

Vibracijska dinamika tankih filmova soli deoksiribonukleinske kiseline

Serec, Kristina

Doctoral thesis / Disertacija

2016

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:217:858335>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

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





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
FIZIČKI ODSJEK

Kristina Serec

**VIBRACIJSKA DINAMIKA TANKIH
FILMOVA SOLI
DEOKSIRIBONUKLEINSKE KISELINE**

DOKTORSKI RAD

Mentor:
doc.dr.sc. Sanja Dolanski Babić

Zagreb, 2016.



UNIVERSITY OF ZAGREB
FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF PHYSICS

Kristina Serec

**VIBRATIONAL DYNAMICS OF THIN
FILMS OF SALT DEOXYRIBONUCLEIC
ACID**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Ass. Prof. Sanja Dolanski Babić, PhD

Zagreb, 2016.

Ovaj doktorski rad izrađen je na Zavodu za fiziku i biofiziku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Sanje Dolanski Babić.

Prije svega želim zahvaliti svojoj mentorici doc. dr. sc. Sanji Dolanski Babić na stručnim savjetima i raspravama tijekom pisanja znanstvenog rada i disertacije, te na vođenju kroza sve ove godine. Posebno joj zahvaljujem što je nesebično sa mnom provodila vrijeme na Zavodu subotama i nedjeljama kako bi ovaj rad bio što bolji, te na iskazanom strpljenju, brizi i lijepim riječima kada su mi bile najviše potrebne.

Zahvaljujem i svojoj „drugoj mentorici“ prof. dr. sc. Silviji Tomić, koja je prije godinu dana odlučila ući u naš mali tim kojem je posvetila puno svog truda i vremena. Zahvaljujem joj na sigurno tisuću mailova koje smo razmijenile u raspravama, te na vodstvu i pomoći pri pisanju znanstvenog rada i disertacije.

Veliko hvala i svim mojim kolegama sa Zavoda za fiziku, od kojih sam puno naučila. Maji Balarin posebno hvala na komentarima i raspravama vezanim uz interpretaciju spektara te na učestalom printanju slika, spektara i rada. Ozrenu Gamulinu zahvaljujem na pomoći s Kineticsom koji sam koristila prilikom obrade spektara. Marinu Kosoviću želim zahvaliti na diskusijama vezanim za znanstveni rad i disertaciju, te na velikoj moralnoj podršci svih ovih godina. Hvala i mom cimeru Marku Škrabiću koji bi uvijek spremno preuzeo moju nastavu i bio velika podrška.

Također zahvaljujem i prof. dr. sc. Rudolfu Podgorniku na pomoći pri pisanju znanstvenog rada, te dr. sc. Tomislavu Iveku na pomoći s programskim paketom Origin.

Želim zahvaliti i članovima komisije za obranu i ocjenu doktorata, prof. dr. sc. Damiru Veži, te izv. prof. dr. sc. Nenadu Pavinu na korisnim savjetima i sugestijama.

Zahvaljujem i svojoj obitelji na bezrezervnoj podršci, a posebno mojoj sestri Tihani koja je prije svega sastavila presudnu pro i con listu, te kroza sve faze prolazila sa mnom, od studija pa do sada.

I na kraju, veliko hvala mom Ivanu, bez kojeg sve ovo ne bi bilo moguće.

VIBRACIJSKA DINAMIKA TANKIH FILMOVA SOLI DEOKSIRIBONUKLEINSKE KISELINE

Sažetak

U ovoj doktorskoj disertaciji istraživana je utjecaj natrijevih i magnezijevih iona na strukturu i dinamiku deoksiribonukleinske kiseline (DNA) primjenom infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom na tankim filmovima DNA. Tanki filmovi DNA pripremljeni su iz niza otopina stalne koncentracije genomske DNA: Na-DNA (DNA s intrinzičnim kationima natrija) u čistoj vodi, 10 mM natrijevom kloridu i magnezijevom kloridu različitih ionskih jakosti, a Mg-DNA (DNA s intrinzičnim kationima magnezija) u čistoj vodi i magnezijevom kloridu različitih ionskih jakosti. Ovakav izbor uzoraka omogućio je istraživanje utjecaja, s jedne strane koncentracije dodane soli, a s druge strane kompeticije intrinzičnih i dodanih protuiona, na strukturu i konformaciju DNA. Pripravom tankih filmova iz otopina izbjegnuta je utjecaj vibracija vode na spektar DNA u području baza. Spektri tankih filmova dobivenih iz Na-DNA u otopini natrijevog klorida te Na-DNA u čistoj vodi pokazali su da je konformacija dvostruke uzvojnice (ds) ostala sačuvana nakon provođenja protokola sušenja pa je za referentni spektar uzet spektar tankog filma dobiven iz čiste vodene otopine Na-DNA. U cilju razumijevanja utjecaja kationa magnezija na strukturu DNA istraživana su vibracijska svojstva tankih filmova Na-DNA u MgCl_2 u širokom rasponu omjera koncentracija kationa i fosfata, $[\text{Mg}]/[\text{P}]$, od 0,0067 do 30. Dobiveni rezultati pokazali su da kationi magnezija već pri niskim koncentracijama ostvaruju interakciju s fosfatnim skupinama, a s daljnim povećanjem koncentracije i s bazama DNA preko dugodosežnih elektrostatskih sila. Pri najvećim omjerima $[\text{Mg}]/[\text{P}]$ diskutiran je prijelaz DNA iz konformacije dvostruke uzvojnice u kompaktnu formu na osnovu eksperimentalnih rezultata, ali i teorijski predviđene neutralizacije fosfatnih skupina dobivene Manningovim dvoparametarskim modelom. Istraživana su i vibracijska svojstva tankih filmova Mg-DNA u čistoj vodi i Mg-DNA u MgCl_2 u intervalu omjera $[\text{Mg}]/[\text{P}]$ od 0,0067 do 10 te su rezultati uspoređeni s rezultatima dobivenim za Na-DNA u istom koncentracijskom rasponu. Spektri tankih filmova Mg-DNA u čistoj vodi pokazali su nešto drugačija vibracijska svojstva u odnosu na Na-DNA u čistoj vodi te je uočen znatno veći udio B forme DNA. Pri niskim koncentracijama magnezijevih iona ($[\text{Mg}]/[\text{P}] < 1$) spektri tankih filmova Na-DNA u MgCl_2 i Mg-DNA u MgCl_2 su različiti što se

može pripisati utjecaju intrinzičnih natrijevih iona i intrinzičnih magnezijevih iona na DNA. S druge strane, pri višim koncentracijama magnezijevih iona, Na-DNA u MgCl_2 i Mg-DNA u MgCl_2 pokazuju slična vibracijska svojstva.

KLJUČNE RIJEČI: tanki filmovi DNA, FTIR spektroskopija, Na^+ ioni, Mg^{2+} ioni, kompaktiranje

Datum obrane: 17.11.2016.

Povjerenstvo za obranu:

Prof. dr. sc. Silvia Tomić (Predsjednik povjerenstva), IF Zagreb

Prof. dr. sc. Damir Veža, PMF Zagreb

Doc. dr. sc. Sanja Dolanski Babić (Mentor), Medicinski fakultet Zagreb

VIBRATIONAL DYNAMICS OF THIN FILMS OF SALT DEOXYRIBONUCLEIC ACID

Abstract

In this doctoral thesis, the impact of sodium and magnesium ions on the structure and dynamics of deoxyribonucleic acid (DNA) was investigated utilizing Fourier transform infrared spectroscopy on DNA thin films. DNA thin films were obtained from a series of genomic DNA solutions of constant DNA concentration: Na-DNA (DNA with intrinsic sodium counterions) in pure water, 10 mM sodium chloride and magnesium chloride of various ionic strengths, and Mg-DNA (DNA with intrinsic magnesium counterions) in pure water and magnesium chloride of various ionic strengths. Such a choice of samples allowed the research of the effect of the concentration of the added salt as well as of the competition of intrinsic and added counterions on DNA structure and conformation. By preparation of thin films from solutions the influence of vibrational bands of bulk water that would impede the proper detection of DNA vibrational bands in the base region was avoided. Spectra of thin films obtained from Na-DNA in solution of sodium chloride and Na-DNA in pure water have shown that DNA retains its double helical structure (ds) under drying protocol so the spectrum of Na-DNA in pure water was chosen as a reference. In order to address how the behaviour of DNA evolves upon progressive addition of Mg^{2+} cations, an extensive investigation of infrared vibrational properties of Na-DNA in a broad range of added magnesium chloride salt concentration with cation to phosphate ratio, $[\text{Mg}]/[\text{P}]$, between 0.0067 and 30 was performed. The obtained results revealed that at low magnesium concentrations the magnesium cations interact with the phosphate groups of the DNA, while with the further increase of magnesium concentration they interact with the base sites as well, via long-range electrostatic interactions. At highest $[\text{Mg}]/[\text{P}]$ ratios the possibility of structural transition into a more compact form is discussed based on both the experimental results and calculations of DNA charge neutralization by Manning's two variable condensation theory. The vibrational properties of Mg-DNA in pure water and Mg-DNA in a broad range of added magnesium chloride salt concentrations with cation to phosphate ratio, $r=[\text{Mg}]/[\text{P}]$, between 0.0067 and 10 were investigated and compared with the results of Na-DNA in the same concentration range. The spectra of thin films Mg-DNA in pure water showed slightly different vibrational properties than Na-DNA in pure water and a significantly higher portion of B form DNA was observed. At low concentrations of

magnesium ions ($r < 1$) spectra of Na-DNA in MgCl_2 and Mg-DNA in MgCl_2 show substantial differences which were attributed to the influence of the intrinsic sodium and magnesium ions on DNA. On the other hand, Na-DNA in MgCl_2 and Mg-DNA in MgCl_2 at higher concentrations of magnesium ions show similar vibrational properties.

KEYWORDS: thin films DNA, FTIR spectroscopy, Na^+ ions, Mg^{2+} ions, compacting

Date of thesis defence: 17.11.2016.

Thesis committee:

Prof. dr. sc. Silvia Tomić (Committee Chair), IF Zagreb

Prof. dr. sc. Damir Veža, PMF Zagreb

Doc. dr. sc. Sanja Dolanski Babić (Mentor), Medicinski fakultet Zagreb

Sadržaj

Sažetak	i
Abstract	iii
Sadržaj	v
Popis slika	viii
Popis skraćenica	x
Poglavlje 1. Uvod	1
1.1 Struktura i konformacija DNA	5
1.1.1 Građa nukleotida	6
1.1.2 Interakcije između nukleotida- sekundarna struktura	9
1.1.3 A i B forma dvostruke uzvojnice	14
1.1.4 Raspodjela naboja u nukleotidu	16
1.1.5 Interakcija kationa i DNA	18
1.1.6 Denaturacija DNA	20
1.1.7 Kompaktiranje DNA	21
1.2 DNA kao polielektrolit	23
1.2.1 Ionska atmosfera DNA	23
1.2.2 Poisson- Boltzmannova jednačba	25
1.2.3 Debye-Hückelova aproksimacija	28
1.2.4 Manningova teorija kondenzacije	30
1.3 Osnove infracrvene spektroskopije	34
1.3.1 Vibracije molekula- normalni modovi	34
1.3.2 Infracrvene aktivne vibracije	35

1.3.3	Grupne i skeletne vibracije	36
1.3.4	Vibracije DNA	38
1.4	Osnove UV spektrofotometrije	40
Poglavlje 2.	Materijali i mjerne tehnike	43
2.1	Priprema uzoraka	43
2.1.1	Protokoli pripreme vodenih otopina	43
2.1.2	Protokol pripreme tankih filmova.....	46
2.2	Mjerne tehnike	48
2.2.1	Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom	48
2.2.2	UV spektrofotometrija	50
2.2.3	pH mjerenja.....	50
Poglavlje 3.	Rezultati i diskusija	51
3.1	Na-DNA u 10 mM NaCl	51
3.1.1	Osnovne vibracije u spektru Na-DNA u 10 mM NaCl	51
3.1.2	A i B forma Na-DNA i IR spektar.....	57
3.2	Na-DNA u čistoj vodi.....	58
3.3	Na-DNA u MgCl ₂	62
3.3.1	Utjecaj magnezijevih iona na IR spektar DNA.....	62
3.3.2	Interakcije magnezijevih iona s DNA okosnicom	67
3.3.3	Interakcije magnezijevih iona s bazama	70
3.3.4	UV spektrofotometrija	72
3.3.5	Neutralizacija naboja fosfatnih skupina.....	74
3.3.6	Mogućnost kompaktiranja DNA u prisustvu magnezijevih iona.....	78
3.4	Mg-DNA u čistoj vodi.....	80
3.4.1	Usporedba spektara tankih filmova Na-DNA i Mg-DNA u čistoj vodi.....	80
3.5	Mg-DNA u MgCl ₂	82
3.5.1	Interakcija magnezijevih iona s Mg-DNA	82
3.5.2	Usporedba Na-DNA i Mg-DNA u MgCl ₂	86
Poglavlje 4.	Zaključak	89
	Popis literature	93
	Životopis.....	97

Popis radova	99
Kazalo.....	100

Popis slika

Slika 1.1 Shematski prikaz dvostruke uzvojnice DNA.....	5
Slika 1.2 Građa nukleotida	6
Slika 1.3 Dušične baze	7
Slika 1.4 Fosfodiester veza	7
Slika 1.5 Torzijski kutevi u DNA	8
Slika 1.6 Konformacija šećera (C3'-endo i C2'-endo).....	9
Slika 1.7 Potencijalna donorska i akceptorska mjesta vodikovih veza na bazama	10
Slika 1.8 Watson-Crick parovi baza i veliki i mali utori.....	12
Slika 1.9 Vertikalno slaganje baza.....	13
Slika 1.10 Dvostruka uzvojnica DNA u A i B formi.....	15
Slika 1.11 Gustoća naboja u nukleotidu	17
Slika 1.12 Interakcija magnezija i gvanina	20
Slika 1.13 Slika kompaktirane DNA λ bakteriofaga <i>in vitro</i> uz pomoć trovalentnog iona kobalt heksamina dobivena krioelektronskom mikroskopijom	22
Slika 1.14 Sastav polielektrolita.....	23
Slika 1.15 Kompeticija natrijevih i magnezijevih iona praćena BE-AE spektroskopijom, Bai i suradnici	24
Slika 1.16 Raspodjela koncentracije iona oko DNA kao funkcija udaljenosti od DNA, Yoo i Aksimentiev.....	25
Slika 1.17 Simetrična i asimetrična istezna vibracija CO ₂	36
Slika 1.18 Denaturacija ds DNA	41
Slika 2.1 Končici natrijeve soli genomske DNA	43
Slika 2.2 Shematski prikaz svih pripremljenih i analiziranih otopina	46
Slika 2.3 Tanki film Na-DNA u čistoj vodi na silicijevom nosaču.	47

Slika 2.4 Valni broj asimetrične PO_2 vibracije kao funkcija relativne vlage, autori Pohle i suradnici	48
Slika 2.5 Korekcija osnovne linije infracrvenog spektra	49
Slika 3.1 FTIR spektar tankih filmova Na-DNA u 10 mM NaCl	52
Slika 3.2 Asignacija vibracija baza	53
Slika 3.3 FTIR spektar tankog filma Na-DNA u čistoj vodi	59
Slika 3.4 FTIR spektar tankih filmova Na-DNA u 10 mM NaCl i Na-DNA u čistoj vodi	60
Slika 3.5 FTIR spektri tankih filmova Na-DNA u MgCl_2 za $r=0,15$ i 1	63
Slika 3.6 FTIR spektri tankih filmova Na-DNA u MgCl_2 za $r=5, 10, 20$ i 30	64
Slika 3.7 Intenzitet i valni broj asimetrične PO_2 vibracije za Na-DNA u MgCl_2	66
Slika 3.8 Intenziteti i valni brojevi A i B markera za Na-DNA u MgCl_2	67
Slika 3.9 Udio A i B forme u Na-DNA	69
Slika 3.10 Intenziteti i valni brojevi vibracija baza za Mg-DNA u MgCl_2	72
Slika 3.11 UV spektri Na-DNA u čistoj vodi i Na-DNA u MgCl_2 otopini	73
Slika 3.12 Ekstinkcijski koeficijent	74
Slika 3.13 Neutralizacija naboja fosfatnih skupina kondenziranim protuionima natrija θ_{Na} i magnezija $2\theta_{\text{Mg}}$	76
Slika 3.14 Neutralizacija naboja fosfatnih skupina	77
Slika 3.15 Ukupni naboj ionske atmosfere, simulacija molekulske dinamike autora Yoo i Aksimentiev	78
Slika 3.16 Usporedba FTIR spektara tankih filmova Na-DNA i Mg-DNA u čistoj vodi	81
Slika 3.17 FTIR spektri tankih filmova Mg-DNA u MgCl_2 za $r = 0,15, 0,7$ i 10	83
Slika 3.18 Intenzitet i valni broj asimetrične PO_2 vibracije za Mg-DNA u MgCl_2	84
Slika 3.19 Intenziteti i valni brojevi A i B markera za Mg-DNA u MgCl_2	85
Slika 3.20 Intenziteti i valni brojevi vibracija baza za Mg-DNA u MgCl_2	86
Slika 3.21 Usporedba intenziteta i valnih brojeva asimetrične PO_2 vibracije Na-DNA u MgCl_2 i Mg-DNA u MgCl_2	87
Slika 3.22 Debyeova duljina zasjenjenja κ^{-1} kao funkcija $r = [\text{Mg}]/[\text{P}]$ za model Na-DNA u MgCl_2 i Mg-DNA u MgCl_2	88

Popis skraćenica

bp – par baza (eng. base pair)

BE-AE spektroskopija – pufer ekvibracijska atomska emisijska spektroskopija (eng. buffer equilibration and atomic emission spectroscopy, BE-AES)

DFT – (eng. density function theory)

DH – Debye-Hückelova

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (eng. deoxyribonucleic acid)

ds – dvostruka uzvojnica (eng. double stranded)

FTIR – spektroskopija s Fourierovom transformacijom

Na-DNA – DNA s intrinzičnim ionima natrija

Mg-DNA – DNA s intrinzičnim ionima magnezija

PB – Poisson-Boltzmannova

ss – jednolančana DNA (eng. single stranded)

UV spektrofotometrija – ultraljubičasta spektrofotometrija

Poglavlje 1. Uvod

Deoksiribonukleinska kiselina (DNA) je biološka makromolekula ili biopolimer koja bilježi i prenosi genetski kod te je odgovorna za rast, razvoj i funkcioniranje stanica svih živih organizama (1). Struktura, konformacija i interakcija DNA s okolišom igraju ključnu ulogu u određivanju fizioloških procesa, pa je tijekom više desetljeća mnogo truda uloženo kako bi se poboljšao opis i razumijevanje ponašanja DNA u različitim okruženjima. U biološkom okruženju, vodenoj otopini, DNA disocira na negativno nabijen polion i protuione - mnoštvo malih naboja koji ju neutraliziraju. Protuioni s ostalim ionima disociranim u vodenoj otopini čine ionsku atmosferu, koja snažno elektrostatski djeluje s polionom DNA te utječe na strukturu i konformaciju makromolekule. Strukturne promjene DNA obuhvaćaju promjene vezane uz građu molekule, vodikove veze i vertikalno slaganje baza, dok konformacijske promjene uključuju promjene vezane za uzvojnici poput denaturacije, forme DNA (A, B, Z forma) te kompaktiranja.

Uz duljinu i koncentraciju poliona u vodenoj otopini vrlo značajnu ulogu na strukturu i konformaciju DNA imaju kationi jer određuju elektrostatske interakcije (2-4). Njihova specifična svojstva poput valencije, veličine, hidratacijske ljuske i elektronske konfiguracije određuju mjesto i način interakcije kationa s DNA. Stoga se brojnim tehnikama poput spektroskopije cirkularnog dikroizma (CD spektroskopija), UV spektrofotometrije, mjerenja ravnotežne sedimentacije (eng. sedimentation equilibrium measurements) te Raman i infracrvene spektroskopije (1,5-9), pokušao riješiti problem strukture i konformacije DNA u prisutnosti raznih kationa. S druge strane, tehnikama poput raspršenja X-zraka pod malim kutovima (SAXS), dielektrične spektroskopije i pufer ekvibracijske atomske emisijske spektroskopije (eng. buffer equilibration and atomic emission spectroscopy, BE-AES) te simulacijama molekulske dinamike, pokušalo se riješiti pitanje raspodjele iona te dosega ionske atmosfere (1,10-13).

Vibracijska istraživanja DNA, koja su se bavila molekulskom strukturom genomske ili sintentizirane DNA u vodenom okruženju datiraju još iz 1960-tih. Ubrzo se počelo rješavati i pitanje utjecaja raznih kationa na vibracijska svojstva DNA, međutim ono do danas nije sasvim riješeno. Tijekom mnogih godina, provedena su istraživanja infracrvenom i Raman spektroskopijom (8,9,14-21), kako bi se identificirala glavna mjesta interakcije kationa i DNA. Rezultati istraživanja su pokazali da fosfatne skupine DNA te elektron donorske grupa baza, kao što su karbonilne skupine i atomi dušika, interagiraju s kationima. Također se pokazalo da interakcija znatno ovisi o vrsti kationa, te njihovoj koncentraciji i stupnju hidratacije. Za neke dvovalentne katione, kao što su kationi zemnoalkalijskih metala Mg^{2+} i Ca^{2+} , predloženo je vezanje ponajprije na fosfatne skupine, putem elektrostatskih interakcija koje neutraliziraju negativan naboj okosnice DNA i na taj način stabiliziraju dvostruku uzvojnica DNA (22). Predloženi su i različiti mehanizmi vezanja kationa na DNA koji uključuju ne samo elektrostatske interakcije (8,15), već i kovalentno vezanje (20). Ipak, novija teorijska istraživanja ukazuju da su interakcije zemnoalkalijskih metala i DNA uglavnom nespecifične elektrostatske (10,23).

Od posebnog interesa uvijek je bila DNA u otopini natrijevog klorida jer je fiziološka otopina najvećim dijelom otopina NaCl. Liofilizirana genomska DNA, dostupna na tržištu, je natrijeva sol DNA. U fiziološkoj otopini osim iona natrija nalaze se i brojni drugi kationi, a autori često otapaju DNA u raznim puferima (npr. natrijev kakodilat i TRIS EDTA pufer) koji održavaju pH otopine te na taj način stabiliziraju strukturu DNA. U slučaju kada se DNA nalazi u prisutnosti brojnih kationa i/ili pufera teško je razlučiti djelovanje pojedine vrste kationa na DNA. Stoga smo razvili pristup sustavnog istraživanja utjecaja jedne ili dvije vrste kationa na strukturu i konformaciju DNA. Utjecaj jedne vrste kationa na DNA je lakše analizirati jer je sistem DNA i kationa dobro definiran. U slučaju DNA i dvije vrste kationa, kationi se natječu za neutralizaciju fosfatnih skupina pa je interpretacija rezultata kompleksnija, ali je bliža realnim uvjetima.

U literaturi također postoje i istraživanja utjecaja magnezija i drugih kationa na DNA, ali u ograničenom području koncentracija dodane soli. Stoga smo odlučili istraživati vibracijska svojstva DNA u prisutnosti kationa magnezija, i to u širokom rasponu koncentracija Mg^{2+} .

U istraživanju smo primjenjivali infracrvenu spektroskopiju s Fourierovom transformacijom (FTIR), prepoznatu kao nedestruktivnu i moćnu tehniku za ispitivanje vibracijske dinamike DNA čvrsto povezane s njezinim strukturnim svojstvima. Također, u svrhu praćenja strukturnih promjena DNA, napravljena su i mjerenja UV spektrofotometrijom. Tako je pripremljen niz DNA otopina u kojima je koncentracija DNA stalna, ali je zato varirana koncentracija dodane soli. Kako bi se izbjegao utjecaj vibracija vode na vibracije DNA u području baza, razvijen je protokol pripreme tankih filmova iz otopina DNA na kojima su onda snimani FTIR spektri.

Doktorski rad podijeljen je na 4 tematske cjeline: *Uvod*, *Materijale i mjerne tehnike*, *Rezultate i diskusiju* te *Zaključak*. U *Uvodu* je detaljno opisana struktura i ionska atmosfera DNA. Potom je predstavljena Manningova teorija kondenzacije, koja opisuje raspodjelu protuiona u otopini DNA, u slučaju jedne ili dvije vrste kationa. Na kraju su predstavljene osnove infracrvene spektroskopije s osvrtom na vibracije DNA te osnove UV spektrofotometrije. U poglavlju *Materijali i mjerne tehnike* opisani su protokoli pripreme vodenih otopina i tankih filmova DNA te detalji vezani uz eksperimentalne tehnike primijenjene u istraživanju. U poglavlju *Rezultati i diskusija* predstavljeni su rezultati dobiveni FTIR spektroskopijom na tankim filmovima pripremljenim iz 5 vrsta otopina: Na-DNA u otopini 10 mM natrijevog klorida, Na-DNA u čistoj vodi, Na-DNA u otopini magnezijevog klorida, Mg-DNA u čistoj vodi te Mg-DNA u otopini magnezijevog klorida.

Prvi dio rezultata i diskusije (potpoglavlje 3.1 i potpoglavlje 3.2) temelji se na istraživanju vibracijske dinamike tankih filmova dobivenih iz Na-DNA u otopini natrijevog klorida te Na-DNA u čistoj vodi. Ujedno je dan i pregled najvažnijih vibracija, koji slijedi njihova detaljna interpretacija.

Drugi dio rezultata i diskusije (potpoglavlje 3.3) obuhvaća utjecaj postepenog dodavanja magnezijevih kationa na vibracijska svojstva Na-DNA u širokom rasponu omjera koncentracija iona magnezija i fosfata, $[Mg]/[P]$, od 0,0067 do 30, na kakav nismo naišli u literaturi. U ovom sistemu DNA se nalazi u prisustvu dvije vrste kationa koji se natječu za neutralizaciju fosfatnih skupina što je komentirano na temelju eksperimentalnih rezultata, ali i Manningove dvoparametarske teorije kondenzacije. Također, diskutirana je mogućnost

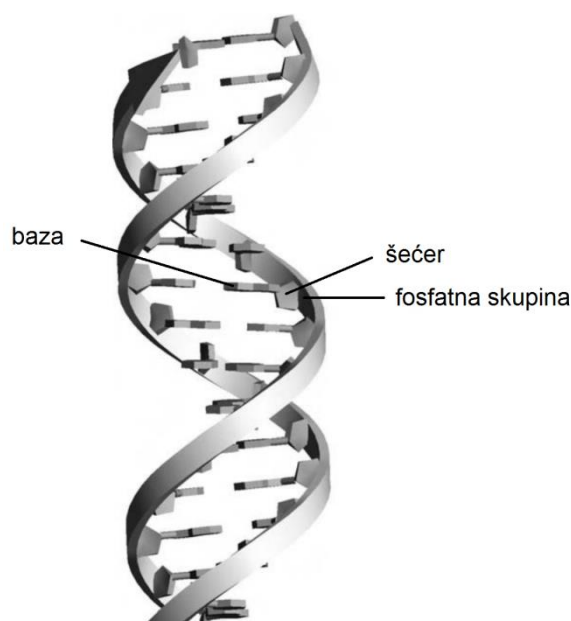
prijelaza DNA u kompaktnu formu pri najvećim omjerima $[Mg]/[P]$, kada neutralizacija DNA tzv. bliskim protuionima dosegne 92-94%.

Dalje su u potpoglavljima 3.4 i 3.5 prikazani rezultati istraživanja vibracijskih svojstava tankih filmova pripremljenih iz otopina Mg-DNA (DNA s intrinzičnim ionima magnezija proizvedena dijalizom) u čistoj vodi i Mg-DNA u otopini magnezijevog klorida u rasponu omjera $[Mg]/[P]$, od 0,0067 do 10. Mg-DNA u čistoj vodi i Mg-DNA u magnezijevom kloridu opisuju ponašanje DNA u prisutnosti jedne, dobro definirane vrste protuiona. Također, dobiveni rezultati uspoređeni su s rezultatima Na-DNA u magnezijevom kloridu u istom koncentracijskom rasponu iona magnezija.

U *Zaključku* su navedeni najbitniji rezultati provedenog istraživanje te perspektive budućih istraživanja.

1.1 Struktura i konformacija DNA

Deoksiribonukleinska kiselina (eng. deoxyribonucleic acid – DNA) je biopolimer sastavljen od dva lanca molekula koji su međusobno uvijeni jedan oko drugog u oblik dvostruke uzvojnice (eng. double stranded - ds) (Slika 1.1) (1,24-27). Svaki lanac DNA sastoji se od niza nukleotida, a svaki nukleotid se sastoji od fosfatne skupine, šećera i dušične baze (adenin, citozin, gvanin i timin). Fosfatne skupine i šećeri čine okosnicu DNA koja je nepromjenjiva duž molekule i okrenuta prema otapalu, dok se baze DNA nalaze u unutrašnjem dijelu uzvojnice. Promjer uzvojnice iznosi oko 2 nm dok je razmak između susjednih baza oko 0,34 nm.



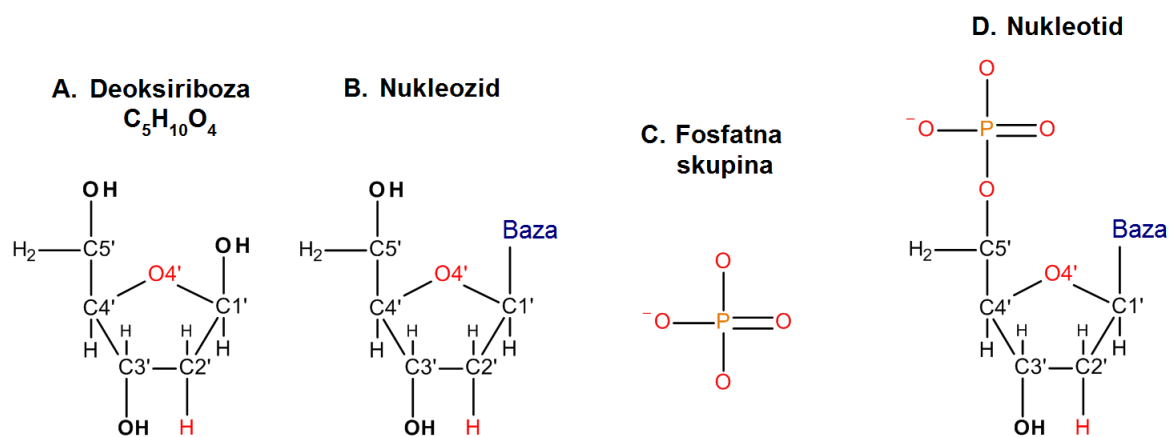
Slika 1.1 Shematski prikaz dvostruke uzvojnice DNA. Slika preuzeta iz (26).

Fosfatne skupine disociraju u vodi i nose negativan naboj u iznosu od $-1e$, pa jedan par baza nosi naboj od $-2e$ (e = elementarni naboj). To čini DNA visoko nabijenim polimerom linearne gustoće naboja $-2e/0,34$ nm. Međutim, otopina DNA je neutralna, pa je negativno nabijen polion DNA okružen ionima suprotnog naboja - protuionima. Možemo reći da je DNA polielektrolit koji se sastoji od poliiona i ionskog oblaka - ionske atmosfere. Snažno elektrostatsko međudjelovanje poliiona i ionske atmosfere postavlja temelj osnovnih karakteristika DNA, odnosno njezine strukture i konformacije. U daljnjem tekstu je prvo je

detaljno predstavljena struktura i konformacija DNA (građa nukleotida, te A i B forma dvostruke uzvojnice), a zatim i glavni koncepti ionske atmosfere DNA.

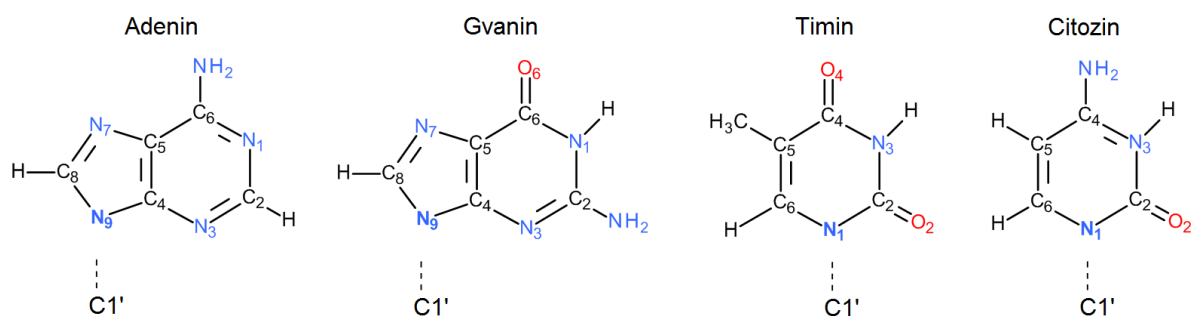
1.1.1 Građa nukleotida

Nukleotid je osnovna sastavna jedinica (monomer) deoksiribonukleinske kiseline (1,24-27). Svaki nukleotid sastoji se od: fosfatne skupine (PO_4^-), šećera (pentoza deoksiriboze, $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_4$) te jedne od četiri dušične baze (adenin, citozin, gvanin i timin). Molekula baze je na molekulu šećera povezana glikozidnom vezom u strukturu koja se zove nukleozid (Slika 1.2 B). Tako npr. adenin i deoksiriboza tvore nukleozid adenzin, gvanin i deoksiriboza gvanozin itd.



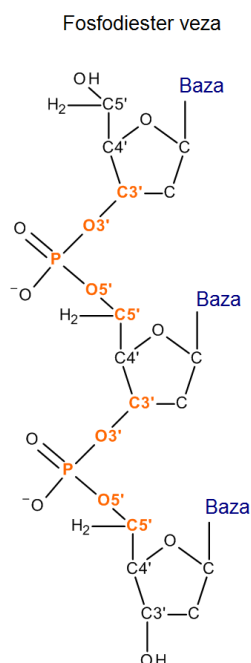
Slika 1.2 Građa nukleotida.

Adenin i gvanin su purinske baze (sastoje se od dva prstena) te se na $\text{C1}'\text{-OH}$ skupinu šećera vežu preko atoma dušika N9 (Slika 1.3). Timin i citozin su pirimidinske baze (jedan prsten) te se na $\text{C1}'\text{-OH}$ skupinu šećera vežu preko atoma dušika N1 (Slika 1.3). Fosfatna skupina povezana je na nukleozid preko petog ugljikovog atoma deoksiriboze (Slika 1.2). Točnije, $\text{C5}'$ skupina šećera povezana je esterskom vezom na jedan od četiri atoma kisika fosfatne skupine (Slika 1.2 D).



Slika 1.3 Dušične baze.

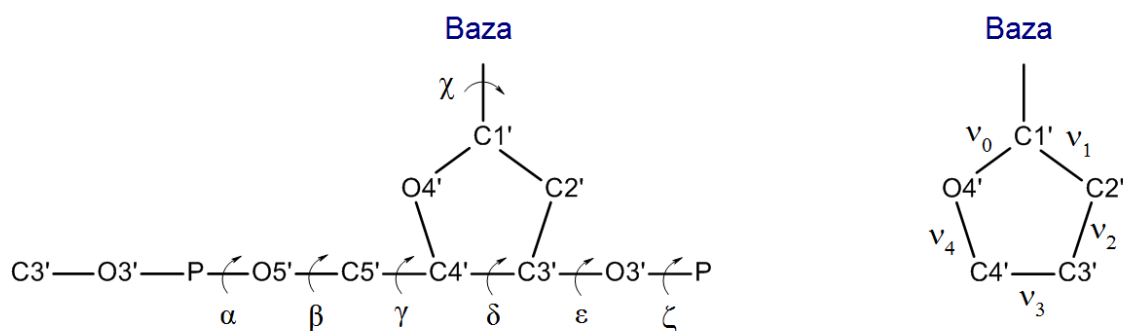
Osim do sada spomenutih kovalentnih veza unutar nukleotida (glikozidna i esterska), u strukturi DNA nalazimo još jednu kovalentnu vezu, fosfodiester vezu, koja veže 2 nukleotida u lanac preko atoma kisika fosfatnih skupina i OH skupina šećera. Točnije, C3' atom deoksiriboze prvog nukleotida spojen je preko atoma kisika i fosfora na C5' atom deoksiriboze drugog nukleotida. Ime veze proizlazi iz: „fosfo“ - fosfor, „di“- dva, „ester“ – ester. Fosfodiester veza (C3'-O3'-P-O5'-C5') okosnica je DNA (eng. DNA backbone) i odgovorna je za povezivanje nukleotida u lanac tj. polimer (Slika 1.4). Redosljed baza u lancu je proizvoljan i on čini primarnu strukturu DNA molekule.



