

Politechnika Gdańska

Wydział Chemiczny

Katedra Technologii Leków i Biochemii

Rozprawa doktorska

**TERMODYNAMICZNY MODEL ODDZIAŁYWANIA
IMIDAZOAKRYDONÓW PRZECIWNOWOTWOROWYCH Z DNA**

mgr inż. Anita Sosnowska

Promotor: prof. dr hab. inż. Jan Mazerski

Gdańsk 2012

Pragnę serdecznie podziękować:

prof. dr hab. inż. Janowi Mazerskiemu
*- za życzliwość, przekazaną wiedzę,
oraz możliwość rozwoju pod Jego kierunkiem*

Mężowi, Rodzinie i Przyjaciółom
- za cierpliwość, wsparcie, mobilizację i wiarę we mnie

SPIS TREŚCI

I. WPROWADZENIE	6
II. CZĘŚĆ TEORETYCZNA.....	8
II.1. Sposoby oddziaływania małowcząsteczkowych ligandów z DNA	8
II.1.1. Wiązanie w małym rowku	9
II.1.2. Interkalacja.....	11
II.1.3. Oddziaływanie zależne od sekwencji	14
II.1.4. Oddziaływanie mieszane	15
II.2. Metody badania oddziaływania małowcząsteczkowych ligandów z kwasami nukleinowymi.	16
II.2.1. Metody pozwalające wykryć oddziaływanie ligand/DNA i określić jego parametry	16
II.2.1.1. Metody spektroskopowe	16
II.2.1.2. Denaturacja termiczna	18
II.2.1.3. Metoda powierzchniowego rezonansu plazmonowego SPR	19
II.2.1.4. Metody kalorymetryczne	21
II.2.1.5. Footprinting	22
II.2.2. Metody pozwalające określić rodzaj wiązania się ligandu do DNA	23
II.2.2.1. Metody wiskozymetryczne	23
II.2.2.2. Wypieranie znacznika z DNA	24
II.2.2.3. Dichroizm kołowy i liniowy	24
II.2.3. Metody pozwalające określić strukturę powstającego kompleksu ligand/DNA	26
II.2.3.1. Analiza dyfrakcyjna monokryształu	26
II.2.3.2. Magnetyczny rezonans jądrowy	26
II.2.3.3. Modelowanie molekularne.....	28
II.3. Termodynamika tworzenia kompleksów ligand/DNA	31
II.3.1. Model oddziaływania ligand-DNA	32
II.3.2. Parametry termodynamiczne oddziaływań ligand-DNA	34
II.4. Agregacja związków organicznych w roztworach wodnych.....	36
II.4.1. Dimeryzacja	37
II.4.2. Trimeryzacja	40
II.4.3. Agregacja nieograniczona.....	41
III. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	44
IV. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA	46
IV.1. Materiały	46
IV.2. Odczynniki chemiczne i biochemiczne	47
IV.3. Roztwory wyjściowe	47
IV.4. Aparatura	47
IV.5. Stosowane metody.....	47
IV.5.1. Pomiar stężenia kwasu nukleinowego.....	47
IV.5.2. Spektrofotometryczne badania stanu pochodnych akrydyny w roztworach wodnych	48

IV.5.3. Analiza zestawów widm pochodnych akrydyny w roztworach wodnych	48
IV.5.4. Pomiary mikrokalorymetryczne procesu agregacji	51
IV.5.5. Analiza danych mikrokalorymetrycznych agregacji akrydyn	52
IV.5.6. Pomiary kalorymetryczne oddziaływania ligand-DNA	53
IV.5.7. Analiza danych mikrokalorymetrycznych oddziaływania akrydyn z DNA	54
V. WYNIKI	56
V.1. Analiza spektroskopowa reakcji agregacji	56
V.1.1. Analiza spektroskopowa agregacji proflawiny	57
V.1.2. Analiza spektroskopowa agregacji C-1330	60
V.1.3. Analiza spektroskopowa agregacji C-1415	64
V.1.4. Analiza spektroskopowa agregacji C-1212	67
V.1.5. Analiza spektroskopowa agregacji C-1371	68
V.1.6. Analiza spektroskopowa agregacji C-1492	70
V.2. Podsumowanie analizy spektroskopowej agregacji pochodnych akrydyny	72
V.3. Analiza termodynamiczna procesu agregacji pochodnych akrydyny	73
V.3.1. Analiza termodynamiczna procesu agregacji proflawiny	73
V.3.2. Analiza termodynamiczna procesu agregacji pochodnej C-1330	77
V.3.3. Analiza termodynamiczna procesu agregacji pochodnej C-1415	82
V.3.4. Analiza termodynamiczna procesu agregacji pochodnej C-1212	85
V.3.5. Analiza termodynamiczna procesu agregacji pochodnej C-1371	88
V.3.6. Analiza termodynamiczna procesu agregacji pochodnej C-1492	91
V.4. Podsumowanie analizy termodynamicznej agregacji pochodnych akrydyny	95
V.5. Analiza termodynamiczna oddziaływań ligandów z DNA	96
V.5.1. Analiza termodynamiczna oddziaływań proflawiny z ctDNA	97
V.5.2. Analiza termodynamiczna oddziaływań imidazoakrydonu C-1330 z ctDNA	108
V.5.3. Analiza termodynamiczna oddziaływań imidazoakrydonu C-1415 z ctDNA	116
V.5.4. Analiza termodynamiczna oddziaływań imidazoakrydonu C-1212 z ctDNA	123
V.5.5. Analiza termodynamiczna oddziaływań imidazoakrydonu C-1371 z ctDNA	130
V.5.6. Analiza termodynamiczna oddziaływań imidazoakrydonu C-1492 z ctDNA	136
VI. DYSKUSJA WYNIKÓW	143
VII. LITERATURA	151
VIII. STRESZCZENIE.....	161
IX. ABSTRACT.....	163
X. DOROBEK NAUKOWY.....	165
XI. OTRZYMANE STYPENDIA.....	169
XII. STAŻE ZAGRANICZNE.....	169
XIII. WSPÓLPRACE MIĘDZYNARODOWE.....	169

Wykaz skrótów stosowanych w pracy:

ε	współczynniki ekstynkcji molowej
ctDNA	calf thymus DNA, DNA z grasicy cielęcej
K	wewnętrzna stała wiązania
K_A	stała agregacji
n	stała opisująca wielkość miejsca wiązania, w przypadku DNA jest to ilość zasad lub par zasad zajętych przez cząsteczkę liganda
pz	pary zasad
ν	gęstość wiązania, stosunek stężenia związanego liganda do stężenia polimeru
T_m	temperatura topnienia DNA
ω	parametr kooperatywności, pomocnicza stała równowagowa opisująca przejście związanego liganda z izolowanego do jednostronnie ciągłego miejsca wiązania, lub z jednostronnie ciągłego do dwustronnie ciągłego miejsca wiązania
DSC	różnicowa kalorymetria skaningowa
ITC	izotermiczna kalorymetria miareczkowa
SPR	powierzchniowy rezonans plazmonowy
CD	dichroizm kołowy
NMR	spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego

I. WPROWADZENIE

Rozwój metod leczenia nowotworów, jaki miał miejsce w ostatnich 20 latach wskazuje na konieczność poszukiwania wciąż nowych, skuteczniejszych i bardziej bezpiecznych leków. Mimo szybkiego rozwoju nowoczesnych sposobów walki z nowotworami, chemoterapia pozostaje jedną z ważniejszych, a w przypadku niektórych nowotworów (np. białaczka), jedyną metodą leczenia. Mechanizm działania większości dotychczas opracowanych leków przeciwnowotworowych wiąże się z ich oddziaływaniem z DNA. Warto zauważyć, że DNA jest prawdopodobnie najlepiej strukturalnie scharakteryzowaną makromolekułą, co czyni ją atrakcyjnym obiektem dla poszukiwań nowych związków, mogących być potencjalnymi lekami nakierowanymi na DNA. Racjonalne planowanie struktur nowych leków wymaga szczegółowego zrozumienia oddziaływań istniejących już leków z DNA.

W ostatnich latach intensywnie studiowane jest oddziaływanie różnorodnych małocząsteczkowych ligandów z DNA. Głównym celem tych badań jest nie tylko uzyskanie informacji na temat struktury kompleksów ligand/DNA i dynamiki tworzenia tych kompleksów, ale również wyznaczenie poszczególnych parametrów termodynamicznych procesu. Termodynamiczny opis oddziaływań małocząsteczkowych ligandów z DNA pozwala bowiem na uzyskanie informacji na temat udziału poszczególnych typów oddziaływań w całkowitej zmianie entalpii swobodnej, która towarzyszy utworzeniu kompleksu związku z kwasem nukleinowym.

W Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej prowadzone są od wielu lat poszukiwania nowych związków o właściwościach przeciwnowotworowych. W kręgu zainteresowań znajdują się między innymi pochodne akrydyny. Wiele z nich charakteryzuje się wysoką aktywnością biologiczną, w tym również przeciwnowotworową. Mechanizm działania przeciwnowotworowych pochodnych akrydyny nie został jeszcze do końca poznany. Wydaje się jednak, że oddziaływanie tych związków z DNA jest jednym z kluczowych etapów tego mechanizmu.

Liczne związki aromatyczne, w tym niektóre pochodne akrydyny, ulegają w roztworze wodnym procesowi agregacji. Siłą napędową tego procesu są oddziaływania hydrofobowe. Agregacja stanowi istotne utrudnienie przy badaniu oddziaływania małocząsteczkowych, aromatycznych ligandów z kwasami nukleinowymi. Bez uwzględnienia tego zjawiska opis oddziaływania jest zafałszowany i może prowadzić do błędnej interpretacji uzyskanych wyników.

Przedmiotem niniejszej pracy jest uzyskanie danych na temat fizykochemicznego oddziaływania ligandów ulegających agregacji w roztworach wodnych z DNA. Głównym celem jest wyznaczenie parametrów termodynamicznych poszczególnych typów oddziaływań w całkowitej zmianie entalpii swobodnej procesu. Uzyskane dane termodynamiczne pozwolą ocenić, który fragment struktury związku zaangażowany jest w selektywne oddziaływanie z DNA.

II. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

II.1. Sposoby oddziaływania małowcząsteczkowych ligandów z DNA [1]

Kwas deoksyrybonukleinowy (DNA) jest długim, liniowym lub cyklicznym, nierozgałęzionym polimerem zbudowanym z połączonych wiązaniem fosfodiestrowym czterech nukleotydów (adenozyny, guanidyny, cytozyny i tymidyny). DNA w warunkach fizjologicznych ma zwykle formę dwuniciowej helisy. Niektóre jego fragmenty mogą jednak przyjmować struktury wieloniciowe. W dwuniciowej strukturze helisy nici bieżą antyrównolegle (jedna od 5' do 3', druga od 3' do 5'). Od czasu przełomowego odkrycia dwuniciowej struktury DNA przez Watson'a i Crick'a w 1953 roku [2], zostały zidentyfikowane również inne, wieloniciowe struktury tych kwasów, takie jak G-kwadrupeks DNA [3] czy tripleks DNA [4]. DNA służy przede wszystkim jako jednostka funkcjonalna do przechowywania informacji genetycznej w organizmach żywych. Poza przechowywaniem informacji genetycznej DNA zaangażowane jest również w szereg procesów biologicznych, głównie w regulację ekspresji genów [5,6,7,8].

