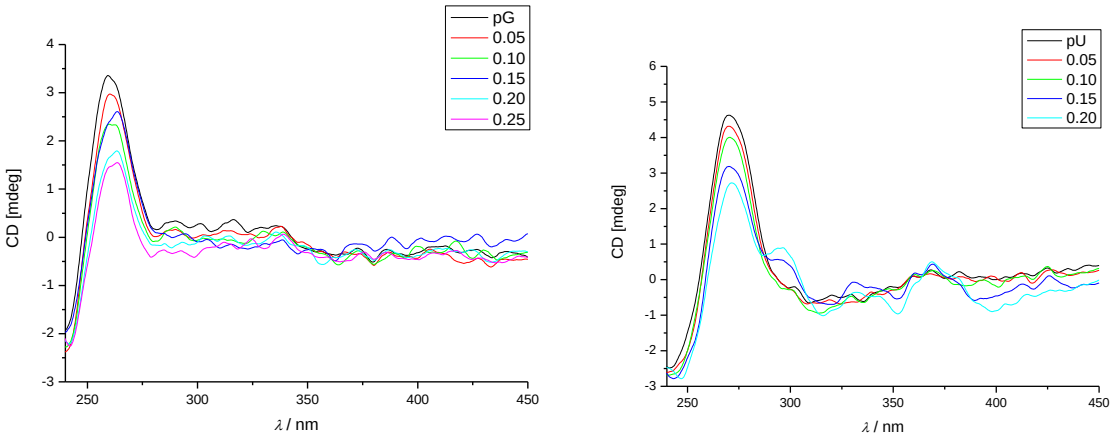
(b)



(c)



(d)



(e) (f)

Slika D19. (a) Promjena CD spektra polinukleotida *ct*DNA prilikom dodatka spoja SG224 pri različitim omjerima *r*; (b) Promjena CD spektra polinukleotida $p(dGdC)_2$ prilikom dodatka spoja SG224 pri različitim omjerima *r*; (c) Promjena CD spektra polinukleotida pA prilikom dodatka spoja SG224 pri različitim omjerima *r*; (d) Promjena CD spektra polinukleotida pC prilikom dodatka spoja SG224 pri različitim omjerima *r*; (e) Promjena CD spektra polinukleotida pG prilikom dodatka spoja SG224 pri različitim omjerima *r*; (f) Promjena CD spektra polinukleotida pU prilikom dodatka spoja SG224 pri različitim omjerima *r*;

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Matea Maslać

Datum rođenja: 10. listopada 1994.

Mjesto rođenja: Slavonski Brod

Obrazovanje

2001.–2009. Osnovna škola Đure Pilara, Slavonski Brod

2009.–2013. Klasična gimnazija fra Marijana Lanosovića s pravom javnosti, Slavonski Brod

2013.–2016. Preddiplomski studij kemije, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2014. Otvoreni dan kemije

2015. Smotra Sveučilišta