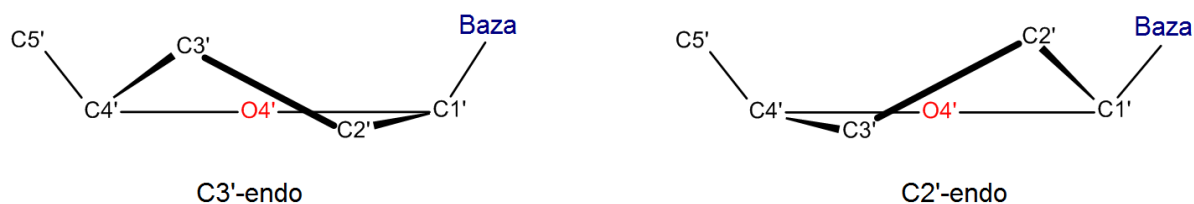
Slika 1.4 Fosfodiester veza, C3'-O3'-P-O5'-C5' u DNA.

Iako je osnovna struktura nukleotida na prvi pogled jednostavna (fosfatna skupina-šećer-dušična baza) postoje mnoge varijacije u konformaciji nukleotida. Razlog tome leži u samoj

građi baza, građi šećera (oko 20 različitih konformacija) i različitim torzijskim kutovima koji su posljedica rotacija oko veza. Konkretno, sedam različitih torzijskih kuteva po nukleotidu definira sekundarnu strukturu nukleinske kiseline (Slika 1.5) odnosno šećer-fosfat okosnicu (eng. sugar-phosphate backbone). Uz to još treba uzeti u obzir moguće konformacije peteročlanog prstena šećera (furanoze), za koju je definirano pet torzijskih kuteva (Slika 1.5). Planarna konformacija peteročlanog furanoznog prstena C1'-C2'-C3'-C4'-O4' (svi torzijski kutevi jednaki nuli) je sterički i energijski vrlo nepovoljna. Stabilnija konformacija šećera je postignuta pomicanjem jednog atoma iz ravnine. Međutim, ne mora uvijek isti atom biti izvan ravnine. Konformacija u kojoj je atom ugljika C3' izvan C1'-C2'-C4'-O4' ravnine i na istoj strani kao i baza naziva se C3'-endo (Slika 1.6). Konformacija u kojoj je atom ugljika C2' nalazi izvan ravnine i na istoj strani kao i baza naziva se C2'-endo (Slika 1.6). Različite konformacije furanoze mogu se naći u A i B-formi dvostruke uzvojnice, o kojima će više biti u potpoglavlju 1.1.3. B-forma dvostruke uzvojnice sadrži strukturu šećera koja je približno C2'-endo, dok A-forma sadrži C3'-endo.



Slika 1.5 Torzijski kutevi u DNA.



Slika 1.6 Konformacija šećera (C3'-endo i C2'-endo).

Osim konformacije šećera još je važno spomenuti torzijski kut vezan uz glikozidnu vezu (χ) (Slika 1.5) koji može biti „syn“ i „anti“. Tzv. „anti“ konformacija je uglavnom stabilnija i vezana uz desnu uzvojnici (A i B), dok se „syn“ konformacija smatra manje stabilnom i vezana je uz lijeve uzvojnice poput Z DNA.

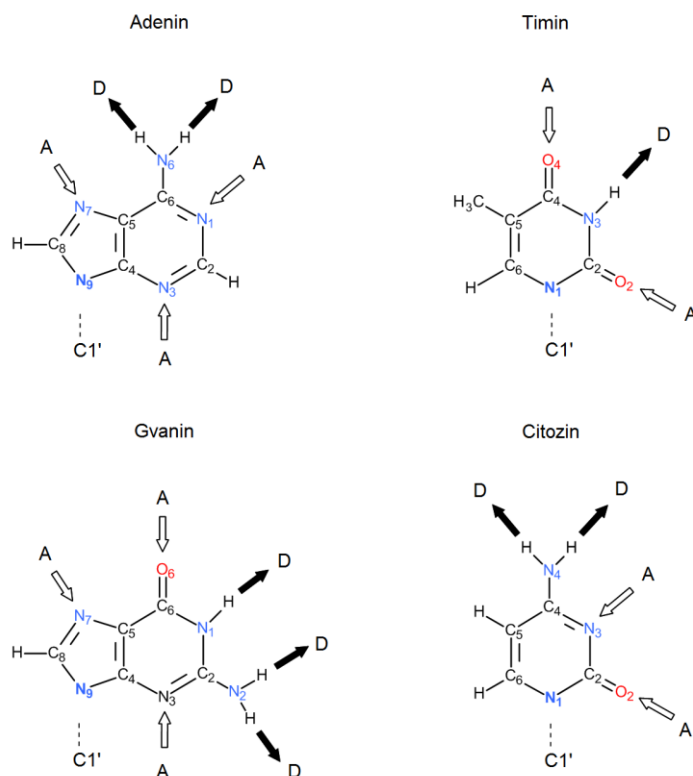
1.1.2 Interakcije između nukleotida- sekundarna struktura

Kako bi dva lanca molekula prikazana na slici 1.1 mogli činiti strukturu dvostruke uzvojnice DNA, između nukleotida moraju postojati određene intermolekularne veze. Uz vodikove veze koje su odgovorne za uparivanje baza (eng. base pairing), stabilnost dvostruke uzvojnice određena je i vertikalnim slaganjem baza (eng. base stacking). Intermolekularne veze koje čine dvostruku uzvojnici puno su slabije od kovalentnih veza unutar nukleotida, ali su mnogobrojne pa znatno utječu na parametre poput širine uzvojnice, duljine uzvojnice, udaljenost baza unutar lanaca i između lanaca. Svi ti parametri definiraju oblik dvostruke uzvojnice, odnosno definiraju njezinu sekundarnu strukturu. Tako je zapravo sekundarna struktura DNA određena intermolekularnim interakcijama, odnosno vodikovim vezama i vertikalnim slaganjem baza.

1.1.2.1 Vodikove veze i uparivanje baza

Klasično gledano, vodikova veza, $X-H\cdots A$, je slaba intermolekularna interakcija elektrostatske prirode između djelomično pozitivno nabijenog vodika (H) i djelomično negativno nabijenog akceptora (A). U grupi $X-H$, X označava proizvoljno odabran atom, najčešće vrlo elektronegativan. Djelomično pozitivan ili negativan naboj posljedica je velike razlike u elektronegativnosti X i H atoma, pa je $X^{\delta-}-H^{\delta+}$ veza uglavnom izrazito polarna. To uzrokuje orijentaciju elektronegativnog atoma $A^{\delta-}$ prema lokalnom dipolu $X^{\delta-}-H^{\delta+}$ te nastaje vodikova veza, $X^{\delta-}-H^{\delta+}\cdots A^{\delta-}$. Grupa $X-H$ naziva se proton donor, a A proton akceptor. Definicija

vodikove veze mijenjala se kroz zadnjih 100 godina, te se danas smatra vrlo širokim fenomenom, gdje se osim elektrostatskog učinka prepoznaju i drugi. Energije disocijacije protežu se kroz dva reda veličine ovisno o prirodi atoma i geometriji veze (28,29).



Slika 1.7 Potencijalna donorska (D) i akceptorska (A) mjesta vodikovih veza na bazama.

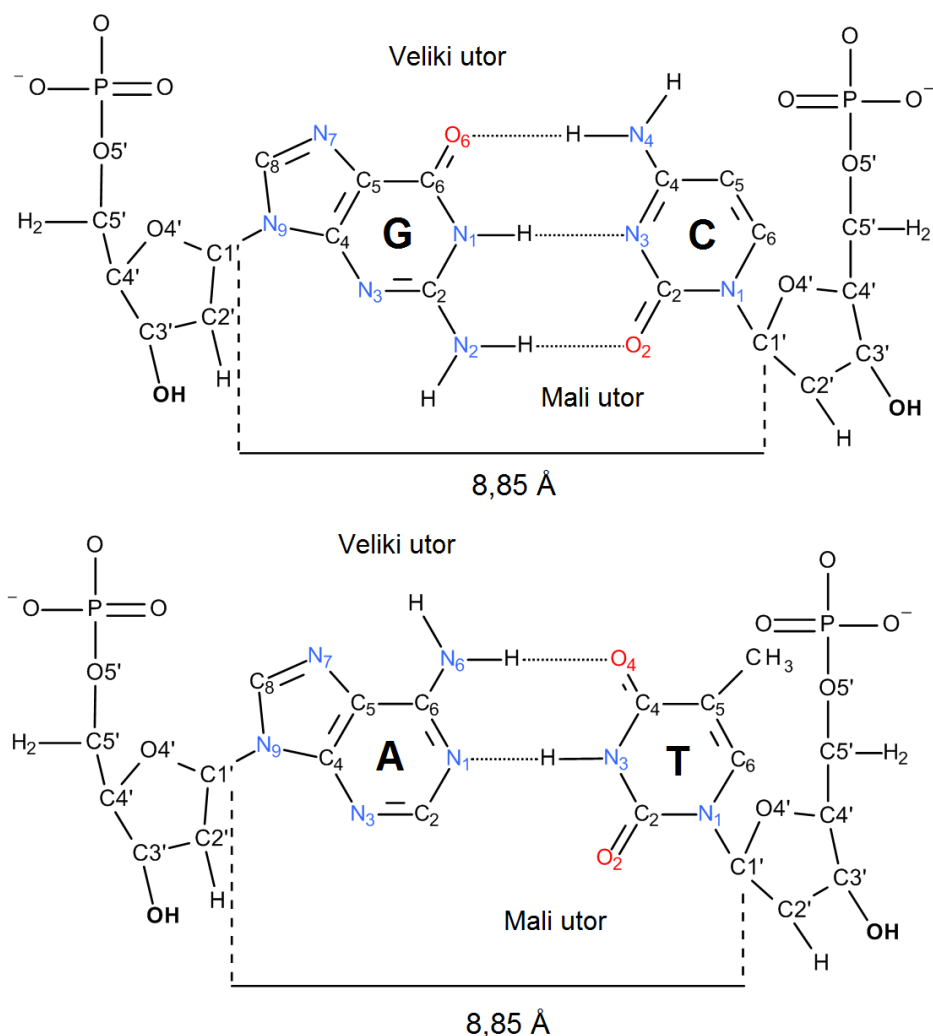
Vodikove veze u DNA javljaju se između molekula baza: atomi kisika i dušika su akceptori, a NH i NH₂ skupine donori vodikovih veza. Tipična duljina veze je između 2,6 i 3,1 Å (0,26 i 0,31 nm), a energija oko 3-6 kcal/mol (13-25 kJ/mol) (25). Svaka baza ima nekoliko donorskih i akceptorskih mjesta (Slika 1.7) pa ako nema posebnih geometrijskih ograničenja svaka baza može biti uparena s istom ili drugom bazom preko vodikove veze. Osim na baze, nukleotidi preko vodikove veze mogu biti vezani za molekule vode, katione, aminokiseline itd. Uglavnom sva akceptorska i donorska mjesta nastoje biti popunjena, pa ako ništa drugo, u vodenoj otopini nukleotidi će biti vezani za molekule vode. Vodikove veze su u pravilu 20 do 30 puta slabije od kovalentnih veza pa su zbog toga više podložnije istezanju i savijanju. Prosječne energije disocijacije nekih kovalentnih i vodikovih veza prikazane su u **Tablica 1.1**. Ta „fleksibilnost“ vodikovih veza omogućuje raznovrsnost geometrije X-H...A sistema.

Tablica 1.1. Usporedba energija kovalentnih i vodikovih veza

Vrsta veze	Naziv	Energija disocijacije*	
		kcal/mol	kJ/mol
Kovalentna	C-C	83,1	347,7
Kovalentna	C-H (u etanu)	98,8	413,4
Vodikova	O-H...O	3 do 6	13-25

*Podaci preuzeti iz (24)

Od posebnog interesa za građu DNA su vodikove veze u kojima sudjeluju dvije baze. Kako svaka baza posjeduje i donorska i akceptorska mjesta, svake dvije baze mogu biti povezane vodikovom vezom. Međutim, proizvoljan odabir baza ne rezultira uređenom strukturom. S druge strane, ukoliko uparimo adenin i timin (A-T) i gvanin i citozin (G-C) dobiti ćemo strukturu u kojoj je udaljenost atoma šećera C1' u komplementarnim bazama jednaka (Slika 1.8). Takav način uparivanja baza poznat je pod nazivom Watson-Crick parovi baza. Međutim, uparivanje baza ne mora biti strogo Watson-Crick. Ostala uparivanja najčešće se pod jednim nazivom zovu non-Watson-Crick uparivanja, od kojih su najpoznatiji Hoogsteen i wobble (1).



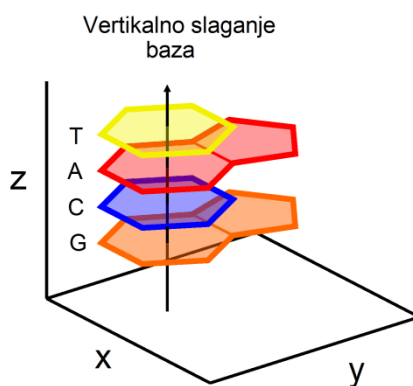
Slika 1.8 Watson-Crick parovi baza; veliki i mali utori. Radi jednostavnosti prikaza izostavljeni su vodikovi atomi na C1' i C4' atomu šećera, C8 atomu gvanina, C5 i C6 atomu citozina, C2 i C8 atomu adenina i C6 atomu timina.

Watson-Crick parovi baza nalaze se u dvostrukim uzvojnica DNA i RNA *in vivo* pa za njih postoji veliki interes još od otkrića dvostruke uzvojnice 1953 god. (30). Ovakvo uparivanje omogućava da bilo koji slijed parova baza stane u spiralnu strukturu DNA bez njenog izobličenja te je energijski vrlo povoljno. Kod Watson-Crick DNA, G-C parovi sadrže tri, a A-T parovi dvije vodikove veze. Budući da dvostruka uzvojnica najčešće sadrži velik broj A-T i G-C parova, lanci su povezani brojnim vodikovim vezama pa one igraju veliku ulogu u stabilizaciji dvostruke uzvojnice.

1.1.2.2 Vertikalno slaganje baza

Osim vodikovih veza, baze DNA mogu sudjelovati i u drugim nekovalentnim interakcijama s otapalom ili međusobno. Od posebne važnosti su interakcije koje uvelike pridonose stabilnosti DNA, a to su vertikalno slaganje baza (eng. base stacking).

Vertikalno slaganje baza je naziv za vrlo kompleksnu interakciju između nukleotida koja ovisi o nekoliko vrsta nekovalentnih interakcija, definiranih u daljnjem tekstu, a čiji je rezultat slaganje baza jedna iznad druge, kao npr. vertikalni stupac od novčića (Slika 1.9) (24,29,31).



Slika 1.9 Vertikalno slaganje baza.

Slaganje kod aromatskih spojeva (eng. aromatic stacking) izrazito je jako ako su molekule tako orijentirane da postoji direktan kontakt između njihovih π orbitala. Kod DNA, dušične baze nisu sasvim paralelne što otežava interakciju, ali zbog činjenice da su međusobno udaljene za samo 3,4 Å (unutar van der Waalsovog dosega) postoji niz interakcija koje se javljaju između baza. Te interakcije uglavnom se mogu svrstati u 3 kategorije: sile između stalnih električnih dipola (eng. permanent electrostatic effects), Londonove disperzne sile te interakcije poput efekta otapanja (eng. solvation effects) (24,29,32,33). Disperzne sile vrlo su važne jer su dušične baze izrazito polarizabilne, a većina atoma leži u istoj ravnini, pa je omogućen vrlo blizak kontakt preko velikog područja. Zbog fluktuacija elektronske gustoće u nekom trenutku elektronska raspodjela unutar atomskih skupina može biti asimetrična. Stoga inducirani dipol u jednoj grupi polarizira sustav susjednih atoma ili molekula čime se dipolni momenti usmjere, pa dipoli privlače jedni druge. Te su sile aditivne i smanjuju se s udaljenosti, zbog ovisnosti s r^{-6} . Osim o udaljenosti, jačina „stackinga“ ovisi i o veličini dodirne površine pa su stacking interakcije izraženije kod purinskih nego kod pirimidinskih

baza. (Tablica 1.2) (24). Iz tog razloga, za razliku od vodikovih sila, vertikalno slaganje baza ovisi i o sekvenci DNA u lancu.

Tablica 1.2. Energije vertikalnog slaganja parova baza (bp)

Dinukleotid**	Energije vertikalnog slaganja po paru baza*	
	kcal/mol	kJ/mol
$\begin{vmatrix} \text{C} & \cdot & \text{G} \\ \text{G} & \cdot & \text{C} \end{vmatrix}$	-14,59	-61,04
$\begin{vmatrix} \text{G} & \cdot & \text{C} \\ \text{G} & \cdot & \text{C} \end{vmatrix}$	-8,26	-34,56
$\begin{vmatrix} \text{T} & \cdot & \text{A} \\ \text{A} & \cdot & \text{T} \end{vmatrix}$	-6,57	-27,49
$\begin{vmatrix} \text{A} & \cdot & \text{T} \\ \text{A} & \cdot & \text{T} \end{vmatrix}$	-5,37	-22,47

*Podaci preuzeti iz (24)

** Vodikova veza označena je točkom (·)

Novija istraživanja pokazuju da se vertikalno slaganje baza može opisati ili modelirati uglavnom stalnim elektrostatskim interakcijama (stalnim dipolnim momentom), hidrofobnim silama (efekti otapanja) i Londonovim disperznim silama te da su upravo odnosi tih sila odgovorni za stabilnost DNA (29,32,33). Zbog osjetljive prirode spomenutih sila, slaganje baza je vrlo osjetljivo na promjene u položaju baza, promjene elektrostatskih uvjeta, prisutnost drugih iona te promjene u otapalu. Stoga unatoč brojnim eksperimentalnim studijama i kvantno kemijskim računima vertikalno slaganje baza ostaje i dalje predmet rasprave (29,32,33).

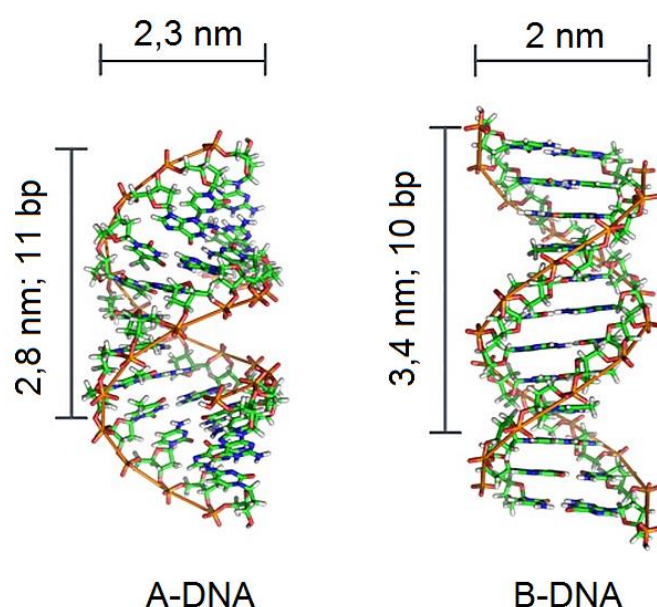
1.1.3 A i B forma dvostruke uzvojnice

U svom najpoznatijem obliku deoksiribonukleinska kiselina ima heličnu B formu gdje uzvojnica čine dva dugačka lanca molekula u kojima su monomeri tj. nukleotidi međusobno povezani vodikovim vezama tako da čine Watson-Crick parove baza: adenin-timin (A-T) i gvanin-citozin (G-C). B forma dvostruke uzvojnice DNA, čiji model potječe još od Watsona i Cricka, dominantna je u stanicama i u vodenom okruženju.

Dvostruka uzvojnica DNA u B formi karakterizirana je s nekoliko parametara. Promjer dvostruke uzvojnice iznosi 2 nm, razmak između susjednih baza je 0,34 nm duž osi uzvojnice, a parovi baza su međusobno zakrenuti oko te osi za 36°. Konformacija šećera je C2' endo,

dok je torzijski kut glikozidne veze, χ , u „anti“ formi (25). U ovom obliku spiralna struktura se ponavlja nakon 10 nukleotida u svakom lancu (Slika 1.10).

Vrlo važna je i A forma DNA, gdje baze također čine Watson-Crick parove, koja se najčešće veže uz smanjenje hidratacije i vrlo je česta pojava u laboratorijskim uvjetima. Glavna razlika A i B forme je u konformaciji šećera, vertikalnoj udaljenosti susjednih baza unutar uzvojnice i broju parova baza po okretu uzvojnice. U A formi molekula deoksiriboze poprima C3' endo formu, susjedne baze su bliže (2.3 Å umjesto 3.4 Å) i jedan okret zahtjeva 11 parova (10 parova u B formi) (Slika 1.10).



Slika 1.10 Dvostruka uzvojnica DNA u A i B formi. Slika preuzeta iz (34).

Osim B i A forme, dvostruka uzvojnica DNA može poprimiti brojne druge konformacije koje su posljedica visoke osjetljivosti uzvojnice na eksperimentalne uvjete. Tako su eksperimentalna istraživanja (prije svega raspršenje rendgenskim zrakama) pokazala da postoji nekoliko različitih tipova dvostruke uzvojnice: A, A', B, α -B', β -B', C, C', C'', D, E i Z (24), što ukazuje da je sekundarna struktura DNA visoko osjetljiva na promjene slabih intermolekularnih sila. Iako DNA u stanicama ima B formu dvostruke uzvojnice u laboratorijskim uvjetima DNA može poprimiti brojne druge oblike: od jednostruke do trostruke uzvojnice te raznih drugih struktura.

Tablica 1.3. Veliki i mali utor DNA

Veliki utor		Mali utor	
Adenin	N6, N7	Adenin	N3
Citozin	N4	Citozin	C2
Gvanin	C6, N7	Gvanin	N2, N3
Timin	C4, C5	Timin	C2

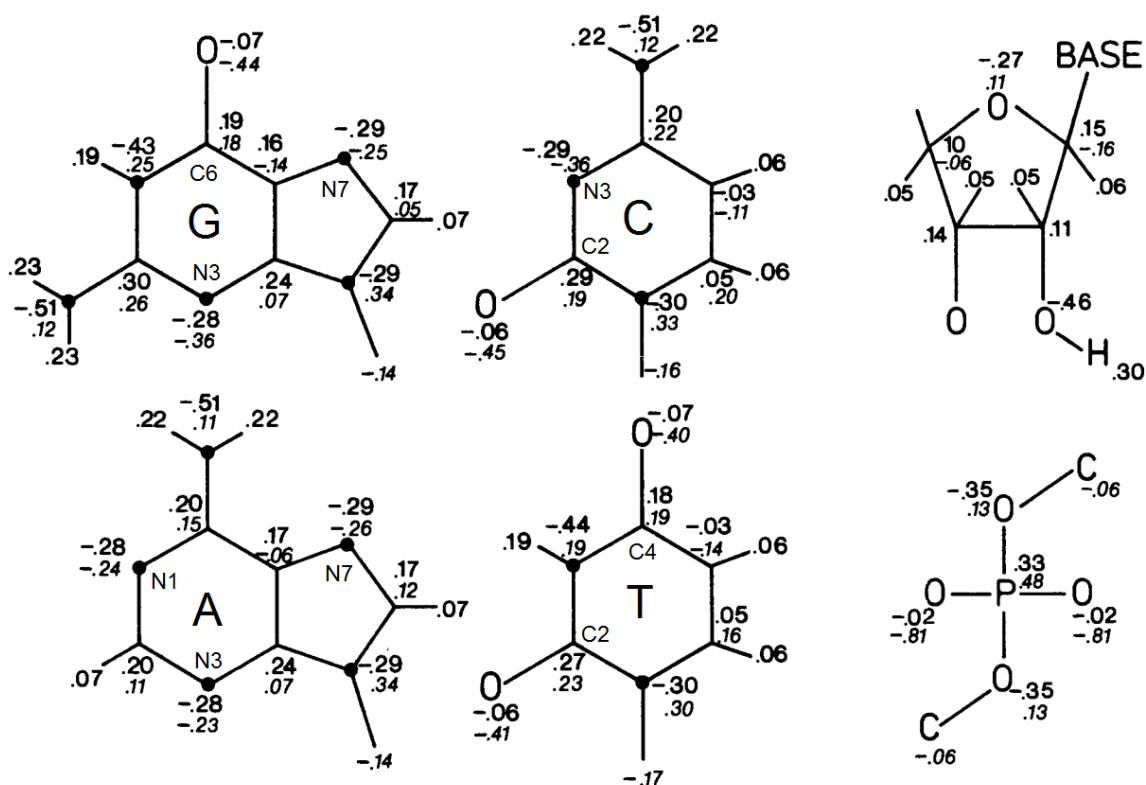
Vidi sliku Slika 1.8. Tablica preuzeta iz (1).

Još jedna od bitnih karakteristika ds DNA su mali i veliki utori koji se javljaju kao posljedica Watson-Crick uparivanja (Slika 1.8) Bez obzira kakav je raspored baza u lancu, neki dijelovi molekula baza biti će više izloženi (veliki utori), a neki će biti manje izloženi (mali utori) prema otapalu (Tablica 1.3). Ovakav raspored je vrlo važan jer određuje dostupnost pojedinih dijelova molekule. Budući da su mali utori djelomično zaštićeni šećer-fosfat okosnicom, interakcije nukleinskih kiselina s nekim ionima i kompleksima događaju se samo u velikim utorima. To je posebno važno kod interakcije kationa s DNA gdje veličina atoma i hidratacijske ljuske kationa može uvelike utjecati na mjesto interakcije.

1.1.4 Raspodjela naboja u nukleotidu

Vodikove veze, vertikalno slaganje baza, te interakcija DNA s okolišem su određene raspodjelom naboja i elektronskom gustoćom u nukleotidima. Iako su baze neutralne, zbog velike razlike u elektronegativnosti elemenata koje ih čine, elektronska gustoća (eng. charge density) nije jednaka u cijeloj molekuli.

Gustoća naboja u nukleotidima prikazana je na Slici 1.11. Vodikovi atomi amino skupina u adeninu, gvaninu i citozinu nose pozitivan σ naboj od $+0,22e$, dok vodikovi atomi kod N1 gvanina nose nešto manji σ naboj od $+0,19e$. Redom: N1, N3 i N7 adenina, N3, N7 i O6 gvanina, O2 i O4 timina te N3 i O2 citozina nose ukupne negativne naboje od $-0,47e$ do $-0,65e$. U fosfatnim skupinama, kisici koji sudjeluju u ester vezi nose negativan naboj od $-0,22e$, dok slobodni kisici nose naboj od $-0,83e$ (24).



Slika 1.11 Gustoća naboja u nukleotidu preuzeta iz (24). Uspravni brojevi odnose se na σ naboj, a ukošeni brojevi odnose se na π naboj. Ukupna gustoća naboja je zbroj σ i π naboja. Npr. ukupna gustoća naboja O4 timina iznosi -0,47e.

Gustoća naboja ima veliki utjecaj na stvaranje vodikovih veza u DNA. Dijelovi molekule koji nose djelomično pozitivan naboj su donori vodikovih veza, a dijelovi koji nose negativan naboj akceptori. Budući da amino skupine baza sadrže pozitivno nabijene vodikove atome, one su dobri donori vodikovih veza. Kisici i ugljici baza nose djelomično negativan naboj pa su dobri akceptori vodikovih veza, dok su kisici šećera u pravilu vrlo slabi akceptori.

Osim percipiranja mjesta na kojima dolazi do formiranja vodikovih veza, iz gustoće naboja mogu se predvidjeti mjesta interakcije i mjesta vezanja kationa i drugih molekula za DNA. Slobodni kisici fosfatnih skupina nose najveći negativni naboj pa znatno interagiraju s pozitivnim ionima, dok su kod baza najčešća mjesta interakcije DNA i kationa atomi baza N7, O6 i O4. Međutim, treba napomenuti da je interakcija kationa i molekula s DNA određena i čimbenicima poput vrste kationa i otapala, a ne samo raspodjelom naboja.

1.1.5 Interakcija kationa i DNA

Interakcija kationa i DNA vrlo je značajna zbog različitih uloga koje kationi imaju u određenju njezine sekundarne strukture, replikacije, transkripcije, vezanje enzima i proteina te kompaktiranja (24). Tako je poznato da neki kationi stabiliziraju dvostruku uzvojniciu DNA, dok neki imaju destabilizacijski učinak, ili uzrokuju kompaktiranje, neki agregaciju (više u potpoglavljima 1.1.6 i 1.1.7) itd. Rezultat međudjelovanja, osim o koncentraciji i vrsti kationa, ovisi i o mjestima interakcije kationa i nukleotida.

DNA ima četiri potencijalna mjesta za vezanje kationa: negativno nabijene fosfatne skupine, hidroksilne skupine šećera, atome dušika baza te karbonilne skupine baza, a na kojim mjestima će doći do interakcije ovisi o prirodi i svojstvima kationa. Tako alkalijski, zemnoalkalijski i prijelazni metali pokazuju različite afinitete prema različitim dijelovima nukleotida.

Fosfatne skupine generalno interagiraju sa svim metalima, čineći komplekse slične soli (eng. salt like complexes) pozitivno nabijenih kationa metala i negativno nabijenih atoma kisika fosfatnih skupina. Tako su npr. kod natrijevih soli DNA fosfatne skupine neutralizirane natrijevim ionima. Interakcijom kationa i fosfatnih skupina, smanjuje se efektivna gustoća naboja i elektrostatsko odbijanje dijelova lanaca, pa gotovo svaka interakcija fosfatne skupine i pozitivno nabijene čestice rezultira stabilizacijom dvostruke uzvojnice. Hidroksilne skupine šećera interagiraju isključivo s alkalijskim i zemnoalkalijskim metalima preko slobodnih elektronskih parova kisika (eng. lone electron pair of oxygen) u slučaju da atomi šećera ne sudjeluju u esterskoj vezi.

S druge strane, interakcije kationa i baza puno su složenije od interakcije kationa i fosfata u smislu da uzrokuju čitav niz strukturnih promjena DNA, ali i promjena u odnosu sila koje definiraju dvostruku uzvojniciu (hidratacijske sile, slaganje baza, vodikove veze, razni efekti otapala itd). Vjerojatno zato još uvijek ne postoji jedinstveni model koji bi opisivao takve interakcije.

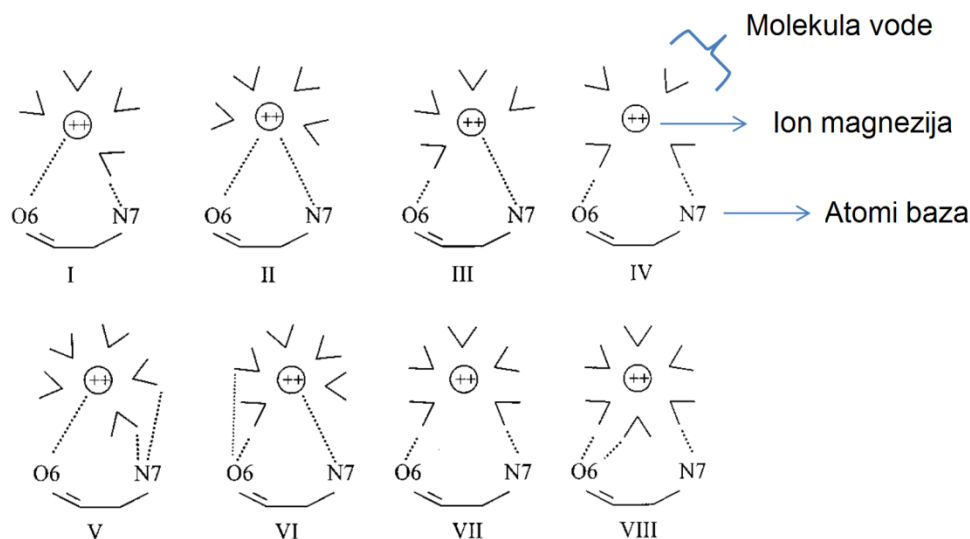
Atomi dušika baza imaju slobodne elektronske parove pa interagiraju s alkalijskim, zemnoalkalijskim i prijelaznim metalima. Interakcija kationa i dušikovih atoma pogodnija je

za purinske (adenin i gvanin) nego za pirimidinske (citozin i timin) baze. Također, postoji razlika u afinitetima između pojedinih dušikovih atoma pa je, npr. u purinskim bazama, N7 puno vjerojatnije mjesto interakcije od N1 ili N3 što je direktna posljedica elektronske raspodjele (Slika 1.11).

Keto skupine baza (C=O skupine) povoljne su i za direktno i indirektno vezanje kationa. Kod pirimidinskih baza moguće je direktno vezanje kationa na O2 citozina i O2 ili O4 timina, dok je kod purinskih baza (npr. O6 gvanina) vezanje na keto skupine uglavnom indirektno, preko molekula vode, vodikovih veza ili hidratacijske ljuske kationa.

1.1.5.1 Interakcija kationa magnezija i DNA

Zbog širokog raspona parametara koji određuju eksperimentalne uvjete kao što su: koncentracija i vrsta iona u puferu, koncentracija DNA, koncentracija dodanih kationa, hidratacijski uvjeti itd., postoji neslaganje autora o mjestima interakcije magnezija i DNA te prirodi interakcije. Do sada je opaženo da interakcija kationa magnezija s DNA, osim o koncentraciji dodanog magnezija, ovisi o koncentraciji natrija ili drugih iona u otopini, te o koncentraciji DNA (11,12). Neki autori navode da ioni magnezija ostvaruju interakciju samo s fosfatnim skupinama DNA (20,35), dok neki autori navode interakciju kationa magnezija i s fosfatnim skupinama i s bazama DNA (8,15,22). Ipak, sama priroda interakcije u literaturi nije jednoznačno određena. Najčešće se spominju nespecifične elektrostatske interakcije (8,10,15,23) između Mg^{2+} i fosfata DNA. Međutim, neki autori predlažu i kovalentno vezanje (20). Smatramo da vezanje Mg^{2+} i fosfata u otopini nikako ne može biti kovalentno, već samo elektrostatsko, što je detaljnije objašnjeno u poglavlju 3.3.2.



Slika 1.12 Shema prikazuje različite mogućnosti interakcije iona magnezija i gvanina. Kod indirektno interakcije, ion magnezija kontakt s atomom baze ostvaruje preko molekule vode, dok kod direktne interakcije ion magnezija neposredno ostvaruje kontakt s atomom baze. Npr. na slici I prikazana je interakcija atoma O6 i iona magnezija je direktna, dok je interakcija atoma N7 i iona magnezija indirektna, tj. preko molekule vode. Slika je preuzeta iz (36).

Autori Petrov i Šponer pokušali su riješiti pitanje interakcije kationa magnezija s bazama pomoću Hartree-Fock modeliranja (36,37). Mogući modeli interakcije gvanina i kationa magnezija preuzeti iz (36) prikazani su na slici 1.12. Po modelu Petrova i Šponera, kation magnezija direktan kontakt s gvaninom ostvaruje preko N7 atoma, a indirektan (preko molekule vode) s O6 atomom (36,37). Kod direktne interakcije (eng. inner-sphere coordination) kation gubi molekulu vode iz hidratacijske ljuske i veže se direktno na atom baze, dok kod indirektno interakcije (eng. outer-sphere coordination) kation u potpunosti zadržava hidratacijsku ljusku te se preko nje ostvaruje interakcija s danim atomom baze. Ako atom baze istovremeno ostvaruje direktno i indirektno vezanje, tada se govori o tzv. mješovitoj interakciji (eng. mixed-sphere coordination).

1.1.6 Denaturacija DNA

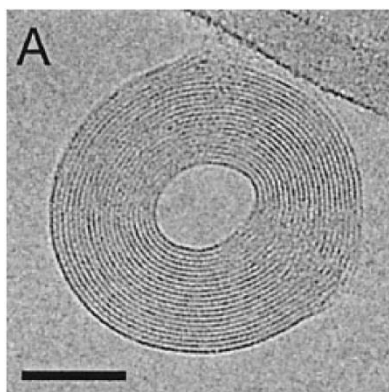
Dvostruka uzvojnica DNA prilično je stabilna. Njezina stabilnost većinom proizlazi iz vodikovih veza i vertikalnog slaganja baza. Uz to, uzvojnica je okružena molekulama vode koje čine primarnu i sekundarnu hidratacijsku ljusku DNA. Da bi se dva lanca uzvojnice odvojila (denaturirala) potrebno je nadvladati sve stabilizacijske sile.