Odkąd poznano budowę i rolę kwasów deoksyrybonukleinowych w żywych organizmach rozpoczęto badania zmierzające do wyjaśnienia wpływu różnorodnych substancji chemicznych na ich strukturę i funkcję. Jednym z ważnych aspektów okazało się poznanie mechanizmu rozpoznawania specyficznych sekwencji podwójnej helisy DNA przez biopolimery oraz związki małowcząsteczkowe.

Rozróżniamy dwa podstawowe mechanizmy oddziaływania substancji chemicznych z dwuniciowym DNA:

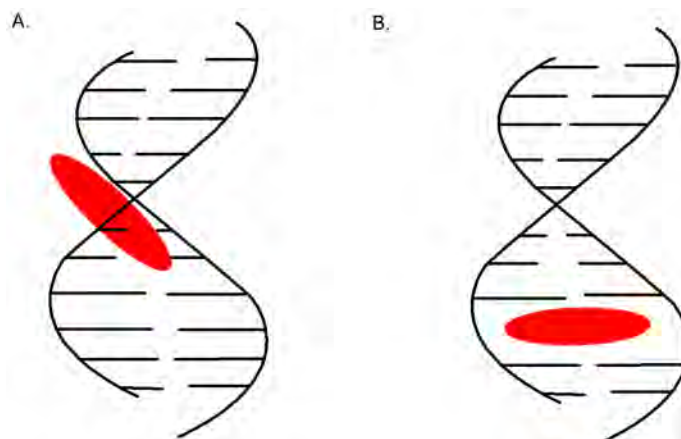
- wiązania kowalencyjne – wiążą się tak związki posiadające odpowiednie grupy funkcyjne (substancje bogate w elektrony, *nukleofile*, bądź substancje z niedoborem elektronów, *elektrofile*)
- oddziaływania fizykochemiczne - DNA posiada wiele miejsc zdolnych do tworzenia silnych oddziaływań fizykochemicznych. Możliwe jest więc powstawanie względnie trwałych kompleksów DNA z ligandami o odpowiednich właściwościach.

W celu racjonalnego projektowania nowych ligandów zdolnych do specyficznego oddziaływania z określonymi sekwencjami DNA niezbędne jest dokładne zrozumienie sposobu, w jaki cząsteczki rozpoznają i wiążą się do DNA.

Podstawowe sposoby niekowalencyjnego oddziaływania małowcząsteczkowych związków chemicznych z DNA to:

- wiązanie w małym rowku DNA [9,10,11] (Ryc. 1A)
- interkalacja [12,13] (Ryc. 1B)

Procesy te mogą być poprzedzone oddziaływaniami elektrostatycznymi, które ułatwiają dotarcie związków w pobliże podwójnej helisy DNA.



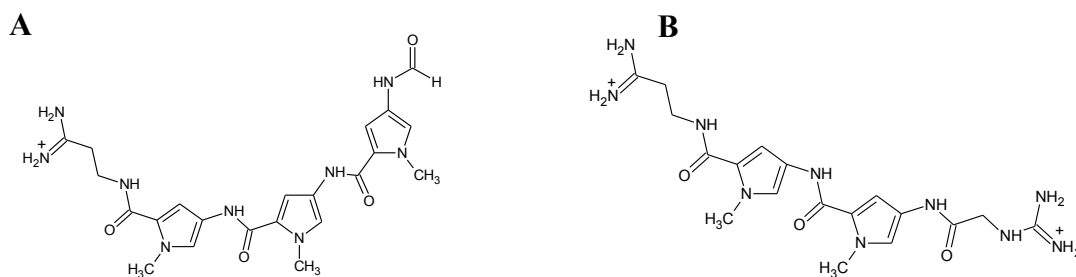
Rycina 1. Schemat pokazujący dwa sposoby niekowalencyjnego oddziaływania ligandów z DNA, A – wiązanie w rowku, B – interkalacja

II.1.1. Wiązanie w małym rowku

Związki oddziałujące z DNA w małym rowku posiadają najczęściej kilka pierścieni aromatycznych (np. fenylowych, furanowych, pirolowych, tiolowych) połączonych w taki sposób, aby możliwa była rotacja pierścieni i dopasowanie kształtu związku do kształtu rowka [14]. Kompleksy tego typu stabilizowane są przez szereg oddziaływań niekowalencyjnych, przede wszystkim wiązań wodorowych oraz w pewnym stopniu oddziaływań van der Waalsa i oddziaływań hydrofobowych. Większość dotychczas poznanych molekuł oddziałujących z DNA w małym rowku wykazuje preferencje w stosunku do fragmentów DNA bogatych w pary AT. Wynika to głównie z faktu, iż preferencyjnie dochodzi do utworzenia wiązania wodorowego pomiędzy atomem tlenu związanym z węglem C2 tyminy lub atomem N3 adeniny oraz donorami tych wiązań występującymi w strukturze ligandu [15]. Wiele związków tej klasy to powszechnie stosowane barwniki oraz niektóre leki.

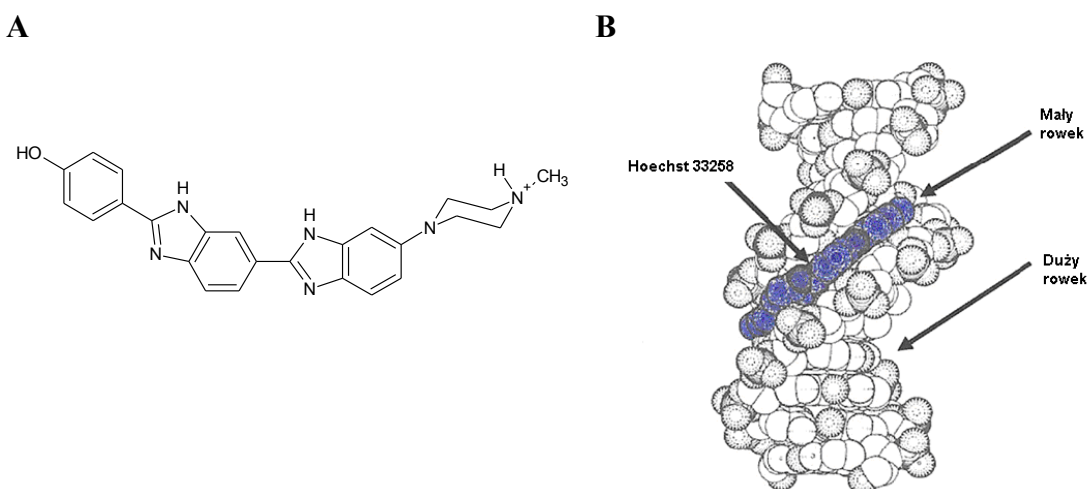
Jedne z pierwszych badań związków wiążących się w małym rowku DNA dotyczyły pirolowych antybiotyków dystamycyny A oraz netropsyny [16]. Związki te zbudowane są z kilku pierścieni pirolowych połączonych liniowo wiązaniami amidowymi. Na końcach

cząsteczki znajdują się dodatnio naładowane grupy funkcyjne guanidyny (Ryc. 2). Dystamycyna A oraz netropsyna wiąże się w małym rowku formy B-DNA dopasowując się do kształtu helisy. Dla utworzenia stabilnego kompleksu z DNA wymagana jest obecność co najmniej 4 par AT [17]. W ostatnim czasie wykazano, że dystamycyna wiąże się z DNA w formie dimeru, wypełniając cały mały rowek helisy [18,19,20,21]. Znane są analogi tego związku charakteryzujące się większym powinowactwem do DNA oraz różnorodną selektywnością sekwencyjną [22].

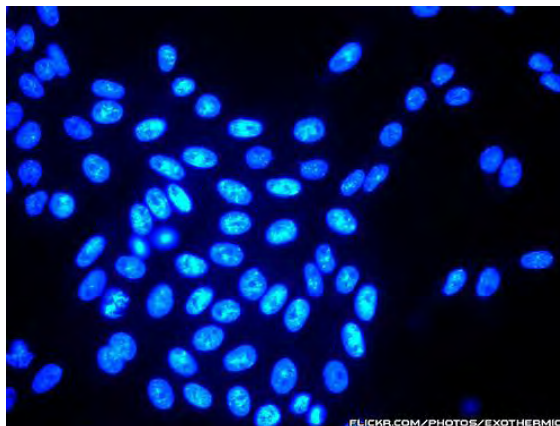


Rycina 2. Struktury chemiczne antybiotyków pirolowych wiążących się w małym rowku: A – dystamycyna A, B – netropsyna

Prawdopodobnie jednym z najlepiej poznanych związków, który wiąże się w małym rowku DNA jest barwnik Hoechst 33258 (Ryc. 3). Związek ten stosowany jest do wybarwiania jąder komórkowych podczas badań cyklu komórkowego oraz procesu apoptozy. Barwnik Hoechst 33258 należy do najczęściej używanych znaczników DNA, ponieważ ma łatwość wnikania do wnętrza komórki. Po wnikięciu do jądra komórki wiąże się z chromosomalnym DNA. Powstały kompleks wykazuje silną niebieską fluorescencję, dzięki czemu DNA widoczne jest w mikroskopie fluorescencyjnym (Ryc. 4). Związek ten wykazuje preferencje w stosunku do sekwencji d(AT)₃ [23].



Rycina 3. A – struktura barwnika Hoechst 33258, B – schemat wiązania się barwnika Hoechst 33258 do DNA [24]



Rycina 4. Komórki CHO traktowane barwnikiem Hoechst 33258 w mikroskopie fluorescencyjnym, kompleks barwnika z DNA fluoryzuje na niebiesko [25]

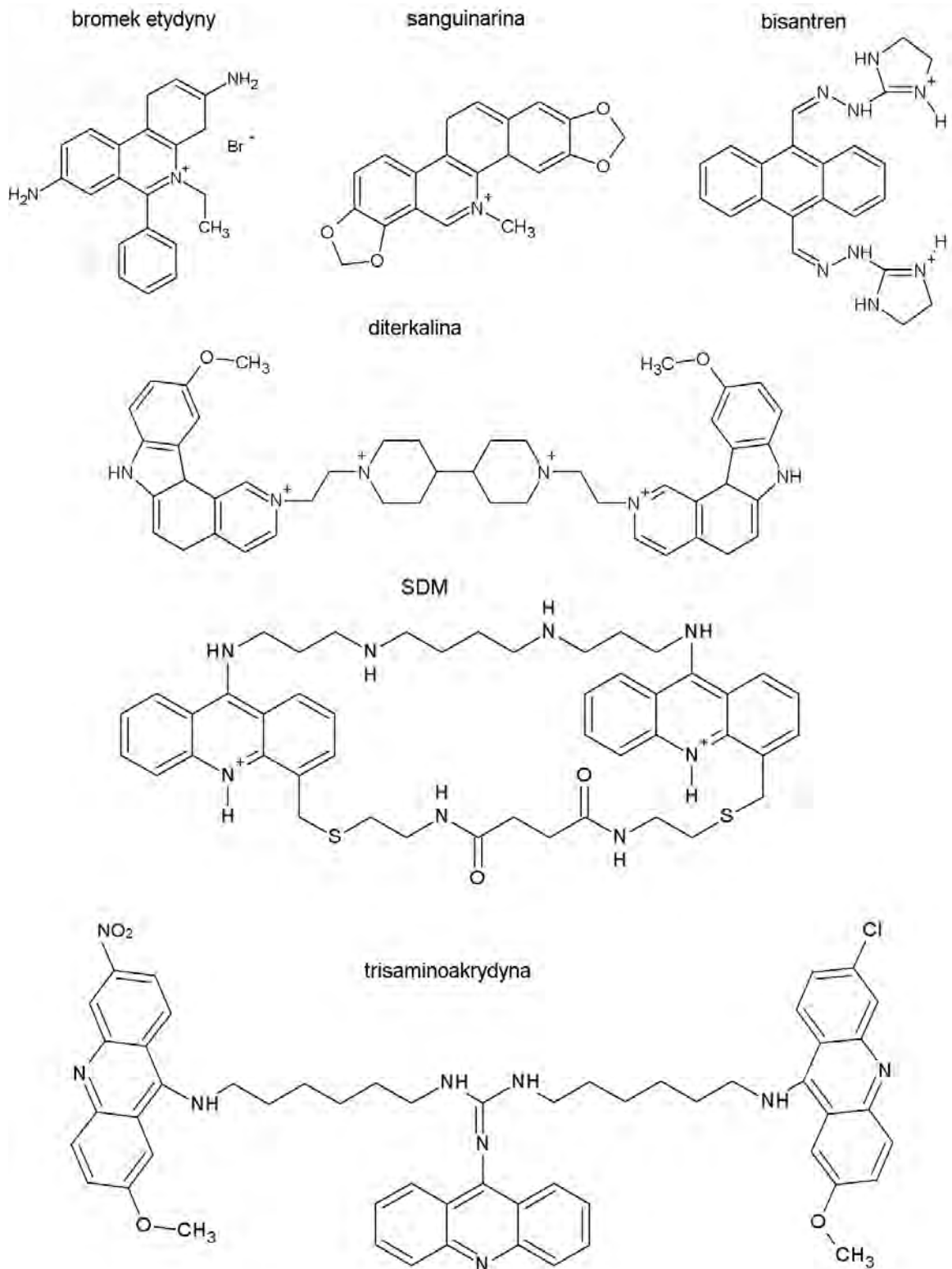
W małym rowku wiążą się również poliaminy alifatyczne takie jak spermina i spermidyna [26].

Związki wiążące się w małym rowku stabilizują strukturę podwójnej helisy.

II.1.2. Interkalacja

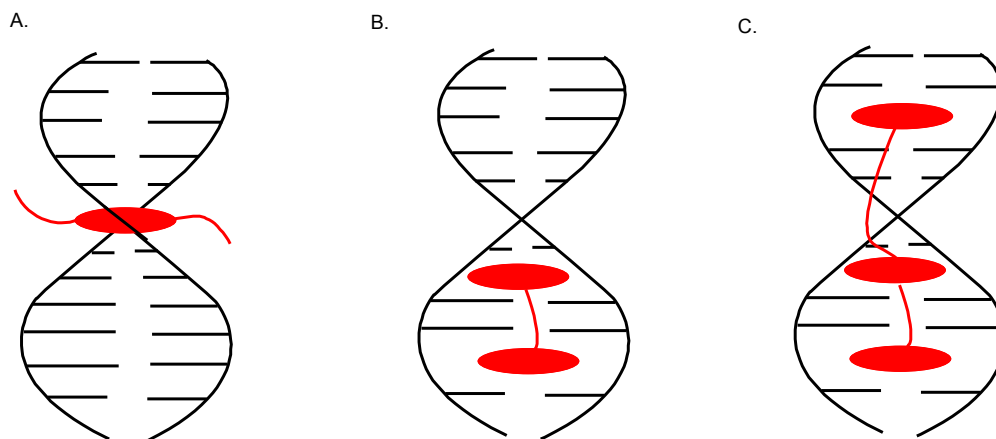
Jako pierwszy, występowanie zjawiska interkalacji do DNA wykazał w 1961 roku Lerman, w pionierskich badaniach dotyczących aminoakrydyn [27,28]. Interkalatory (Ryc. 5, bromek etydyny, sanguinarina) to związki, które posiadają płaski, skondensowany układ trzech lub więcej pierścieni aromatycznych lub heteroaromatycznych, który może wnikać pomiędzy sąsiednie pary zasad w podwójnej helisie DNA. Powstający w ten sposób kompleks jest stabilizowany głównie przez oddziaływania typu π - π płaskich układów aromatycznych z układami aromatycznymi par zasad. Pewien udział w stabilizacji kompleksu interkalacyjnego odgrywają również oddziaływania hydrofobowe.

Interkalacja ligandu powoduje lokalne zmiany kąta skręcenia helisy wywołując jej rozwinięcie, usztywnienie oraz wydłużenie [29]. Zmiany w strukturze DNA zależą zwykle od budowy interkalatora i tak odległość między sąsiednimi parami zasad może wzrosnąć z 0,34 nm do około 0,7 - 0,8 nm, natomiast zmiana kąta skręcenia może zawierać się w zakresie od 10 do 26° [30]. Zmiany w strukturze DNA, które występują podczas procesu interkalacji mogą być używane, jako narzędzie diagnostyczne dla określenia mechanizmu wiązania się ligandu do podwójnej helisy. Dotyczy to szczególnie wydłużenia liniowych fragmentów DNA i zmiany stopnia nadskręcenia form kolistych. Najbardziej trwałe kompleksy interkalatorów z DNA powstają w wyniku łączenia się ligandu z parami GC w DNA [31].



Rycina 5. Struktury chemiczne wybranych interkalatorów

Oprócz klasycznych, prostych interkalatorów znane są związki o bardziej skomplikowanym mechanizmie oddziaływania z DNA. Ich cechą charakterystyczną jest posiadanie płaskiego układu lub układów skondensowanych pierścieni aromatycznych, które mogą interkalować pomiędzy pary zasad DNA (Ryc. 6).

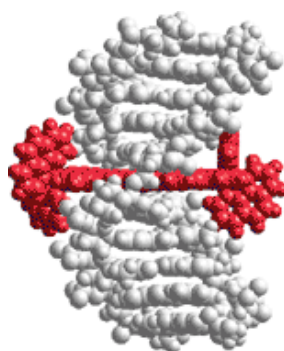


Rycina 6. Schemat oddziaływania nieklasycznych interkalatorów z DNA, A – interkalatory przebijające, B – bisinterkalatory, C – multinterkalatory

Wśród cząsteczek tego typu wyróżnić można:

1. **interkalatory przebijające** [32], (ang. *threading intercalators*), które posiadają duże podstawniki po przeciwnych stronach interkalującego układu aromatycznego, Ryc. 6A. Płaski układ wnika pomiędzy pary zasad, a podstawniki lokują się w małym i dużym rowku helisy DNA, Ryc. 7.

Aby doszło do utworzenia kompleksu, jeden z podstawników musi „przejsć” pomiędzy parami zasad. W procesie tym dochodzi do chwilowego zniekształcenia struktury podwójnej helisy. Zniekształcenie to jest znacznie większe niż w przypadku tradycyjnej interkalacji. Powstawanie takiego kompleksu przebiega wolniej, ale za to utworzony kompleks jest bardziej stabilny. Przykładem tego typu cząsteczek może być bisantren (Ryc. 5).

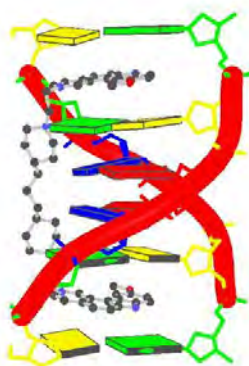


Rycina 7. Schemat struktury kompleksu interkalatora przebijającego z DNA [33].

2. **bisinterkalatory** posiadają dwa układy skondensowanych pierścieni aromatycznych połączone względnie giętkim łącznikiem, Ryc. 6B. Zwykle związki tego typu wykazują większe powinowactwo do podwójnej helisy DNA niż zawarte w nich

pojedyncze układy interkalujące [34].

Jednym z przykładów związków łączących się z DNA jako bisinterkalator jest diterkalina, Ryc. 5. Związek ten tworzy kompleks z oligonukleotydowym dupleksem d(CGCG)₂, w którym dwa układy aromatyczne interkalują do dwóch skrajnych miejsc CpG, pomijając środkowy układ GpC w duplesie, a łącznik wiąże się z dużym rowkiem [35,36,37]. Interkalacja do sąsiednich miejsc w duplesie jest zdecydowanie niekorzystna termodynamicznie, co prawdopodobnie wiąże się z sumarycznym wpływem efektów sterycznych, elektrostatycznych i naprężeń konformacyjnych szkieletu DNA. Schemat oddziaływania analogu diterkaliny z DNA przedstawiono na Ryc. 8.



Rycina 8. Schemat oddziaływania bisinterkalatora z DNA [38]

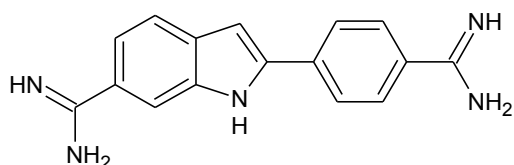
3. **przebijające bisinterkalatory** posiadające dwa układy aromatyczne połączone kowalencyjnie łącznikami znajdującymi się po przeciwnych stronach pierścieni. Cząsteczki tego typu mają zwykle strukturę makrocycliczną [39]. Przykładem bisinterkalatora jest związek przeciwnowotworowy o symbolu SDM (Ryc. 5).
4. **multi-interkalatory**, posiadają kilka układów aromatycznych, z których jednak tylko trzy mogą równocześnie interkalować do DNA [40], schematycznie taki sposób interkalacji przedstawiono na Ryc. 6C. Przykładową strukturę multi-interkalatora trisaminoakrydyny zaprezentowano na Ryc. 5.

II.1.3. Oddziaływanie zależne od sekwencji

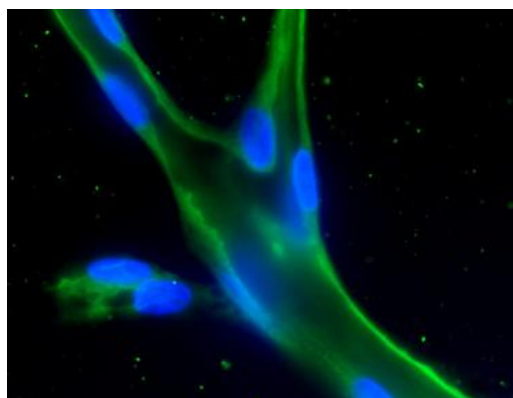
Wśród związków oddziałujących z DNA występują cząsteczki, które w zależności od sekwencji zasad podwójnej helisy i warunków reakcji, mogą oddziaływać z DNA bądź na drodze interkalacji, bądź poprzez wiązania się w małym rowku. Przykładem takiego

związku jest barwnik fluorescencyjny DAPI, (Ryc. 9), który wybarwia jądro komórkowe w mikroskopie fluorescencyjnym na niebiesko. W przypadku fragmentów DNA bogatych w pary AT związek ten tworzy kompleks w małym rowku. Kompleks ten stabilizowany jest wiązaniami wodorowymi tworzonymi z grupami funkcyjnymi obecnymi na krawędziach par zasad od strony małego rowka. Natomiast w przypadku fragmentów DNA bogatych w pary GC (brak co najmniej trzech kolejno ułożonych par AT) DAPI interkaluje pomiędzy zasady [41].