Vodikove veze i hidratacijska ljuska DNA osjetljive su na promjene pH. Naime, vrlo visoki pH (≥ 9) ili vrlo nizak pH ($\lesssim 4$) (1) uzrokuje ionizaciju baza, odnosno promjene donorskih i akceptorskih svojstava baza, pa se narušava Watson-Crick uparivanje. Također, promjene pH uzrokuju promjene u hidratacijskoj ljusci DNA koja pak direktno utječe na vertikalno slaganje baza. Povećanje temperature DNA može također destabilizirati dvostruku uzvojnica i tako rezultirati odvajanjem lanaca. Temperatura na kojoj je denaturiralo 50% DNA uzorka naziva se temperatura denaturacije (eng. melting temperature), T_m . Dovedena toplina utječe na vodikove veze i uparivanje baza te uništava hidratacijsku ljusku DNA pa time destabilizira dvostruku uzvojnica DNA.

Pojavu denaturacije DNA moguće je pratiti na nekoliko načina. Vrlo praktičan način je pomoću UV spektrofotometrije mjerenjem apsorbancije elektromagnetskog zračenja na valnoj duljini od 260 nm. Povećanje apsorbancije ukazuje na hiperkromni porast (eng. hyperchromicity), koji nastaje zbog narušenosti vertikalnog slaganja baza (eng. unstacking). UV spektrofotometrija je također uvriježena metoda za određenje koncentracije i čistoće DNA u uzorku o čemu će biti više rečeno u potpoglavlju 1.3.

1.1.7 Kompaktiranje DNA

Genomska DNA je vrlo dugačka molekula koja se *in vivo* nalazi na vrlo malom prostoru unutar jezgri stanica ili kapsidi virusa. Tako npr. kromosom, koji se sastoji od makromolekula DNA, RNA, histona i proteina, bakterije *Escherichia coli* sadrži DNA od 4,2 milijuna parova baza te potpuno izdužen ima duljinu oko 1,4 mm i stane u stanicu promjera oko 1 μm (38). DNA najmanjeg ljudskog kromosoma potpuno izdužena ima duljinu oko 1,4 cm te stane u jezgri stanice promjera oko 2 μm (39). Kako bi dugačka DNA mogla stati u tako reducirane dimenzije, uzvojnica se mora posložiti u vrlo gusto i uređeno pakiranje koje se naziva kompaktno stanje. Preduvjeti za ostvarivanje kompaktiranja DNA mogu biti zadovoljeni prisustvom određenih iona i drugih molekula u okolini DNA (40). Naime, u virusima i bakterijama DNA se kompaktira uz pomoć poliamina i proteina, a u eukariotskim stanicama uz pomoć histona (40). *In vitro*, kompaktiranje DNA se postiže uz pomoć različitih kondenzirajućih agensa, od jednostavnih iona do makromolekula, primjenom vanjske sile (npr. osmotski tlak) ili induciranjem privlačnih interakcija između DNA segmenata.



Slika 1.13 Slika kompaktirane DNA λ bakteriofaga *in vitro* uz pomoć trovalentnog iona kobalt heksamina dobivena krioelektronskom mikroskopijom. Mjerilo odgovara duljini od 50 nm. Slika je preuzeta iz (41).

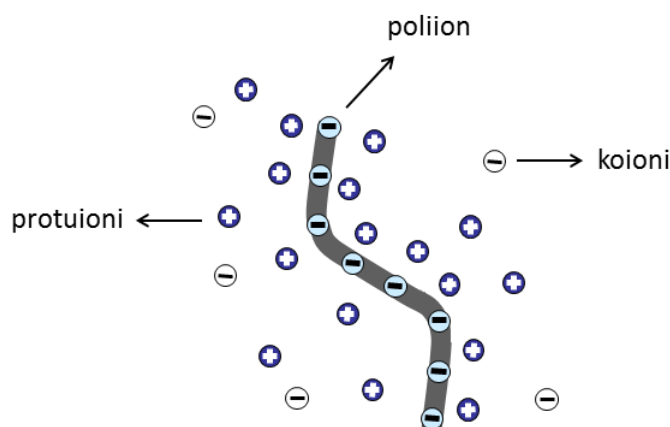
Budući je DNA visoko nabijeni polimer linearne gustoće naboja od $-2e/0,34$ nm, elektrostatske interakcije igraju vrlo važnu ulogu u kompaktiranju DNA. Kako bi se ostvarila pojava kompaktiranja DNA, moraju se savladati odbojene elektrostatske sile između segmenata DNA (42).

Protuioni smanjuju elektrostatsko odbijanje odnosno zasjenjuju naboj fosfatnih skupina. Wilson i Bloomfield povezali su pojavu kompaktiranja DNA potvrđenu tehnikom raspršenja svjetlosti s Manningovom teorijom kondenzacije (43,44) o čemu će biti više govora u potpoglavlju 1.2.4. Naime, dobiveni rezultati ukazivali su da DNA prelazi u kompaktnu formu kada je više od 90% naboja fosfatnih skupina neutralizirano tzv. kondenziranim (bliskim) protuionima. Detalji diskusije vezani uz mogućnost kompaktiranja DNA u prisutnosti Mg^{2+} nalaze u potglavlju 3.3.6.

Treba napomenuti da se kompaktno stanje često pogrešno povezuje s procesom agregacije u kojem DNA lanci tvore nakupine koje imaju niži stupanj uređenosti. Prilikom agregacije također dolazi do induciranja privlačnih sila između dijelova lanaca i susjednih lanaca, međutim interakcija lanaca međusobno je puno veća od interakcije lanca samog sa sobom (35). Također, za razliku od kompaktiranja DNA, proces agregacije je ireverzibilan i jednim dijelom uključuje (barem) lokalnu denaturaciju uzvojnice.

1.2 DNA kao polielektrolit

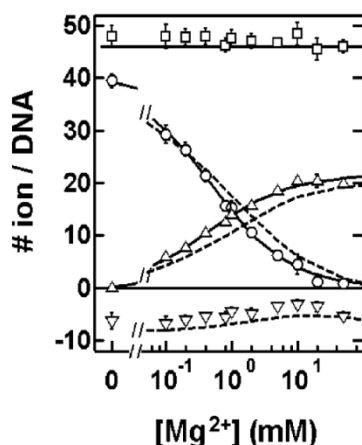
Polielektroliti su polimeri koji sadrže veliki broj ioniziranih grupa (3). U polarnom otapalu poput vodene otopine disociraju na poliione i ione suprotnog naboja - protuione. Za DNA se može reći da je polielektrolit s obzirom da predstavlja polimer s ioniziranim grupama. U vodenoj otopini DNA disocira na poliione u kojima fosfatne skupine nose negativan naboj te na male pozitivne ione - protuione. U slučaju natrijevih soli DNA (Na-DNA) protuioni su intrinzični natrijevi ioni. U vodenoj otopini se također mogu nalaziti i drugi ioni što se postiže npr. dodavanjem jednostavnih soli poput natrijevog klorida, magnezijevog klorida itd. U slučaju natrijevih soli DNA, u otopini natrijevog klorida osim poliiona i protuiona natrija nalaze se i koioni klora (Slika 1.14). Svi ioni zajedno čine ionski oblak (ionsku atmosferu) čije snažno elektrostatsko međudjelovanje s poliionom čini osnovu za razumijevanje svojstava i strukture DNA.



Slika 1.14 Shematski prikaz natrijevih soli DNA kao polielektrolita. DNA u NaCl otopini disocira na negativni poliion DNA i protuione Na^+ . Koioni klora (prazni kružići) potječu iz NaCl otopine.

1.2.1 Ionska atmosfera DNA

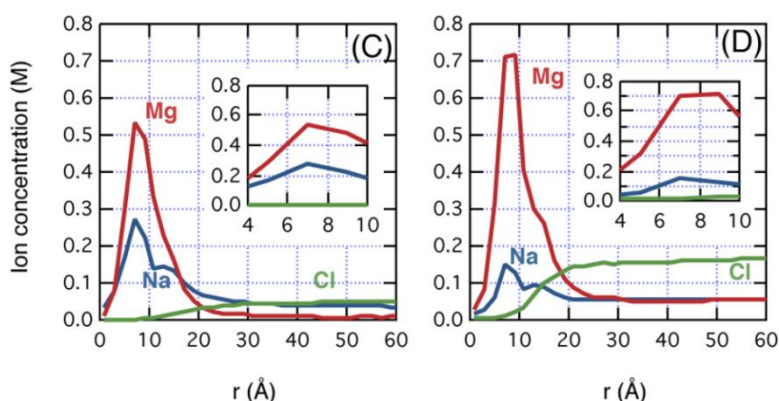
Ionska atmosfera je skup protuiona i koiona koji okružuju DNA te se proteže u svim smjerovima od površine DNA. Doseg ionske atmosfere može se definirati kao udaljenost na kojoj je lokalna koncentracija iona jednaka koncentraciji iona u bulk otopini ili u daljem tekstu kraće otopini (42). Vrlo važan koncept vezan uz ionsku atmosferu je koncept neutralnosti, odnosno činjenica da je zbroj svih naboja u otopini jednak nuli. Drugim riječima, zbroj naboja DNA i ionske atmosfere jednak je nuli.



Slika 1.15 Kompeticija natrijevih i magnezijevih iona praćena BE-AE spektroskopijom na sintetiziranoj ds DNA duljine 24 bp. Slika je preuzeta iz (11). Otopina koja sadrži Mg^{2+} ione (uspravni trokutići) je postepeno dodavana u DNA otopinu koja sadrži 20 mM Na^{+} (kružići). Koioni klora prikazani su obrnutim trokutićima. Ukupan naboj ionske atmosfere prikazan je kvadratićima i iznosi +46, dok je naboj fosfatnih skupina -46. Povećanjem koncentracije magnezija broj vezanih protuiona magnezija raste. Pri podjednakim koncentracijama Na^{+} i Mg^{2+} (≈ 10 mM) gotovo svi protuioni u ionskoj atmosferi su magnezijevi.

Negativno nabijena DNA privlači pozitivne naboje, a odbija negativne, pa je uz DNA veća gustoća pozitivnih naboja nego negativnih. Prostorni raspored i sastav iona u ionskoj atmosferi teško je okarakterizirati zbog njene dinamične prirode, pogotovo kada se nekoliko vrsta kationa natječe za neutralizaciju fosfatnih skupina. Bai i suradnici pokušali su razriješiti pitanje sastava ionske atmosfere sintetizirane ds DNA od 24 parova baza u prisutnosti natrijevih i magnezijevih iona koristeći pufer ekvilibracijsku atomsku emisijsku spektroskopiju, (kraće BE-AE spektroskopija, eng. buffer equilibration and atomic emission spectroscopy, BE-AES) (11). Titracijom otopine magnezijevog klorida u DNA otopinu koja sadrži 20 mM Na^{+} dobiveno je da se broj natrijevih iona po broju fosfata DNA znatno smanjuje kako se povećava koncentracija dodanih magnezijevih iona (Slika 1.15) (11). Također, kada koncentracija magnezijevih iona dostigne početnu koncentraciju natrijevih iona, dolazi do gotovo potpune izmjene protuionske atmosfere: broj natrijevih iona pada gotovo na nulu, a broj magnezijevih iona ima maksimum (11). Drugim riječima, snažno međudjelovanje magnezijevih iona i DNA istiskuje natrijeve ione iz ionske atmosfere DNA. Također, eksperiment pokazuje značajno isključenje koiona-negativno nabijenih klorovih iona iz ionske atmosfere.

Yoo i Aksimentiev su atomskom simulacijom molekulske dinamike (eng. all-atom molecular dynamic simulation) odredili raspodjelu koncentracija iona te doseg ionske atmosfere u slučaju kada se dvije vrste kationa natječu za neutralizaciju DNA (10). Modelirali su molekulu DNA tako da odgovara molekuli DNA iz prethodno opisanog eksperimenta Bai i suradnika, dakle ds DNA od 24 parova baza, pri različitim koncentracijama natrijevih i magnezijevih iona. Raspodjela koncentracija protuiona i koiona u ovisnosti o udaljenosti od DNA preuzeta iz (10) prikazana je na slici 1.16 za različite udjele magnezijevih i natrijevih iona: (C) 5 mM Mg^{2+} i 40 mM Na^+ te (D) 50 mM Mg^{2+} i 50 mM Na^+ . Rezultati simulacije molekulske dinamike, kao i eksperimentalni rezultati BE-AE spektroskopije Bai i suradnika, pokazuju da je pri podjednakoj koncentraciji jednovalentnih i dvovalentnih kationa većina kationa u ionskoj atmosferi dvovalentna. Također, model smješta unutarnju ljusku ionske atmosfere na udaljenost manju od 1.5 nm ($r < 15 \text{ \AA}$) unutar koje se nalaze magnezijevi i natrijevi oni, a klorovih iona ima zanemarivo malo.



Slika 1.16 Raspodjela koncentracije iona oko DNA kao funkcija udaljenosti od DNA ($r(\text{\AA})$) dobivena simulacijom molekulske dinamike autora Yoo i Aksimentiev preuzeta iz (10). Raspodjela koncentracija protuiona i koiona ovisi o sastavu otopine: C) 5 mM Mg^{2+} i 40 mM Na^+ ; D) 50 mM Mg^{2+} i 50 mM Na^+ . U navedenim slučajevima maksimalna koncentracija protuiona nalazi se na udaljenosti oko 1 nm od površine DNA.

1.2.2 Poisson- Boltzmannova jednadžba

Raspodjela iona unutar cijelog volumena neke otopine težiti će prema jednolikoj raspodjeli pozitivnih i negativnih naboja, koju može osigurati njihovo nasumično termičko gibanje. Drugim riječima, u *bulk* otopini ukupni električni potencijal biti će jednak nuli, $\varphi = 0$. Raspodjela iona u otopini na temperaturi T dana je Boltzmannovom relacijom

$$c_i = c_{i,\infty} e^{-\frac{E_i}{RT}}, \quad (1.1)$$

gdje c_i označava množinsku koncentraciju (eng. molar concentration) i -te vrste iona, $c_{i,\infty}$ množinsku koncentraciju i -te vrste iona u bulk otopini, E_i potencijalnu energiju 1 mola i -te vrste iona, R univerzalnu plinsku konstantu ($R=8,314 \text{ J/Kmol}$), a T temperaturu otopine (45).

Polielektrolit posjeduje nepomične naboje jedne vrste na samom lancu (fosfatne skupine kod DNA) pa to onemogućuje postojanje jednolike raspodjele disociranih iona u ukupnom volumenu tekućine, a pogotovo u njegovoj blizini. Uz aproksimaciju da je u otopini potencijalna energija jednog mola iona uglavnom definirana elektrostatskom potencijalnom energijom, izraz za potencijalnu energiju jednog mola iona vrste i u potencijalu polielektrolita φ postaje:

$$E_i = z_i F \varphi, \quad (1.2)$$

gdje je z_i valencija i -te vrste iona, F Faradayeva konstanta, $F = eN_A = 96485 \text{ C/mol}$ ($e = 1.6 \cdot 10^{-19} \text{ C}$, N_A je Avogadrova konstanta). Uvrštavanjem izraza za energiju (1.2) u Boltzmannovu relaciju (1.1), izraz za raspodjelu naboja postaje

$$c_i = c_{i,\infty} e^{-\frac{z_i F \varphi}{RT}}. \quad (1.3)$$

Drugim riječima, privlačne i odbojne elektrostatske sile uravnotežene su toplinskim pobuđenjem iona. Udaljenost na kojoj su izjednačene elektrostatska i toplinska energija naziva se Bjerrumova duljina, l_B . Energija asocijacije naboja $+z_i e$ i $-z_j e$ u otopini relativne permitivnosti ϵ_r iznosi

$$\frac{z_i z_j e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r}, \quad (1.4)$$

dok je kinetička energija iona $k_B T$. Iz relacije jednakosti energija,

$$k_B T = \frac{z_i z_j e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r r}, \quad (1.5)$$

slijedi izraz za Bjerrumovu duljinu,

$$l_B = \frac{z_i z_j e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r k_B T}. \quad (1.6)$$

Kada je udaljenost iona u otopini veća od Bjerrumove duljine, $r > l_B$, toplinsko pobuđenje prevladava elektrostatsko privlačenje pa ioni disociraju.

Izraz za koncentraciju iona (1.3) podrazumijeva da su naboji točkasti te da se otopina promatra u aproksimaciji srednjeg polja (eng. mean field aproximation). Drugim riječima, dana raspodjela naboja vrijedi samo ako su interakcije između iona zanemarive, te oni vide samo potencijal nabijenog poliona. Takva aproksimacija je dobra kada su ioni na relativno velikim udaljenostima. Što su ioni bliže, odnosno na udaljenostima bliskim Bjerrumovoj duljini, elektrostatsko međudjelovanje postaje značajno pa aproksimacija više ne vrijedi. U slučaju jednovalentnih iona aproksimacija srednjeg polja je vrlo dobra, dok u slučaju dvovalentnih i trovalentnih kationa vrijedi samo pri niskim koncentracijama.

Ukupna gustoća naboja ρ_E u nekoj točki ovisi o raspodjeli iona c_i i definirana je izrazom

$$\rho_E = \sum_i c_i z_i F . \quad (1.7)$$

Uvrštavanjem izraza za koncentraciju, (1.3) u jednadžbu (1.7), gustoća naboja postaje

$$\rho_E = \sum_i c_{i,\infty} z_i F e^{-\frac{z_i F \varphi}{RT}} . \quad (1.8)$$

Poissonova jednadžba, koja povezuje potencijal s gustoćom naboja, i dana je jednadžbom

$$\nabla^2 \varphi = -\frac{\rho_E}{\epsilon_0 \epsilon_r} . \quad (1.9)$$

Kada izraz (1.8) za gustoću naboja uvrstimo u Poissonovu jednadžbu (1.9), proizlazi Poisson-Boltzmanova (PB) jednadžba (45):

$$\nabla^2 \varphi = -\frac{F}{\epsilon_0 \epsilon_r} \sum_i c_{i,\infty} z_i e^{-\frac{z_i F \varphi}{RT}} . \quad (1.10)$$

Jednadžba (1.10) može se zapisati preko brojčane koncentracije, $n_{i,\infty}$ (broj iona po jedinici volumena, $n_{i,\infty} = N_{i,\infty}/V$) koristeći vezu množinske koncentracije c i brojnosti N , $c = N/N_A V$, te pokrate $F = eN_A$, $R = k_B N_A$:

$$\nabla^2 \varphi = -\frac{e}{\epsilon_0 \epsilon_r} \sum_i n_{i,\infty} z_i e^{-\frac{z_i e \varphi}{k_B T}} . \quad (1.11)$$

PB jednadžba, je dakle nelinearna diferencijalna jednadžba koja opisuje električni potencijal u otopini. Najčešće se rješava numerički uz uvođenje karakterističnih rubnih uvjeta za dani slučaj. Rješenja PB jednadžbe koriste se dalje za računanje raznih veličina pa se zapravo može govoriti o PB teoriji. Poznavanjem potencijala φ u svakoj točki prostora moguće je izračunati elektrostatski doprinos slobodnoj energiji sistema u raznim procesima kao što su asocijacija i savijanje lanaca DNA, konformacijske promjene DNA itd. (42).

PB teorija podrazumijeva nekoliko pojednostavljenih aproksimacija. Prvo, ioni nisu diskretni objekti već su njihove interakcije usrednjene i prikazane u okviru teorije srednjeg polja. Dakle, ion-ion interakcije su zanemarane. Drugo, u PB teoriji naboji su točkasti, odnosno zanemarene su njihove dimenzije, i jedino svojstvo koje posjeduju je naboj odnosno valencija. Također, zanemareni su drugi efekti na razini atoma kao što su polarizabilnost, hidratacijske ljuske atoma itd. Unatoč navedenim ograničenjima, PB teorija se primjenjuje na brojne sisteme pa tako i na nukleinske kiseline, za koja se uvode daljnja pojednostavljenja i aproksimacije.

1.2.3 Debye-Hückelova aproksimacija

Jedno od bitnih pojednostavljenja PB jednadžbe predstavlja Debye-Hückelova (DH) aproksimacija, a uvodi se kada se može pretpostaviti da je elektrostatsko međudjelovanje puno slabije od termičkog pobuđenja, odnosno kada vrijedi

$$z_i e \varphi \ll k_B T . \quad (1.12)$$

U tom slučaju, eksponencijalna funkcija u PB jednadžbi (1.11) se može razviti u Taylorov red. U okviru DH aproksimacije zadržavaju se samo prva dva člana reda ($e^{-x} = 1 - x$) pa PB jednadžba (1.11), uz uvjet neutralnosti otopine, $\sum_i n_{i,\infty} z_i = 0$, postaje linearna PB jednadžba:

$$\nabla^2 \varphi = \frac{e^2}{\varepsilon_0 \varepsilon_r k_B T} \sum_i n_{i,\infty} z_i^2 \varphi . \quad (1.13)$$

Gornji izraz može se pojednostaviti uvođenjem veličine κ definirane iz:

$$\kappa^2 = \frac{e^2}{\varepsilon_0 \varepsilon_r k_B T} \sum_i n_{i,\infty} z_i^2 , \quad (1.14)$$

pa jednadžba (1.13) postaje

$$\nabla^2 \varphi = \kappa^2 \varphi. \quad (1.15)$$

i naziva se Debye-Hückelova jednažba. Rješenje jednažbe daje potencijal

$$\varphi \propto \frac{e^{-\kappa r}}{r}, \quad (1.16)$$

gdje κ^{-1} ima dimenziju duljine i naziva se Debyeova duljina zasjenjenja (27). Parametar κ može se izraziti preko ionske jakosti otopine, I_s , definirane jednažbom

$$I_s [1/m^3] = \frac{1}{2} \sum_i n_{i,\infty} z_i^2 [1/m^3]. \quad (1.17)$$

Ionska jakost otopine u eksperimentalnim uvjetima najčešće je izražena u M (mol/L) pa se često koristi relacija

$$I_s [1/m^3] = N_A 10^{-3} I_s [M] = N_A I_s [mM], \quad (1.18)$$

gdje je ponovno iskorištena veza brojčane i molarne koncentracije, $c_{,\infty} = n_{i,\infty} N_A$.

Koristeći definiciju ionske jakosti, izraz (1.14) može se napisati kao

$$\kappa^2 = \frac{2e^2}{\epsilon_0 \epsilon_r k_B T} I_s, \quad (1.19)$$

iz kojeg koristeći relaciju (1.18) slijedi izraz za Debyeovu duljinu zasjenjenja prilagođenu eksperimentalnim uvjetima:

$$\kappa^{-1} [m] = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon_r k_B T}{2e^2 N_A}} \frac{1}{\sqrt{I_s [mM]}}. \quad (1.20)$$

Debyeova duljina zasjenjenja predstavlja fundamentalnu skalu ionskih otopina te definira doseg potencijala u otopini. Na udaljenostima manjim od κ^{-1} elektrostatsko međudjelovanje je jako, dok je na udaljenostima većim od κ^{-1} , zbog zasjenjenja iona u otopini, elektrostatsko međudjelovanje vrlo slabo. Debyeova duljina zasjenjenja se smanjuje s povećanjem ionske jakosti otopine ($\kappa^{-1} \propto I_s^{-1/2}$), a za ione u vodenim otopinama na sobnoj temperaturi dana je relacijom

$$\kappa^{-1} [nm] \approx \frac{10}{\sqrt{I_s [mM]}}. \quad (1.21)$$

1.2.4 Manningova teorija kondenzacije

Ponašanje protuiona u polielektrolitskoj otopini može se razumjeti i u okviru Manningove teorije kondenzacije (46). DNA je visoko nabijeni polimer pa jako elektrostatsko privlačenje između poliiiona i protuiona rezultira pojavom nakupljanja tj. kondenzacije protuiona u neposrednoj blizini poliiiona. U tzv. dvostanjskom modelu kondenzacije, protuioni se dijele na slobodne i vezane. Kondenzirani ili bliski protuioni su teritorijalno vezani za određeni volumen oko poliiiona, ali se mogu gibati duž poliiiona, dok se slobodni protuioni nalaze izvan spomenutog volumena te se njihovo gibanje može promatrati u Debye-Hückelovoj aproksimaciji. I kondenzirani (vezani) i slobodni protuioni pridonose neutralizaciji fosfatnih skupina te je zadovoljen princip neutralnosti.

Kondenzaciju protuiona Manning je definirao na sljedeći način: Neka je poliiion (DNA) određen linearnom gustoćom naboja e/b , gdje je b prosječna udaljenost susjednih elementarnih naboja na lancu. U slučaju polielektrolita s jednom vrstom protuiona valencije Z , parametar gustoće naboja ξ definiran je kao

$$\xi = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r k_B T b} . \quad (1.22)$$

Način vezanja protuiona valencije Z na polielektrolit zove se kondenzacija ako je reducirani naboj (eng. charge fraction) polielektrolita u prisustvu jedne vrste protuiona konstantan i iznosi $(Z\xi)^{-1}$ (46).

Manning je predvidio 3 različita modela, ovisno o sastavu polielektrolita, tj. o broju vrsta protuiona u otopini. Najjednostavniji model opisuje polielektrolit s definiranom jednom vrstom protuiona valencije Z . Druga dva modela opisuju ponašanje polielektrolita u prisustvu dvije vrste protuiona. Tzv. teorija jedne varijable (eng. single variable theory) opisuje polielektrolit s 2 vrste protuiona u kojem je koncentracija jednovalentnog protuiona puno veća od koncentracije viševalentnog protuiona. Teorija dvije varijable (dvoparametarski model) opisuje polielektrolit s 2 vrste protuiona u kojem jednovalenti i Z valentni kationi mogu imati proizvoljne koncentracije, dakle nema prethodnog ograničenja.

Manningovi modeli temelje se na minimizaciji ukupne slobodne energije sistema koja je definirana kao zbroj raznih doprinosa G_i . Općenito vrijedi relacija

$$\bar{g}_i = \frac{G_i}{n_p RT}, \quad (1.23)$$

gdje je n_p broj molova nabijenih grupa poliiiona (u slučaju DNA broj molova fosfatnih skupina). Također, teorija podrazumijeva da je

$$I_s \gg c_p, \quad (1.24)$$

gdje je c_p koncentracija poliiiona (množinska koncentracija fosfatnih skupina). Debyeov parametar κ definiran je jednačinom (1.19) koji prilagođen eksperimentalnim uvjetima uz korištenje jednačine (1.18) glasi

$$\kappa^2 = \frac{2e^2}{\epsilon_0 \epsilon_r k_B T} N_A 10^{-3} I_s, \quad (1.25)$$

pri čemu je ionske jakosti otopine, I_s , izražena u M.

Predloženi modeli detaljnije su opisani u radu (46), a u ovom tekstu će biti predstavljeni prethodno navedeni prvi model koji pretpostavlja samo jednu vrstu protuiona u otopini, te treći model u kojem postoje dvije vrste protuiona u otopini.

Slijedi opis prvog modela za polielektrolit s definiranom jednom vrstom protuiona. Neka je θ_Z broj asociranih protuiona po fiksnom naboju poliiiona, uz pretpostavku da svi protuioni M^{Z+} imaju istu valenciju Z . Tada je efektivni naboj q_{net} svakog fiksnog naboja, u odnosu na naboj q smanjen za faktor $1 - Z\theta_Z$,

$$\frac{q_{net}}{q} = 1 - Z\theta_Z, \quad (1.26)$$

Elektrostatski doprinos slobodnoj energiji uslijed vezanja protuiona na poliiion iznosi

$$\bar{g}_{el} = -(1 - Z\theta_Z)^2 \xi \ln(1 - e^{-\kappa b}), \quad (1.27)$$

dok je energija miješanja slobodnih M^{Z+} kationa, vezanih M^{Z+} kationa i molekula otapala dana izrazom

$$\bar{g}_{mix} = \theta_Z \ln \left(\frac{10^3 \theta_Z}{c_Z V_p} \right), \quad (1.28)$$

pri čemu je c_Z koncentracija protuiona, a V_P volumen unutar kojeg su M^{Z+} kationi vezani. Mjerna jedinica za V_P je cm^3/mol , gdje je V_P volumen jednog mola fosfata, tako da je lokalna koncentracija $10^3 \theta_Z / V_P$ izražena u $M = \text{mol/L}$, pa je argument logaritma u jednadžbi (1.28) bezdimenzionalan.

$\bar{g}_{el}$, izražen relacijom (1.27), je pozitivan i smanjuje se s povećanjem θ_Z . Drugim riječima, doprinos elektrostatskog odbijanja fosfat-fosfat se smanjuje kako raste broj vezanih protuiona, jer se smanjuje efektivni naboj fosfatnih skupina. Kada ne bi bilo drugih doprinosa, taj član bi težio potpunom vezanju, odnosno $Z\theta_Z = 1$ u ravnotežnom stanju. Međutim, vezanjem M^{Z+} kationa na poliion povećava se „red“ u sistemu, odnosno smanjuje se entropija što se očituje kao povećanje $\bar{g}_{mix}$ s povećanjem θ_Z . Sam po sebi $\bar{g}_{mix}$ teži ravnotežnom stanju $\theta_Z = 0$, odnosno potpunoj disocijaciji poliiona. Dakle, stvarno ravnotežno stanje je stanje nepotpunog vezanja, s vrijednosti $Z\theta_Z$ negdje između 0 i 1. U ravnotežnom stanju maksimizacija entropije disocijacijom uravnotežena je minimizacijom energije vezanja protuiona na poliion. Kvantitativno, operacija minimizacije zbroja $\bar{g}_{el} + \bar{g}_{mix}$ obzirom na θ_Z daje rezultat

$$1 + \ln\left(\frac{10^3 \theta_Z}{c_Z V_P}\right) = -2Z\xi(1 - Z\theta_Z) \ln(1 - e^{-\kappa b}). \quad (1.29)$$

U limitu niskih koncentracija za $c_Z \rightarrow 0$, rješenja gornje jednadžbe postaju

$$Z\theta_Z = 1 - (Z\xi)^{-1} \quad (1.30)$$

uz

$$V_P = 4\pi e N_A Z' \nu^{-1} (\nu + \nu') (\xi - Z^{-1})^3, \quad (1.31)$$

gdje su ν i ν' broj protuiona i koiona, a Z i Z' valencije protuiona i koiona. Iz jednadžbe (1.30) slijedi izraz za faktor smanjenja linearne gustoće naboja polielektrolita f , uslijed kondenzacije protuiona

$$f = Z\theta_Z = 1 - (Z\xi)^{-1}. \quad (1.32)$$

U slučaju 1:1 soli, kao što je NaCl jednadžba (1.32) daje faktor smanjenja linearne gustoće naboja polielektrolita f , uslijed kondenzacije protuiona:

$$f = \theta_1 = 1 - \xi^{-1} \quad (1.33)$$

i

$$V_p = 41,1(\xi - 1)b^3, \quad (1.34)$$

gdje je b izražen u Å.

Za ds DNA u vodenoj otopini na sobnoj temperaturi, $b = 1,7$ Å i $\xi = 4,2$ pa iz jednadžbe (1.33) slijedi da smanjenje gustoće naboja polielektrolita uslijed kondenzacije monovalentnih protuiona iznosi 0,76. Drugim riječima, 76% naboja fosfatnih skupina neutralizirano je kondenziranim monovalentnim protuionima, dok je ostatak, odnosno 24% naboja fosfatnih skupina neutralizirano slobodnim protuionima. U slučaju dvovalentnih kationa, iz jednadžbe (1.32) proizlazi da je kondenziranim protuionima neutralizirano 88% naboja fosfatnih skupina, što je vrlo blizu eksperimentalno dobivenim podacima (47).

Treći Manningov model, odnosno dvoparametarski model, odnosi se na sistem u kojem je polion u otopini okružen s dvije vrste protuiona: jednovalentnim i Z valentnim kationima. Wilson i Bloomfield (43) prilagodili su Manningove jednadžbe na sistem u kojem je polion u otopini okružen s dvije vrste protuiona valencija Z_1 i Z_2 . Cijela otopina je neutralna, zbog prisustva jednovalentnih kationa. Budući da se u otopini nalaze 2 vrste kationa, postoji kompeticija između kationa za neutralizaciju fosfatnih skupina pa gustoća naboja više nije određena samo valencijom već i koncentracijom kationa (c_1 i c_2).

Minimizacija slobodne energije, obzirom na udio vezanih kationa θ_1 i θ_2 , daje sustav logaritamskih jednadžbi

$$1 + \ln\left(\frac{10^3 \theta_1}{c_1 V_{p1}}\right) = -2Z_1 \xi (1 - Z_1 \theta_1 - Z_2 \theta_2) \ln(1 - e^{-\kappa b}) \quad (1.35)$$

i

$$\ln\left(\frac{\theta_2}{c_2}\right) = \ln\left(\frac{V_{p2}}{10^3 e}\right) + \frac{Z_2}{Z_1} \ln\left(\frac{10^3 \theta_1 e}{c_1 V_{p1}}\right), \quad (1.36)$$

gdje V_{p1} i V_{p2} odgovaraju volumenu vezanih protuiona u limitu niskih koncentracija. Volumen V_p je konstantan i određen relacijom

$$V_p = 4\pi e N_{AV} (1 + Z)(\xi - Z^{-1})b^3. \quad (1.37)$$

Konačno, rješavanjem jednačbi (1.35) i (1.36) po θ_1 i θ_2 , može se dobiti ukupni reducirani naboj fosfatnih skupina uslijed vezanja protuiona, i on je dan izrazom

$$Z_1\theta_1 + Z_2\theta_2. \quad (1.38)$$

Treba napomenuti još jednom, da Manningova teorija kondenzacije vrijedi u u limitu niskih koncentracija dodane soli, odnosno u slučaju kada je $\kappa b \ll 1$, što u slučaju 1:1 soli iznosi oko 1 M. Također, koncentracija DNA mora biti niska tako da vrijedi $I_s \gg c_p$, gdje je c_p množinska koncentracija fosfata (46). Kao i PB teorija, Manningova teorija kondenzacije također zanemaruje međusobne interakcije iona, iona i otapala, te druge faktore na razini atoma kao što su hidratacija, elektronegativnost, veličina iona itd.

1.3 Osnove infracrvene spektroskopije

1.3.1 Vibracije molekula- normalni modovi

Vibracijsko gibanje poliatomskih molekula vrlo je kompleksno. Svaki atom može se gibati u tri prostorna smjera, pa je za gibanje N atoma u molekuli potrebno definirati $3N$ prostornih koordinata ili $3N$ stupnjeva slobode. Translacija i rotacija molekule opisana je s 6 stupnjeva slobode, pa prema tome preostaje $3N-6$ vibracijskih stupnjeva slobode. Vibracije koje se mogu pobuditi neovisno jedna od druge i u kojima atomi istovremeno prolaze kroz položaj ravnoteže zovu se normalni modovi. Konačna vibracija molekule može se prikazati kao linearna kombinacija normalnih modova. Atomi koji sudjeluju u normalnom modu titraju istom frekvencijom, ali različitim amplitudama. Frekvencija normalnog moda ovisi o masi atoma (m_i), koordinatama (x_i, y_i, z_i) i međuatomskom polju sila (eng. interatomic force field) u molekuli (48-50).

Dvoatomska molekula ima samo jedan normalni mod koji u harmonijskoj aproksimaciji ima frekvenciju ν

$$\nu = c\bar{\nu} = \frac{1}{2\pi} \left(\frac{k}{m} \right)^{1/2}, \quad (1.39)$$

gdje je c brzina svjetlosti, $\bar{\nu}$ valni broj u cm^{-1} , k konstanta vezanja, a m reducirana masa

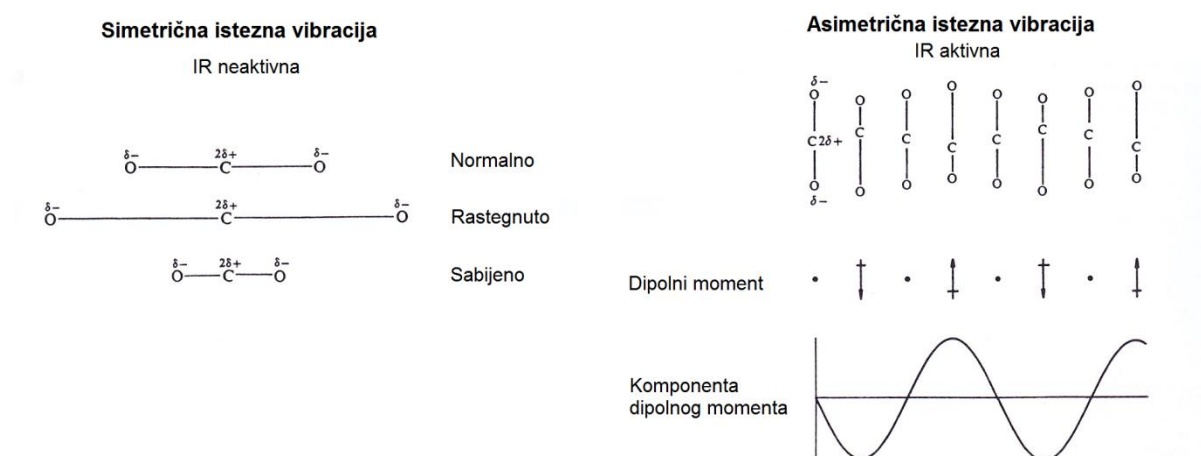
$$m = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}, \quad (1.40)$$

pri čemu su m_1 i m_2 mase atoma.