A



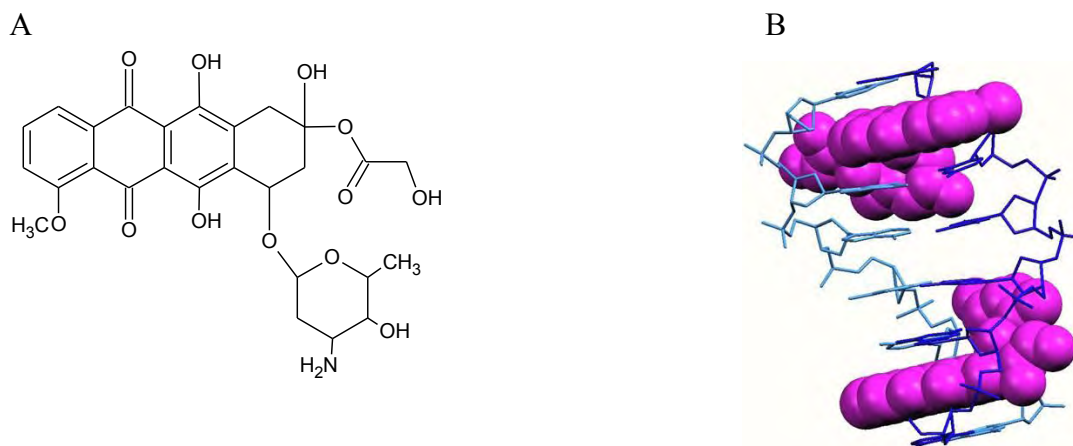
B



Rycina 9. A – struktura barwnika DAPI, B – jądra komórkowe wybarwione barwnikiem DAPI (kolor niebieski)

II.1.4. Oddziaływanie mieszane

Z punktu widzenia medycyny na szczególne zainteresowanie zasługują związki wiążące się z określonymi sekwencjami DNA. Przez wiele lat, wydawało się, że mogą to być tylko związki wiążące się w małym rowku. Związki te, tworząc wiązania wodorowe z odpowiednimi grupami wyścielającymi rowek, rozpoznają większe fragmenty kwasu nukleinowego. Interkalatory wchodzą pomiędzy sąsiadujące pary zasad, zatem generalnie charakteryzują się preferencją jedynie względem par AT bądź GC [42]. Ostatnio znaleziono jednak interkalatory zdolne do rozpoznawania bardziej skomplikowanych sekwencji DNA [43]. Związki tego typu posiadają poza płaskim układem heteroaromatycznym również fragmenty cząsteczki zdolne do specyficznego tworzenia wiązań wodorowych z atomami lub grupami atomów znajdującymi się w małym bądź dużym rowku kwasów nukleinowych. Przykładem takiego związku jest dokсорubicyna (Ryc. 10).



Rycina 10. A – struktura doksorubicyny, B – schemat wiązania się do DNA [44]

II.2. Metody badania oddziaływania małowcząstkowych ligandów z kwasami nukleinowymi.

Do badania oddziaływania małych ligandów z kwasami nukleinowymi wykorzystuje się obecnie szereg różnorodnych technik i metod eksperymentalnych. Wybór metody zależy od rodzaju informacji jaką chce się uzyskać, ponieważ badanie kompleksów tworzących się w wyniku oddziaływań małych cząsteczek z kwasami nukleinowymi mogą dostarczyć cennych informacji na temat:

- struktury tworzonych kompleksów,
- rodzaju i siły oddziaływań odpowiedzialnych za tworzenie kompleksów,
- termodynamiki kompleksów,
- stechiometrii powstałych kompleksów.

Zwykle do uzyskania pełnej informacji o mechanizmie oddziaływania konieczne jest jednoczesne zastosowanie kilku metod, ponieważ techniki te uzupełniają się wzajemnie.

II.2.1. Metody pozwalające wykryć oddziaływanie ligand/DNA i określić jego parametry

II.2.1.1. Metody spektroskopowe

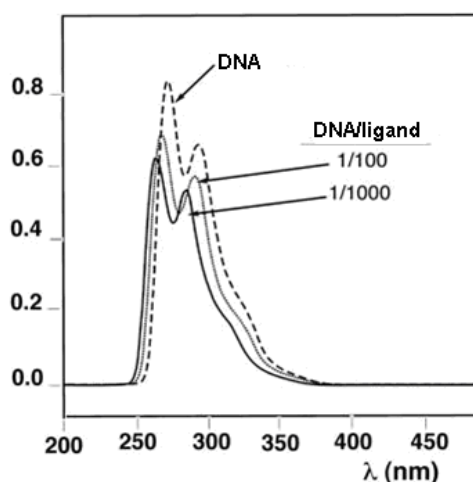
W celu wykrycia powstawania kompleksów ligand/DNA stosowane są różnorodne techniki spektroskopowe. W metodach tych wykorzystuje się zmiany właściwości spektralnych ligandu lub DNA podczas tworzenia kompleksu.

Spektroskopia absorpcyjna UV-VIS

Najbardziej powszechnie stosowaną metodą spektroskopową jest spektroskopia absorpcyjna UV-VIS. W metodzie tej można wykorzystać zmiany w widmie DNA lub w widmie ligandu. Absorpcyjne widmo UV-Vis dwuniciowego DNA wykazuje szerokie pasmo w zakresie 250-350 nm, z maksimum przypadającym przy długości fali równej 260 nm. Pasma to jest konsekwencją obecności układów chromoforowych zawartych w cząsteczkach puryn i pirymidyn. Oddziaływanie ligandu z DNA może być zidentyfikowane poprzez porównanie widm absorpcji UV-Vis wolnego DNA oraz DNA w obecności ligandu. Maksimum absorpcji kompleksu ligand/DNA w zakresie absorpcji DNA przesunięte jest o 20-70 nm w kierunku fal krótszych oraz ma mniejszą intensywność [45] (Ryc. 11).

Jeżeli ligand wykazuje absorbancję światła przy długości fali większej niż ok. 350 nm, to do wykrycia oddziaływania ligand/DNA można wykorzystać widmo ligandu. Jeśli porównujemy widmo ligandu i kompleksu ligand/DNA zwykle widmo kompleksu przesunięte jest w kierunku fal dłuższych [46].

Metoda ta może być wykorzystana również do oceny stałych wiązania [47,48,49]. Stałe wiązania można uzyskać dzięki wyznaczeniu ilościowych zmian w widmie absorpcji liganda w obecności rosnącej ilości DNA. Równowagową stałą wiązania otrzymuje się poprzez numeryczne dopasowanie wyników do modelu Scatcharda [50] lub modelu McGhee-von Hippel [51].



Rycina 11. Wpływ dodatku liganda na absorpcję UV-Vis DNA [52].

Spektroskopia fluorescencyjna

Spektroskopia fluorescencyjna i różne narzędzia analityczne oparte na emisji fluorescencji mogą również dostarczyć przydatnych informacji o oddziaływaniu ligandów z DNA. Samo DNA nie wykazuje mierzalnej fluorescencji własnej z wyjątkiem niskich temperatur. Z DNA mogą wiązać się związki wykazujące fluorescencję, takie jak bromek etydyny czy barwniki akrydynowe. Emisja fluorescencji jest bardzo wrażliwa na środowisko. Przeniesienie fluorochromów ze środowiska o niskiej polarności do wysokiej zazwyczaj powoduje przesunięcia widma (o ok. 10-20 nm) w widmach wzbudzenia i emisji ligandu [53]. Rotacja wolnych cząsteczek sprzyja ponadto bezpromienistej dezaktywacji stanów wzbudzonych, jeśli natomiast dochodzi do unieruchomienia fluorochromu (np. w kompleksie ligand/DNA), to obserwuje się znaczny wzrost natężenia fluorescencji. Do badania oddziaływania ligandu z DNA najczęściej stosuje się metodę fluorescencyjnego miareczkowania równowagowego, gdzie obserwuje się zmiany w widmie związku podczas dodawania kolejnych porcji DNA (do roztworu związku, bądź roztworu związku z DNA). Metoda ta umożliwia wyznaczenie stężenia związku niezwiązanego i związanego z kwasem nukleinowym w warunkach równowagowych, oraz wyznaczenie stałej wiązania K_i (poprzez wyznaczenie krzywej Scatcharda oraz dopasowanie izotermy McGhee-von Hippel [54] metodami regresji nieliniowej).

Orientacja fluorochromów ligandów i ich bliskie położenie względem par zasad w DNA mogą być badane przez anizotropię fluorescencji lub fluorescencyjny transfer energii rezonansu (z ang. *Förster Resonance Energy Transfer*, FRET).

II.2.1.2. Denaturacja termiczna

Stabilność kompleksu związku z dwu- i trójniciowymi formami DNA może być ustalona na podstawie badań termicznej denaturacji DNA [55,56]. Analiza krzywej topnienia stosowana może być do oceny dysocjacji dwuniciowego DNA podczas ogrzewania. Wraz ze wzrostem temperatury dochodzi do dysocjacji podwójnej helisy, co skutkuje wzrostem intensywności absorpcji. Temperatura, w której 50% DNA ulega denaturacji zwana jest temperaturą topnienia (z ang. *melting temperature* - T_M), choć nie jest to najdokładniejsze określenie, ponieważ ma bardzo niewiele wspólnego z tradycyjnym topnieniem. Dzięki metodzie termicznej denaturacji możemy wyznaczyć stałą wiązania kompleksu ligand/DNA.

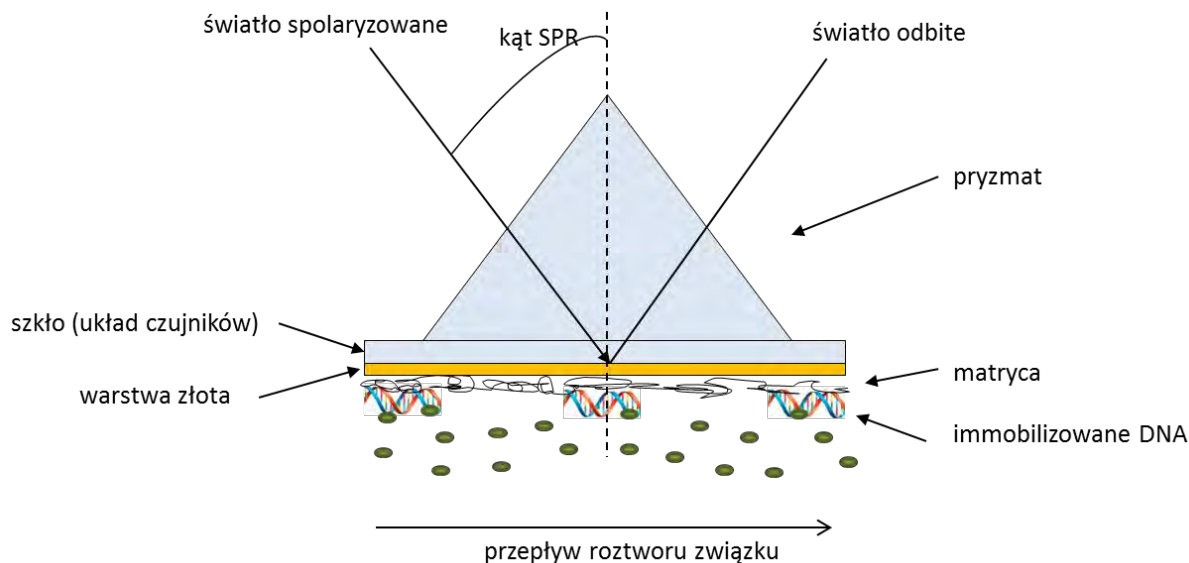
Metoda ta jest z powodzeniem stosowana do badania oddziaływań zachodzących w wyniku tworzenia kompleksu ligandu z DNA. Interkalatory wnikają między pary zasad helisy, a kompleks ligand/DNA stabilizowany jest przez oddziaływania typu π - π płaskich układów aromatycznych z układami aromatycznymi zasad. Takie oddziaływanie stabilizuje strukturę helisy, w wyniku czego podwyższona zostaje temperatura topnienia kompleksu.

Gdy ligand wiąże się z jedną nicią helisy, destabilizuje to strukturę kwasu, co prowadzi do obniżenia T_M . Wzrost pH badanego roztworu ma negatywny wpływ na stabilność DNA, natomiast zwiększenie stężenia soli w roztworze powoduje podwyższenie T_M [57,58].

II.2.1.3. Metoda powierzchniowego rezonansu plazmonowego SPR

Metoda powierzchniowego rezonansu plazmonowego (ang. *Surface Plasmon Resonance*, SPR) stała się ostatnio jedną z najbardziej popularnych metod badania selektywnego oddziaływania ligandów z różnymi biomolekułami [59,60,61].

W technice tej wykorzystuje się zjawisko wzbudzenia plazmonów (powierzchniowych fal elektromagnetycznych) w warstewce metalu – najczęściej złota lub srebra) – przez padającą pod odpowiednim kątem wiązkę światła spolaryzowanego. W przypadku oddziaływania ligand/DNA na warstewce metalu znajduje się matryca, do której immobilizowane jest DNA (Ryc. 12). Matryca omywana jest przez przepływający bufor o regulowanym składzie. Zjawisko rezonansowego wzbudzenia plazmonów zachodzi tylko przy określonym kącie padania światła. Rezonans plazmonowy jest bardzo czuły na zmiany właściwości ośrodka optycznie rzadszego (matrycy) oraz stałej dielektrycznej. Jeżeli w buforze pojawi się ligand oddziałujący z DNA i dojdzie do powstania kompleksu, to warunki rezonansu ulegną zmianie, a tym samym zmianie ulegnie intensywność światła odbitego i kąt odbicia światła pochłanianego rezonansowo. Podczas tworzenia kompleksu możliwe jest monitorowanie odpowiedzi w czasie rzeczywistym [62]. Ponieważ wartość lokalnej stałej dielektrycznej matrycy jest proporcjonalna do zaabsorbowanej masy, metoda SPR pozwala na wykrycie oddziaływania znajdującego się w buforze ligandu z „receptorem” obecnym w matrycy [63].



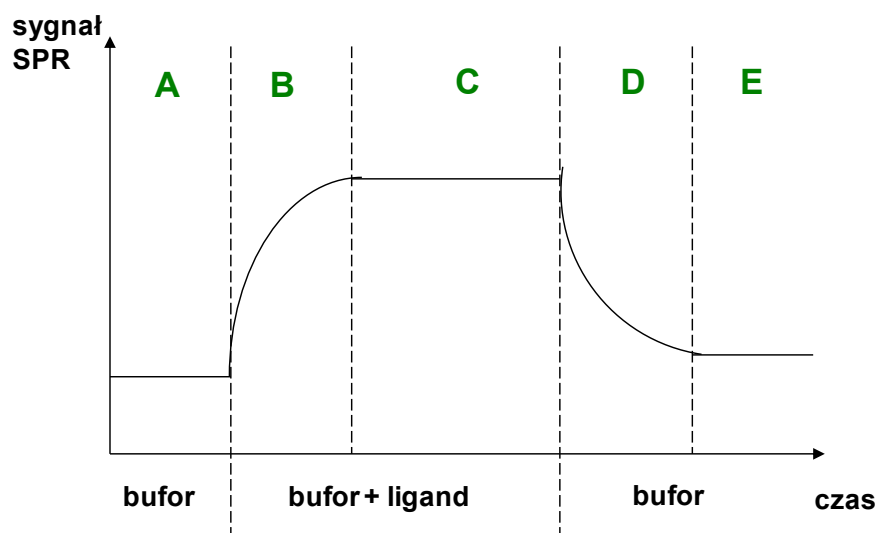
Rycina 12. Schemat działania powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SRP) [na podstawie 52].

Technika ta może być stosowana do badania oddziaływań w każdym systemie biologicznym, zarówno do badania oddziaływań oligonukleotydów, oligosacharydów, białek i lipidów z małymi cząsteczkami, cząstek wirusowych, bakteryjnych i komórek. Co ważniejsze, SRP pozwala na bezpośrednią obserwację szybkości asocjacji i dysocjacji cząsteczek, które przyczyniają się do ogólnego powinowactwa wiązania.

Przebieg pomiaru składa się z trzech etapów różniących się składem buforu (Ryc. 13.):

- etap I – tylko bufor – matryca dochodzi do stanu równowagi
- etap II – w buforze pojawia się skokowo ligand o zadanym stężeniu
- etap III – skokowy powrót do czystego ligandu.

Analizując schemat (Ryc. 13) dla oddziaływania idealnie odwracalnego można wyróżnić pięć zakresów. Początkowo wolna matryca obmywana jest przez czysty bufor (Ryc. 13, etap A). W chwili gdy w przepływającym roztworze pojawi się ligand dochodzi do jego oddziaływania z DNA (Ryc. 13, etap B), aż do uzyskania stanu równowagi z częściowo skompleksowaną matrycą (Ryc. 13, etap C). Gdy matryca ponownie omywana jest roztworem czystego buforu, dochodzi do desorpcji ligandu (Ryc. 13, etap D). Ostatnim etapem jest regeneracja wolnej matrycy (Ryc. 13, E). Czas etapów B i D zależy od kinetyki oddziaływania (sorpcji/ desorpcji). Natomiast na wartość sygnału w stanie C ma wpływ stężenie ligandu, stała kompleksowania oraz stechiometria kompleksu.



Rycina 13. Schemat typowego pomiaru SPR: A – stan równowagi wolnej matrycy, B – sorpcja ligandu, C – stan równowagi z częściowo skompleksowaną matrycą, D – desorpcja ligandu, E – stan równowagi wolnej matrycy.

Wzrastająca dostępność instrumentów do badań oraz duża czułość metody sprawiły, że technika ta jest coraz częściej wybierana do badań kinetycznych oraz równowagowych [64]. Wielką zaletą takiego podejścia jest możliwość stosowania SPR dla cząsteczek, które nie absorbują światła i nie fluoryzują, oraz możliwość badania bardzo niskich stężeń związków (od nanomolowych do mikromolowych). Jedyną trudność sprawia wyznaczenie współczynnika załamania światła, który jest różny dla różnych związków, a na jego podstawie ustalana jest stechiometria reakcji [65].

II.2.1.4. Metody kalorymetryczne

Metody kalorymetryczne, w szczególności izotermiczna kalorymetria miareczkowa (ang. *isothermal titration calorimetry*, ITC) [66,67] oraz różnicowa kalorymetria skaningowa (ang. *differential scanning calorimetry*, DSC) [68,69] są ostatnio coraz częściej używane do bezpośredniego wyznaczania parametrów oddziaływań międzycząsteczkowych [70].

Kiedy dochodzi do wiązania się ligandu z DNA pojawia się efekt cieplny: wydzielanie bądź pochłanianie ciepła. Metoda ITC pozwala na bezpośredni pomiar ilości ciepła uwalnianego lub zabsorbowanego podczas oddziaływania. Pomiar tego ciepła pozwala na dokładne określenie stałych wiązania (K_B), stechiometrii reakcji (n), entalpii (ΔH) i entropii (ΔS), tym samym dając pełny, termodynamiczny profil reakcji molekularnej w jednym eksperymencie. Wielką zaletą metody ITC jest bezpośredni

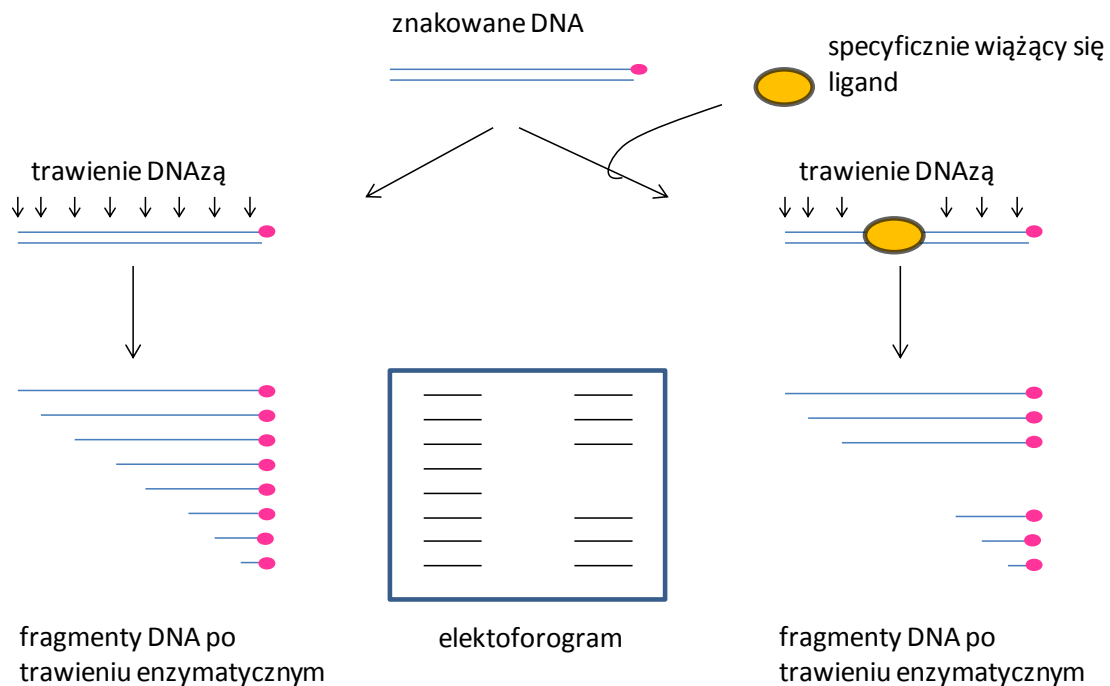
miar zmian entalpii reakcji, w porównaniu z metodami pośrednimi (np. metodami spektroskopowymi), w których oszacowanie entalpii reakcji jest możliwe tylko na podstawie równań van't Hoffa. Dodatkowo, zmiany w pojemności cieplnej układu mogą być w tej technice otrzymane dzięki pomiarom zmiany entalpii w szerokim zakresie temperatur. Miareczkowanie z zastosowaniem metody ITC wykorzystuje się również do badania kinetyki oddziaływań makrocząsteczek [71,72]. Obecnie technika ITC znajduje coraz szersze zastosowanie, ze względu na prostotę jej wykonania oraz dokładność uzyskiwanych wyników [73,74].

Druga metoda, DCS, jest nieoceniona dla określenia stabilności termicznej systemów biologicznych. DSC bezpośrednio mierzy zmiany ciepła, które występują w układzie podczas kontrolowanego wzrostu lub spadku temperatury. DNA w roztworze znajduje się w równowadze pomiędzy stanem natywnym i zdenaturowanym. Położenie tej równowagi ulega gwałtownej zmianie w temperaturze zwanej temperaturą przejścia (T_M). Im wyższa T_M tym stabilniejsza jest struktura cząsteczki. Oprócz informacji o temperaturze przejść metoda ta wnosi użyteczne informacje o zmianach pojemności cieplnej, wykrywanych, gdy próbka jest skanowana w szerokim zakresie temperatur. Dodatkowo na podstawie profili cieplnych możliwe jest badanie odwracalności reakcji [75,76] oraz oszacowanie czynników odpowiedzialnych za siły napędowe reakcji (w tym oddziaływania hydrofobowe, wiązania wodorowe, entropia konformacyjna czy środowisko fizyczne) [50,77].