U slučaju poliatomske molekule, k i m postaju komplicirane funkcije pa se vibracije prikazuju sekularnom jednadžbom ($3N$ linearnih jednadžbi) čija rješenja daju frekvencije normalnih modova.

1.3.2 Infracrvene aktivne vibracije

Elektromagnetsko zračenje odgovarajuće frekvencije u infracrvenom (IR) području interagira s molekulom, ako je vibracija dotične atomske grupe povezana s promjenom njezinog dipolnog momenta. U tom slučaju kažemo da je vibracija IR aktivna. Ako se tijekom vibracije nekog normalnog moda dipolni moment ne mijenja, taj mod biti će IR neaktivan. Primjer IR aktivnog i IR neaktivnog moda CO_2 molekule prikazan je na slici 1.17. CO_2 je linearna molekula u kojoj atomi kisika imaju mali negativan naboj (δ^-), a ugljik mali pozitivan naboj ($2\delta^+$). Prilikom simetrične istezne vibracije atomi kisika se istodobno gibaju ili prema ili od atoma ugljika što znači da se ukupni dipolni moment molekule ($\mu = qx + qy$, gdje je q naboj) ne mijenja ($x=y$ u svakom trenutku vibracije). Prilikom asimetrične istezne vibracije jedna C-O veza se isteže, a druga sabija što rezultira ukupnim dipolnim momentom u smjeru istezanja jedne od veza (Slika 1.17). Vibriranjem molekule mijenjaju se međusobni položaji atoma kisika pa se ukupni dipolni moment mijenja u vremenu. Dakle, asimetrična istezna vibracija CO_2 molekule je IR aktivna. Broj IR aktivnih modova usko je povezan sa simetrijama u molekuli. Ako molekula posjeduje visoki stupanj simetrije broj apsorpcijskih linija $3N-6$ može biti znatno reduciran.



Slika 1.17 Shematski prikaz simetrične i asimetrične istezne vibracije molekule ugljikovog dioksida. Slika preuzeta iz (50).

Osim frekvencije, apsorpcijske linije određene su i intenzitetom. U pravilu, što je veća promjena dipolnog momenta apsorpcijska linija biti će intenzivnija. Osim promjene dipolnog momenta, intenzitet linije proporcionalan je koncentraciji odnosno broju molekula po jedinici volumena. Molarni apsorpcijski koeficijent $\varepsilon(\bar{\nu})$ dan je jednažbom

$$\log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon(\bar{\nu})cl, \quad (1.41)$$

gdje je $\log(I_0/I)$ absorbancija, c koncentracija izražena u mol/L i l duljina optičkog puta. Integralni intenzitet apsorpcijske linije

$$\Gamma \propto \int \varepsilon(\bar{\nu}) d\bar{\nu} / \bar{\nu} \quad (1.42)$$

proporcionalan je ukupnoj promjeni dipolnog momenta koja je uzrokovana normalnom vibracijom,

$$\Gamma \propto (\partial\mu/\partial Q)^2 / \nu. \quad (1.43)$$

gdje Q označava položaj odnosno koordinate atoma.

1.3.3 Grupne i skeletne vibracije

Normalni modovi, općenito, uključuju gibanje svih atoma u molekuli. U određenim modovima svi atomi vibriraju podjednako, tj. atomi imaju podjednake pomake iz položaja ravnoteže. Međutim, postoje situacije u kojima gibanje atoma nije podjednako u svim dijelovima molekule. Pomaci iz ravnotežnog položaja mogu biti lokalizirani na samo jedan dio

molekule i kod takvih modova amplitude pojedinih atoma su jako velike, dok su amplitude preostalih atoma izrazito male. Zato se normalni modovi mogu podijeliti u dvije kategorije: skeletni modovi (modovi u kojima sudjeluju gotovo svi atomi u molekuli) i karakteristične grupne vibracije (uključuju mali dio molekule, najčešće dva ili tri atoma) (49-51).

Kod organskih molekula, skeletne vibracije nalaze se u području od $800\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ te zbog sličnih konstanti vezanja jednostrukih veza u ovom području dolazi do jake interakcije isteznih i striznih vibracija (eng. strong coupling of stretching and bending vibrations) (51). Ovo područje izrazito je osjetljivo na promjene u strukturi molekule pa se još zove i „fingerprint region“. Asignaciju vrpce srednjih i slabih intenziteta vrlo je teško izvesti zbog nestalnosti u njihovom položaju, ali upravo zato ovaj dio spektra služi kao identifikacija autentičnih tvari i konformacijskih promjena (49).

Grupne vibracije najčešće podrazumijevaju vibracije samo dva ili tri atoma dok je ostatak molekule manje više u mirovanju. Npr., kod O-H skupine, vibracije vodikovog atoma uglavnom su neovisne od ostatka molekule zbog velike razlike u masama. Masa vodikovog atoma je u usporedbi s drugim atomima u molekuli izrazito mala, pa vodikov atom vibrira kao da ostatak molekule ima beskonačno veliku masu. Frekvencija istezne vibracije O-H skupine jednaka je

$$\nu(\text{O-H}) = \frac{1}{2\pi} \left[\frac{k(\text{O-H})}{m} \right]^{\frac{1}{2}} . \quad (1.44)$$

Reducirana masa m približno je jednaka masi vodikovog atoma m_{H}

$$m = \frac{m_{\text{H}} m_{\text{R}}}{m_{\text{H}} + m_{\text{R}}} \approx \frac{m_{\text{H}} m_{\text{R}}}{m_{\text{R}}} = m_{\text{H}} , \quad (1.45)$$

gdje su m_{H} i m_{R} masa vodikovog atoma i masa ostatka molekule, pa vrijedi

$$\nu(\text{O-H}) \approx \frac{1}{2\pi} \left[\frac{k(\text{O-H})}{m_{\text{H}}} \right]^{\frac{1}{2}} . \quad (1.46)$$

Uz konstantu vezanja $k(\text{O-H}) = 760\text{ N/m}$ gornja jednačba daje tipičan valni broj O-H istezne vibracije, 3600 cm^{-1} .

Grupne vibracije uglavnom su određene masom atoma i jačinom veze, odnosno konstantom vezanja. Općenito, frekvencije grupnih vibracija povećavaju se s povećanjem konstante vezanja. Zato se $C\equiv C$ vibracije nalaze na višim valnim brojevima nego $C=C$ ili $C-C$ vibracije. Također, vibracija $C-X$ pomiče se prema nižim valnim brojevima kako se povećava masa X .

Grupne vibracije u pravilu su neovisne od ostatka molekule pa se pojava određenih vibracija u spektru koristi za identifikaciju spojeva. Međutim, postoje slučajevi kada struktura molekule znatno utječe na frekvencije grupnih vibracija. To je posebno izraženo u slučaju polarnih veza, grupnih vibracija bliskih frekvencija (rezonancijski efekti) ili u slučaju intermolekularnih interakcija kao što su vodikove veze.

Od grupnih vibracija u organskim spojevima od posebne su važnosti $C=O$, $C=N$ i $C=C$ vibracije. Karbonilna vrpca ($C=O$) nalazi se u području $1800-1650\text{ cm}^{-1}$ i velikog je intenziteta. $C=O$ veza posebno je važna jer na više načina utječe na molekulsku strukturu zbog svoje sklonosti intramolekulskom i intermolekulskom djelovanju. Ova veza je također izrazito polarna što znači veliku promjenu dipolnog momenta pa je vrlo često jedna od najintenzivnijih vrpca u spektru. Frekvencija karbonilne vrpce izrazito je osjetljiva na promjenu supstituenata pa služi za analizu mnogih efekata. Dvostruka veza $C=N$ nalazi se u sličnom području kao i $C=C$ ($1650-1600\text{ cm}^{-1}$) pa moguća pojava elektrostatskih i rezonancijskih efekata otežava točnu asignaciju ovih vibracija. Kako je intenzitet vrpce proporcionalan promjeni dipolnog momenta, veze koje imaju izraženiji polarni karakter najčešće imaju intenzivnije vrpce. Zato se intenzitet vibracija $C=O$, $C=N$ i $C=C$ smanjuje danim redoslijedom.

1.3.4 Vibracije DNA

Infracrvenu i Raman spektroskopiju možemo ubrojiti u nedestruktivne i vrlo moćne tehnike za ispitivanje vibracijskih svojstava DNA koja su usko povezana sa strukturnim svojstvima. Zato su do sada napravljena brojna istraživanja koja ispituju vibracije DNA u prisutnosti kationa i raznih drugih molekula. Istraživači najčešće odabiru kao uzorke DNA izoliranu iz bioloških tkiva (npr. teleće žlijezde timusa ili lososovih testisa) koje imaju 1000 do 30000 parova baza pa ih zato nazivamo duge DNA. S druge strane, DFT (eng. density function theory) računi koji teorijski predviđaju frekvencije modova vibracije molekule DNA obično su rađeni ili na nukleozidima ili nukleotidima, odnosno ne obuhvaćaju više od nekoliko parova

baza. Stoga postoji malo neslaganje u literaturi oko asignacije pojedinih modova, odnosno valnih brojeva vibracija.

Deoksiribonukleinska kiselina u području od $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ ima oko 40 apsorpcijskih linija koje su posljedica njezine karakteristične građe (14). Cijelo spektralno područje se može podijeliti na nekoliko dijelova ovisno o vrsti i podrijetlu vibracija. Područje od $4000\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$ uglavnom posjeduje svega nekoliko širokih spektralnih linija koje se javljaju kao posljedica vibracija OH i NH_2 skupina. Spektralni dio od $1800\text{--}800\text{ cm}^{-1}$ sadrži najveći broj vibracija i koristi se kao glavno područje za identifikaciju strukture i konformacije DNA. Područje ispod 800 cm^{-1} uglavnom sadrži van-ravninske vibracije baza najčešće vrlo slabih intenziteta.

Spektar DNA u području od $1800\text{--}800\text{ cm}^{-1}$ se može podijeliti u 2 dijela: vibracije baza ($1800\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$) i vibracije DNA okosnice (eng. backbone vibrations) pri čemu se vibracije okosnice sastoje od vibracija šećera i fosfata ($1300\text{--}800\text{ cm}^{-1}$). Razlog tome je velika razlika u konstantama vezanja i građi različitih dijelova molekule. Dvostruke veze, koje se u principu nalaze na višim frekvencijama od jednostrukih veza, ograničene su na područje baza pa je moguće odvojeno gledati vibracije baza od vibracija ostatka molekule. Međutim, vibracije pojedinačnih baza (A, T, G, C) puno je teže razlučiti, pogotovo ako se radi o istoj vibraciji ili vibracijama bliskih frekvencija. C=O vibracija je dobar primjer. Naime, i timin i gvanin i citozin posjeduju barem jednu C=O vibraciju, koja bi se trebala nalaziti na oko 1750 cm^{-1} . Međutim, različiti atomi koji se nalaze u neposrednoj blizini ugljikovog i kisikovog atoma utječu na pomak karbonilne skupine, pa C=O vibracije kod DNA nalazimo i na oko 1710 i 1660 cm^{-1} . S druge strane, moguće je ispreplitanje modova koji pripadaju različitim bazama (A, G, C ili T). Dobar primjer je C=N vibracija na 1490 cm^{-1} koja ima doprinos i od gvanina i citozina. Takva ispreplitanja vrpce otežavaju asignaciju vibracija pa ona često nije jednoznačna.

Vibracije okosnice generalno se mogu podijeliti na vibracije fosfatne skupine ($1235\text{--}1085\text{ cm}^{-1}$), fosfodiester veze (860 i 830 cm^{-1}) te vibracije deoksiriboze. Vibracije deoksiriboze najteže je asignirati od spomenutih vibracija zbog velikog preplitanja (eng. mixing) C-C i C-O veza. Modovi vezani uz fosfodiester vezu i šećer osjetljivi su na promjenu konformacije DNA okosnice pa se vibracije oko 860 i 830 cm^{-1} smatraju markerima A i B forme.

1.4 Osnove UV spektrofotometrije

UV spektrofotometrija, u istraživanju DNA ispituje elektronska svojstva baza, vrlo je korisna i uvriježena metoda za karakterizaciju deoksiribonukleinske kiseline. DNA apsorbira ultraljubičasto svjetlo u području valnih duljina od 220 do 300 nm, te na oko 260 nm postiže maksimum apsorpcije (1). Tri ključne veličine koje karakteriziraju uzorak DNA korištenjem UV spektrofotometrije su ekstinkcijski koeficijent, valna duljina za koju se postiže maksimalna apsorpcija te hipokromativnost (eng. hypochromicity). Odnos intenziteta ulaznog zračenja I_0 i transmitiranog zračenja I prolaskom kroz otopinu dan je Beer-Lambertovim zakonom

$$I = I_0 10^{-\varepsilon c l}, \quad (1.47)$$

gdje je ε ekstinkcijski koeficijent, c koncentracija otopine, a l duljina optičkog puta. Omjer intenziteta transmitiranog i ulaznog zračenja naziva se transmitancija T ,

$$T = \frac{I}{I_0} = 10^{-\varepsilon c l}. \quad (1.48)$$

Iz gornje relacije može se uvesti i veličina apsorbancija definirana kao

$$A = \log(T^{-1}) = \log(I_0 / I), \quad (1.49)$$

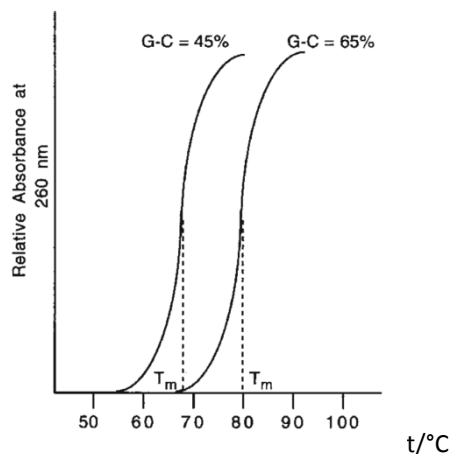
tj.

$$A = \varepsilon c l. \quad (1.50)$$

Maksimalna apsorbancija postiže se na valnoj duljini od oko 260 nm i označava se A_{260} . Ekstinkcijski koeficijent DNA ovisi o udjelu određenih baza u DNA, a za otopine DNA u konformaciji dvostruke uzvojnice prosječan ekstinkcijski koeficijent iznosi $\varepsilon = 6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (25). Ako se uzme u obzir da molarna masa para baza iznosi $M_r = 660 \text{ g/mol}$, ekstinkcijski koeficijent može se zapisati u mjernim jedinicama prilagođenim eksperimentalnim uvjetima, odnosno u L/gcm. Tada za ds DNA otopine ekstinkcijski koeficijent iznosi $\varepsilon = 20 \text{ Lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Koncentracija DNA u otopini može se odrediti mjerenjem apsorbancije te uvrštavanjem u relaciju (1.50). Ukoliko maksimalna apsorbancija u kiveti optičkog puta 1 cm iznosi $A_{260} = 1$, tada je koncentracija ds DNA 0,05 g/L. Osim za određenje koncentracije, mjerenje apsorbancija se koristi za određivanje „čistoće“ uzorka u odnosu na udio proteina u DNA. Budući da proteini apsorbiraju na valnoj duljini od oko 280 nm, omjer A_{260}/A_{280} služi kao

mjera čistoće DNA. Priprema se smatra čistom ako omjer A_{260}/A_{280} iznosi od 1,8 do 2,0, dok su niži omjeri indicacija zagađenja proteinima.



Slika 1.18 Slika prikazuje povećanje apsorbancije (hiperkromni porast) s porastom temperature kod ds DNA s različitim udjelom G-C parova. G-C parovi sadrže tri vodikove veze, a A-T parovi dvije, pa DNA s većim udjelom G-C parova ima višu temperaturu denaturacije T_m . Preuzeto iz (52).

Budući da apsorpcija DNA u UV području uglavnom dolazi od apsorpcije baza, a ne šećera i fosfata, promjene apsorbancije mogu se povezati s promjenama u vertikalnom slaganju baza. Apsorbancija polinukleotida ovisi o sumi apsorbancija pojedinih nukleotida, ali i o učinku međusobne interakcije nukleotida pa tako jedan lanac DNA apsorbira manje od zbroja svojih nukleotida, dok DNA u konformaciji dvostruke uzvojnice apsorbira manje od zbroja dva pojedinačna lanca. Taj efekt naziva se hipokromizam i ovisi o slaganju baza (1). Obrnuta pojava zove se hiperkromnost, i odnosi se na povećanje apsorbancije uslijed denaturacije DNA prijelazom iz konformacije dvostruke uzvojnice u jednolančanu konformaciju (ss). Drugim riječima, ds DNA ima manju apsorbanciju od ss DNA pa se UV spektrofotometrijom može pratiti stabilnost dvostruke uzvojnice (Slika 1.18).

Poglavlje 2. Materijali i mjerne tehnike

Za pripremu DNA otopina korišteni su sušeni končići natrijeve soli genomske DNA (Na-DNA) izolirane iz lososovih testisa proizvođača Sigma-Aldrich (proizvodni broj D1626) i čista (demineralizirana) voda Ultrapure MilliQ deklarirane vodljivosti od 0,056 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Prethodno napravljena gel elektroforeza pokazala je da se većina fragmenata DNA nalazi u rasponu od 2000-20 000 parova baza, što odgovara prosječnoj duljini od 4 μm (13). Također, UV spektrofotometrijom utvrđen je mali udio proteina, $A_{260}/A_{280} = 1,8\text{-}2,0$. Za pripremu MgCl_2 otopina korišten je magnezij klorid heksahidrat (Roth Company), a za dijalizu DNA vodenih otopina korištena je membrana od celuloze nabavljena od Sigma-Aldrich.



Slika 2.1 Suhi končići natrijeve soli genomske DNA izolirane iz lososovih testisa korišteni za pripremu otopina DNA.

2.1 Priprema uzoraka

2.1.1 Protokoli pripreme vodenih otopina

Na-DNA otopine pripremljene su od liofiliziranih končića DNA u kojima 20% mase odgovara masi vode, a 80% masi DNA (53). Ovaj je rezultat potvrđen mjerenjima UV spektrofotometrijom te je uzet u obzir prilikom pripreme otopina.

Ovisno o kontekstu, koncentraciju DNA moguće je izraziti na više načina pa se tako u daljnjem tekstu spominju: masena koncentracija parova baza DNA (γ_{DNA} u g/L), množinska koncentracija parova baza DNA (c_{DNA} u mM) te množinska koncentracija fosfata (c_P u mM). U daljnjem tekstu, radi jednostavnosti, za koncentraciju parova baza DNA rabi se termin koncentracija DNA.

Kod pripreme vodenih otopina praktično je govoriti o masenoj koncentraciji DNA, γ_{DNA} izraženoj u [g/L] koja se može definirati kao

$$\gamma_{DNA} = \frac{m_{DNA}}{V}, \quad (2.1)$$

pri čemu je m_{DNA} izmjerena masa suhe DNA u gramima, a V volumen otopine u litrama. Množinska koncentracija DNA, c_{DNA} , može se povezati s masenom koncentracijom DNA jednadžbom

$$c_{DNA} = \frac{\gamma_{DNA}}{M_{DNA}}, \quad (2.2)$$

gdje je M_{DNA} molekularna masa jednog para baza i iznosi 666 g/mol. Obzirom da jedan par baza sadrži dvije fosfatne skupine, množinska koncentracija fosfata, c_P , iznosi

$$c_P [mM] = 2 \cdot c_{DNA} [mM], \quad (2.3)$$

ili

$$c_P [mM] = 3 \cdot \gamma_{DNA} [g / L]. \quad (2.4)$$

Protokolom I a) se priprema otopina Na-DNA u 10 mM NaCl u kojoj se uz intrinzične ione natrija nalaze i dodani ioni natrija, dakle imamo sistem s jednom vrstom protuiona (Slika 2.2). Protokolom I b) se priprema otopina Na-DNA u čistoj vodi u kojoj se nalaze samo intrinzični ioni natrija. Protokolom II se pripremaju otopine Na-DNA u $MgCl_2$ različitih ionskih jakosti. Dakle, uz intrinzične ione natrija u otopini se nalaze i dodani magnezijevi ioni. Protokolom III se pripremaju dijalizirane otopine Mg-DNA u $MgCl_2$ različitih ionskih jakosti, u kojima se uz intrinzične ione magnezija nalaze i dodani ioni magnezija. Protokolom IV se pripremaju dijalizirane otopine Mg-DNA u čistoj vodi u kojima se nalaze samo intrinzični ioni magnezija. Slijedi detaljan opis protokola.

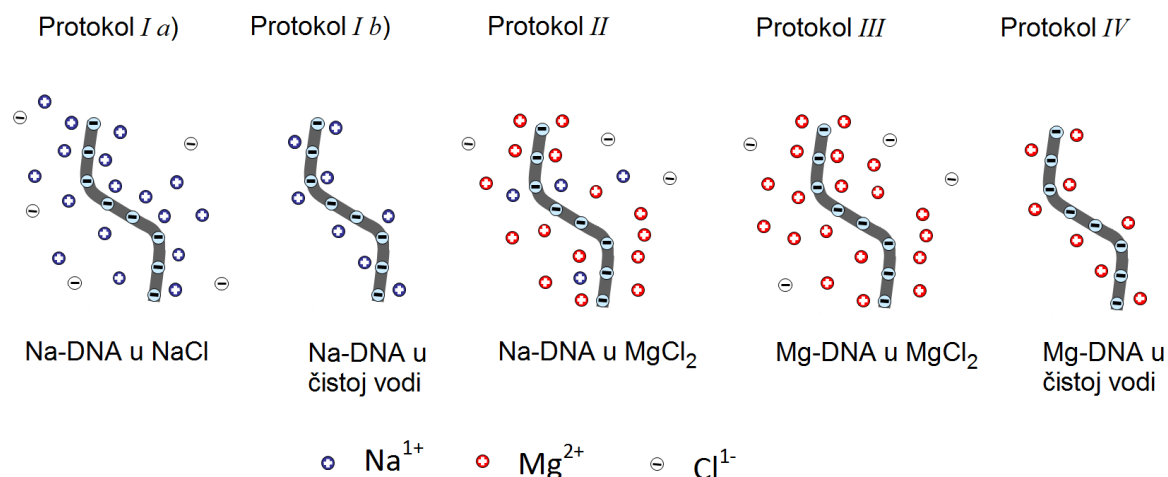
Protokol I a) i I b): Suhi Na-DNA končići otopljeni su u: a) otopini 10 mM natrijevog klorida (Na-DNA u 10 mM NaCl) i b) čistoj vodi (Na-DNA) tijekom 48 sati na 4°C uz povremeno miješanje kako bi se postigla što homogenija otopina konačne koncentracije DNA 7,5 mM. Koncentracija DNA (parova baza) od 7,5 mM odgovara koncentraciji od 15 mM fosfata, tj. $c_{DNA} = 7,5 \text{ mM}$, $c_P = 15 \text{ mM}$.

Protokol II: Otopine MgCl_2 različitih ionskih jakosti su prethodno pripremljene u čistoj vodi i dodavane u Na-DNA u čistoj vodi (Protokol I b) kako bi se u konačnim otopinama postigli željeni omjeri množinskih koncentracija kationa i fosfata, $r = [\text{Mg}]/[\text{P}]$: 0,0067, 0,01, 0,02, 0,07, 0,15, 0,3, 0,5, 0,67, 1, 1,5, 2, 3,3, 5, 10, 20 i 30. Tako se dobije set otopina koji se kraće zove Na-DNA u MgCl_2 . Konačna koncentracija Na-DNA u MgCl_2 otopini također je 7,5 mM (15 mM fosfata).

Protokol III: Otopine Mg-DNA u MgCl_2 proizvedene su u dva koraka. Prvi korak podrazumjeva otapanje suhih Na-DNA končića u otopinama magnezijevog klorida različitih ionskih jakosti tijekom 48 sati na 4°C kako bi se postigli željeni omjeri: $r = 0,0067, 0,02, 0,07, 0,3, 0,67, 3,3$ i 10, te koncentracija DNA od 15 mM (30 mM fosfata). Tako dobivene DNA MgCl_2 otopine dijalizirane su prema MgCl_2 otopinama iste ionske jakosti tijekom 24 sata na 4°C u omjeru volumena uzorka i MgCl_2 otopine 1:500, uz dvije izmjene, u svrhu zamjene intrinzičnih iona natrija magnezijevim ionima (12). Konačne otopine Mg-DNA u MgCl_2 dobivene su razrjeđivanjem otopinama odgovarajućeg volumena i ionske jakosti kako bi se postigli željeni omjeri $r = 0,0067, 0,01, 0,02, 0,07, 0,15, 0,3, 0,5, 0,67, 2, 3,3, 5$ i 10 konačne koncentracije DNA 7.5 mM (15 mM fosfata).

Protokol IV: Otopina Mg-DNA u čistoj vodi proizvedena je iz otopine Mg-DNA u MgCl_2 , pripravljene po protokolu III dijalizom prema čistoj vodi tijekom 24 sata na 4°C u omjeru volumena uzorka i čiste vode 1:500, uz dvije izmjene, u svrhu uklanjanja dodanih magnezijevih iona. Konačna koncentracija DNA u danoj otopini iznosi 7,5 mM (15 mM fosfata) te se u otopini nalaze samo intrinzični Mg ioni.

Slijedeći opisane protokole pripremljene su ove otopine: Na-DNA u 10 mM otopini natrijevog klorida (Na-DNA u 10 mM NaCl), čiste vodene otopine Na-DNA (Na-DNA), Na-DNA u otopini magnezijevog klorida (Na-DNA u MgCl_2), Mg-DNA u otopini magnezijevog klorida (Mg-DNA u MgCl_2) te čiste vodene otopine Mg-DNA (Mg-DNA) (Slika 2.2).



Slika 2.2 Shematski prikaz svih pripremljenih i analiziranih otopina. Plavi kružići označavaju ione natrija, narančasti kružići ione magnezija, a zeleni trokuti ione klorida.

2.1.2 Protokol pripreme tankih filmova

Eksperimentalno najzahtjevniji dio istraživanja predstavljao je razvoj protokola za pripremu tankih filmova koji moraju biti homogeni, jednake debljine i u istim uvjetima sušenja. Optimiziranje parametara vezanih uz same DNA otopine, podloge za sušenje i FTIR mjerenja trajalo je gotovo 2 godine. Tako je u testnim protokolima sušenja varirana koncentracija DNA otopina, volumen kapljice, vrijeme sušenja te metode sušenja. Također, isprobane su razne podloge poput ZnSe, CaF_2 te BaF.

Istraživanje Kellera i suradnika pokazalo je da sporim, korak po korak sušenjem, kod tankih filmova dolazi do prijelaza ds DNA iz B u A formu. Drugim riječima, ako se uzorak u nekoliko koraka, od po 24 h suši od 100% do 65% r.h. (eng. relative humidity) tada će prijelaz iz B u A formu biti potpun (16). S druge strane, kod brzog sušenja, zbog spore kinetike prijelaza, potpuni prijelaz iz B u A nije moguć (16) pa dio DNA zadržava B formu. To nas je navelo na zaključak da kratkim sušenjem možemo izbjeći prijelaz iz B u A formu ds DNA.

Tanki filmovi DNA pripremljeni su od konačnih otopina DNA ($c_{DNA} = 7,5$ mM, masena koncentracija je 5 g/L) na slijedeći način. 30 μ L odgovarajuće DNA otopine nanoseno je na silicijevu pločicu (koja ujedno služi i kao IR prozor) te sušeno pomoću vakuum pumpe u eksikatoru tijekom 10 min. Ovakav protokol se, nakon niza testiranja drugih protokola, pokazao kao vrlo dobar jer je vrijeme sušenja kratko, a nakon njegovog provođenja spektri

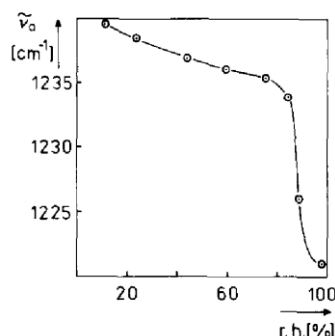
tankih filmova ostaju nepromijenjeni i do 24 h nakon pripreme. Tanki film Na-DNA u čistoj vodi na silicijevom nosaču prikazan je na slici 2.3.



Slika 2.3 Tanki film Na-DNA u čistoj vodi (Protokol i *I b*) na silicijevom nosaču. Film je pripremljen sušenjem 30 μL uzorka pomoću vakuum pumpe u eksikatoru tijekom 10 min.

Treba primijetiti da prethodno definirana koncentracija DNA zapravo odgovara koncentraciji konačne otopine, a ne koncentraciji DNA u tankom filmu koja se ne može lako definirati. Međutim, to ne utječe na rezultate jer su FTIR mjerenja provedena kao funkcija omjera množinskih koncentracija kationa i fosfata, što je svakako dobro definirana veličina te se ne mijenja tijekom sušenja u eksikatoru.

Fosfatne skupine osjetljive su na hidratacijske uvjete u tankom filmu pa se pozicija asimetrične PO_2^- vibracije može povezati s postotkom vlage u tankom filmu (54). Pohle i suradnici koristili su vrlo sličan eksperimentalni postav kao u našem slučaju pa je moguće pomoću slike 2.4 odrediti postotak vlage u tankom filmu. Uzimajući u obzir vrijeme sušenja te poziciju asimetrične PO_2 vibracije referentnog Na-DNA spektra (1234 cm^{-1}) procijenjena je relativna vlažnost Na-DNA filma na oko 85%.



Slika 2.4 Valni broj asimetrične vibracije PO₂ skupine kao funkcija relativne vlage dobiven infracrvenom spektroskopijom na tankim filmovima autora Pohle i suradnika. Slika je preuzeta iz (54).

2.2 Mjerne tehnike

Za karakterizaciju uzoraka napravljena je infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR), UV spektrofotometrija te pH mjerenja. Za FTIR mjerenja filmovi DNA pripremljeni su iz otopina koncentracije 7,5 mM, dok su za UV mjerenja otopine razrijeđene do koncentracije od 0,1 g/L (0,15 mM).

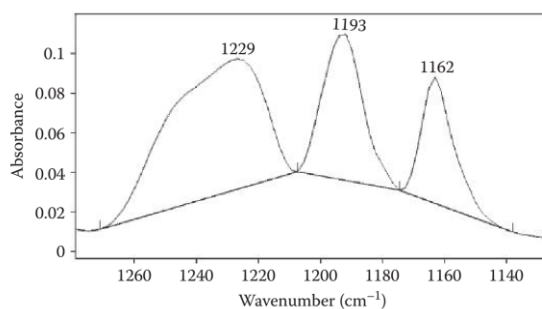
2.2.1 Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom

FTIR spektri tankih filmova dobiveni su na PerkinElmer uređaju Spectrum GX u Laboratoriju za nanomaterijale Zavoda za fiziku i biofiziku Medicinskog fakulteta. Korišten je MCT detektor hlađen tekućim dušikom te KBr djelitelj zrake (eng. beamsplitter). Spektri su snimani u transmisijском modu usrednjavajući 64 skenova s rezolucijom 4 cm⁻¹ i automatskom korekcijom za vodu. Svi spektri su dobiveni unutar 30 minuta od izrade tankog filma. Također, dodatnom analizom spektara snimanih 120 i 240 min nakon izrade tankog filma utvrđeno je da spektri ostaju nepromijenjeni unutar navedenog vremenskog intervala. Svi spektri prikazani i analizirani u ovom radu snimljeni su unutar 3 tjedna.

2.2.1.1 Obrada spektara

U idealnom slučaju, apsorpcijski FTIR spektar trebao bi imati ravnu osnovnu liniju (eng. flat baseline) koja prolazi kroz nulu. Međutim, u mnogim slučajevima spektri nemaju idealan baseline. Problemi koji se javljaju mogu se svrstati u 3 kategorije: pomak, nagib i zakrivljenost (eng. offset, slope and curvature) osnovne linije (55). Uzroci mogu biti raznoliki, od prevelike debljine i nehomogenosti uzorka do variranja temperature i napona u samom

instrumentu. Zakrivljenost osnovne linije najčešće je uzrokovana odazivom detektora, ali može biti povezana i s FTIR laserom ili interferometrom. U tom slučaju, spektri se korigiraju, odnosno korigira se osnovna linija (eng. baseline correction). Na slici 2.5 prikazan je spektar u kojem su linije između lokalnih minimuma linearne funkcije. U praksi se često koriste polinomi, ali i neke druge funkcije.



Slika 2.5 Korekcija osnovne linije infracrvenog spektra pomoću 3 linearne funkcije. Slika preuzeta iz (55).

Osim korekcije osnovne linije ponekad je pogodno napraviti normiranje spektra. Normiranje na određenu vrpce ν_N podrazumijeva množenje apsorbancije cijelog spektra konstantnim faktorom tako da apsorbancija vrpce ν_N nakon normiranja iznosi 1. Većina radova IR spektroskopije analizira intenzitete vrpce renormaliziranih na intenzitet vrpce na 967 cm^{-1} , odnosno I_x/I_{967} (15,56,57). Tako su i u ovom radu intenziteti spektara podijeljeni s intenzitetom odgovarajuće ν_{967} vrpce, što olakšava međusobnu usporedbu spektara.

Obrada spektara napravljena je pomoću programskog paketa Kinetics u sklopu Matlaba. Neobrađeni spektri prvo su korigirani na osnovnu liniju (eng. baseline corrected) koristeći funkciju polinoma (eng. polynomial baseline), a zatim normirani na vrpce 967 cm^{-1} koja pokazuje zanemarive spektralne promjene dodavanjem kationa (15,56,57).

2.2.1.2 Reproducibilnost spektara tankih filmova

U cilju utvrđivanja reproducibilnosti valnih brojeva i intenziteta vrpce spektara tankih filmova napravljen je set FTIR mjerenja tankih filmova dobivenih iz Na-DNA u čistoj vodi koncentracije DNA od 7.5 mM (5 g/L) dobivene protokolom *I b*). Iz iste otopine Na-DNA, pripremljeno je 5 tankih filmova po protokolu sušenja opisanom u prethodnom potpoglavlju.

Na temelju analize spektara 5 tankih filmova moguće je donijeti generalni zaključak da spektri dobiveni iz iste otopine danim protokolom sušenja daju vrlo precizne rezultate valnih

brojeva i intenziteta vrpce. Odstupanja valnih brojeva su manja od 0,1%, dok su odstupanja intenziteta vrpce do 3%, s iznimkom A (860 cm^{-1}) i B markera (836 cm^{-1}) koji pokazuju odstupanje intenziteta do 10%. Veće odstupanje intenziteta vrpce A i B markera od ostalih vrpce je prihvatljivo jer se radi o vrpce vrlo malog intenziteta. Također, područje ispod 900 cm^{-1} pokazuje nešto veću ovisnost o pozadinskoj apsorpciji (eng. background) obzirom da kristalni silicij u tom području više nije sasvim IR transparentan.

2.2.2 UV spektrofotometrija

UV spektrofotometrijska mjerenja napravljena su u rasponu valnih duljina od 200 do 800 nm na uređaju Varian Cary Bio 100 na Zavodu za kemiju i biokemiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu. Za mjerenja je korištena kvarcna kiveta optičkog puta 10 mm pa su DNA otopine razrijeđene do koncentracije parova baza 0,15 mM (0,3 mM fosfata) pritom pazeći da se ne naruši omjer koncentracija dodanih kationa i fosfata. Volumen otopina u kiveti iznosio je 2 mL. Sve otopine mjerene su unutar 72 sata od njihove pripreme. Prilikom analize spektara korišteni su neobrađeni spektri.

Za karakterizaciju uzoraka važna je apsorbancija na valnim duljinama oko 260 i 280 nm koje su označene kao A_{260} i A_{280} . Spektrofotometrijska mjerenja apsorbancije na valnoj duljini 260 nm izvedena su u cilju utvrđivanja realnih koncentracija DNA u otopinama te stabilnosti dvostruke uzvojnice DNA u čistim vodenim otopinama i vodenim otopinama s dodanom soli. Čistoća DNA provjerena je mjerenjem apsorbancija na valnim duljinama 260 i 280 nm. Omjeri A_{260}/A_{280} za sve ispitane uzorke su između 1,8-2,0. Time je utvrđeno da je priprema DNA uzoraka čista, odnosno da DNA ne sadrži veliki udio proteina.