II.2.1.5. Footprinting

Eksperymenty typu „odcisku stopy” [78,79] (ang. *foot printing*) od wielu lat są uważane za skuteczne narzędzia do badania wiązania związków do podwójnej helisy DNA. Po raz pierwszy metoda ta została użyta do badania interakcji między białkami i DNA, a od tego czasu wykorzystywana jest do identyfikacji specyficznej sekwencji oddziaływania wielu ligandów z DNA [80]. W metodzie tej używa się fragmentów DNA o określonej długości (zwykle od kilkudziesięciu do kilkuset par zasad) znakowanych na jednym z końców (Ryc. 14). Znacznikiem może być izotop promieniotwórczy lub fluorochrom. Roztwór DNA dzieli się na dwie części i jedną z nich inkubuje z ligandem. Następnie obydwie próbki poddaje się trawieniu endonukleazą, np. DNAzą I. Warunki trawienia dobiera się tak, aby średnio na każdą cząsteczkę DNA przypadało tylko jedno cięcie. Uzyskane mieszaniny fragmentów DNA rozdziela się elektroforetycznie w żelu

poliakrylamidowym, stosując odpowiednie warunki rozdzielania pozwalające na rozróżnienie fragmentów DNA różniących się między sobą długością o jeden nukleotyd.



Rycina 14. Schemat analizy oddziaływania ligandu z DNA za pomocą metody footprinting.

Na elektroforogramie próbki bez ligandu obserwuje się charakterystyczną „drabinkę” prążków odpowiadających poszczególnym fragmentom częściowo zdegradowanego DNA (każdy fragment różniący się długością o jeden nukleotyd od następnego). Jeżeli ligand tworzy stabilny kompleks z DNA to w obszarze kompleksowania utrudnione lub niemożliwe jest trawienie enzymatyczne i na elektroforogramie nie będzie prążków odpowiadających rejonowi DNA, z którym połączył się dany ligand. Jest to tak zwany "odcisk stopy", który wskazuje z jaką sekwencją DNA oddziałuje badany ligand [81, 82]. Doświadczenia wykorzystujące footprinting są bardzo przydatne przy badaniu nowych związków oraz ich powinowactwa do określonych sekwencji w DNA.

II.2.2. Metody pozwalające określić rodzaj wiązania się ligandu do DNA

II.2.2.1. Metody wiskozymetryczne

Podczas wiązania się ligandu z DNA dochodzić może do zaburzeń w strukturze podwójnej helisy. Powoduje to zmiany właściwości hydrodynamicznych cząsteczki kwasu.

Interkalatory wiążące się między pary zasad w helisie DNA powodują względne wydłużenie cząsteczki DNA, co prowadzi do wzrostu lepkości roztworu. Pomiar lepkości jest więc jedną z bezpośrednich metod umożliwiających wykrycie takich zmian, a w przypadku braku krystalograficznych danych strukturalnych, jest to niezbędny dowód na poparcie modelu interkalacji [83,84]. W przeciwieństwie do interkalatorów, związki wiążące się kowalencyjnie do DNA powodując zaginanie się helisy, zmniejszają jej długość jak również lepkość roztworów. Związki wiążące się w małym rowku nie wpływają na strukturę DNA, przez co nie zmieniają lepkości badanego roztworu.

II.2.2.2. Wypieranie znacznika z DNA

Wypieranie znacznika fluorescencyjnego z DNA (ang. *Fluorescent Intercalator Displacement* - FID) [85,86] jest wygodnym i praktycznym narzędziem do identyfikacji ligandów interkalujących do DNA i określenia ich względnego powinowactwa. W metodzie tej wykorzystuje się znacznik fluorescencyjny, który wykazuje silną fluorescencję dopiero po interkalacji do DNA. Gdy dodamy do roztworu badany ligand, również interkalujący pomiędzy pary zasad, to będzie on wypierał znacznik do roztworu, w efekcie czego nastąpi spadek fluorescencji. Miareczkując kompleks DNA-znacznik ligandem możemy wyznaczyć stężenie c_{50} , przy którym zmniejsza się intensywność fluorescencji o połowę w stosunku do wartości początkowej. Znając stałą wiązania znacznika, jego stężenie oraz wartość c_{50} możemy wyznaczyć stałą wiązania liganda. Jako znacznika w tej metodzie zwykle używa się bromku etydyny, który jest jednym z najlepiej poznanych interkalatorów [87]. Związki wiążące się w małym rowku DNA nie wypierają znaczników interkalujących, więc nie obserwujemy zmian fluorescencji.

II.2.2.3. Dichroizm kołowy i liniowy

Dichroizm kołowy (ang. *Circular Dichroism*, CD) jest definiowany jako różnica w absorpcji światła spolaryzowanego kołowo w lewo i w prawo (równanie 1),

$$CD = \epsilon_L - \epsilon_R \quad (1)$$

gdzie: ϵ_l i ϵ_r to współczynniki ekstynkcji molowej odpowiednio dla światła spolaryzowanego kołowo w lewo i w prawo

Dla przejścia dozwolonego (np. $\pi \rightarrow \pi^*$) kształt widma CD jest bardzo zbliżony do kształtu widma absorpcji (tzw. efekt Cottona).

Efekt ten występuje w paśmie absorpcyjnym asymetrycznie zaburzonego chromoforu. Zjawisko dichroizmu kołowego jest skutkiem zaburzenia symetrii chromoforu. Zaburzenia symetrii chromoforu mogą wynikać z:

- obecności chiralnego układu znajdującego się w sąsiedztwie achiralnego chromoforu (asymetrii wewnętrznej),
- asymetrycznego rozmieszczenia symetrycznych chromoforów w strukturze biopolimeru lub w kompleksie,
- zaburzenia symetrii chromoforu ligandu pod wpływem oddziaływania asymetrycznych fragmentów biopolimerów (asymetria indukowana).

Przykładem asymetrii indukowanej może być występowanie efektu Cottona w widmach długich cząsteczek polimetylenofenoli, które oddziałują z małym rowkiem w podwójnej helisie B-DNA. Cząsteczka liganda wpasowuje się w mały rowek przyjmując przy tym kształt linii śrubowej. Wywołuje to silne asymetryczne zaburzenie chromoforów tworzących szkielet cząsteczki.

Technika CD jest wyjątkowo wrażliwa na wszelkie spiralne lub chiralne postaci w strukturze elektronowej molekuł, dlatego okazała się bardzo przydatną techniką analityczną do ustalania konformacji podwójnej helisy i do śledzenia jej zmian wynikających z oddziaływań z ligandem.

Stosując CD możemy uzyskać informacje o strukturze, kinetyce, termodynamice i zmianach konformacyjnych [88] badanych makrocząsteczek [89,90,91]. Jeśli w trakcie badania oddziaływania chiralnego związku dochodzi do indukowanej zmiany geometrii chromoforu (np. układu się on helikoidalnie wzdłuż małego rowka DNA), to w widmie CD kompleksu obserwuje się nowy, silny dublet ekscytacyjny w obszarze odpowiadającym widmu absorpcyjnemu liganda [92].

Metodą dostarczającą informacji o orientacji liganda w kompleksie jest dichroizm liniowy (ang. *Linear Dichroism*, LD). Wykorzystuje on różnicę w absorpcji światła spolaryzowanego liniowo w kierunku równoległym i prostopadłym do wyróżnionej osi cząsteczki. Dla wystąpienia zjawiska dichroizmu liniowego (w odróżnieniu od dichroizmu kołowego) nie jest niezbędne chiralne zaburzenie chromoforu. Niezbędna jest za to makroskopowa orientacja cząsteczek w obrębie całej próbki. Jeśli poddamy roztwór kompleksu działaniu sił orientujących to otrzymamy informacje o orientacji liganda względem osi długiej cząsteczki. W kompleksach interkalacyjnych ligand ułożony jest prostopadle do osi helisy, a w przypadku kompleksowania w małym rowku prawie równoległe [93]. Do badania kompleksów z DNA wykorzystywany jest w tym celu

przepływ laminarny, głównie technika FLD (ang. *Flow-oriented Linear Dichroism*), lub silne zewnętrzne pole elektryczne, technika ELD (ang. *Electric Linear Dichroism*).

II.2.3. Metody pozwalające określić strukturę powstającego kompleksu ligand/DNA

Jednymi z najbardziej popularnych metod pozwalających na wyznaczenie struktury kompleksów są analiza dyfrakcyjna monokryształu oraz techniki magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) [94]. Są to metody wymagające dużych nakładów pracy oraz dużych nakładów finansowych, jednak pozwalają bezpośrednio potwierdzić wnioski wyciągane z wcześniej zastosowanych metod.

II.2.3.1. Analiza dyfrakcyjna monokryształu

Ponad pięćdziesiąt lat temu na podstawie zdjęć rentgenowskich DNA wykonanych przez młodą doktor Rosalindę Franklin, Watson i Crick określili strukturę podwójnej helisy DNA, za co w 1962 roku otrzymali Nagrodę Nobla. Wydarzenie to uważane jest dzisiaj za przełomowy moment w rozwoju biologii molekularnej i genetyki.

Do określenia struktury trójwymiarowej (3D) kompleksów ligand-DNA za pomocą analizy dyfrakcyjnej konieczna jest forma krystaliczna badanych kompleksów. Jest to duża wada tej metody, ponieważ już samo otrzymanie monokryształów nie jest proste [95]. Na strukturę kompleksu w kryształach może mieć wpływ tzw. energia sieci krystalicznej, a struktura tego samego kompleksu w roztworze może być inna. Ponadto do uzyskania monokryształów nadających się do zastosowania krystalografii, wykorzystuje się zwykle krótkie oligonukleotydy, które dużo łatwiej mogą ulegać zmianom konformacyjnym i dopasowywać się do ligandu w porównaniu z dłuższymi łańcuchami DNA.

Stosując analizę dyfrakcyjną z wykorzystaniem promieni X otrzymujemy jedynie przybliżoną informację o położeniu atomów „ciężkich” – węgla, tlenu, azotu. Położenie atomów wodoru można jedynie odgadnąć. Do udokładnienia struktury stosuje się dodatkowo techniki modelowania molekularnego, w szczególności mechanikę molekularną (p. II. 2.3.3)

II.2.3.2. Magnetyczny rezonans jądrowy

W porównaniu z analizą dyfrakcyjną techniki NMR mają tę zaletę, że pozwalają uzyskać informacje o strukturze kompleksu w roztworze, czyli w warunkach zbliżonych do

panujących w komórce. Ponieważ roztwór najbardziej przypomina naturalne środowisko DNA oraz ligandu NMR jest najczęstszą metodą bezpośredniego badania oddziaływania ligand/DNA [96,97,98].