2.2.3 pH mjerenja

Sva pH mjerenja izvedena su na uređaju SevenEasy pH proizvođača Mettler Toledo. Korištena je elektroda za male volumene otopina (oko 100 μL). pH mjerenja izvedena su na istim otopinama od kojih su se dobivali filmovi, a koje su prethodno bile uskladištene na temperaturi $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ unutar nekoliko tjedana. Za čiste vodene otopine DNA izmjeren je $\text{pH} = 7$ dok je za otopine Na-DNA u MgCl_2 i Mg-DNA u MgCl_2 različitog omjera r izmjeren $\text{pH} = 6,0 \pm 0,5$.

Poglavlje 3. Rezultati i diskusija

3.1 Na-DNA u 10 mM NaCl

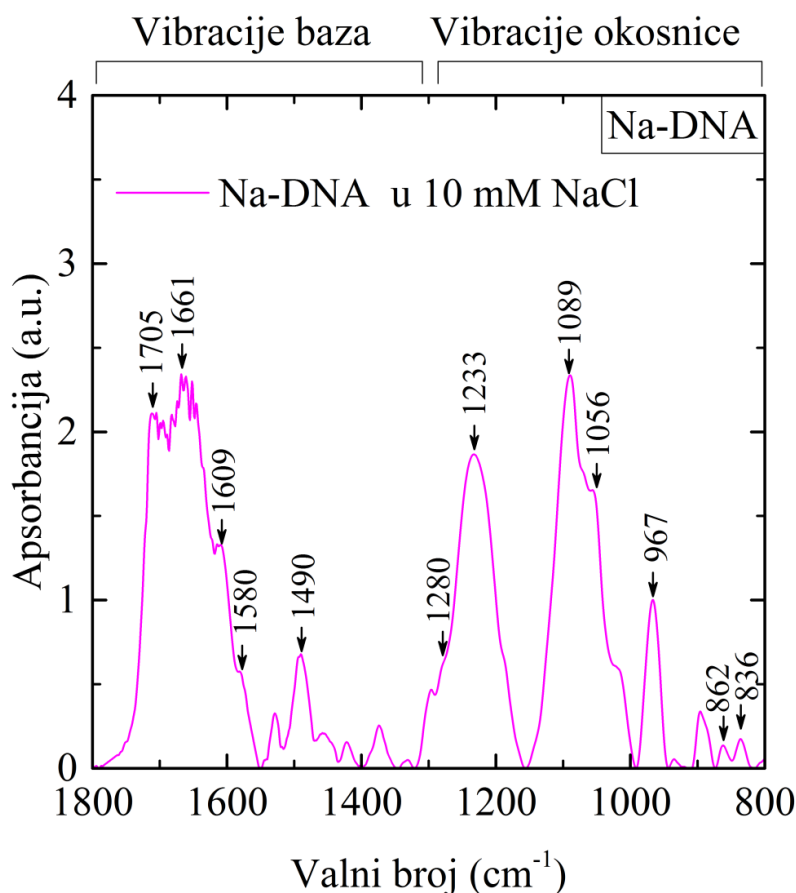
3.1.1 Osnovne vibracije u spektru Na-DNA u 10 mM NaCl

Na slici 3.1 prikazan je spektar tankog filma Na-DNA u 10 mM otopini natrijevog klorida (Na-DNA u 10 mM NaCl) u području valnih brojeva od 800 do 1800 cm^{-1} , koji je podjeljen na vibracije baza i okosnice. Vibracije koje pripadaju bazama nalaze se u području između 1300-1800 cm^{-1} dok su vibracije fosfatnih skupina i šećera između 800-1300 cm^{-1} . Na temelju ranije objavljenih rezultata mjerenja infracrvenom spektroskopijom DNA tankih filmova (16,17,22,58-60), DNA otopina (14,15,19,56,61) i DFT kalkulacija (62-65) napravljena je asignacija vibracija tankih filmova Na-DNA u 10 mM NaCl (Tablica 3.1) koja je detaljnije opisana u daljnjem tekstu.

Tablica 3.1. Asignacija vibracija tankih filmova Na-DNA u 10 mM NaCl

Valni brojevi (cm^{-1})	Asignacija*
1705	C6=O6 (G) i C2=O2 (T)
1661	C4=O4 (T)
1609	C8=N7 (A)
1580	C=N i C=C (G i A)
1490	C8=N7 (G) i C4=N3 (C)
1280	Šećer-timin
1233	P-O ν_{as}
1089	P-O ν_{sim}
1056	C-O i C-C šećera
967	C-C šećer
862	A marker
836	B marker

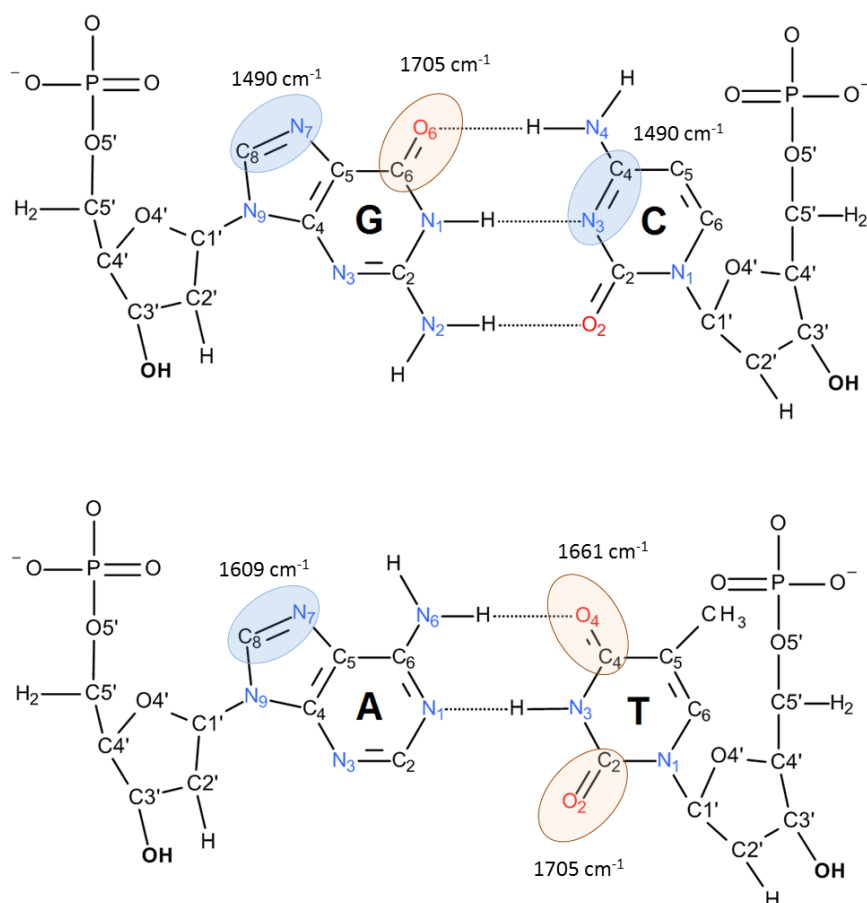
*Asignacija je napravljena na temelju referenci (14-17,19,22,56,58-65)



Slika 3.1 FTIR spekter tankih filmova Na-DNA u 10 mM NaCl u području od 800-1800 cm⁻¹ na približno 85% r.h. Brojevi i strelice označavaju vrpce asignirane vibracijama baza i DNA okosnice.

3.1.1.1 Vibracije baza

Četiri najintenzivnije vibracije u području baza nalaze se na valnim brojevima 1705, 1661, 1609 i 1490 cm⁻¹ (Slika 3.1). Prve dvije vrpce (1705 i 1661 cm⁻¹) najveći doprinos imaju od C=O vibracija, dok su vrpce na 1609 i 1490 cm⁻¹ određene C=N vibracijama (Slika 3.1). Važno je primijetiti da se C=N veze nalaze u gvaninu, adeninu i citozinu, a C=O veze u gvaninu, citozinu i timinu, te da timin sadrži dvije C=O veze, jednu u kojoj sudjeluje atom ugljika C2 i jednu u kojoj sudjeluje atom ugljika C4 (Slika 3.2).



Slika 3.2 Asignacija vibracija baza FTIR spektra tankih filmova Na-DNA u 10 mM NaCl.

Vrpca na 1705 cm⁻¹ superpozicija je C6=O6 vibracije gvanina i C2=O2 vibracije timina. Zbog vrlo bliskih frekvencija, ove dvije vibracije se uglavnom ne mogu razlučiti pa čine jednu vrpca. U literaturi je stoga vrlo čest zapis C=O (G,T).

Vrpca na 1661 cm⁻¹ assignirana je drugoj od ukupno dvije C=O vibracije u timinu, tj. C4=O4. Iako obje karbonilne skupine timina imaju karakter dvostruke veze, C4=O4 vibracija nalazi se na puno manjem valnom broju (1661 cm⁻¹) od C2=O2 vibracije (1705 cm⁻¹). Razlog leži, jednim dijelom, u tome što je O4 atom timina sudjeluje u vodikovoj vezi s NH₂ skupinom adenina u Watson-Crick paru, dok je O2 atom u timinu slobodan (Slika 3.2). Formiranjem vodikove veze N-H...O4, smanjuje se elektronska gustoća C4=O4 veze pa se vibracija nalazi na nižem valnom broju nego u slučaju C2=O2 veze.

Vrpca na 1609 cm⁻¹ najveći doprinos ima od N7=C8 vibracije adenina, dok je vrpca na 1490 cm⁻¹ superpozicija C4=N3 citozina i C8=N7 gvanina.

Vibracije baza u pravilu su osjetljive na promjene u vertikalnom slaganju baza, promjene vodikovih veza te na interakcije DNA s ionima i molekulama.

3.1.1.2 Vibracije fosfatnih skupina

Asimetrična i simetrična istezna vibracija fosfatne skupine (ν_{as} , ν_s) nalaze se na valnim brojevima 1233 i 1089 cm^{-1} te se ubrajaju u najintenzivnije vibracije u spektru DNA. Budući da su fosfatne skupine negativno nabijene, ove vrpce vrlo su osjetljive na prisutnost različitih kationa, promjene u vodikovim vezama koje fosfatne skupine čine s otapalom te na hidratacijske uvjete. Od spomenute dvije, asimetrična vibracija puno je osjetljivija na elektrostatske promjene u bliskoj okolini uzvojnice u odnosu na simetričnu vibraciju, stoga promjene intenziteta i valnog broja asimetrične vrpce sugeriraju strukturne i konformacijske promjene u DNA (54).

Frekvencije vibracija O-P-O veze (Slika 3.2) ovise o mnogo parametara, od kojih su najvažniji jačina P-O veze i kut O-P-O veze. Pohle i suradnici navode kako eksperimentalna istraživanja pokazuju da se prilikom formiranja vodikove veze s fosfatnom skupinom, odnosno $\text{PO}_2^- \cdots \text{H}_2\text{O}$, jačina kovalentne P-O veze smanjuje u iznosu od oko 5% (54). Razlog tome je smanjenje elektronske gustoće oko P-O veze uslijed vezanja molekule vode na fosfatnu skupinu. Takva promjena manifestira se u IR spektru kao smanjenje valnog broja ν_{as} i ν_s . Kod asimetrične vibracije smanjenje valnog broja (crveni pomak) prilikom formiranja vodikove veze može biti i do 30 cm^{-1} , dok se valni broj simetrične vibracije pomiče tek svega nekoliko cm^{-1} . Kod ν_{as} , smanjenje konstante vezanja i smanjenje kuta uzrokuju promjene u istom smjeru, tj. obje uzrokuju smanjenje valnog broja. Kod simetrične vibracije promjene nisu u istom smjeru, tj. smanjenje kuta uzrokuje povećanje valnog broja (plavi pomak) pa dolazi do kompenzacije između dvije promjene, što rezultira manjim ukupnim pomakom valnog broja. Zbog velike razlike u osjetljivosti vrpce, često se analizira samo ν_{as} , čije promjene položaja i intenziteta mogu biti prepoznate kao posljedice promjena: konformacije DNA, razine hidratacije, koncentracije kationa, jačina vertikalnog slaganja baza te vodikovih veza Watson-Crick parova.

Položaj asimetrične vibracije ovisno o konformaciji DNA usko je povezan s hidratacijskim uvjetima u kojima se DNA nalazi. Zato postoje male razlike u opaženim intervalima valnih

brojeva za A i B formu u otopini i tankom filmu. U DNA otopini, asimetrična vibracija nalazi se u intervalu $1222\text{--}1225\text{ cm}^{-1}$ kada je DNA u B formi, a u A formi nalazi se na višim valnim brojevima, oko 1240 cm^{-1} (15,65,66). Kod DNA tankih filmova situacija je kompliciranija jer se filmovi mogu nalaziti na različitom stupnju vlage što utječe na poziciju vrpce. Generalno, DNA u tankom filmu je u B formi pri visokom stupnju vlage, od 84-100%, i u tom intervalu asimetrična vibracija može se nalaziti od 1220 do 1232 cm^{-1} (16,17,22,58-60). U tankom filmu relativne vlage niže od 85% r.h., DNA pokazuje naznake prijelaza iz B u A formu te se, kao i u otopini, asimetrična vibracija pomiče prema višim valnim brojevima do 1240 cm^{-1} .

Utjecaj kationa na asimetričnu vibraciju fosfata u pravilu nije jednoznačno određen zbog različite prirode vezanja kationa i fosfata. Tako se u literaturi može naći da prisutnost kationa u otopini DNA ponekad uzrokuje povećanje valnog broja asimetrične vibracije fosfata, kao u slučaju nekih kationa iz skupine lantanida (19,21), a ponekad smanjenje, kao npr. za kation olova (18). Također, vibracija asimetrične fosfatne skupine osjetljiva je na koncentraciju kationa, pa tako nije rijedak slučaj da unutar jednog koncentracijskog intervala određeni kation uzrokuje pomak vrpce u jednom smjeru, a u drugom intervalu pomak u suprotnom smjeru (19,21). Uglavnom se pomak prema nižim valnim brojevima povezuje sa stabilizacijom B forme dvostruke uzvojnice uslijed djelovanja kationa (18).

Također, uz promjene valnih brojeva, ν_{as} i ν_s mogu pokazivati promjene intenziteta koje se u grubo mogu prepoznati kao stabilizacijski i destabilizacijski efekti. Smanjenje intenziteta fosfatnih skupina povezano je sa stabilizacijom i povećanim vertikalnim slaganjem baza, dok je povećanje intenziteta uglavnom povezano s destabilizacijskim efektima kao što su denaturacija i smanjenje vertikalnog slaganja baza (18,19) ili drugim konformacijskim promjenama, npr. kompaktiranjem (35,67).

3.1.1.3 Vibracije šećera

Vrpce valnih brojeva nižih od 1090 cm^{-1} uglavnom pripadaju vibracijama dijelova nukleotida koji čine diestersku vezu ili pripadaju šećeru, tj. furanoznom prstenu. Vrlo su osjetljive na strukturne i konformacijske promjene pa služe kao indikatori forme DNA. Najvažnije vibracije ovog dijela spektra nalaze se na 1056 , 967 , 862 i 836 cm^{-1} . Vibracija na 967 cm^{-1} asignirana je

C-C i C-O vibracijama šećera i u pravilu je neosjetljiva na konformacijske promjene (64) pa se uzima kao referentna vrpca za normiranje spektra (vidi 2.2.1.1).

Vibracija na 1056 cm^{-1} ima doprinos od više C-O i C-C veza, a po referenci (64) u toj vibraciji sudjeluju: C3'-C4', C5'-O5' te C1'-C2'H veze (Slika 1.4 i Slika 3.2). Dakle, ova vibracija sastoji se i od atoma koji čine furanozni prsten (C1', C2', C3' i C4'), ali i od atoma koji sudjeluju u fosfodiester vezi (C3' i O5'). Drugim riječima, vrpca na oko 1056 cm^{-1} daje informacije o konformaciji samog šećera, ali i o strukturi cijele DNA okosnice. Iz tog razloga, asignacija i interpretacija promjena koje se događaju na ovoj vrpci je izrazito složena, a i sama identifikacija atoma koji sudjeluju u ovoj vibraciji nije jednoznačna. Hidratacija, odnosno hidratacijski uvjeti uvelike određuju izgled i položaj vrpce. U smanjenim hidratacijskim uvjetima, relativne vlage niže od 75%, furanozni prsten DNA poprima C3'-endo strukturu (treći ugljikov atom nalazi se izvan ravnine) koja se povezuje s A konformacijom DNA (64). U tom slučaju vrpca se pomiče prema većim valnim brojevima (plavi pomak), oko 1069 cm^{-1} (60,66). U slučaju B konformacije DNA, furanozni prsten poprima C2'-endo strukturu te se vrpca nalazi u intervalu $1050\text{--}1055\text{ cm}^{-1}$.

Od važnijih vrpca u spektru Na-DNA u 10 mM NaCl preostale su vibracije asignirane na 862 i 836 cm^{-1} (Slika 3.1). U IR spektroskopiji ove vrpce se smatraju markerima A i B forme te se često u literaturi spominju zajedno. Vibracija na 836 cm^{-1} asignirana je vibraciji šećera (C-C i C-O vibracije) u C2'-endo formi. Prilikom promjene forme iz C2'-endo u C3'-endo, dana vibracija se pomiče na niže valne brojeve, od oko 810 cm^{-1} (64,65). Vibracija na valnom broju $\approx 860\text{ cm}^{-1}$ se također pripisuje vibraciji šećera (C-C i C-O vibracije), ali se javlja samo kada se šećer nalazi u C3'-endo formi. Zato se vrpca na 836 cm^{-1} smatra markerom B forme, a 860 cm^{-1} markerom A forme. Česta zabuna je da ove dvije vrpce predstavljaju isti mod te da se prilikom B-A prijelaza vrpca s 836 cm^{-1} pomiče na 860 cm^{-1} . Do zabune obično dolazi kada se u spektrima istovremeno javljaju oba moda. Zapravo je B forma ds DNA karakterizirana jednom vibracijom na 836 cm^{-1} , a A forma ds DNA s dvije vibracije na 810 cm^{-1} i 860 cm^{-1} , iako se u A formi najčešće gleda samo doprinos od vibracije na 860 cm^{-1} .

U spektru Na-DNA u 10 mM NaCl (Slika 3.1) vidljiva su oba moda, te je intenzitet vrpce na 836 cm^{-1} nešto veći. Prisutnost oba moda sugerira da cijeli uzorak nije sasvim u B formi, već

se dio ds DNA nalazi u A formi (detaljnije u sljedećem potpoglavlju). U tom slučaju moguće je na temelju omjera integralnih intenziteta vrpce odrediti udio DNA u B formi (%B), ili A formi (%A) po jednadžbama autora Taillandier i Liquers:

$$\begin{aligned} \%B &= \frac{A_{836}}{A_{836} + A_{860}} \cdot 100\% \\ \%A &= \frac{A_{860}}{A_{836} + A_{860}} \cdot 100\% \end{aligned} \quad (3.1)$$

gdje A_{836} i A_{860} predstavljaju integralne intenzitete danih A i B markera (66,68,69).

3.1.2 A i B forma Na-DNA i IR spektar

U infracrvenom spektru DNA postoji nekoliko vibracija koje mogu dati informaciju vezanu za formu DNA. To su prije svega A i B markeri (862 i 836 cm^{-1}), asimetrična vibracija fosfatne skupine (1233 cm^{-1}) i šećer-fosfat vrpca (1056 cm^{-1}) (22,64,68). Međutim, zbog vrlo širokog raspona eksperimentalnih uvjeta u kojima su snimani IR spektri, postoji čitav niz neslaganja između autora koja se prije svega odnose na definiranje rubnih uvjeta položaja vibracija A i B forme DNA. Analiza postaje još kompleksnija ukoliko se želi uspoređivati DNA u vodenoj otopini s tankim filmom DNA.

Spektri DNA otopina u pravilu ne pokazuju značajne konformacijske promjene te su valni brojevi vrpce u literaturi slični. Tanki filmovi, zbog direktnog utjecaja vlage, pokazuju visoku osjetljivost na eksperimentalne uvjete pa su neslaganja između autora nešto veća. **Tablica 3.2** prikazuje okvirne vrijednosti valnih brojeva vibracija tankih filmova Na-DNA u 10 mM NaCl ($\approx 85\% \text{ r.h.}$) uspoređene s vrijednostima iz literature za otopine DNA u B formi te tanke filmove DNA u B i A formi.

U spektru Na-DNA u 10 mM NaCl (Slika 3.1) postoje vrpce koje ukazuju na postojanje A forme (862 cm^{-1}) i B forme (836 i 1056 cm^{-1}) dok je asimetrična vrpca, 1233 cm^{-1} , na granici između te dvije forme. Osim vibracija DNA okosnice, vibracije baza također mogu ukazivati na prisutnost A ili B forme. U ovom slučaju mogućnost interpretacije je nešto slobodnija, ali u pravilu vrijedi da su C=O vibracije na nešto većem valnom broju u B DNA ($\approx 1715 \text{ cm}^{-1}$) nego u A DNA ($\approx 1705 \text{ cm}^{-1}$). U spektru Na-DNA u 10 mM NaCl , C=O vibracija (1705 cm^{-1}) i asimetrična vibracija fosfatne skupine (1233 cm^{-1}) ukazuju na postojanje A forme. S druge

strane, B marker na 836 cm^{-1} je intenzivniji od A markera na 860 cm^{-1} , stoga analiza Na-DNA u 10 mM NaCl spektra sugerira da se dio uzorka nalazi u B formi DNA, a dio u A formi.

Ovakvo razmišljanje je i u skladu s dobivenim rezultatom iz jednadžbi (3.1) koje daju udio B DNA od 58%. Situacija da spektri istovremeno pokazuju oba markera uobičajena je za tanke filmove, a vrlo često ista situacija može se naći i u tekućinama (19). U tom slučaju pravu informaciju o formi DNA daje istovremena analiza spomenutih vrpca.

Tablica 3.2. Vrijednosti valnih brojeva vibracija tankih filmova Na-DNA u 10 mM NaCl ($\approx 85\%$ r.h.) uspoređene s vrijednostima iz literature za otopine DNA u B formi te tanke filmove DNA u B i A formi

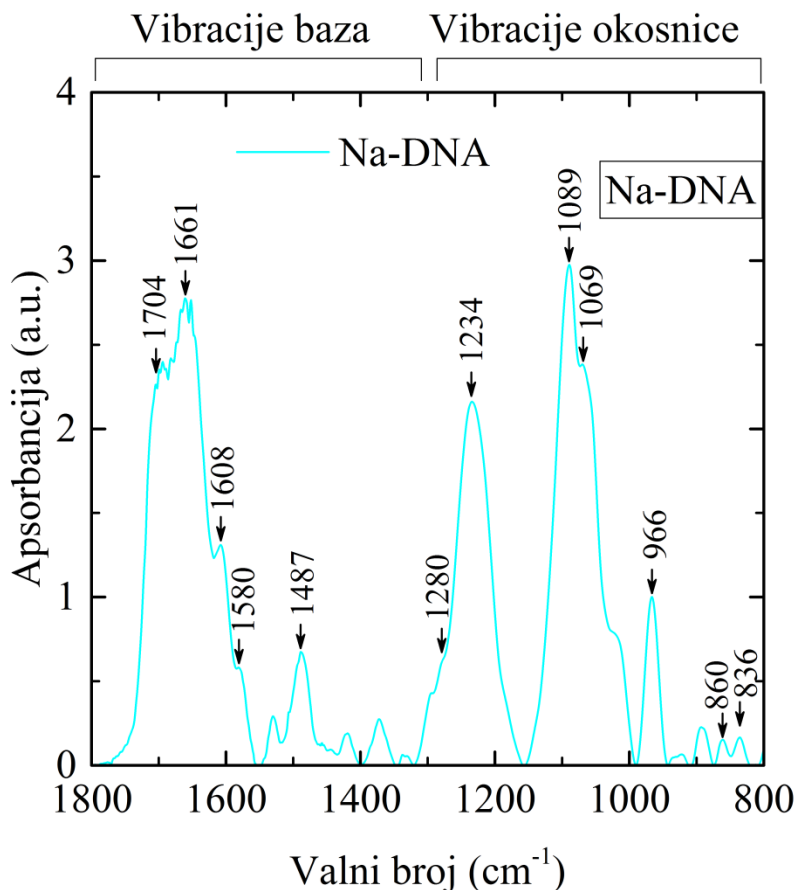
Na-DNA u 10mM NaCl $\approx 85\%$ r.h.	Otopine	Tanki filmovi	
	B forma	B forma 98-84% r.h.	A forma $\approx 75\%$ r.h.
Valni broj (cm^{-1})	Valni broj (cm^{-1})	Valni broj (cm^{-1})	Valni broj (cm^{-1})
1705	1690-1717 ^(a)	1709-1714 ^(d)	1700-1709 ^(g)
1233	1222-1225 ^(a)	1220-1232 ^(e)	1228-1235 ^(h)
862	863 ^(b)	≈ 860 ^(f)	860-864 ^(h)
836	836 ^(c)	833-838 ^(e)	≈ 835 ⁽ⁱ⁾
Indeksirana slova uz valni broj odgovaraju referencama.	^(a) (14,15,19,56,61) ^(b) (19) ^(c) (15,19,56,61)	^(d) (22,59,60) ^(e) (16,17,22,58-60) ^(f) (16,22)	^(g) (22,59) ^(h) (16,17,22,58,59) ⁽ⁱ⁾ (16,17,22)

Spektri Na-DNA u 10 mM NaCl pokazali su se vrlo dobri za usporedbu s već ranije objavljenim rezultatima DNA otopina i tankih filmova (Tablica 3.2). Protokol izrade tankih filmova se pokazao vrlo dobar, jer spektri ne pokazuju znakove denaturacije, te su vidljivi markeri B forme. Međutim, iako je protokol baziran na vrlo kratkom vremenu sušenja i DNA je u prisutnosti i dodanih i intrinzičnih natrijevih iona, djelomičan prijelaz u A formu nije izbjegnut. Obzirom da je jedan od osnovnih ciljeva ovog rada istražiti vibracijska svojstva DNA u prisutnosti dodanih magnezijevih iona, pokazala se potreba za analizom tankih filmova dobivenih iz čiste vodene otopine natrijevih soli DNA.

3.2 Na-DNA u čistoj vodi

Na slici 3.3 prikazan je spektar tankog filma dobivenog iz otopine Na-DNA u čistoj vodi (Na-DNA). U području baza najvažnije su C=O i C=N vibracije koje se nalaze na 1704 cm^{-1} (C6=O6 gvanina i C2=O2 timina), 1661 cm^{-1} (C4=O4 timina), 1608 cm^{-1} (C8=N7 adenina) i 1487 cm^{-1} (C8=N7 gvanina i C4=N3 citozina), dok su u području okosnice najvažnije asimetrična

vibracija fosfatne skupine (1234 cm^{-1}), vibracija šećera na 1069 cm^{-1} te A i B markeri na 860 i 836 cm^{-1} .

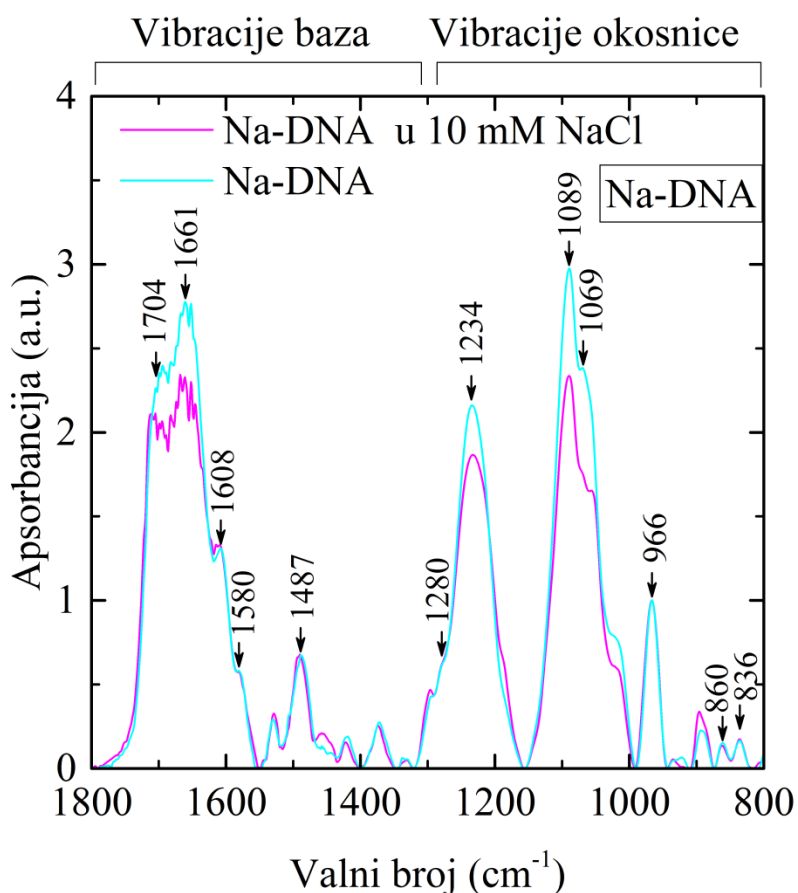


Slika 3.3 FTIR spektar tankog filma Na-DNA u čistoj vodi u području od $800\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ na približno 85% r.h. Brojevi i strelice označavaju vrpce asignirane vibracijama baza i DNA okosnice.

Vibracije na 1704 , 1234 , 1069 cm^{-1} te A i B markeri pokazuju da DNA nije sasvim u B formi (vidi prethodna potpoglavlja) (15). Najrelevantniji su integralni intenziteti A i B markera, koji po jednadžbama (3.1) daju udio B forme oko 55%, i A forme oko 45%. Također, vibracija šećera na 1069 umjesto na 1055 cm^{-1} , C=O vibracija na 1704 umjesto na 1715 cm^{-1} te asimetrična vibracija fosfata na 1234 cm^{-1} umjesto u intervalu od $1220\text{--}1225\text{ cm}^{-1}$, su pokazatelji djelomičnog prijelaza DNA iz B forme u A formu. Ovi rezultati u skladu su s prethodnim FTIR mjerenjima drugih autora koja su pokazala ovakve spektralne promjene čak i pri visokoj relativnoj vlazi do 90% (16,54,58). Kako Na-DNA u čistoj vodi sadrži samo intrinzične natrijeve ione, prijelaz u A formu može se povezati s niskom slanosti otopine. To

je dalje potvrđeno činjenicom da A marker nestaje s povećanjem slanosti, odnosno dodavanjem magnezijevih iona, što se može vidjeti u potpoglavljima 3.3 i 3.5.

Više informacija o utjecaju slanosti otopine može se dobiti iz usporedbe tankih filmova Na-DNA u 10 mM NaCl i Na-DNA u čistoj vodi (Slika 3.4). Na prvi pogled spektri su vrlo slični, osim razlike u intenzitetima nekoliko vrpce koje su izraženije kod Na-DNA uzoraka.



Slika 3.4 FTIR spektar tankih filmova Na-DNA u 10 mM NaCl (rozi) i Na-DNA u čistoj vodi (Na-DNA, plavi) u području od 800-1800 cm^{-1} na približno 85% r.h. Brojevi i strelice označavaju vrpce asignirane vibracijama baza i DNA okosnice za spektar Na-DNA.

Na području baza nema velikih razlika u valnim brojevima C=O i C=N vrpce. Najveći pomak evidentiran je za C=N vibraciju gvanina i citozina, u iznosu od 3 cm^{-1} prema nižim valnim brojevima u odnosu u Na-DNA u 10 mM NaCl (s 1490 cm^{-1} u Na-DNA u 10 mM NaCl na 1487 cm^{-1} u Na-DNA u čistoj vodi). Ostale promjene valnih brojeva su svega oko 1 cm^{-1} , pa je zaključak da Na-DNA u 10 mM NaCl i Na-DNA u čistoj vodi u području baza ne pokazuju značajne promjene valnih brojeva.

Promjene intenziteta su nešto izraženije od promjena valnih brojeva i odnose se primarno na C=O vrpce (1704 i 1661 cm^{-1} u Na-DNA). Intenziteti C=O vrpca nešto su veći kod Na-DNA, nego u Na-DNA u 10 mM NaCl , međutim, kako vrpce Na-DNA u čistoj vodi ne pokazuju širenje, a istovremeno A i B markeri ne pokazuju značajne promjene, porast intenziteta može se interpretirati kao slabljenje „stackinga“ između baza uslijed manjka natrijevih iona (18,19). Ili obrnuto, dodavanjem 10 mM natrijevih iona u otopinu Na-DNA povećava se vertikalno slaganje baza u odnosu na Na-DNA u čistoj vodi te se intenziteti vrpca baza i fosfata smanje. Osim spomenutih C=O i C=N vibracija, u području baza nema većih razlika između spektara Na-DNA u 10 mM NaCl i Na-DNA u čistoj vodi.

U području fosfata promjene uključuju skoro zanemariv pomak asimetrične vibracije s 1233 cm^{-1} u Na-DNA u 10 mM NaCl , na 1234 cm^{-1} u Na-DNA u čistoj vodi te povećanje intenziteta asimetrične i simetrične vibracije u Na-DNA u čistoj vodi u odnosu na Na-DNA u 10 mM NaCl (Slika 3.4). Vrpce također ne pokazuju značajno širenje.

Možda najveća spektralna promjena odnosi se na šećer-fosfat vrpca (1056 cm^{-1}) koja se u Na-DNA nalazi na 1069 cm^{-1} . Ta promjena povezana je s hidratacijskim uvjetima oko DNA okosnice. Naime, u Na-DNA u 10 mM NaCl natrijevi ioni utječu na hidratacijsku ljusku DNA, te se vrpca nalazi na 1056 cm^{-1} , sugerirajući stabilniju B formu. U slučaju Na-DNA u čistoj vodi, bez dodanih iona natrija, DNA gubi dio molekula vode iz hidratacijske ljuske te se vrpca pomiče na 1069 cm^{-1} , sugerirajući promjene DNA prema A formi (60,66).

Usporedba A i B markera Na-DNA u 10 mM NaCl i Na-DNA u čistoj vodi ne daje velike razlike (Slika 3.4). To potvrđuju i vrlo slični udjeli B forme od 58% kod Na-DNA u 10 mM NaCl i 55% kod Na-DNA u čistoj vodi.

Generalno, usporedba Na-DNA u 10 mM NaCl i Na-DNA u čistoj vodi (Na-DNA), daje male razlike, većim dijelom vezane uz blago smanjenje intenziteta 4 vrpce: C=O vibracije baza (1705 i 1661 cm^{-1}) te vibracije fosfatne skupine (1233 i 1089 cm^{-1}). Obzirom da su sve navedene razlike vrlo male može se zaključiti da, kao i Na-DNA u 10 mM NaCl , Na-DNA uzorci pokazuju stabilnu ds konformaciju.

Ovakva situacija uvelike je olakšala izbor referentnog uzorka (spektra) te smo se odlučili za Na-DNA u čistoj vodi. Iako se većina autora odlučuje za DNA u natrijevom kloridu ili puferu, to nije bio naš izbor s obzirom da natrijevi ioni, i ioni koji dolaze u različitim puferima (npr. natrijev kakodilat, TRIS EDTA) natječu se s dodanim ionima, te zasjenjuju njihove efekte, pogotovo kada se radi o malim koncentracijama dodanih iona.

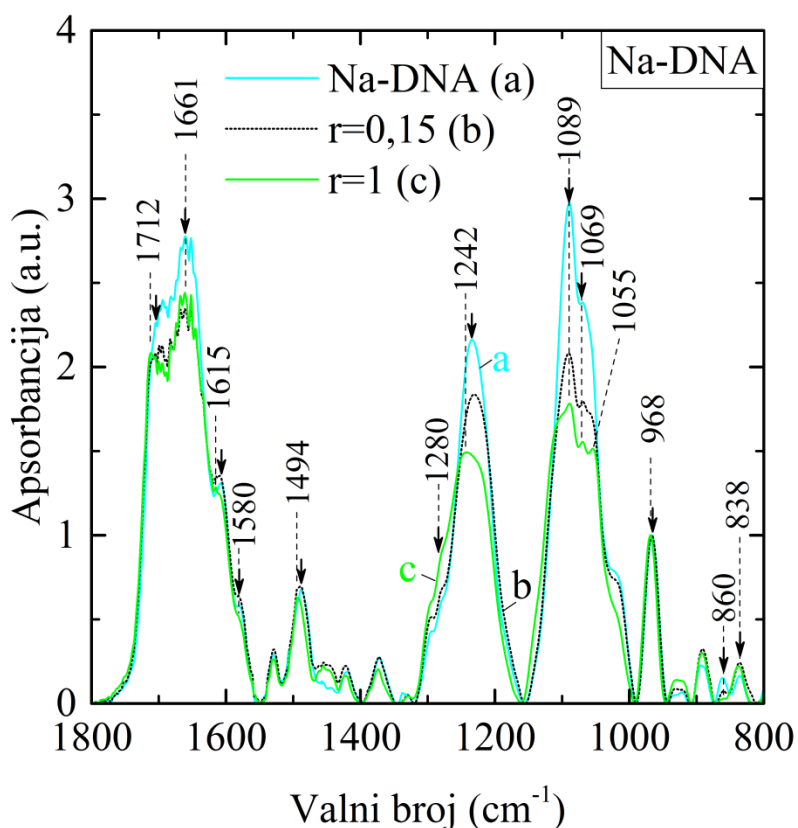
Kako je u ovom radu, primarni cilj utvrđivanje utjecaja magnezijevih iona na strukturu i konformaciju DNA, odlučili smo se u potpunosti ukloniti dodane natrijeve ione, te na taj način omogućiti analizu utjecaja magnezijevih iona na strukturu i konformaciju DNA pri vrlo niskim koncentracijama kationa. I drugi autori su prepoznali tu potrebu pa je tako nedavno objavljen rad Matsuija i suradnika koji su također pripremali tanke filmove iz DNA u čistoj vodi (60).

Stoga se u daljnjem tekstu referentnim uzorkom smatra tanki film Na-DNA u čistoj vodi, ili kraće Na-DNA, te se sve promjene intenziteta i valnih brojeva gledaju u odnosu na referentni uzorak.

3.3 Na-DNA u $MgCl_2$

3.3.1 Utjecaj magnezijevih iona na IR spektar DNA

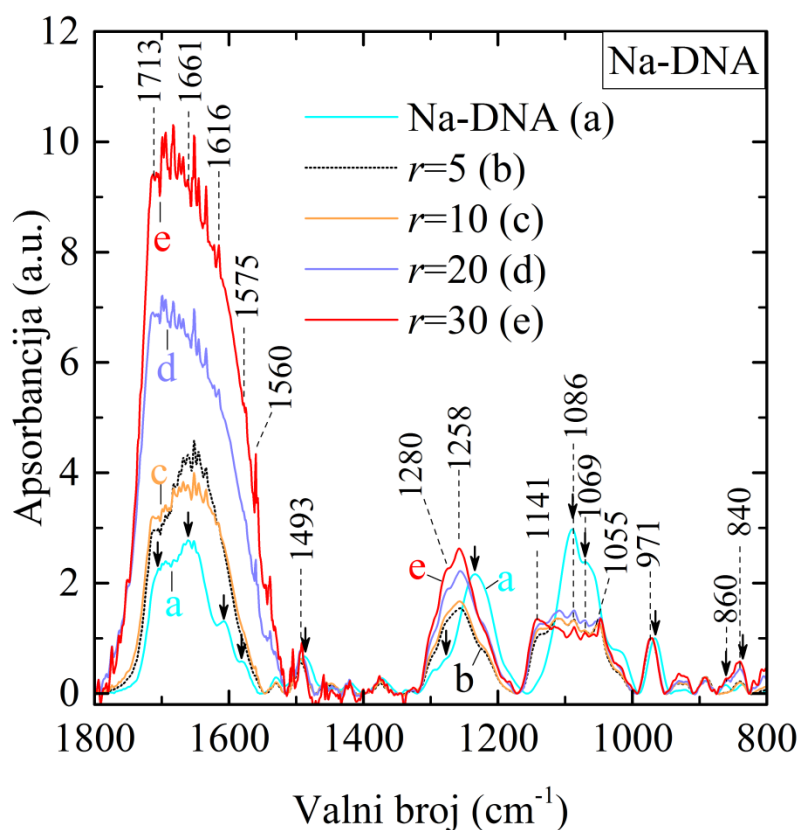
U ovom dijelu slijede rezultati infracrvene spektroskopije na uzorcima tankih filmova Na-DNA u prisutnosti dodanih magnezijevih iona. Udio magnezijevih iona definiran je pomoću omjera koncentracija magnezija i fosfata $r = [Mg]/[P]$, a mjerenja su izvedena u intervalu $0,0067 \leq r \leq 30$. Obzirom da je koncentracija DNA, a time i fosfata, u svim uzorcima jednaka, možemo reći da je udio magnezijevih iona proporcionalan njegovoj koncentraciji. Stoga mali udio magnezijevih iona odgovara maloj koncentraciji magnezijevih iona itd. Na temelju spektralnih promjena ovisno o udjelu magnezija moguće je identificirati 3 karakteristična područja: mali udio magnezija, $0,0067 \leq r < 0,5$, umjeren udio magnezija, $0,5 \leq r < 5$ ($r \approx 1$) i veliki udio magnezija, $r \geq 5-10$. Pripadajući spektri prikazani su na slikama 3.5 i 3.6.



Slika 3.5 FTIR spektri tankih filmova Na-DNA u MgCl_2 u području od $800\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ na približno 85% r.h. za omjere $r=[\text{Mg}]/[\text{P}]$: 0,15 (b- crni, iscrtkani) i 1 (c-zeleni). Brojevi i isprekidane crte označavaju vrpce asignirane za spektar $r=1$. Referentni spektar Na-DNA (a-plavi) pokazan je za usporedbu: asignirane vibracije baza i okosnice označene su crnim strelicama.

Prvo slijedi prikaz rezultata u slučaju malog udjela magnezijevih iona, za $0,0067 \leq r < 0,5$. U ovom intervalu najbitnije promjene događaju se na vrpca DNA okosnice i one uključuju smanjenje intenziteta asimetrične PO_2 vibracije na 1234 cm^{-1} , simetrične PO_2 vibracije na 1089 cm^{-1} te fosfodiester veze na 1069 cm^{-1} (Slika 3.5). Uz navedene promjene intenziteta, također se može vidjeti crveni pomak asimetrične PO_2 vrpce s 1234 cm^{-1} na 1229 cm^{-1} (Slika 3.7) koji ukazuje na sve veću interakciju magnezija i fosfata s porastom koncentracije magnezija. Još jedna bitna promjena koja se događa s porastom koncentracije magnezijevih iona je pad intenziteta vrpce na 860 cm^{-1} (A marker) i povećanje intenziteta vrpce na 836 cm^{-1} (B marker) (Slika 3.8). Za $r \approx 0,5$, vrpca na 860 cm^{-1} je gotovo u potpunosti nestala, intenzitet vrpce na 1069 cm^{-1} je značajno pao i pojavilo se rame na 1055 cm^{-1} pa navedene promjene sugeriraju stabilizaciju B forme. U području baza vidljivo je smanjenje intenziteta $\text{C}=\text{O}$ vrpce na 1704 i 1661 cm^{-1} , dok $\text{C}=\text{N}$ vibracije na 1608 i 1487 cm^{-1} ne pokazuju značajne promjene intenziteta (Slika 3.10). Također, vibracije baza ne pokazuju promjene valnih

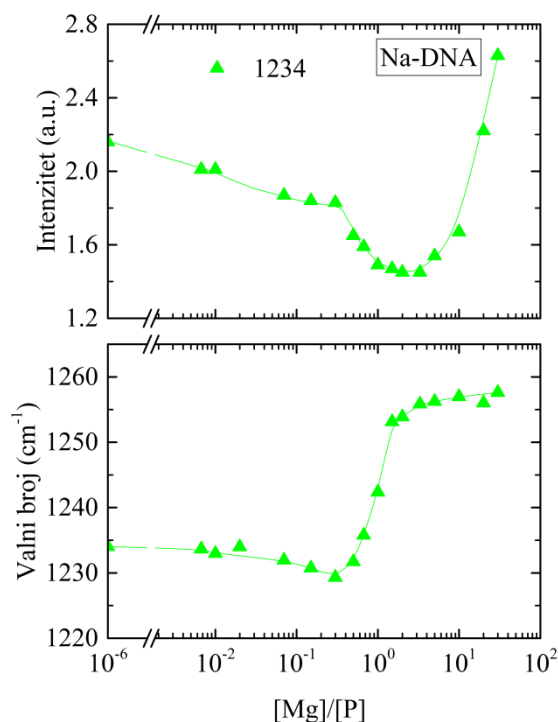
brojeva vrpce, osim na 1487 cm^{-1} , gdje se vidi plavi pomak od $\approx 4\text{ cm}^{-1}$. Obzirom da su promjene na fosfatnim skupinama puno izraženije, može se donijeti zaključak da je interakcija iona magnezija i fosfatnih skupina puno veća nego interakcija magnezijevih iona i baza. Ovakvi rezultati su u skladu s dosadašnjim FTIR i Raman istraživanjima za male omjere r (20,22). Ukupne spektralne promjene za male koncentracije magnezija ($0,0067 \leq r < 0,5$) pokazuju da magnezijevi ioni uslijed interakcije s fosfatnim skupinama, zasjenjuju naboj DNA, te na taj način pospješuju vertikalno slaganje baza koje na kraju rezultira stabilnijom B formom ds DNA.



Slika 3.6 FTIR spektri tankih filmova Na-DNA u MgCl_2 u području od $800\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ na približno 85% r.h. za omjere $r=[\text{Mg}]/[\text{P}]$: 5 (b- crni, iscrtkani), 10 (c-narančasti), 20 (d-ljubičasti) i 30 (e-crveni). Brojevi i isprekidane crte označavaju vrpce asignirane za spektar $r=30$. Referentni spektar Na-DNA (a-plavi) pokazan je za usporedbu: asignirane vibracije baza i okosnice označene su crnim strelicama.

Kod umjerenog udjela magnezijevih iona, $0,5 \leq r < 5$ spektralne promjene na bazama i fosfatima sugeriraju jaču interakciju Mg^{2+} i DNA, pogotovo u području baza. C=N vibracije (1608 cm^{-1} u Na-DNA) i C=O vibracije (1704 cm^{-1} u Na-DNA) pokazuju porast intenziteta i plavi pomak s 1608 cm^{-1} i 1704 cm^{-1} na 1616 cm^{-1} i 1713 cm^{-1} (Slika 3.10). S druge strane,

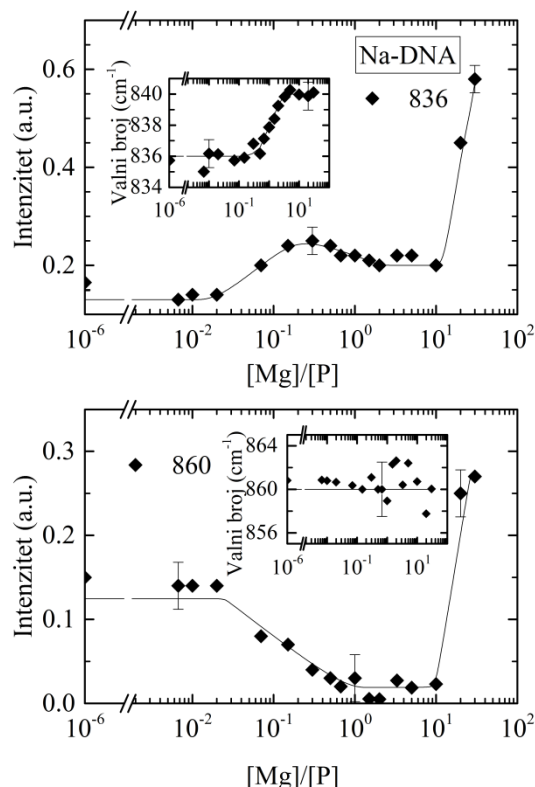
C=O vibracija koja se u Na-DNA nalazi na 1661 cm^{-1} pokazuje samo blagi porast intenziteta bez promjene valnog broja, dok pomak C=N vrpce s 1487 cm^{-1} na 1494 cm^{-1} ulazi u saturaciju te vrpca ne pokazuje promjene intenziteta. Uz navedene promjene na bazama (plavi pomak), istovremeno se događaju pomaci na vrpca DNA okosnice. B marker (836 cm^{-1}) se pomiče prema višim frekvencijama i saturira na 840 cm^{-1} za $r \approx 5$ (Slika 3.8). Asimetrična vibracija fosfatne skupine, koja se u Na-DNA nalazila na 1234 cm^{-1} , doživljava najveću promjenu. U prethodnom intervalu omjera r vrpca se pomicala prema manjim valnim brojevima (1229 cm^{-1}) sugerirajući stabilizaciju B forme ds DNA (Slika 3.7). U ovom intervalu pomak vrpce kreće u suprotnom smjeru, dakle prema većim valnim brojevima, i za $r = 1$ vrpca se nalazi na 1242 cm^{-1} . Također, izgled vrpce upućuje na postojanje 3 vrpce: 1280 , 1242 i 1226 cm^{-1} (nije istaknuto na slici 3.6). Može se i uočiti značajan rast intenziteta ramena na 1280 cm^{-1} . Ovakve spektralne promjene na području baza i DNA okosnice sugeriraju jaču interakciju između Mg^{2+} i DNA u usporedbi s prethodnim intervalom malih omjera r .



Slika 3.7 Intenzitet (gornja slika) i valni broj (donja slika) asimetrične PO_2 vibracije (1234) tankih filmova Na-DNA u $MgCl_2$, kao funkcija $r=[Mg]/[P]$. Točka na $r=10^{-6}$ odgovara referentnom uzorku Na-DNA. Pune linije su povučena „naoko“. Na slikama na kojima nisu označene pogreške mjerenja, smatra se da su pogreške u okvirima simbola.

Daljnim povećanjem koncentracije magnezija ($r \geq 5-10$) događaju se velike promjene na $C=O$ i $C=N$ vibracijama baza u području $1550-1800\text{ cm}^{-1}$ te na asimetričnoj PO_2 vibraciji koje prije svega uključuju veliki porast intenziteta i širenje vrpce (Slika 3.6 i Slika 3.10). Također, može se uočiti porast intenziteta šećer-timin vrpce na 1280 cm^{-1} . Još jedna važna promjena je pojava nove vrpce na 1560 cm^{-1} , koja je jednim dijelom asignirana vibracijama u timinu. Simetrična PO_2 vibracija također pokazuje velike spektralne promjene koje su se počele manifestirati već pri niskim i umjerenim koncentracijama iona magnezija, a sada su znatno izraženije. Vrpca se sastoji od nekoliko uskih spektralnih linija, od kojih najveći plavi pomak pokazuje vrpca na oko 1130 cm^{-1} za $r = 10$ (Slika 3.6). Vibracija šećera na 966 cm^{-1} također se pomiče prema većim valnim brojevima, na 971 cm^{-1} što ukazuje na blage strukturne promjene unutar same DNA okosnice. Za najviše koncentracije magnezija ($r = 20$ i 30) sve navedene promjene nastavljaju trend i postaju još izraženije. Također, intenziteti A i B markera na 860 i 836 cm^{-1} doživljavaju nagli porast (Slika 3.8). Sveukupne spektralne promjene za najviše koncentracije magnezija ukazuju na to da interakcija Mg^{2+} s fosfatnim

skupinama i bazama inducira velike konformacijske promjene u nefiziološkim uvjetima ($r > 10$ što odgovara koncentraciji $\text{Mg}^{2+} > 150 \text{ mM}$) te moguć prijelaz ds DNA u kompaktnu formu, o kojoj će biti govora u potpoglavlju 3.3.6.



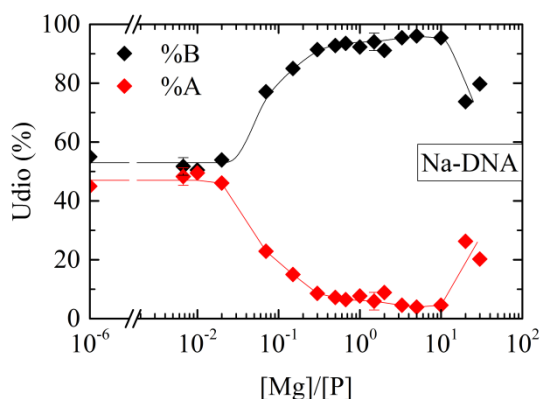
Slika 3.8 Gornja slika: Intenzitet i valni broj (umetak) B markera (836) tankih filmova Na-DNA u MgCl_2 , kao funkcija $r=[\text{Mg}]/[\text{P}]$. Donja slika: Intenzitet i valni broj (umetak) A markera (860) tankih filmova Na-DNA u MgCl_2 , kao funkcija $r=[\text{Mg}]/[\text{P}]$. Točke na $r=10^{-6}$ odgovaraju referentnom uzorku Na-DNA. Pune linije su povučene "naoko".

3.3.2 Interakcije magnezijevih iona s DNA okosnicom

Navedene spektralne razlike iz prethodnog poglavlja ukazuju na progresivnu interakciju fosfatnih skupina i magnezijevih iona. Fosfatne skupine DNA negativno su nabijene pa postoji veliki afinitet kationa prema njima. Međutim, interakcija fosfata i kationa nije određena samo nabojem (valencijom) nego i drugim čimbenicima poput veličine kationa, hidratacijske ljuske i elektronske konfiguracije pa kao otvoreno pitanje ostaje mehanizam djelovanja kationa magnezija, odnosno mehanizam interakcije kationa magnezija s fosfatnim skupinama. U radu J. Stangret, koji istražuje vezanje kationa na fosfatne skupine, interakcija kationa i fosfatnih skupina podjeljena je u tri tipa: nespecifične elektrostatske interakcije, formiranje veza preko molekula vode (eng. outer-sphere interactions) te direktno vezanje

kationa na jedan od atoma kisika (70). Nespecifične elektrostatske interakcije autori su podijelili na slabe i jake. Kod slabih interakcija, molekule vode vezane na fosfatne skupine elektrostatski interagiraju s kationima poput Na^+ , i uglavnom su simetrične obzirom na dva atoma kisika u PO_2^- . Kod jakih interakcija, interakcija kationa i fosfata je izraženija, što uzrokuje djelomično kidanje vodikovih veza između molekula vode i PO_2^- skupine. Takav efekt je ekvivalentan djelomičnoj dehidraciji PO_2^- skupina koja rezultira pomicanjem simetrične fosfatne vibracije ν_s prema višim frekvencijama. Također, ovaj tip interakcije pokazuje blagu asimetriju prema jednom od kisikovih atoma, što rezultira smanjenim intenzitetom vrpce na 1055 cm^{-1} . Kako autori navode, interakcija s fosfatnim skupinama značajno ovisi o koncentraciji kationa pa se vrsta interakcije može mijenjati s njezinim porastom.

Ponašanje slično gore opisanom (70) može se vidjeti i u spektrima Na-DNA u MgCl_2 niske i umjerene koncentracije magnezija (Slika 3.5). Naime, pri malim koncentracijama magnezija ($[\text{Mg}]/[\text{P}] < 0,5$), vidljiv je pad intenziteta i smanjenje frekvencije asimetrične vrpce ν_{as} (Slika 3.7). Intenzitet danih promjena je malen pa upućuje na nespecifične elektrostatske interakcije fosfatne skupine i kationa magnezija. U ovom intervalu dio fosfatnih skupina još uvijek je neutraliziran natrijevim kationima. Kako se povećava r , magnezijevi kationi zamjenjuju natrijeve, smanjuje se efektivna gustoća naboja na fosfatnim skupinama, te se frekvencija ν_{as} smanjuje (Slika 3.7). Također, promjena gustoće naboja na fosfatnim skupinama uzrokuje pojačano vertikalno slaganje baza pa se istodobno vidi smanjenje intenziteta vibracija baza (Slika 3.10). Znatna pad intenziteta vibracija na 860 i 1069 cm^{-1} ukazuje na konformacijske promjene u ds DNA koje odgovaraju stabilizaciji B forme ds DNA (Slika 3.8). Tome ide u prilog i izračunati omjer integralnih intenziteta 836 (B marker) i 860 cm^{-1} (A marker) vrpce s porastom r , po jednadžbama (3.1) (Slika 3.9). Udio A forme u uzorku naglo pada kako se povećava $[\text{Mg}]$, te već za $r = 0,07$ udio B forme s 55% naraste do oko 76%. Za $r \geq 0,5$ udio B forme iznosi oko 95% iz čega, uzevši u obzir pogreške mjerenja, možemo zaključiti da je ds DNA potpuno u B formi.



Slika 3.9 Udio A (crveni dijamanti) i B forme (crni dijamanti) tankih filmova Na-DNA u $MgCl_2$ kao funkcija $r=[Mg]/[P]$, računat po jednadžbama (3.1). Točke na $r=10^{-6}$ odgovaraju referentnom uzorku Na-DNA. Pone linije su povučene „naoko“.

S daljnjim povećanjem koncentracije magnezija ($0,5 \leq r < 5$) B ds DNA ostaje stabilna, ali spektralne promjene pokazuju puno intenzivnije vezanje između fosfatnih skupina i magnezija. Pad intenziteta ν_{as} (1234) je brži, a vrpca se počinje pomicati u suprotnom smjeru, prema višim frekvencijama. Simetrična vibracija ν_s (1089) također pokazuje značajniji pad intenziteta nego prije, te se javljaju vrpce na valnim brojevima većim od 1100 cm^{-1} . To sugerira da je izmjena natrijevih i magnezijevih iona potpuna te da je okolina DNA renormalizirana novom atmosferom kationa u kojoj su elektrostatske sile jače i pokazuju dugodosežno djelovanje (eng. long range character). Iako pad intenziteta ν_s (1089) sugerira djelomično asimetričnu interakciju s jednim kisikovim atomom, lokalizirano direktno vezanje Mg^{2+} je isključeno zbog činjenice da ion magnezija ima mogućnosti očuvanja hidratacijske ljuske u velikom rasponu koncentracija (47). Tom zaključku ide u prilog i nedostatak spektralnih promjena na 860 i 836 cm^{-1} vrpca koje i dalje ukazuju na stabilnu B ds DNA konformaciju u ovom području omjera r (Slika 3.9).

Konačno, za najveće koncentracije magnezija ($r = 20$ i 30) spektralne promjene fosfatnih skupina postaju jako izražene. Intenzitet asimetrične vibracije postaje veći nego u Na-DNA, a obje vrpce su izrazito široke (Slika 3.7 i Slika 3.6). Također, vide se promjene na A i B markerima (Slika 3.8). Intenziteti obiju vrpce pokazuju znatni porast tj. u spektru se ponovo može vidjeti vrpca na 860 cm^{-1} . To ukazuje na prijelaz DNA u konformaciju koja više ne odgovara standardnoj B ds DNA. Značajan porast intenziteta na fosfatnim skupinama u slučaju nekih kationa (Cu^{2+} , Pb^{2+} , La^{3+}) autori pripisuju djelomičnoj denaturaciji DNA (18,19).

[TR 1993]. Prilikom pucanja vodikovih veza u sekundarnoj strukturi DNA otvaraju se nova potencijalna mjesta vezanja za katione te vibracije baza pokazuju crveni pomak, a vibracije fosfodiester veze (1055 cm^{-1}) plavi pomak (18,19). Budući da se takvi efekti ne mogu uočiti u našim spektrima visokih koncentracija magnezija, denaturacija DNA uslijed vezanja magnezijevih iona je isključena. To dodatno potvrđuju i rezultati UV spektrofotometrijskih mjerenja DNA otopina za visoke i niske koncentracije kationa magnezija (Slika 3.11), o kojima će biti riječi u potpoglavlju 3.3.4.

3.3.3 Interakcije magnezijevih iona s bazama

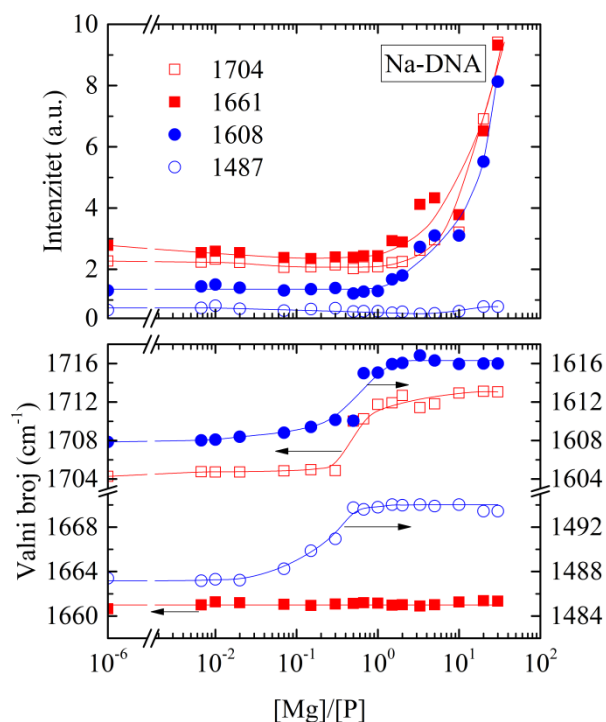
Značajna interakcija kationa magnezija s bazama dolazi do izražaja na puno većim omjerima r nego u slučaju fosfata. Pri malim koncentracijama magnezija, za $r < 0,5$, pad intenziteta $\text{C}=\text{O}$ vibracija (1704 i 1661) te nedostatak pomaka valnih brojeva upućuje na povećano slaganje baza prilikom vezanja magnezija na fosfatne skupine. Pri umjerenim koncentracijama magnezija, $0,5 \leq r < 5$, $\text{C}=\text{O}$ (1704) te $\text{C}=\text{N}$ (1608) vibracije pokazuju plavi pomak, dok obje vibracije $\text{C}=\text{O}$ (1704 i 1661) te $\text{C}=\text{N}$ (1608) pokazuju porast intenziteta. Daljnjim povećanjem omjera, za $r > 5$, pomaci valnih brojeva vrpce se ne mijenjaju, za razliku od intenziteta $\text{C}=\text{O}$ (1704 i 1661) te $\text{C}=\text{N}$ (1608) vibracija koji i dalje pokazuju značajan porast.

Navedene spektralne promjene sugeriraju početak interakcije iona magnezija s bazama već pri umjerenim koncentracijama magnezija. Vrpce koje pritom doživljavaju najveće promjene intenziteta i valnih brojeva predstavljaju potencijalna mjesta vezanja kationa magnezija na baze. $\text{C}=\text{N}$ vibracija na 1487 cm^{-1} pokazuje najmanje promjene (samo blagi plavi pomak, od približno 5 cm^{-1}) pa je vezanje Mg^{2+} na N7 gvanina te N3 citozina isključeno. $\text{C}=\text{O}$ vibracija timina na 1661 cm^{-1} doživljava samo porast intenziteta pa je značajna interakcija magnezija i O4 timina također isključena. Iz istog razloga može se reći da vezanje Mg^{2+} ne uzrokuje promjene u vodikovim vezama $\text{N}-\text{H}\cdots\text{O4}$ kod AT parova baza. Plavi pomak i porast intenziteta $\text{C}=\text{N}$ vibracije adenina na 1608 cm^{-1} mogao bi ukazivati na indirektnu interakciju magnezijevih kationa preko molekula vode s N7 atomom u adeninu koji se nalazi u velikom utoru DNA. Kako je N7 mjesto lako dostupno te se nalazi u blizini šećer-fosfat okosnice najvjerojatniji model interakcije Mg^{2+} s adeninom je preko hidratacijske ljuske uz istovremenu koordinaciju na najbližu fosfatnu skupinu. Slična interakcija adenina i Mg^{2+}

dobivena je teorijskim računom u radu (37,71,72). Zadnja vrpca preostala za identifikaciju je C=O vibracija gvanina i timina na 1704 cm^{-1} koja pokazuje znatan plavi pomak te porast intenziteta. Kako O6 atom gvanina sudjeluje u N-H... O6 vodikovoj vezi u GC paru, a vodikova veza ne pokazuje znatne promjene, može se isključiti destabilizacija Watson-Crick parova uslijed interakcije Mg^{2+} i baza DNA. S druge strane, vibracija C2=O2 vibracija timina ne sudjeluje u vodikovoj vezi te se nalazi u blizini šećer-fosfat okosnice. Dakle, navedene promjene sugeriraju da interakcija Mg^{2+} s DNA ne narušava vodikove veze unutar Watson-Crick parova te smješta interakciju u velike utore DNA, a ne u samu unutrašnjost uzvojnice. Tome idu u prilog istovremene promjene na fosfatnim skupinama te nedostatak spektralnih promjena koje bi ukazivale na promjene u konformaciji DNA. Naime, markeri A i B forme u cijelom intervalu omjera $0,5 \leq r \leq 10$ pokazuju stabilnu B konformaciju DNA (Slika 3.9).

Također, valja napomenuti da su Yoo i Aksimentiev koristili simulacije molekulske dinamike kako bi odredili preferencijalna mjesta interakcije Mg^{2+} i DNA (10). U tu svrhu odredili su popunjenost elektronegativnih mjesta (dušikovi i kisikovi atomi malih i velikih utora DNA) kationima Na^+ i Mg^{2+} . Mali utori DNA identificirani su kao mjesta interakcije s natrijevim ionima, dok su i mali i veliki utori DNA identificirani u slučaju magnezijevih kationa. Također, iz raspodjele elektronske gustoće utvrđeno je da ne postoje specifična mjesta vezanja, već su kationi široko raspoređeni u utorima. To podupire naše zaključke vezane za elektrostatsku prirodu interakcije, a ne za kovalentno vezanje (20,23).

Ukupne spektralne promjene baza i fosfatnih skupina ukazuju na snažnu ovisnost vibracijske dinamike DNA o ionskoj atmosferi koja ju okružuje. Interakcija magnezija s DNA određena je dugodosežnim elektrostatskim silama koje znatno ovise o sastavu ionske atmosfere, odnosno o količini i omjeru vezanih intrinzičnih iona natrija i dodanih iona magnezija. Vrlo dobro slaganje eksperimentalnih rezultata s promjenama gustoće naboja uslijed promjene koncentracije magnezija opisano je u poglavlju 3.3.5.

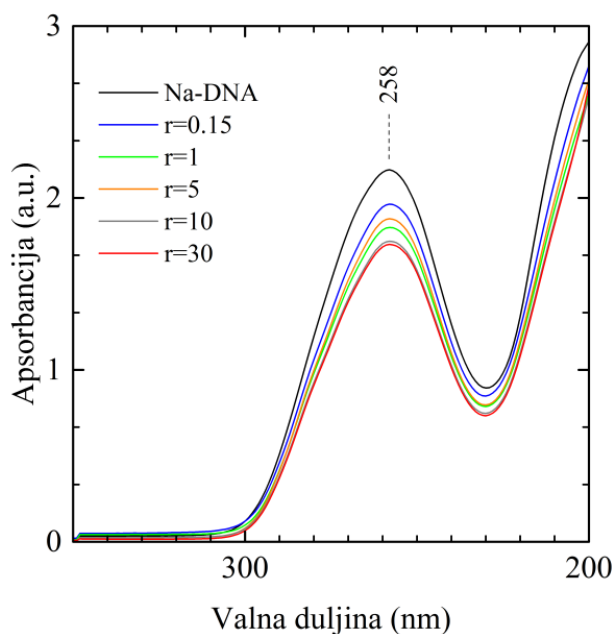


Slika 3.10 Intenzitet (gornja slika) i valni broj (donja slika) najznačajnijih vrpci baza Na-DNA u MgCl_2 kao funkcija $r=[\text{Mg}]/[\text{P}]$. C=O vrpca na 1704 cm^{-1} (otvoreni crveni kvadratići) i 1661 cm^{-1} (puni crveni kvadratići); C=N vrpca na 1608 cm^{-1} (puni plavi kružići) i 1487 cm^{-1} (prazni plavi kružići). Točke na $r=10^{-6}$ odgovara referentnom uzorku Na-DNA. Pune linije su povučene "naoko".

3.3.4 UV spektrofotometrija

Na slici 3.11 prikazani su UV spektri Na-DNA u čistoj vodi te Na-DNA u MgCl_2 otopinama omjera koncentracija kationa i fosfata $r = [\text{Mg}]/[\text{P}] = 0,15, 1, 5, 10$ i 30 i koncentracije DNA od $0,1\text{ g/L}$ ($0,15\text{ mM}$) u području valnih duljina od 200 do 400 nm . Spektar ima jednu apsorpcijsku liniju koja postiže maksimum na 258 nm . Dana linija odgovara elektronskim prijelazima u bazama koji su uglavnom $\pi-\pi^*$ karaktera (60,73). Spektri pokazuju hipokromni efekt, tj. smanjenje apsorbancije, s povećanjem koncentracije magnezija koje ide u prilog već opaženom povećanom vertikalnom slaganju baza FTIR spektroskopijom, odnosno promjenama u dipol-dipol interakcijama.

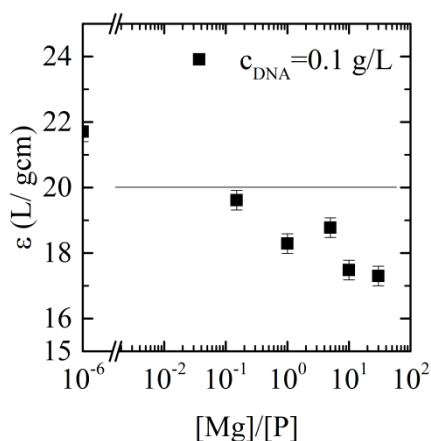
Od posebne važnosti je utvrditi, prije svega, kako liofilizirana Na-DNA otopljena u čistoj vodi ostaje u ds formi. S tim ciljem, izračunat je ekstinkcijski koeficijent po jednadžbi (1.50) za sve uzorke te je prikazan na slici 3.12.



Slika 3.11 UV spektri otopina Na-DNA i Na-DNA u MgCl_2 za omjere $r=0,15, 1, 5, 10, 30$ koncentracije $c_{\text{DNA}}=0,1$ g/L u području od 200-300 nm. Isprekidana crta označava maksimum apsorbancije na 258 nm.

Ekstinkcijski koeficijent ds DNA otopina iznosi $\varepsilon = 20 \text{ Lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (potpoglavlje 1.4), dok iz mjerenja Na-DNA u čistoj vodi proizlazi ekstinkcijski koeficijent u iznosu od $\varepsilon = 21,7 \text{ Lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Uslijed denaturacije ds DNA, ekstinkcijski koeficijent DNA pokazuje porast, za 30-40%. Kako je ekstinkcijski koeficijent za Na-DNA, $\varepsilon = 21,7 \text{ Lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$, a ds DNA $\varepsilon = 20 \text{ Lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ iz blagog porasta manjeg od 10% može se zaključiti da Na-DNA u čistoj vodi ostaje u formi dvostruke uzvojnice.

Odstupanje ekstinkcijskog koeficijenta može biti posljedica lokalnih konformacijskih fluktuacija zbog niske koncentracije intrinzičnih iona natrija (53). Nadalje, ekstinkcijski koeficijent otopina Na-DNA u MgCl_2 s porastom koncentracije magnezija se smanjuje što ukazuje na dodatnu stabilizaciju dvostruke uzvojnice DNA (73).



Slika 3.12 Ekstinkcijski koeficijent ε kao funkcija $r=[\text{Mg}]/[\text{P}]$ za otopine Na-DNA i Na-DNA u MgCl_2 koncentracije $c_{\text{DNA}}=0,1 \text{ g/L}$ (0,15 mM). Točka na $r=10^{-6}$ odgovara uzorku Na-DNA u čistoj vodi. Povučena linija prikazuje očekivanu vrijednost za ds DNA od 20 L/gcm.

Čistoća DNA provjerena je mjerenjem apsorbancija na valnim duljinama 260 i 280 nm. Omjeri A_{260}/A_{280} za sve ispitane uzorke su između 1,8-2,0. Time je utvrđeno da je priprema DNA uzoraka čista, odnosno da DNA ne sadrži veliki udio proteina.

3.3.5 Neutralizacija naboja fosfatnih skupina

Spektralne promjene praćene kroz tri prethodno definirana intervala omjera $r = [\text{Mg}]/[\text{P}]$ moguće je povezati s promjenama u ionskoj atmosferi DNA preko Manningove teorije kondenzacije opisane u poglavlju 1.2.4. U Manningovom pristupu za otopinu koja sadrži polielektrolit i jednu vrstu protuiona valencije Z , gustoća naboja reducirana je za faktor

$$\theta = 1 - (|Z|\xi)^{-1}, \quad (3.2)$$

gdje je ξ definiran jednažbom (1.22). Dakle, linearna gustoća naboja DNA u otopini koja sadrži samo natrijeve ione biti će reducirana za 76%, dok u prisustvu samo divalentnih protuiona magnezija iznosi 88%. Te vrijednosti označene su na slici 3.14 istočkanim crtama. Međutim, kako otopine Na-DNA u MgCl_2 sadrže i intrinzične ione natrija i dodane magnezijeve protuione, sistem se bolje može opisati Manningovom teorijom dvije varijable (dvoparametarski model) koja se svodi na rješavanje jednažbi (1.35) i (1.36). Indeksi 1 i 2 u danim jednažbama mogu se zamijeniti oznakama Na i Mg te odgovarajućim valencijama pa jednažbe postaju

$$1 + \ln \left(\frac{10^3 \theta_{Na}}{c_{Na} V_{Na}} \right) = -2\zeta(1 - \theta_{Na} - 2\theta_{Mg}) \ln(1 - e^{-\kappa b}) \quad (3.3)$$

i

$$\ln \left(\frac{\theta_{Mg}}{c_{Mg}} \right) = \ln \left(\frac{V_{Mg}}{10^3 e} \right) + 2 \ln \left(\frac{10^3 \theta_{Na} e}{c_{Na} V_{Na}} \right). \quad (3.4)$$

Parametar κ proizlazi iz jednadžbi (1.17) i (1.21), i iznosi

$$\kappa [nm^{-1}] = \frac{\sqrt{I_S [mM]}}{10} = \frac{\sqrt{0,5 \left((c_{Na} Z_{Na} + c_{Cl} Z_{Cl})_{NaCl} + (c_{Mg} Z_{Mg} + 2c_{Cl} Z_{Cl})_{MgCl_2} \right)}}{10}, \quad (3.5)$$

gdje je koncentracija c izražena u mM.