Wszystkie cząstki elementarne, które budują świat atomów posiadają własność określaną mianem spin. Spektroskopia NMR polega na wzbudzaniu spinów jądrowych atomów, które znajdują się w zewnętrznym polu magnetycznym, poprzez szybkie zmiany pola magnetycznego i następnie rejestrację powstającego na skutek relaksacji pola elektromagnetycznego. Relaksacja jest to powrót układu spinów jądrowych do stanu równowagi termodynamicznej [99]. Każde magnetycznie aktywne jądro charakteryzuje się różnymi parametrami, takimi jak: przesunięcia chemiczne (pozycja lub częstotliwości linii widmowej), multipletowość (stopniem degeneracji badanego układu), sprzężenie pomiędzy dwoma spinami jądrowymi, czy relaksacja, które mogą być wykorzystywane w celu uzyskania szczegółowych informacji na temat struktury badanej cząsteczki. Wartości przesunięć chemicznych w klasycznych jednowymiarowych widmach NMR zależne są od wartości lokalnych pól magnetycznych otaczających dane jądro. Zmiana tych pól, np. na skutek powstania kompleksu, prowadzi do zmiany przesunięć chemicznych. Jednak w przypadku widm kwasów nukleinowych i ich kompleksów duża liczba sygnałów, które położone są blisko siebie, skutecznie uniemożliwia dostatecznie precyzyjne wychwycenie zmian. Dlatego NMR jest ograniczona do cząsteczek o masie cząsteczkowej mniejszej niż 35kDa. Ponadto pewnym utrudnieniem przy interpretacji danych uzyskanych technikami magnetycznego rezonansu jądrowego, jest fakt, że są to dane uśrednione po wszystkich typach kompleksów występujących w badanym roztworze. Dlatego też najbardziej wiarygodne wyniki uzyskuje się tą metodą dla ligandów tworzących kompleksy o bardzo dużej stałej wiązania.

W porównaniu do jednowymiarowych widm NMR, dużo większe zastosowanie do badania struktury kompleksów mają specjalne techniki rejestracji i obróbki widm NMR, takie jak technika 2D NOESY (ang. *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) i COSY (ang. *Correlation Spectroscopy*) [100]. Dwuwymiarowe widma NOESY pozwalają na otrzymanie sygnałów odpowiadających protonom, których odległość w przestrzeni jest mniejsza niż ok. 0,3 nm. Natomiast z widm typu COSY otrzymuje się informacje o wartościach kątów torsyjnych określonych wiązań. Uzyskane informacje nie pozwalają zwykle na bezpośrednie ustalenie struktury kompleksu 3D. Używa się ich jako tzw. więzów w modelowaniu molekularnym (p. II. 2.3.3.) [101,102,103].

II.2.3.3. Modelowanie molekularne

W ostatnim czasie, w dobie dużej dostępności szybkiego i stosunkowo niedrogiego sprzętu komputerowego, nastąpiły postępy w rozwoju nowych modeli matematycznych opisujących zjawiska chemiczne, głównie oddziaływania występujące między atomami oraz cząsteczkami. Narzędzia te są z powodzeniem wykorzystywane w połączeniu z tradycyjnymi technikami badawczymi do badania właściwości strukturalnych istniejących związków oraz do przewidywania właściwości i działania nowych cząsteczek. Modelowanie molekularne (ang. *Molecular Modeling*) jest bardzo użytecznym narzędziem w zrozumieniu mechanizmów wiązania się ligandów do biopolimerów oraz przy projektowaniu nowych związków [104,105].

Istnieją trzy podstawowe techniki modelowania molekularnego:

- mechanika molekularna
- dynamika molekularna
- metody statystyczne typu Monte Carlo

Mechanika molekularna

Stosując mechanikę molekularną (ang. *Molecular Mechanics, MM*) poszukuje się geometrii układu o najniższej energii. Zgodnie z zasadami termodynamiki statystycznej stan o najniższej energii jest stanem najbardziej prawdopodobnym [106,107]. W mechanice molekularnej energię układu wyznaczyć można korzystając z różnych metod:

- metoda *ab initio* – w metodzie tej funkcja falowa układu jest kombinacją liniową funkcji falowych bazy orbitali elektronowych. Metoda ta wymaga dużych nakładów obliczeniowych jednak uznawana jest za jedną z najdokładniejszych i najbardziej uniwersalnych [108].
- metody półempiryczne – są to również metody kwantowo-chemiczne, jednak część parametrów nie pochodzi z obliczeń lecz z uśrednionych danych eksperymentalnych
- metody empiryczne – w przeciwieństwie do dwóch powyższych metod jest to ujęcie klasyczne (nie kwantowe). Metody te wymagają dużo mniejszego nakładu czasu obliczeniowego, jednak niezbędna jest szczegółowa parametryzacja dla danej klasy związków chemicznych.

Znalezienie minimum globalnego energii dużego układu jest trudne ze względu na występowanie licznych minimów lokalnych. Dużą pomocą są dane empiryczne np. z metod dyfrakcyjnych (gdzie startuje się z geometrii układu bliskiej minimum globalnemu) lub NMR (geometria układu musi respektować tzw. więzy, np. wartości kątów torsyjnych niektórych wiązań lub odległości niektórych atomów).

Dynamika molekularna

W zastosowaniach dynamiki molekularnej atomy układu traktowane są jako punkty materialne podlegające klasycznej dynamice Newtona (2). Natomiast wiązania chemiczne i oddziaływania fizykochemiczne traktowane są jako źródła sił działających na poszczególne punkty materialne.

$$\vec{F}_i = m_i \frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2} \quad (2)$$

gdzie: m_i jest masą atomu, $a_i = d^2 r_i / dt^2$ jest jego przyspieszeniem, F_i jest siłą działającą na niego, zależną od oddziaływań z innymi atomami.

Obliczenia w dynamice molekularnej sprowadzają się do numerycznego rozwiązania układu równań (2) dla wszystkich atomów układu. W efekcie uzyskuje się tzw. trajektorię układu, czyli zestaw uporządkowanych w czasie geometrii układu. Przy odpowiednio długim czasie symulacji uzyskuje się reprezentatywny zestaw geometrii jakie przyjmować może układ w zadanych warunkach brzegowych (np. temperatura i ciśnienie). Częstość występowania poszczególnych geometrii związana jest z ich energią równaniem (3).

$$N_j = N_i e^{\frac{-\Delta E}{RT}} \quad (3)$$

gdzie $\Delta E = E_j - E_i$,

R – stała gazowa (8,314 J/molK),

N_i i N_j , ilość cząsteczek o energii odpowiednio E_i i E_j .

Metody Monte Carlo

Metody Monte Carlo generują zestaw reprezentatywnych geometrii układu o energiach zgodnych z rozkładem Boltzmann'a (3). Energia układu obliczana może być metodami analogicznymi jak w MM [109,110]. Ze względu na dużą liczbę generowanych geometrii rzadko używa się metody *ab initio*. W odróżnieniu od zestawu otrzymanego

z symulacji dynamicznych pomiędzy poszczególnymi geometriami nie ma następstwa czasowego. Z zestawu takiego nie można wyciągać wniosków o przemianach konformacyjnych, a jedynie o prawdopodobieństwie (energii) poszczególnych stanów.

Istnieje szereg publikacji opisujących modelowanie molekularne, w których można znaleźć próby analizy oddziaływań związków małowcząsteczkowych z fragmentami kwasów nukleinowych [111,112,113] oraz oszacowania energii tych oddziaływań [114]. Åqvist w 1994 roku przedstawił jedną z metod oszacowania zmian entalpii swobodnej ΔG_w związanej z powstawaniem kompleksu. Wartość ΔG_w oblicza się na podstawie uśrednionych energii oddziaływań elektrostatycznych i van der Waalsa liganda z otoczeniem wykorzystując przy tym dynamikę molekularną [115]. Podejście to jest stosunkowo proste i szybkie. Metoda ta pozwala wyznaczyć niezbędne wielkości do oszacowania zmiany entalpii swobodnej na podstawie dwóch symulacji dynamicznych [116,117]. Wzór na oszacowaną wartość zmiany entalpii swobodnej (4) przedstawiony został poniżej;

$$\Delta G_w = \Delta G_w^{el} + \Delta G_w^{vdw} \cong \alpha \left(\langle V_{l-s:zw.}^{el} \rangle - \langle V_{l-s:sw.}^{el} \rangle \right) + \beta \left(\langle V_{l-s:zw.}^{vdw} \rangle - \langle V_{l-s:sw.}^{vdw} \rangle \right) \quad (4)$$

gdzie: $\langle V_{l-s:zw.}^{el} \rangle$ uśrednione oddziaływania elektrostatyczne związanego liganda z otoczeniem,

$\langle V_{l-s:sw.}^{el} \rangle$ uśrednione oddziaływania elektrostatyczne niezwiązanego (swobodnego) liganda z otoczeniem,

$\langle V_{l-s:zw.}^{vdw} \rangle$ uśrednione oddziaływania van der Waalsa związanego liganda z otoczeniem,

$\langle V_{l-s:sw.}^{vdw} \rangle$ uśrednione oddziaływania van der Waalsa swobodnego liganda z otoczeniem,

$$\alpha = 0,5,$$

$\beta = 0,161$ (wartość została skalibrowana na serii inhibitorów o znanej stałej wiązania).

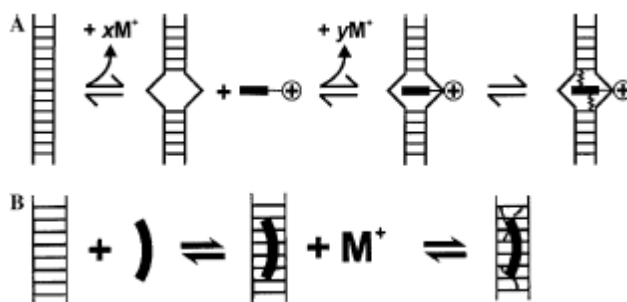
Zastosowanie metod modelowania molekularnego ułatwia zrozumienie struktury, dynamiki oraz mechanizmu działania związków, interpretację zależności aktywności czy właściwości związków od ich struktury, jak również pozwala na projektowanie związków o potencjalnie pożądanymi właściwościami. Modelowanie molekularne pozwala na opis takich procesów jak związanie się białek i ich stabilność, katalizę enzymatyczną

[118,119], zmiany konformacji związane z aktywnością biologiczną, rozpoznawanie molekularne, strukturę DNA czy kompleksów membranowych. Techniki numeryczne nie zastępują jednak całkowicie badań eksperymentalnych, a jedynie mogą być ich uzupełnieniem.

II.3. Termodynamika tworzenia kompleksów ligand/DNA

Wraz ze wzrostem dostępności czułych mikrokalorymetrów wzrosło zainteresowanie termodynamiką procesów zachodzących podczas oddziaływania ligandu z DNA [53,120]. Termodynamika stanowi istotne uzupełnienie badań strukturalnych, które wykorzystane same, nie są w stanie określić rodzaju oddziaływań odpowiedzialnych za tworzenie kompleksów. Początkowe, przybliżone próby analizy ciepła oddziaływania ligand/DNA dały zaskakujący wynik [67,121]. Badania te wykazały, że procesowi tworzenia kompleksu, zarówno związków wiążących się w małym rowku [67] jak i interkalatorów [121] towarzyszy istotny spadek pojemności cieplnej układu, co sugeruje, że siłami napędowymi tego procesu są oddziaływania hydrofobowe [122].

Schemat wiązania w małym rowku oraz interkalacji można porównać do modeli klucza i zamka (ang. *lock-and-key*) oraz indukowanego dopasowania (ang. *induced-fit*) wiązania enzym-substrat. Na Ryc. 15 przedstawiono model mechanizmu interkalacji oraz wiązania w małym rowku. Interkalacja (Ryc. 15A) wymaga utworzenia w helisie niszy interkalacyjnej. Wiąże się to z lokalną zmianą kąta skręcenia helisy. Po wnikięciu liganda do niszy interkalacyjnej dochodzi do jego zakotwiczenia przez oddziaływania Van der Waalsa i oddziaływania π -elektronowe.