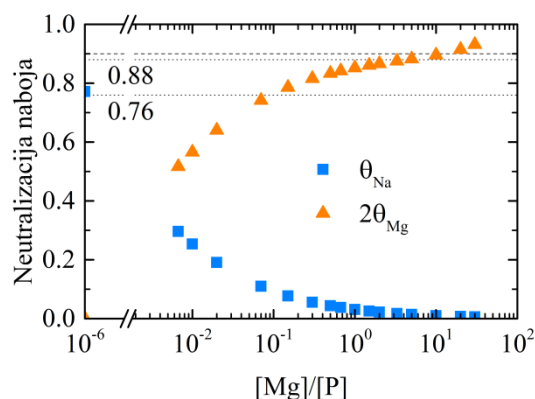
Treba napomenuti da je koncentracija NaCl konstantna i iznosi 15 mM, dok se koncentracija MgCl₂ mijenja ovisno o omjeru $r = [Mg]/[P]$. Dalje se gornje jednadžbe mogu pojednostaviti uvrštavanjem konstantnih vrijednosti za c_{Na} , V_{Na} te V_{Mg} koje redom iznose $c_{Na} = 15$ mM, $V_{Na} = 720$ cm³ mol⁻¹, $V_{Mg} = 1259$ cm³ mol⁻¹ (74). Također, za ds DNA u vodenoj otopini na sobnoj temperaturi, $b = 1,7$ Å i $\zeta = 4,2$.

Ukupna reducirana gustoća naboja dana je jednadžbom (1.38), odnosno

$$\theta_{Na} + 2\theta_{Mg}, \quad (3.6)$$

gdje θ_{Na} i θ_{Mg} predstavljaju udio vezanih Na⁺ i Mg²⁺ protuiona koji ovise o koncentraciji magnezija.

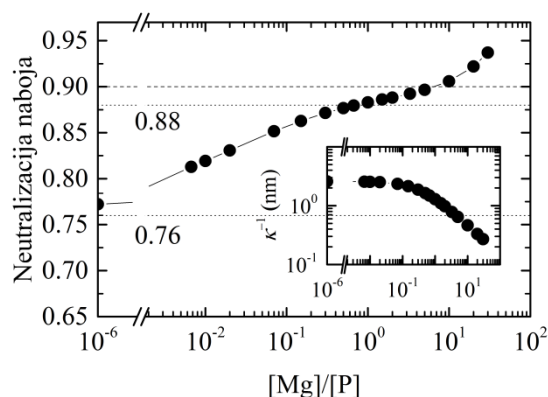
Na slici 3.13 prikazan je udio neutraliziranih naboja fosfatnih skupina bliskim (kondenziranim) protuionima natrija θ_{Na} i magnezija $2\theta_{Mg}$ kao funkcija $r = [Mg]/[P]$. Za $r \approx 1$, postotak neutraliziranih fosfatnih skupina vezanim natrijevim ionima (θ_{Na}) iznosi 3%, dok postotak neutraliziranih fosfatnih skupina vezanim magnezijevim ionima iznosi 85% (Slika 3.13). Ukupno, udio neutraliziranih fosfatnih skupina kondenziranim protuionima iznosi 88%, što odgovara teorijski predviđenoj vrijednosti neutralizacije u prisustvu samo dvovalentnih protuiona. Drugim riječima, oko $r \approx 1$ koncentracija natrijevih iona u protuionskoj atmosferi postaje zanemarivo mala.



Slika 3.13 Teorijski predviđena neutralizacija naboja fosfatnih skupina bliskim (kondenziranim) protuionima natrija θ_{Na} i magnezija $2\theta_{Mg}$ dobivena Manningovom teorijom dvije varijable (jednadžbe 3.3 i 3.4) kao funkcija $r = [Mg]/[P]$. θ_{Na} i θ_{Mg} predstavljaju udio vezanih Na^+ i Mg^{2+} protuiona. Istočkane linije predstavljaju teorijski predviđene vrijednosti za neutralizaciju fosfatnih skupina u prisustvu jedne vrste kationa $\theta_{Na} \approx 0,76$ i $\theta_{Mg} \approx 0,88$. Isprekidana linija označava $(\theta_{Na} + 2\theta_{Mg}) \approx 0,90$, kada je moguć kolaps DNA u kompaktnu formu.

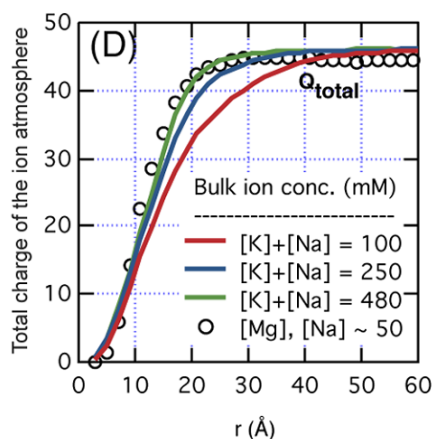
Ukupna reducirana gustoća naboja, odnosno neutralizacija fosfatnih skupina ovisno o omjeru $r = [Mg]/[P]$, koji ujedno prikazuje i omjer koncentracija magnezija i natrija, prikazana je na slici 3.14. Graf pokazuje da se povećanjem koncentracije magnezija u otopini povećava neutralizacija kondenziranim ionima. To se može objasniti smanjenjem broja kondenziranih (vezanih) protuiona natrija i povećanjem broja kondenziranih iona magnezija u ionskoj atmosferi (Slika 3.13).

Dobiveni rezultati neutralizacije fosfatnih skupina mogu se usporediti s rezultatima Bai i suradnika (11) koji su BE-AE spektroskopijom uslijed titracije magnezijevih iona u otopinu s konstantnom koncentracijom natrijevih iona pokazali kako se broj magnezijevih iona po broju fosfatnih skupina povećava s povećanjem koncentracije magnezija (Slika 1.16). Također, postoji lijepo slaganje s radom (42) u kojem stoji da ukoliko se u otopini nalazi podjednaka koncentracija jednovalentnih i dvovalentnih kationa, gotovo svi kondenzirani kationi biti će dvovalentni.



Slika 3.14 Neutralizacija naboja fosfatnih skupina bliskim (kondenziranim) protuionima ($\theta_{Na} + 2\theta_{Mg}$) dobivena Manningovom teorijom dvije varijable i Debyeve duljina zasjenjenja κ^{-1} (umetak) kao funkcija $r = [Mg]/[P]$. θ_{Na} i θ_{Mg} predstavljaju udio vezanih Na^+ i Mg^{2+} protuiona. Istočkane linije predstavljaju teorijski predviđene vrijednosti za neutralizaciju fosfatnih skupina u prisustvu jedne vrste kationa $\theta_{Na} \approx 0,76$ i $\theta_{Mg} \approx 0,88$. Isprekidana linija označava ($\theta_{Na} + 2\theta_{Mg}$) $\approx 0,90$, kada je moguć kolaps DNA u kompaktnu formu.

Neutralizacija naboja fosfatnih skupina u iznosu od 88% koju daje Manningova dvoparametarska teorija kondenzacije u slučaju jednake koncentracije magnezijevih i natrijevih iona ($r = 1$) može se povezati i s rezultatom dobivenim simulacijom molekulske dinamike (Slika 3.15) autora Yoo i Aksimentieva za jednake koncentracije magnezijevih i natrijevih iona (10). Rezultati autora Yoo i Aksimentieva za neutralizaciju naboja fosfatnih skupina u iznosu od 88% (prazni kružići na slici 3.15), sugeriraju da Manningov dvoparametarski model odgovara opisu ionske atmosfere do na udaljenosti 2 nm od površine DNA.



Slika 3.15 Ukupni naboj ionske atmosfere 24 bp DNA dobiven simulacijom molekulske dinamike preuzet iz Yoo i Aksimentiev (10): 50 mM Na^+ i 50 mM K^+ (crvena linija); 50mM Na^+ i 200 mM K^+ (plava linija); 50mM Na^+ i 430 mM K^+ (zelena linija); 50 mM Mg^{2+} i 50mM Na^+ (crni kružići). Doseg ionske atmosfere ovisi o ukupnoj koncentraciji iona, ali i o prisutnosti Mg^{2+} .

Računski dobivena neutralizacija fosfatnih skupina kondenziranim protuionima (Slika 3.14) dobro se slaže s promjenama valnih brojeva i intenziteta pojedinih vrpca. Prije svega, neutralizacija fosfatnih skupina utjecala je na asimetričnu vibraciju fosfata (Slika 3.7). Najveće promjene valnog broja i intenziteta asimetrične vibracije događaju se za $r \approx 1$, upravo za vrijednost vrijednosti r kada Manningova teorija predviđa potpunu zamjenu jednovalentnih kationa dvovalentnima. Također, pomaci valnih brojeva asimetrične fosfatne vrpce (1234) i C=O (1704) vrpce ulaze u saturaciju za $r \approx 5$ što, ako se usporedi s teorijski predviđenim vrijednostima sa slike 3.14, odgovara neutralizaciji naboja DNA uslijed kondenzacije bliskih protuiona od oko 90%. Dakle, kada je gotovo sav naboj fosfatnih skupina neutraliziran bliskim protuionima, promjene na vibracijama ulaze u saturaciju.

3.3.6 Mogućnost kompaktiranja DNA u prisustvu magnezijevih iona

U prethodnim poglavljima utvrdili smo da promjene u ionskoj atmosferi uzrokuju velike promjene u elektrostatici što se znatno odrazilo na molekulske vibracije DNA. Najintrigantnije promjene događaju se za $r = 20$ i 30 kada spektri pokazuju strukturne i konformacijske promjene, a Manningova teorija kondenzacije predviđa gotovo potpunu neutralizaciju fosfatnih skupina vezanim protuionima. To nas je navelo na mogućnost da DNA u ekstremnim uvjetima slanosti (> 150 mM) možda prelazi u kompaktnu formu.

Kao što je predloženo od strane drugih autora, dvovalentni kationi poput magnezija pri koncentracijama od nekoliko stotina mM i/ili u reduciranim dimenzijama mogu prouzročiti kompaktiranje DNA u različite morfologije koje ovisi o mjestima vezanja kationa za DNA (7,67,75,76). Tako pri ekstremno visokim koncentracijama iona magnezija, većim od 150 mM ($r > 10$), zbog snažnih korelacijskih učinaka vezanja (eng. coupling correlation effects) postoji mogućnost prelaska odbojnih elektrostatskih interakcija između segmenata DNA u privlačne (77). Također, elektronska mikroskopija potvrdila je da magnezijevi ioni pospješuju približavanje DNA segmenata (78). Unatoč tome, treba napomenuti da dvovalentni kationi ne pokazuju isto ponašanje kao viševalentni kationi koji uzrokuju kondenzaciju DNA (79). Neki autori navode da unatoč induciranju privlačnih interakcija, magnezijevi ioni ne uzrokuju potpuno kompaktiranje u otopini (80) ili u kristalima (78).

Osim elektrostatskog djelovanja, kompaktiranje DNA regulirano je i drugim interakcijama, od kojih su posebno značajne hidratacijske sile. Hidratacijske sile vrlo su složene prirode jer ovise o zbroju tisuća slabih intermolekularnih sila. U pravilu su odbojne i pokazuju sljedeća svojstva: imaju kratko djelovanje, padaju eksponencijalno s udaljenošću, ne ovise o ionskoj jakosti i vrlo su slične za različite molekulske sisteme (38). Te činjenice sugeriraju jedan zajednički mehanizam djelovanja, a to je polarizacija molekula vode u prisutnosti polarnih grupa DNA. U posebnim uvjetima, hidratacijska struktura DNA i kationa koji ju okružuju može iz odbojne prijeći u privlačnu (81). Ligandi tako induciraju preraspodjelu vezanog sloja molekula vode, tvoreći područja hidratacijskog privlačenja, ili premošćivanje molekulama vode (eng. water bridging) (7,80-82).

Rezultati mjerenja tehnikama raspršenja svjetlosti (eng. light scattering), UV spektrofotometrije i FTIR pokazali su da je kompaktiranje DNA moguće kada je oko 90% naboja fosfatnih skupina neutralizirano kondenziranim protuionima (43,83). Kod uzoraka Na-DNA u $MgCl_2$, neutralizacija fosfatnih skupina kondenziranim protuionima u iznosu preko 90%, dobivena Manningovim dvoparametarskim modelom (Slika 3.14), dobivena je za najviše koncentracije iona magnezija ($r > 10$). U istom koncentracijskom području spektri su pokazali značajan porast intenziteta i širenje spektralnih linija baza i fosfatnih skupina. Porast intenziteta spektralnih linija u slučaju dvovalentnih kationa neki autori povezali su s

kompaktiranjem DNA (35,67). Stoga bi značajno širenje vrpce i porast intenziteta za $r = 20$ i 30 , u skladu s dobivenim rezultatima neutralizacije fosfatnih skupina, moglo ukazivati na prijelaz Na-DNA u kompaktnu formu u prisutnosti magnezijevih iona. Tome idu u prilog i konformacijske promjene opažene za $r = 20$ i 30 (A i B markeri), koje bi pak mogle sugerirati promjene u hidratacijskoj ljusci DNA. Ovakav zaključak je vrlo važan jer pokazuje da u reduciranim dimenzijama odnos hidratacijskih i elektrostatskih interakcija vrlo vjerojatno inducira prijelaz u kompaktnu formu. Naravno, strukturne tehnike poput mikroskopije atomskih sila (eng. atomic force microscopy, AFM), ukoliko se mogu izvesti u sličnim uvjetima, mogle bi utvrditi predloženo.

3.4 Mg-DNA u čistoj vodi

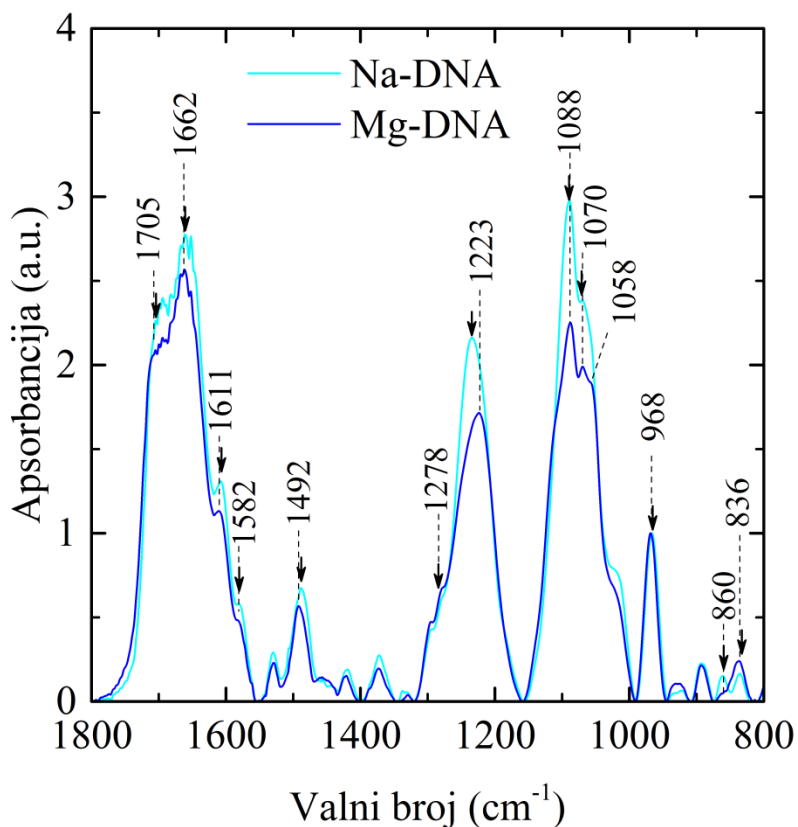
U ovom odjeljku prikazani su rezultati spektara tankih filmova magnezijevih soli DNA u čistoj vodi koje su dobivene protokolom (IV) (vidi potpoglavlje 2.1.1). Tanki filmovi Mg-DNA sadrže samo intrinzične magnezijeve ione pa je vrlo korisno napraviti usporedbu sa spektrima tankih filmova dobivenih iz Na-DNA u čistoj vodi (Slika 3.16).

3.4.1 Usporedba spektara tankih filmova Na-DNA i Mg-DNA u čistoj vodi

U odnosu na Na-DNA, spektri Mg-DNA u čistoj vodi pokazuju određene spektralne promjene. Najizraženije promjene vezane su uz asimetričnu vibraciju fosfatne skupine (1234 cm^{-1} u Na-DNA), fosfodiester vezu (1069 cm^{-1} u Na-DNA) te A i B markere (860 i 836 cm^{-1} u Na-DNA) (Slika 3.16).

U području vibracija DNA okosnice, najveća promjena vidljiva je na asimetričnoj PO_2 vibraciji koja je s 1234 cm^{-1} u Na-DNA pomaknuta na 1223 cm^{-1} u Mg-DNA. Crveni pomak asimetrične PO_2 vrpce Mg-DNA u odnosu na Na-DNA sugerira da je dijalizom uspješno uklonjena većina intrinzičnih natrijevih iona. Magnezijevi ioni imaju veći pozitivni naboj, pa vrlo lako zamjenjuju natrijeve ione. Vezanjem na fosfatne skupine, smanjuju gustoću naboja te se asimetrična vrpca pomiče na manje valne brojeve. Također, kod tankih filmova Mg-DNA pospješena je stabilizacija B forme u odnosu na Na-DNA što se vidi iz puno manjeg intenziteta A markera na 860 cm^{-1} , te pojave ramena na 1055 cm^{-1} kod Mg-DNA u odnosu na

Na-DNA (Slika 3.16). Također, omjer integralnih intenziteta A i B markera računat po jednadžbama (3.1) daje veći udio B forme (oko 80%) kod Mg-DNA u čistoj vodi u odnosu na Na-DNA u čistoj vodi (55%).



Slika 3.16 FTIR spektri tankih filmova Na-DNA (svijetlo plavi) i Mg-DNA (tamno plavi) u području od 800-1800 cm^{-1} na približno 85% r.h. Brojevi i isprekidane crte označavaju vrpce asignirane za spektar Mg-DNA. Crne strelice označavaju asignirane vibracije baza i DNA okosnice za spektar Na-DNA.

S druge strane, vibracije baza Mg-DNA u odnosu na Na-DNA pokazuju vrlo male promjene: minimalan pad intenziteta u cijelom području, od 1750-1400 cm^{-1} , te pomak C=N vibracija s 1608 na 1611 cm^{-1} i 1487 na 1492 cm^{-1} (Slika 3.4 i Slika 3.16). Kako su pomaci valnih brojeva baza mali i nema drastičnih promjena intenziteta, navedene promjene valnih brojeva najvjerojatnije su posljedica promjena koje se događaju na DNA okosnici uslijed izmjene intrinzičnih natrijevih iona magnezijevim. Ostale vibracije ne pokazuju značajne promjene u odnosu na Na-DNA.

Spektri tankih filmova Mg-DNA tako su pokazali da je dijalizom uspješno proizvedena Mg-DNA, tj. da su uklonjeni intrinzični ioni natrija i zamijenjeni magnezijevima. Također, spektri

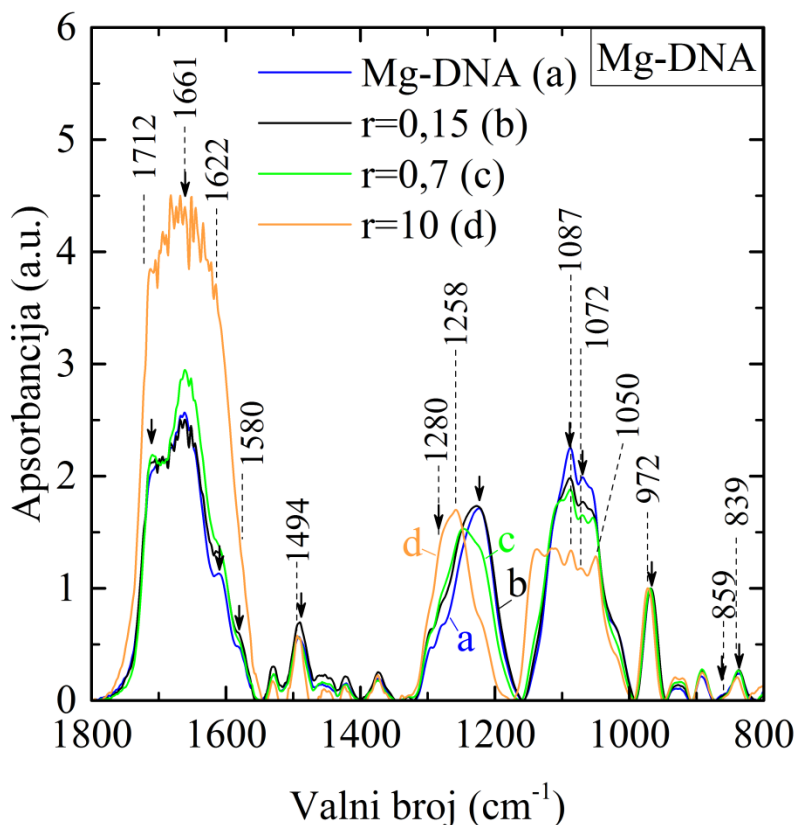
Mg-DNA pokazali su da intrinzični magnezijevi ioni utječu uglavnom na vibracije DNA okosnice (prije svega asimetričnu PO_2 vibraciju) te da vibracijska svojstva baza ostaju nepromijenjena. S druge strane, utjecaj dodanih magnezijevih iona na Mg-DNA opisan je u sljedećem poglavlju.

3.5 Mg-DNA u $MgCl_2$

U ovom odjeljku prikazani su rezultati spektara tankih filmova dobivenih iz otopina Mg-DNA u $MgCl_2$ u širokom rasponu omjera r , ($0,0067 \leq r \leq 10$) pripremljenih protokolom (III) (vidi potpoglavlje 2.1.1) Ovaj sistem podrazumijeva DNA okruženu jednom vrstom protuiona (Slika 2.2) te je referentni uzorak za daljnju analizu Mg-DNA u čistoj vodi, odnosno Mg-DNA.

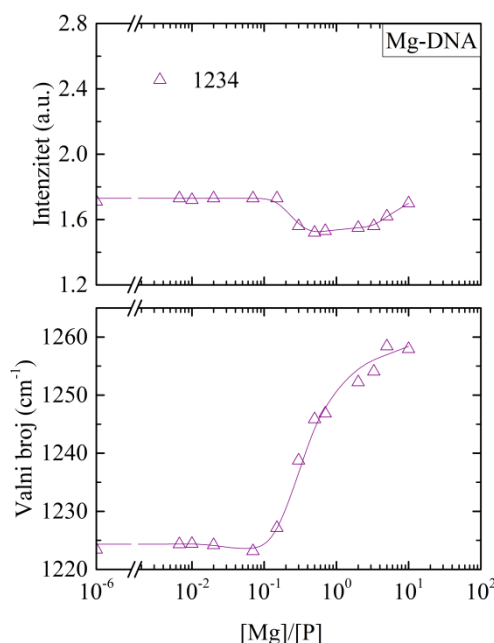
3.5.1 Interakcija magnezijevih iona s Mg-DNA

Udio magnezijevih iona, kao i prije, definiran je pomoću omjera $r = [Mg]/[P]$, te se na temelju spektralnih promjena mogu definirati 3 karakteristična područja: mali udio magnezija, $0,0067 \leq r < 0,5$, umjeren udio magnezija, $0,5 \leq r < 5$ ($r \approx 1$) i velik udio magnezija, $r \geq 5-10$. Kao i kod Na-DNA u $MgCl_2$, udio magnezijevih iona proporcionalan je njegovoj koncentraciji pa mali udio magnezijevih iona odgovara maloj koncentraciji magnezijevih iona. Pripadajući spektri prikazani su na slici 3.17.



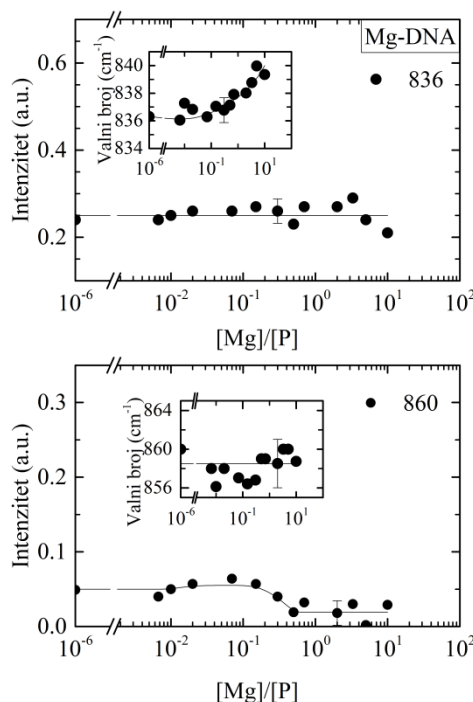
Slika 3.17 FTIR spektri tankih filmova Mg-DNA u MgCl_2 u području od $800\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ na približno 85% r.h. za omjere $r=[\text{Mg}]/[\text{P}]$: 0,15 (b- crni), 0,7 (c-zeleni) i 10 (d-narančasti). Brojevi i isprekidane crte označavaju vrpce asignirane za spektar $r=10$. Referentni spektar Mg-DNA (a-tamno plavi) pokazan je za usporedbu: asignirane vibracije baza i okosnice označene su crnim strelicama.

U području malih koncentracija magnezija ($0,0067 \leq r < 0,5$) spektri tankih filmova Mg-DNA u MgCl_2 ne pokazuju ovisnost o r sve do $r = 0,15$ (Slika 3.18). Asimetrična PO_2 vibracija koja se u Mg-DNA nalazila na 1223 cm^{-1} ne pokazuje značajne promjene intenziteta niti valnih brojeva s porastom koncentracije dodanih magnezijevih iona (Slika 3.18). Također, C=O i C=N vibracije baza, te A i B markeri ne pokazuju značajne promjene sve do $r \approx 0,15$ (Slika 3.19 i Slika 3.20). Sličnost spektara pri niskim omjerima ($r = 0,0067$ do $0,15$) rezultat je dominantne uloge intrinzičnih Mg iona u odnosu na dodane ione magnezija iz MgCl_2 otopina, čije su koncentracije još uvijek vrlo male. Tek za $r \approx 0,3$ spektri ponovo pokazuju ovisnost o r , odnosno početak utjecaja dodanih Mg iona na vibracije Mg-DNA okosnice i baza (Slika 3.18 i Slika 3.20).



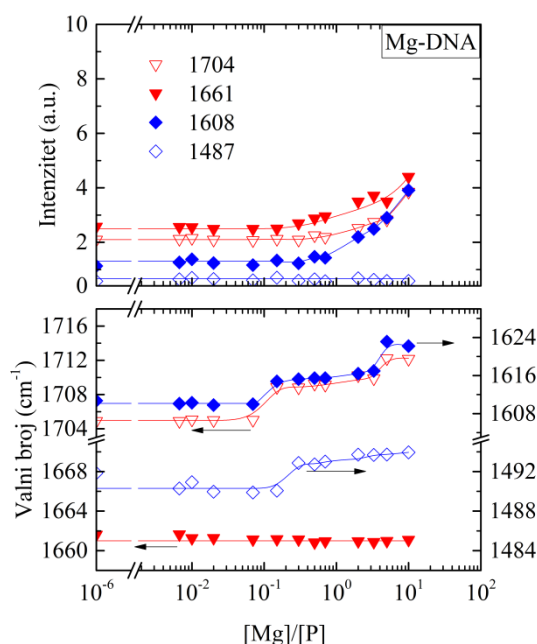
Slika 3.18 Intenzitet (gornja slika) i valni broj (donja slika) asimetrične PO_2 vibracije (1234) tankih filmova Mg-DNA u $MgCl_2$, kao funkcija $r=[Mg]/[P]$. Točka na $r=10^{-6}$ odgovara referentnom uzorku Mg-DNA. Pune linije su povučene „naoko“.

Pri umjerenim koncentracijama magnezija, $0,5 \leq r < 5$, povećanjem koncentracije magnezija spektri pokazuju promjene na fosfatnim skupinama, ali i na bazama. Vibracije baza, $C=O$ (1704) i $C=N$ (1608), pokazuju plavi pomak na 1710 i 1617 cm^{-1} , te povećanje intenziteta (Slika 3.20) kao i u slučaju Na-DNA u $MgCl_2$ (Slika 3.10). $C=O$ vibracija timina na 1661 cm^{-1} pokazuje samo porast intenziteta, dok $C=N$ vibracija na 1487 cm^{-1} pokazuje plavi pomak na 1494 cm^{-1} , bez značajne promjene intenziteta (Slika 3.20). Od vibracija DNA okosnice, najveće promjene se ponovno događaju na vibracijama fosfata. Asimetrična PO_2 vibracija, koja se pri niskim koncentracijama dodanih magnezijevih kationa nalazila na oko 1223 cm^{-1} , pomiče se prema višim valnim brojevima, i za $r = 3,3$ se nalazi na 1254 cm^{-1} (Slika 3.18). Ovako značajna promjena ukazuje na snažno međudjelovanje Mg^{2+} i DNA te dodatno potvrđuje zaključak da je plavi pomak asimetrične PO_2 vibracije i kod Na-DNA u $MgCl_2$ i kod Mg-DNA u $MgCl_2$ uzrokovan interakcijom Mg^{2+} s DNA, a ne dehidracijom DNA. Također, može se uočiti smanjenje intenziteta A markera na 860 cm^{-1} (Slika 3.19) koje ide u prilog stabilizaciji B forme. Nadalje, plavi pomak vibracija baza (1704 i 1608) te asimetrične vibracije fosfata (1234) sugerira veće konstante vezanja odnosno strmiji potencijal.



Slika 3.19 Gornja slika: Intenzitet i valni broj (umetak) B markera (836) tankih filmova Mg-DNA u $MgCl_2$, kao funkcija $r=[Mg]/[P]$. Donja slika: Intenzitet i valni broj (umetak) A markera (860) tankih filmova Mg-DNA u $MgCl_2$, kao funkcija $r=[Mg]/[P]$. Točke na $r=10^{-6}$ odgovaraju referentnom uzorku Mg-DNA. Pune linije su povučene „naoko“.

Pri velikim koncentracijama magnezija, $r = 5$ i 10 , C=O, C=N i vibracije fosfata pokazuju značajan porast intenziteta i širenje vrpce, dok promjene pozicija vrpce ulaze u zasićenje (Slika 3.20). Treba primijetiti da se na 1560 cm^{-1} javlja nova vrpca, a rame na 1280 cm^{-1} pokazuje značajan porast intenziteta (Slika 3.17). Pomak vibracije šećera na 966 cm^{-1} prema višim valnim brojevima (972 cm^{-1} za $r = 10$) ukazuje na blage strukturne promjene unutar same DNA okosnice kako smo primijetili i kod Na-DNA u $MgCl_2$.



Slika 3.20 Intenzitet (gornja slika) i valni broj (donja slika) najznačajnijih vrpca Mg-DNA u MgCl_2 kao funkcija $r=[\text{Mg}]/[\text{P}]$. C=O vrpca na 1704 cm^{-1} (otvoreni crveni trokutići) i 1661 cm^{-1} (puni crveni trokutići); C=N vrpca na 1608 cm^{-1} (puni plavi rombovi) i 1487 cm^{-1} (prazni plavi rombovi). Točke na $r=10^{-6}$ odgovaraju referentnom uzorku Mg-DNA. Pune linije su povučene „naoko“.

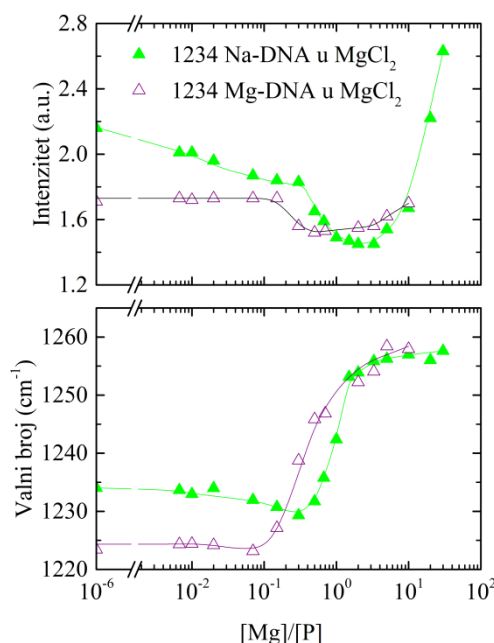
3.5.2 Usporedba Na-DNA i Mg-DNA u MgCl_2

U potpoglavlju 3.4.1 usporedili smo vibracijska svojstva DNA s intrinzičnim natrijevim ionima i DNA s intrinzičnim magnezijevim ionima te smo zaključili da postoje određene razlike. U ovom potpoglavlju ćemo usporediti spektre tankih filmova Na-DNA u magnezijevom kloridu s Mg-DNA u magnezijevom kloridu.

Pri malim koncentracijama dodanih magnezijevih kationa ($0,0067 \leq r < 0,5$) spektri tankih filmova Na-DNA u MgCl_2 i Mg-DNA u MgCl_2 bitno su drugačiji. U intervalu $r < 0,15$ razlike između spektara uglavnom su vezane za vibracije fosfatnih skupina (1234), fosfodiester vezu (1069) te A i B markere (836 i 860).

Najveća razlika vidljiva je na asimetričnoj PO_2 vibraciji koja se kod Mg-DNA u magnezijevom kloridu i pri najmanjem omjeru $r = 0,0067$ nalazi na 1224 cm^{-1} , dok se PO_2 vibracija kod Na-DNA u MgCl_2 uslijed povećanja koncentracije magnezijevih iona prvo pomiče s 1234 na 1229 cm^{-1} , te se zaustavlja na 1229 cm^{-1} za $r = 0,3$ (Slika 3.21). Zbog kompeticije natrijevih i magnezijevih iona kod Na-DNA u MgCl_2 , pomak valnog broja asimetrične PO_2 vibracije ne dostiže 1224 cm^{-1} . Stoga položaj asimetrične PO_2 vrpce Na-DNA u odnosu na Mg-DNA u

prisustvu magnezijevih iona sugerira da postoji veliki utjecaj intrinzičnih natrijevih iona na vibracije fosfatne skupine kod Na-DNA.

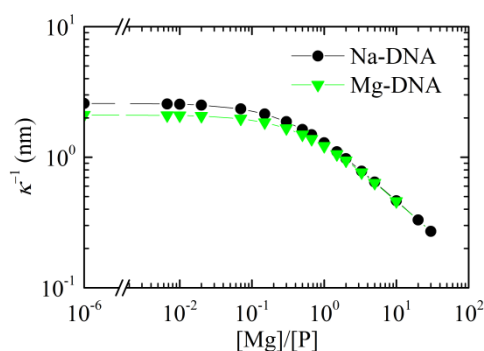


Slika 3.21 Intenzitet (gornja slika) i valni broj (donja slika) asimetrične PO_2 vibracije (1234) tankih filmova Na-DNA u MgCl_2 , (zeleni trokutići) i Mg-DNA u MgCl_2 , (narančasti trokutići) kao funkcija $r=[\text{Mg}]/[\text{P}]$. Točke na $r=10^{-6}$ odgovaraju referentnim uzorcima Na-DNA i Mg-DNA. Pune linije su povučene „naoko“.

Pri višim koncentracijama magnezijevih iona, razlike između spektara tankih filmova Mg-DNA u magnezijevom kloridu i Na-DNA u magnezijevom kloridu postaju sve manje. Spektralne promjene uslijed povećanja koncentracije kationa magnezija $\text{C}=\text{O}$ (1704) i $\text{C}=\text{N}$ (1608) vrpce Mg-DNA u MgCl_2 usporedive su s promjenama koje se događaju na istim vrpama u slučaju Na-DNA u MgCl_2 . (Slika 3.10 i Slika 3.20). Najveće odstupanje pokazuje $\text{C}=\text{O}$ vibracija (1704) pri umjerenoj koncentraciji magnezija, dok za $r = 5$ i 10 , valni brojevi postaju opet vrlo slični.

Na slici 3.22 usporedno su prikazane Debyeve duljine zasjenjenja za modele Na-DNA u MgCl_2 (prethodno prikazana u umetku slike 3.14) i Mg-DNA u MgCl_2 . U modelu Mg-DNA u MgCl_2 aproksimirali smo koncentraciju intrinzičnih kationa magnezija s koncentracijom MgCl_2 od 7,5 mM, dok se koncentracija dodanog MgCl_2 mijenja ovisno o omjeru $r = [\text{Mg}]/[\text{P}]$. Za omjere $r > 1$ Debyeve duljine zasjenjenja Na-DNA i Mg-DNA se podudaraju što potvrđuje dominaciju dodanih kationa nad intrinzičnim. Također, oko $r \approx 1$ udio vezanih iona natrija (θ_{Na}) kod Na-DNA u MgCl_2 dobiven Manningovom teorijom dvije varijable (Slika 3.13)

drastično je smanjen. Iznad $r > 1$ DNA je uglavnom neutralizirana Mg ionima te postotak neutralizacije fosfatnih skupina od natrijevih iona (Θ_{Na}) pada ispod 3% (Slika 3.13). Drugim riječima, koncentracija natrijevih iona u ionskoj atmosferi dobivena teorijskim računom za $r > 1$ postaje zanemariva. Stoga se može pretpostaviti da ionske atmosfere Na-DNA u otopini magnezijevog klorida i Mg-DNA u otopini magnezijevog klorida za $r > 1$ postaju vrlo slične.



Slika 3.22 Debyeova duljina zasjenjenja κ^{-1} kao funkcija $r = [Mg]/[P]$ za model Na-DNA u $MgCl_2$ (crni kružići) i Mg-DNA u $MgCl_2$ (zeleni trokuti). Detalji računa dani su u poglavlju 3.3.5.

Naši rezultati također se vrlo dobro slažu s eksperimentalno dobivenim rezultatima Bai i suradnika (opširnije u potpoglavljima 1.2.1 i 3.3.5) (11) koji su pratili udio vezanih natrijevih i magnezijevih iona na ds DNA prilikom titracije magnezija u otopinu DNA s 20 mM NaCl (Slika 1.16). Njihovi rezultati također pokazuju da pri podjednakim koncentracijama magnezija i natrija, udio natrija u ionskoj atmosferi postaje zanemariv.

Zaključimo, najveća razlika između tankih filmova Na-DNA u $MgCl_2$ i Mg-DNA u $MgCl_2$ vidljiva je pri niskim koncentracijama dodanih kationa magnezija, kada postoji kompeticija između natrijevih i magnezijevih iona kod Na-DNA u $MgCl_2$. S druge strane, kada dodani ioni prevladaju intrinzične, ionske atmosfere postaju slične, a posljedica toga su naravno i slična vibracijska svojstva tankih filmova Na-DNA i Mg-DNA u prisustvu visokih koncentracija magnezijevih iona. Ostaje još komentirati mogućnost kompaktiranja Mg-DNA u $MgCl_2$ pri visokim koncentracijama dodanog kationa magnezija. Kako je protokolom *III* skupo i eksperimentalno zahtijevno proizvesti Mg-DNA u koncentracijama $MgCl_2$ većim od 150 mM, a spektri tankih filmova Na-DNA i Mg-DNA pri visokim omjerima r pokazuju slična vibracijska svojstva i slične ionske atmosfere, zaključili smo da postoji mogućnost da i Mg-DNA u $MgCl_2$ pri koncentracijama magnezija većim od 150 mM prelazi u kompaktnu formu.

Poglavlje 4. Zaključak

U cilju dobivanja što cjelovitijeg razumijevanja utjecaja kationa na strukturu i konformaciju deoksiribonukleinske kiseline (DNA) istraživana su vibracijska svojstva tankih filmova Na-DNA (intrinzični natrijevi ioni) i Mg-DNA (intrinzični magnezijevi ioni) pripremljenih iz 5 vrsta otopina: Na-DNA u otopini 10 mM natrijevog klorida, Na-DNA u čistoj vodi, Na-DNA u otopini magnezijevog klorida, Mg-DNA u čistoj vodi te Mg-DNA u otopini magnezijevog klorida.

Vibracijska dinamika tankih filmova DNA praćena je infracrvenom spektroskopijom, a UV spektrofotometrija je primjenjena za karakterizaciju razrijeđenih DNA otopina iz kojih su pripremani tanki filmovi. Također, radi što boljeg opisa protuionske atmosfere izračunat je udio neutraliziranih fosfatnih skupina kondenziranim (bliskim) protuionima slijedeći Manningovu dvoparametarsku teoriju kondenzacije.

Vibracijski spektri tankih filmova dobiveni iz Na-DNA u otopini natrijevog klorida te Na-DNA u čistoj vodi, u skladu s relevantnom literaturom, pokazali su da Na-DNA u oba slučaja nakon provedenog protokola sušenja ostaje u konformaciji dvostruke uzvojnice te uglavnom zadržava B formu. Rezultati dobiveni UV spektrofotometrijom na otopini Na-DNA u čistoj vodi dodatno su potvrdili zadovoljavajuću stabilnost dvostruke uzvojnice, pa smo shodno s time, kao referentan uzorak odabrali spektar tankog filma Na-DNA u čistoj vodi.

Utjecaj magnezijevih kationa na vibracijska svojstva Na-DNA istraživan je u širokom rasponu omjera koncentracija iona magnezija i fosfata, $r = [\text{Mg}]/[\text{P}]$, od 0,0067 do 30. Tri vibracije pokazale su se ključne za interpretaciju interakcije magnezijevih kationa i DNA: asimetrična vibracija fosfatne skupine (1234), karbonilna C=O (1704) te C=N (1608) vibracija.

Za niske koncentracije magnezijevih iona ($r < 0,5$), u području vibracija DNA okosnice, crveni pomak i smanjenje intenziteta asimetrične PO₂ vibracije mogu se pripisati postepenom nakupljanju magnezijevih kationa u blizini suprotno nabijenih fosfatnih skupina te jačanju vertikalnog slaganja baza uslijed neutralizacije fosfatnih skupina. U području baza vibracijski

spektri ostaju gotovo nepromijenjeni, osim opaženog blagog plavog pomaka C=N vibracija i smanjenja intenziteta. Istovremeno, vrpce na 860 i 1069 cm^{-1} , karakteristične za ds DNA u A formi nestaju, dok vrpce karakteristične za ds DNA u B formi, asignirane na 836 i 1055 cm^{-1} , postaju izraženije.

U području podjednakih koncentracija intrinzičnih natrijevih i dodanih magnezijevih kationa ($r \approx 1$) B konformacija ostaje stabilna te asimetrična PO_2 vibracija (1234), karbonilna C=O (1704) te C=N (1608) vibracija pokazuju plavi pomak i značajne promjene u intenzitetima. Plavi pomak spomenutih vibracija ukazuje na pojavu strmijeg potencijala u području DNA okosnice i baza uzrokovan promjenama Debyejevog zasjenjenja uslijed supstitucije jednovalentnih kationa s dvovalentnima. Pri koncentracijama magnezija većim od 150 mM, ($r > 10$), u nefiziološkim uvjetima, vibracijski spektri pokazuju značajne perturbacije te velik porast intenziteta.

Rezultati infracrvene spektroskopije na tankim filmovima dobro se slažu s Manningovim dvoparametarskim modelom kondenzacije, ali i s eksperimentalnim rezultatima BE-AE spektroskopije autora Bai i suradnika (11). Naime, najveće spektralne promjene događaju se upravo oko $r \approx 1$, kada Manningov model i BE-AE spektroskopija pokazuju gotovo potpunu zamjenu natrijevih iona magnezijevima.

Također, treba napomenuti da Manningova teorija kondenzacije predviđa neutralizaciju preko 90% fosfatnih skupina kondenziranim protuionima za $r = 20$ i 30, kada se u spektrima tankih filmova Na-DNA u MgCl_2 događaju značajne spektralne promjene. S druge strane, prethodni rezultati mjerenja tehnikama raspršenja svjetlosti (eng. light scattering), UV spektrofotometrije i FTIR pokazali su da je kompaktiranje DNA moguće kada je oko 90% naboja fosfatnih skupina neutralizirano kondenziranim protuionima (43,83). To nas je navelo na zaključak da bi spektralne promjene pri najvišim koncentracijama magnezija ($r = 20$ i 30) mogle sugerirati prijelaz DNA u kompaktnu formu, koji je inače vrlo teško izvesti u laboratorijskim uvjetima s dodanim kationima niskih valencija.

Zaključimo, dani rezultati pokazuju da pri umjerenim koncentracijama magnezija, magnezijevi kationi ostvaruju interakciju s DNA pretežno preko dugodosežnih nespecifičnih elektrostatskih interakcija, prvo na razini fosfatnih skupina, a kasnije i s bazama DNA te na taj

način stabiliziraju B formu ds DNA. S druge strane, velike koncentracije magnezija uzrokuju jako Debyevo zasjenjenje te perturbacije hidratacijske ljuske zbog čega dolazi do promjena u sekundarnoj strukturi DNA, te pri najvišim koncentracijama magnezija mogućeg kompaktiranja DNA. Ovi rezultati pokazuju da je međudjelovanje dugodosežnih elektrostatskih i kratkodosežnih hidratacijskih interakcija od primarne važnosti u određivanju sekundarne strukture DNA.

Drugi dio rada predstavlja rezultate istraživanja vibracijskih svojstava tankih filmova dobivenih iz Mg-DNA u čistoj vodi (Mg-DNA) te Mg-DNA u otopinama MgCl_2 (Mg-DNA u MgCl_2) u intervalu omjera koncentracija kationa i fosfata, $r = 0,0067$ do 10. Ovaj sistem posebno je zanimljiv jer predstavlja DNA okruženu samo jednom vrstom protuiona, pa je na taj način izbjegnuta kompeticija natrijevih i magnezijevih iona. Kao i kod Na-DNA, ključne vibracije za analizu su asimetrična vibracija fosfatne skupine (1234), karbonilna $\text{C}=\text{O}$ (1704) te $\text{C}=\text{N}$ (1608) vibracija.

Spektri tankih filmova Mg-DNA u čistoj vodi pokazali su nešto drugačija vibracijska svojstva od tankih filmova Na-DNA u čistoj vodi. Najveća razlika vezana je za vibraciju fosfatne skupine koja se kod Na-DNA u čistoj vodi nalazi na 1234 cm^{-1} , dok se kod Mg-DNA u čistoj vodi nalazi na 1223 cm^{-1} . Crveni pomak PO_2 vrpce Mg-DNA u odnosu na Na-DNA sugerira da prisustvo Mg iona smanjuje elektronsku gustoću oko P-O veze što rezultira pomakom asimetrične PO_2 vrpce na manje valne brojeve. Također, kod tankih filmova Mg-DNA pospješena je stabilizacija B forme u odnosu na Na-DNA, što je i potvrđeno računom udjela B forme kod Mg-DNA (oko 80%), u odnosu na Na-DNA u čistoj vodi (55%).

Rezultati spektara tankih filmova Mg-DNA u MgCl_2 u širokom rasponu omjera r , ($0,0067 \leq r \leq 10$) pokazali su da se vibracijska svojstva Mg-DNA ne mijenjaju značajno u intervalu $0,0067 \leq r < 0,5$, te da je za uspješnu supstituciju natrijevih iona magnezijevim provođenjem dijalize, dovoljna koncentracija MgCl_2 od svega 0,1 mM.

Pri umjerenim i velikim koncentracijama magnezija ($0,5 \leq r \leq 10$) asimetrična PO_2 vibracija (1234), karbonilna $\text{C}=\text{O}$ (1704) te $\text{C}=\text{N}$ (1608) vibracija pokazuju plavi pomak i značajne promjene u intenzitetima. Plavi pomak spomenutih vibracija, kao i kod tankih filmova Na-DNA u MgCl_2 , ukazuje na pojavu strmijeg potencijala u području DNA okosnice uzrokovanog

promjenama Debyejevog zasjenjenja te upućuje da je interakcija Mg iona i DNA elektrostatske prirode.

Usporedba spektara tankih filmova Mg-DNA u MgCl_2 i Na-DNA u MgCl_2 pokazala je da su razlike između navedenih uzoraka najizraženije pri najmanjim koncentracijama dodanih kationa magnezija ($r < 0,15$) dok pri većim koncentracijama kationa magnezija ($r > 1$) sistemi pokazuju slična vibracijska svojstva. Razlike pri niskim koncentracijama dodanog Mg^{2+} posljedica su različitih vibracijskih svojstava DNA s intrinzičnim ionima natrija i DNA s intrinzičnim ionima magnezija, čije razlike dolaze do izražaja upravo pri niskim koncentracijama dodanog Mg^{2+} . S druge strane, pri višim koncentracijama magnezijevih iona, razlike između spektara Mg-DNA i Na-DNA u magnezijevom kloridu postaju sve manje, što ukazuje na dominantu ulogu dodanih magnezijevih iona. Nadalje, kako spektri Mg-DNA i Na-DNA u MgCl_2 na visokim koncentracijama magnezija postaju slični, također se može pretpostaviti prijelaz Mg-DNA u kompaktnu formu u nefiziološkim uvjetima, tj. za koncentracije magnezijevih iona veće od 150 mM.

Istraživanje vibracijskih svojstava deoksiribonukleinske kiseline te utjecaja kationa natrija i magnezija na DNA otvorilo je nekoliko perspektiva. Prije svega, nameće se pitanje utjecaja drugih dvovalentnih kationa, npr. mangana, na strukturu i dinamiku DNA. Vrlo su zanimljivi i trovalentni kationi poput spermidina te kobalt heksamina koji, zbog veće valencije, također otvaraju mogućnost prijelaza DNA u kompaktnu formu što je i potvrđeno u literaturi. Osim drugih kationa, proširenje istraživanja na tehnike poput spektroskopije cirkularnog dikroizma (CD) te spektroskopije atomskih sila (AFM) moglo bi se pokazati ključno za razumijevanje interakcije kationa i DNA te konformacijskih promjena poput kompaktiranja.

Popis literature

1. Bloomfield, V.A., Crothers, D.M. and Tinocco, I. (2000) *Nucleic Acids: Structures, Properties and Functions*. University Science Books, Sausalito.
2. Cherstvy, A.G. (2011) Electrostatic interactions in biological DNA-related systems. *Phys Chem Chem Phys*, **13**, 9942-9968.
3. Dobrynin, A.V. and Rubinstein, M. (2005) Theory of polyelectrolytes in solutions and at surfaces. *Prog Polym Sci*, **30**, 1049-1118.
4. Kanduc, M., Trulsson, M., Naji, A., Burak, Y., Forsman, J. and Podgornik, R. (2008) Weak- and strong-coupling electrostatic interactions between asymmetrically charged planar surfaces. *Phys Rev E*, **78**, 061105.
5. Eichhorn, G.L. (1962) Metal Ions as Stabilizers or Destabilizers of Deoxyribonucleic Acid Structure. *Nature*, **194**, 474-475.
6. Clement, R.M., Sturm, J. and Daune, M.P. (1973) Interaction of Metallic Cations with DNA VI. Specific Binding of Mg⁺⁺ and Mn⁺⁺. *Biopolymers*, **12**, 405-421.
7. Zimmer, C., Luck, G. and Triebel, H. (1974) Conformation and Reactivity of DNA. IV. Base Binding Ability of Transition-Metal Ions to Native DNA and Effect on Helix Conformation with Special Reference to DNA-Zn(II) Complex. *Biopolymers*, **13**, 425-453.
8. Taboury, J.A., Bourtayre, P., Liquier, J. and Taillandier, E. (1984) Interaction of Z form poly(dG-dC).Poly(dG-dC) with divalent metal ions: localization of the binding sites by I.R. spectroscopy. *Nucleic Acids Res*, **12**, 4247-4258.
9. Duguid, J., Bloomfield, V.A., Benevides, J. and Thomas, G.J. (1993) Raman Spectroscopy of DNA-Metal Complexes. I. Interactions and Conformational Effects of the Divalent Cations: Mg, Ca, Sr, Ba, Mn, Co, Ni, Cu, Pd, and Cd. *Biophys J*, **65**, 1916-1928.
10. Yoo, J. and Aksimentiev, A. (2012) Competitive Binding of Cations to Duplex DNA Revealed through Molecular Dynamics Simulations. *J Phys Chem B*, **116**, 12946-12954.
11. Bai, Y., Greenfeld, M., Travers, K.J., Chu, V.B., Lipfert, J., Doniach, S. and Herschlag, D. (2007) Quantitative and Comprehensive Decomposition of the Ion Atmosphere around Nucleic Acids. *J Am Chem Soc*, **129**, 14981-14988.
12. Grgicin, D., Babic, S.D., Ivek, T., Tomic, S. and Podgornik, R. (2013) Effect of magnesium ions on dielectric relaxation in semidilute DNA aqueous solutions. *Phys Rev E*, **88**, 052703.
13. Tomic, S., Grgicin, D., Ivek, T., Vuletic, T., Babic, S.D. and Podgornik, R. (2012) Dynamics and structure of biopolyelectrolytes in repulsion regime characterized by dielectric spectroscopy. *Physica B*, **407**, 1958-1963.
14. Tsuboi, M. (1970) Application of Infrared Spectroscopy to Structure Studies of Nucleic Acids. *Applied Spectroscopy Reviews*, **3**, 45-90.
15. Ahmad, R., Arakawa, H. and Tajmir-Riahi, H.A. (2003) A Comparative Study of DNA Complexation with Mg(II) and Ca(II) in Aqueous Solution: Major and Minor Grooves Bindings. *Biophys J*, **84**, 2460-2466.
16. Keller, P.B. and Hartman, K.A. (1986) The Effect of Ionic Environment and Mercury(II) Binding on the Alternative Structures of DNA. An Infrared Spectroscopic Study. *Spectrochim Acta A*, **42**, 299-306.
17. Dirico, D.E., Keller, P.B. and Hartman, K.A. (1985) The Infrared-Spectrum and Structure of the Type-I Complex of Silver and DNA. *Nucleic Acids Res*, **13**, 251-260.
18. Tajmir-Riahi, H.A., Naoui, M. and Ahmad, R. (1993) The Effects of Cu²⁺ and Pb²⁺ on the Solution Structure of Calf Thymus DNA - DNA Condensation and Denaturation Studied by Fourier-Transform IR Difference Spectroscopy. *Biopolymers*, **33**, 1819-1827.
19. Tajmir-Riahi, H.A., Ahmad, R. and Naoui, M. (1993) Interaction of Calf-Thymus DNA with Trivalent La, Eu, and Tb Ions - Metal-Ion Binding, DNA Condensation and Structural Features. *J Biomol Struct Dyn*, **10**, 865-877.

20. Langlais, M., Tajmir-Riahi, H.A. and Savoie, R. (1990) Raman Spectroscopic Study of the Effects of Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , and Cd^{2+} Ions on Calf Thymus DNA: Binding Sites and Conformational Changes. *Biopolymers*, **30**, 743-752.
21. Ouameur, A.A., Arakawa, H., Ahmad, R., Naoui, M. and Tajmir-Riahi, H.A. (2005) A comparative study of Fe(II) and Fe(III) interactions with DNA duplex: Major and minor grooves bindings. *DNA Cell Biol*, **24**, 394-401.
22. Bhattacharyya, R.G., Nayak, K.K. and Chakrabarty, A.N. (1988) Interaction of MgATP^{2-} with DNA: Assessment of Metal-Binding Sites and DNA Conformations by Spectroscopic and Thermal Denaturation Studies. *Inorg Chim Acta*, **153**, 79-86.
23. Misra, V.K. and Draper, D.E. (1999) The Interpretation of Mg^{2+} Binding Isotherms for Nucleic Acids using Poisson-Boltzmann Theory. *J Mol Biol*, **294**, 1135-1147.
24. Egli, M. and Saenger, W. (2013) *Principles of Nucleic Acid Structure*. Springer New York.
25. Sinden, R.R. (2012) *DNA Structure and Function*. Elsevier Science.
26. Neidle, S. (2010) *Principles of Nucleic Acid Structure*. Elsevier Science.
27. Daune, M. (2003) *Molecular Biophysics- Structures in motion*. Oxford University Press, New York.
28. Steiner, T. (2002) The hydrogen bond in the solid state. *Angew Chem Int Edit*, **41**, 48-76.
29. Kool, E.T. (2001) Hydrogen bonding, base stacking, and steric effects in dna replication. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **30**, 1-22.
30. Watson, J.D. and Crick, F.H. (1953) Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, **171**, 737-738.
31. Bruist, M.F. (1998) A simple demonstration of how intermolecular forces make DNA helical. *J Chem Educ*, **75**, 53-55.
32. Sponer, J., Sponer, J.E., Mladek, A., Jurecka, P., Banas, P. and Otyepka, M. (2013) Nature and magnitude of aromatic base stacking in DNA and RNA: Quantum chemistry, molecular mechanics, and experiment. *Biopolymers*, **99**, 978-988.
33. Mak, C.H. (2016) Unraveling Base Stacking Driving Forces in DNA. *The Journal of Physical Chemistry B*.
https://www.mun.ca/biology/scarr/A_B_Z_DNA.html.
34. Hackl, E.V., Kornilova, S.V. and Blagoi, Y.P. (2005) DNA structural transitions induced by divalent metal ions in aqueous solutions. *Int J Biol Macromol*, **35**, 175-191.
35. Petrov, A.S., Lamm, G. and Pack, G.R. (2002) Water-mediated magnesium-guanine interactions. *J Phys Chem B*, **106**, 3294-3300.
36. Sponer, J., Burda, J.V., Sabat, M., Leszczynski, J. and Hobza, P. (1998) Interaction between the guanine-cytosine Watson-Crick DNA base pair and hydrated group IIa (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+}) and group IIb (Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+}) metal cations. *J Phys Chem A*, **102**, 5951-5957.
37. Bloomfield, V.A. (1997) DNA Condensation by Multivalent Cations. *Biopolymers*, **44**, 269-282.
38. Lewis, R. (2004) *Human Genetics : Concepts and Applications*. McGraw-Hill College.
39. Teif, V.B. and Bohinc, K. (2011) Condensed DNA: Condensing the concepts. *Prog Biophys Mol Bio*, **105**, 208-222.
40. Hud, N.V. and Downing, K.H. (2001) Cryoelectron microscopy of lambda phage DNA condensates in vitreous ice: The fine structure of DNA toroids. *P Natl Acad Sci USA*, **98**, 14925-14930.
41. Lipfert, J., Doniach, S., Das, R. and Herschlag, D. (2014) Understanding Nucleic Acid-Ion Interactions. *Annu Rev Biochem*, **83**, 813-841.
42. Wilson, R.W. and Bloomfield, V.A. (1979) Counter-Ion-Induced Condensation of Deoxyribonucleic-Acid - Light-Scattering Study. *Biochemistry-Us*, **18**, 2192-2196.
43. Bloomfield, V.A. (1996) DNA condensation. *Curr Opin Struc Biol*, **6**, 334-341.
44. Kirby, B.J. (2010) *Micro- and Nanoscale Fluid Mechanics: Transport in Microfluidic Devices*. Cambridge University Press.
45. Manning, G.S. (1978) Molecular Theory of Polyelectrolyte Solutions with Applications to Electrostatic Properties of Polynucleotides. *Q Rev Biophys*, **11**, 179-246.
46. Skerjanc, J. and Strauss, U.P. (1968) Interactions of Polyelectrolytes with Simple Electrolytes. III. The Binding of Magnesium Ion by Deoxyribonucleic Acid. *J Am Chem Soc*, **90**, 3081-3085.
47. Diem, M. (2015) *Modern Vibrational Spectroscopy and Micro-Spectroscopy: Theory, Instrumentation and Biomedical Applications*. Wiley.
48. Gunzler, H. and Gremlich, H.U. (2006) *Uvod u infracrvenu spektroskopiju*. Školska knjiga, Zagreb.
49. Banwell, C.N. and McCash, E.M. (1994) *Fundamentals of Molecular Spectroscopy*. McGraw-Hill England.
50. Hollas, J.M. (2004) *Modern Spectroscopy*. Wiley.

52. Bergethon, P.R. (1998) *The Physical Basis of Biochemistry: The Foundations of Molecular Biophysics*. Springer.
53. Babić, S.D. (2008), Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, neobjavljeno.
54. Pohle, W., Bohl, M. and Bohlig, H. (1990) Interpretation of the influence of hydrogen bonding on the stretching vibrations of the PO_2^- moiety. *J Mol Struct*, **242**, 333-342.
55. Smith, B.C. (2011) *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Second Edition*. CRC Press.
56. Arakawa, H., Ahmad, R., Naoui, M. and Tajmir-Riahi, H.A. (2000) A comparative study of calf thymus DNA binding to Cr(III) and Cr(VI) ions - Evidence for the guanine N-7-chromium-phosphate chelate formation. *J. Biol. Chem.*, **275**, 10150-10153.
57. Ouameur, A.A. and Tajmir-Riahi, H.A. (2004) Structural Analysis of DNA Interactions with Biogenic Polyamines and Cobalt(III)hexamine Studied by Fourier Transform Infrared and Capillary Electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **279**, 42041-42054.
58. Champeil, P., Tran, T.P.L. and Brahms, J. (1973) New Approach to Characterization of B-Forms and A-Forms of DNA by IR Spectroscopy. *Biochem Bioph Res Co*, **55**, 881-887.
59. Andrushchenko, V.V., Kornilova, S.V., Kapinos, L.E., Hackl, E.V., Galkin, V.L., Grigoriev, D.N. and Blagoi, Y.P. (1997) IR-spectroscopic studies of divalent metal ion effects on DNA hydration. *J Mol Struct*, **408**, 225-228.
60. Matsui, H., Toyota, N., Nagatori, M., Sakamoto, H. and Mizoguchi, K. (2009) Infrared spectroscopic studies on incorporating the effect of metallic ions into a M-DNA double helix. *Phys Rev B*, **79**, 235201.
61. Neault, J.F. and Tajmir-Riahi, H.A. (1999) Structural Analysis of DNA-Chlorophyll Complexes by Fourier Transform Infrared Difference Spectroscopy. *Biophys J*, **76**, 2177-2182.
62. Letellier, R., Ghomi, M. and Taillandier, E. (1986) Interpretation of DNA Vibration Modes: I-The guanosine and cytidine residues involved in Poly(dG-dC).Poly(dG-dC) and d(CG)3.d(CG)3. *J Biomol Struct Dyn*, **3**, 671-687.
63. Letellier, R., Ghomi, M. and Taillandier, E. (1987) Interpretation of DNA Vibration Modes II-The Adenosine and Thymidine Residues Involved in Oligonucleotides and Polynucleotides. *J Biomol Struct Dyn*, **4**, 663-683.
64. Dohy, D., Ghomi, M. and Taillandier, E. (1989) Interpretation of DNA Vibration Modes: III - The Behavior of the Sugar Pucker Vibration Modes as a Function of Its Pseudorotation Parameters. *J Biomol Struct Dyn*, **6**, 741-754.
65. Letellier, R., Ghomi, M. and Taillandier, E. (1989) Interpretation of DNA Vibration Modes: IV - A Single-Helical Approach to Assign the Phosphate-Backbone Contribution to the Vibrational Spectra in A and B Conformations. *J Biomol Struct Dyn*, **6**, 755-768.
66. Taillandier, E., Fort, L., Liquier, J., Couppez, M. and Sautiere, P. (1984) Role of the Protein-Alpha Helixes in Histone DNA Interactions Studied by Vibrational Spectroscopy. *Biochemistry-Us*, **23**, 2644-2650.
67. Hackl, E.V., Kornilova, S.V., Kapinos, L.E., Andrushchenko, V.V., Galkin, V.L., Grigoriev, D.N. and Blagoi, Y.P. (1997) Study of Ca^{2+} , Mn^{2+} and Cu^{2+} binding to DNA in solution by means of IR spectroscopy. *J Mol Struct*, **408**, 229-232.
68. Liquiers, J., Taillandier, E., Peticolas, W.L. and Thomas, G.A. (1990) The Infrared and Raman Spectra of the Duplex of d(GGTATACC) in the Crystal Show Bands Due to Both the A-form and the B-form of DNA. *J Biomol Struct Dyn*, **8**, 295-302.
69. Taillandier, E. and Liquier, J. (1992) Infrared-Spectroscopy of DNA. *Method Enzymol*, **211**, 307-335.
70. Stangret, J. and Savoie, R. (1992) Vibrational Spectroscopic Study of the Interaction of Metal-Ions with Diethyl Phosphate, a Model for Biological-Systems. *Can J Chem*, **70**, 2875-2883.
71. Burda, J.V., Sponer, J. and Hobza, P. (1996) Ab Initio study of the interaction of guanine and adenine with various mono- and bivalent metal cations (Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ ; Cu^+ , Ag^+ , Au^+ ; Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} ; Zn^{2+} , Cd^{2+} , and Hg^{2+}). *J Phys Chem-Us*, **100**, 7250-7255.
72. Munoz, J., Sponer, J., Hobza, P., Orozco, M. and Luque, F.J. (2001) Interactions of hydrated Mg^{2+} cation with bases, base pairs, and nucleotides. Electron topology, natural bond orbital, electrostatic, and vibrational study. *J Phys Chem B*, **105**, 6051-6060.
73. Omerzu, A., Mihailovic, D., Anzelak, B. and Turel, I. (2007) Optical spectra of wet and dry M-DNA. *Phys Rev B*, **75**, 121103(R).
74. Manning, G.S. (1977) Limiting Laws and Counterion Condensation in Polyelectrolyte Solutions .4. Approach to Limit and Extraordinary Stability of Charge Fraction. *Biophys Chem*, **7**, 95-102.
75. Koltover, I., Wagner, K. and Safinya, C.R. (2000) DNA condensation in two dimensions. *P Natl Acad Sci USA*, **97**, 14046-14051.

76. Sun, X.G., Cao, E.H., Zhang, X.Y., Liu, D.G. and Bai, C.L. (2002) The divalent cation-induced DNA condensation studied by atomic force microscopy and spectra analysis. *Inorg Chem Commun*, **5**, 181-186.
77. Shaw, S.Y. and Wang, J.C. (1993) Knotting of a DNA Chain during Ring-Closure. *Science*, **260**, 533-536.
78. Timsit, Y., Westhof, E., Fuchs, R.P.P. and Moras, D. (1989) Unusual Helical Packing in Crystals of DNA Bearing a Mutation Hot Spot. *Nature*, **341**, 459-462.
79. Naji, A., Kanduc, M., Forsman, J. and Podgornik, R. (2013) Perspective: Coulomb fluids-Weak coupling, strong coupling, in between and beyond. *J Chem Phys*, **139**, 150901.
80. Rau, D.C. and Parsegian, V.A. (1992) Direct Measurement of the Intermolecular Forces between Counterion-Condensed DNA Double Helices - Evidence for Long-Range Attractive Hydration Forces. *Biophys J*, **61**, 246-259.
81. Bloomfield, V.A. (1991) Condensation of DNA by Multivalent Cations - Considerations on Mechanism. *Biopolymers*, **31**, 1471-1481.
82. Ben-Yaakov, D., Andelman, D., Podgornik, R. and Harries, D. (2011) Ion-specific hydration effects: Extending the Poisson-Boltzmann theory. *Curr Opin Colloid In*, **16**, 542-550.
83. Polyanichko, A.M., Andrushchenko, V.V., Chikhirzhina, E.V., Vorob'ev, V.I. and Wieser, H. (2004) The effect of manganese(II) on DNA structure: electronic and vibrational circular dichroism studies. *Nucleic Acids Res*, **32**, 989-996.

Životopis

Kristina Serec rođena je 18. kolovoza 1986. godine u Zagrebu. Završila je opću gimnaziju „Ivan Supek“ u Zagrebu te 2005. godine upisala studij matematike i fizike na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirala je 13. srpnja 2010. godine. Trenutno je zaposlena kao asistent na Zavodu za fiziku i biofiziku Medicinskog fakulteta u Zagrebu gdje sudjeluje u nastavi na kolegijima Fizika i biofizika za studente prve godine studija medicine na hrvatskom i engleskom jeziku te Fizika medicinske dijagnostike za studente četvrte godine studija medicine na hrvatskom i engleskom jeziku. Doktorski studij atomske i molekularne fizike upisuje 2011. godine na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu. Surađivala je na istraživanjima različitih bioloških sistema kao što su utjecaj kationa na vibracijska svojstva deoksiribonukleinske kiseline, utjecaj BPC-a na glavice femura, oksidacijski procesi plazma lipoproteina, interakcija malih molekula s liposomima, itd. Objavila je kao koautor 5 radova u časopisima indeksiranim u bazi Current Contents, 1 rad s međunarodnom recenzijom indeksiranim u bazi Scopus te je sudjelovala na više domaćih i međunarodnih konferencija.

Popis radova

1. Kristina Serec; Sanja Dolanski Babić; Rudolf Podgornik; Silvia Tomić. Effect of magnesium ions on the structure of DNA thin films: an infrared spectroscopy study. // *Nucleic Acids Research*. 44 (2016); 8456-8464 (IF: 9.203, Q1)
2. Krilov, Dubravka; Kosović, Marin; Serec, Kristina. Spectroscopic studies of alpha tocopherol interaction with a model liposome and its influence on oxidation dynamics. // *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*. 129 (2014); 588-593 (IF: 2.129, Q2)
3. Gamulin, Ozren; Serec, Kristina; Bilić, V.; Balarin, Maja; Kosović, Marin; Drmić, Domagoj; Brčić, Luka; Seiwerth, Sven; Sikirić, Predrag. Monitoring the Healing Process of Rat Bones Using Raman Spectroscopy. // *Journal of molecular structure*. 1044 (2013) ; 308-313 (IF: 1.551, Q3)
4. Krilov, Dubravka; Kosović, Marin; Brnjas-Kraljević, Jasminka; Serec, Kristina; Vogrinc, Željka. Structural and Oxidation Properties of Plasma Lipoproteins from Different Phenotypes: FT-IR and ESR Study. // *Croatica chemica acta*. 86 (2013) ; 265-272 (IF: 0.556, Q4)
5. Gamulin, Ozren; Balarin, Maja; Ivanda, Mile; Kosović, Marin; Đerek, Vedran; Mikac, Lara; Serec, Kristina; Furić, Krešimir; Krilov, Dubravka. Micro and nano structure of electrochemically etched silicon epitaxial wafers. // *Croatica chemica acta*. 85 (2012) , 1; 101-106 (IF: 0.614, Q4)
6. Gamulin, Ozren; Balarin, Maja; Ivanda, Mile; Kosović, Marin; Đerek, Vedran; Mikac, Lara; Serec, Kristina; Furić, Krešimir; Krilov, Dubravka. Micro and nano structure of electrochemically etched silicon epitaxial wafers // *Proceedings of MIPRO 2011 / Biljanović, Petar; Skala, Karolj (ur.). Rijeka: Croatian Society for Information and Communication Technology, Electronics and Microelectronics - MIPRO, 2011. 53-54*

Kazalo

- A forma, 15, 55, 56, 57
- agregacija DNA, 22
- apsorbancija, 40
- B forma, 55, 56, 58
- Bjerrumova duljina, 26
- C2'-endo, 8, 9
- C3'-endo, 8, 9
- Debye-Hückelova aproksimacija, 28
- Debyeova duljina zasjenjenja, 29
- denaturacija, 20, 55
- deoksiribonukleinska kiselina, 1, 5
- ekstincijski koeficijent, 40
- fosfodiester veza, 7
- FTIR spektroskopija, 48
- grupne vibracije, 37
- hiperkromni porast, 21
- hipokromizam, 41
- integralni intenzitet apsorpcijske linije, 36
- intenzitet apsorpcijske linije, 36
- ionska atmosfera, 5, 23
- ionska jakost otopine, 29
- koioni, 23
- kompaktiranje, 21, 78, 79
- Manningova teorija kondenzacije, 30, 74
- masena koncentracija parova baza DNA, 43
- množinska koncentracija fosfata, 43
- množinska koncentracija parova baza DNA, 43
- normiranje spektara, 49
- nukleotid, 5, 6
- nukleozid, 6
- okosnica DNA, 5
- osnovna linija, 48
- Poisson- Boltzmannova jednačba, 25, 28
- primarna struktura DNA, 7
- protuioni, 5
- pufer, 2, 62
- pufer ekvilibracijska atomska emisijska
spektroskopija, 24
- sekundarna struktura DNA, 8, 9
- skeletne vibracije, 37
- temperatura denaturacije, 21, 41
- torzijski kut, 8
- UV spektrofotometrija, 40, 50, 72
- vertikalno slaganje baza, 13
- vodikova veza, 9
- Watson-Crick parovi baza, 12