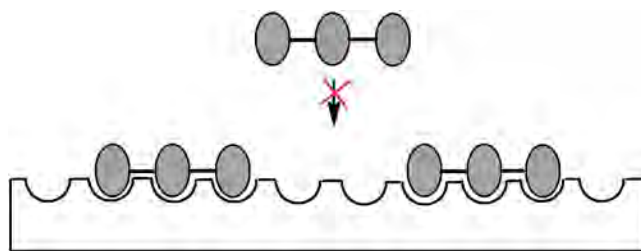
Rycina 15. Schemat mechanizmu interkalacji (A), oraz wiązania się w małym rowku (B), M^+ - kation uczestniczący w tworzeniu elektrycznej warstwy podwójnej wokół polianionu DNA [123]

W przeciwieństwie do interkalacji, do oddziaływania w małym rowku nie jest wymagana zmiana konformacji DNA (Ryc. 15B). „Półksiężycowy” kształt liganda pasuje

do krzywizny małego rowka DNA, dzięki czemu ligand może oddziaływać z DNA. Oba typy ligandów są zwykle związkami naładowanymi dodatnio. W rezultacie, utworzenie obu typów kompleksów powoduje uwolnienie części kationów tworzących elektryczną warstwę podwójną wokół polianionu DNA. Właściwości tej warstwy podwójnej opisuje teoria polielektrolitu zaproponowana przez Manninga i Recorda [120]. Uwolnienie jonów z elektrycznej warstwy podwójnej wnosi korzystny efekt entropowy do zmiany entalpii swobodnej wiązania liganda. Wielkość tego efektu zależy od ładunku liganda i stężenia soli w buforze [124,125].

II.3.1. Model oddziaływania ligand-DNA [1]

Zaproponowano szereg modeli opisujących oddziaływania małowymiarowych ligandów z DNA. Najczęściej stosowanymi są modele z wykluczonym sąsiedztwem (ang. *neighbor exclusion models*), w których podwójna helisa DNA traktowana jest jako nieskończenie długa, jednowymiarowa matryca. Jednostką matrycy jest w tym modelu pojedyncza para zasad. Ligand może oddziaływać z więcej niż jedną jednostką matrycy i nie ma on dostępu do miejsc wiązania tworzących ciągi krótsze niż liczba zajmowanych miejsc. Liczba dostępnych miejsc maleje więc nieliniowo wraz ze wzrostem stopnia obsadzenia matrycy. Schematycznie zostało to przedstawione na Ryc. 16.



Rycina 16. Schemat oddziaływania liganda z matrycą w modelach z wykluczonym sąsiedztwem

Najszerze zastosowanie wśród modeli tego typu znalazł model zaproponowany w 1974 przez McGhee i von Hippel [54]. Znane są dwie wersje tego modelu. W wersji prostszej nie uwzględnia się oddziaływań pomiędzy stykającymi się ligandami i wówczas równanie wyprowadzone przez McGhee i von Hippel ma postać:

$$\frac{\nu}{L} = K(1 - n\nu) \left(\frac{1 - n\nu}{1 - (n-1)\nu} \right)^{n-1} \quad (5)$$

gdzie:

L – molowe stężenie wolnego liganda, ν – gęstość wiązania, czyli średnia liczba cząsteczek liganda związana przez jednostkę matrycy ($\nu=B/D$, B – stężenie molowe związanego liganda, D – ogólne molowe stężenie jednostek matrycy), K – wewnętrzna stała wiązania, n – wielkość miejsca wiązania (ilość jednostek matrycy wyeliminowanych jako potencjalne miejsca wiązania, wyrażona w parach zasad).

W bardziej rozwiniętej wersji tego modelu bierze się dodatkowo pod uwagę możliwość oddziaływania pomiędzy sąsiadującymi ze sobą ligandami. Parametrem opisującym takie oddziaływania jest parametr kooperatywności ω . Równanie wyprowadzone dla oddziaływań z uwzględnieniem kooperatywności ma postać:

$$\frac{\nu}{L} = K(1-n\nu) \left(\frac{(2\omega-1)(1-n\nu)+\nu-R}{2(\omega-1)(1-n\nu)} \right)^{n-1} \left(\frac{1-(n+1)\nu+R}{2(1-n\nu)} \right)^2 \quad (6)$$

$$R = \sqrt{(1-(n+1)\nu)^2 + 4\omega\nu(1-n\nu)}$$

Jeżeli $\omega > 1$ to mamy do czynienia z wiązaniem kooperatywnym, czyli obecność związanego liganda sprzyja przyłączeniu w jego najbliższym sąsiedztwie kolejnego liganda. Jeżeli $\omega < 1$ jest to wiązanie antykooperatywne: obecność związanego liganda przeszkadza związaniu kolejnego liganda w ciągu. Jeżeli $\omega = 1$ wiązanie jest niekooperatywne, czyli ligand wiąże się z taką samą stałą do wszystkich typów miejsc wiązania. Dla tego typu oddziaływań równanie (6) upraszcza się do równania (5).

Model McGhee-von Hippel nie zawsze daje się zastosować w praktyce, zdarzają się bowiem układy wyraźnie odbiegające od przyjętych założeń. Najczęściej jest to wynikiem:

- dużych różnic w powinowactwie do różnych sekwencji zasad – więcej niż jedna stała wiązania,
- różnic w stechiometrii wiązania – więcej niż jedna wartość n ,
- oddziaływania ligandu nie tylko z najbliższymi ligandami – więcej niż jedna wartość ω .

II.3.2. Parametry termodynamiczne oddziaływań ligand-DNA

Wyznaczenie parametrów termodynamicznych procesu tworzenia kompleksów ligand-DNA pozwala określić jakie czynniki decydują o powinowactwie i sile napędowej kompleksowania.

Do najczęściej eksperymentalnie wyznaczanych parametrów termodynamicznych należą:

K – wewnętrzna stała wiązania

ΔH – zmiana entalpii

Wyznaczone eksperymentalnie wartości stałej wiązania oraz zmiany entalpii oddziaływań wykorzystuje się do obliczenia zmian standardowej entalpii swobodnej układu oraz entropii układu, zgodnie z wzorem:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (7)$$

Dodatkowo, dzięki pomiarom zmiany entalpii w różnych temperaturach można wyznaczyć zmiany w pojemności cieplnej układu zgodnie z równaniem [126]:

$$\Delta C_p = \frac{d(\Delta H^0)}{dT} = \frac{\Delta H^0_{T_2} - \Delta H^0_{T_1}}{(T_2 - T_1)} \quad (8)$$

Związanie dodatnio naładowanego liganda z DNA prowadzi do uwolnienia jednego lub więcej kationów z elektrycznej warstwy podwójnej. Oznacza to, że tworzenie kompleksu ligand/DNA oraz skład elektrycznej warstwy podwójnej wokół DNA są powiązane termodynamicznie. Przejawia się to w zależności stałej wiązania K od siły jonowej buforu [120]. Obserwowaną zmianę entalpii swobodnej, ΔG_{obs} , można więc podzielić na zmianę entalpii swobodnej oddziaływań elektrostatycznych ΔG_{pe} , oraz zmianę entalpii swobodnej oddziaływań pozaelektrostatycznych (oddziaływania hydrofobowe, oddziaływania van der Waalsa, π -elektronowe, itd.), ΔG_t :

$$\Delta G_{obs} = \Delta G_{pe} + \Delta G_t \quad (9)$$

Wartość ΔG_{pe} można wyznaczyć korzystając z liniowej zależności logarytmu naturalnego ze stałej wiązania K od logarytmu naturalnego ze stężenia soli, $[MX]$. Nachylenia tej zależności jest dane wzorem:

$$SK = \frac{\delta \ln K}{\delta \ln [MX]} = -Z\Psi \quad (10)$$

gdzie: Z – ładunek liganda, Ψ – współczynnik proporcjonalny do liczby przeciwjonów grup fosforanowych cząsteczki DNA (współczynnik ten jest równy 0,88 dla B-DNA).

Entalpia swobodna oddziaływań elektrostatycznych może być wówczas obliczona zgodnie z zależnością:

$$\Delta G_{pe} = (SK)RT \ln[MX] \quad (11)$$

Wspomnianą już zmianę entalpii swobodną oddziaływań pozaelektrostatycznych, ΔG_t , można z kolei podzielić na 4 człony:

- zmianę entalpii swobodnej konformacyjnych przekształceń DNA i liganda, ΔG_{konf} ,
- zmianę entalpii swobodnej wynikającą z utraty swobody rotacji i translacji podczas kompleksowania, ΔG_{r+t} ,
- zmianę entalpii swobodnej oddziaływań hydrofobowych związaną z przejściem ligandu z roztworu do DNA, ΔG_{hyd} , oraz
- zmianę entalpii swobodnej słabych oddziaływań niekowalencyjnych (oddziaływań van der Wasala, interakcji dipol-dipol, itd.), ΔG_{mol} [127].

$$\Delta G_{obs} = \Delta G_{pe} + \Delta G_{konf} + \Delta G_{r+t} + \Delta G_{hyd} + \Delta G_{mol} \quad (12)$$

Każdy z członów składających się na całkowitą zmianę entalpii swobodnej, zgodnie z równaniem (12), można wyznaczyć teoretycznie bądź eksperymentalnie. Co najmniej dwa człony przyjmują zawsze wartości dodatnie (ΔG_{r+t} , ΔG_{konf}), zatem aby doszło do utworzenia kompleksu pozostałe człony muszą posiadać na tyle dużą wartość ujemną, aby całkowita zmiana entalpii swobodnej była mniejsza od zera. Wykazano, iż dla większości interkalatorów oraz związków wiążących się z DNA w małym rowku, członem promującym tworzenie kompleksu ligand-DNA jest człon opisujący oddziaływania hydrofobowe, ΔG_{hyd} (13). Uzyskano empiryczną zależność pozwalającą oszacować wartość ΔG_{hyd} dysponując wartością pojemności cieplnej [128]:

$$\Delta G_{hyd} = (80 \pm 10) \Delta C_p \quad (13)$$

Znajomość wszystkich członów składających się na całkowitą zmianę entalpii swobodnej pozwala ocenić, który fragment struktury związku odpowiada za jego zdolność do oddziaływania z DNA, a co za tym idzie za jego aktywność biologiczną. Taka informacja może być użyteczna dla racjonalnego projektowania nowych leków [129].

II.4. Agregacja związków organicznych w roztworach wodnych

Zjawisko agregacji jest to proces tworzenia się zorganizowanych struktur przestrzennych o różnych rozmiarach z pojedynczych cząsteczek. Agregacja jest zwykle wynikiem oddziaływań zachodzących pomiędzy składnikami układu takich jak:

- siły van der Waalsa,
- wiązania wodorowe,
- oddziaływania elektrostatyczne,
- oddziaływania typu π - π ,

oraz pochodnych tych oddziaływań.

Samoistna asocjacja związków organicznych jest bardzo ważnym zjawiskiem obserwowanym w różnych zagadnieniach chemicznych i fizykochemicznych, takich jak: znakowanie materiału biologicznego, chemia fotografii [130,131,132] oraz w przypadku cząsteczek o znaczeniu biologicznym takich jak cząsteczki leków [133]. Jest to również jeden z podstawowych modeli wielu różnorodnych procesów molekularnych takich jak: tworzenie form micelarnych przez związki amfifilowe, oraz wiązanie się małych cząsteczek z makromolekułami. Przykładowo zjawisko wiązania kooperatywnego obserwowane w systemach amfifilowych oraz białkach, jest zapoczątkowywane przez asocjację wiążących się do makromolekuły ligandów [134,135,136,137]. Aktualnie prowadzi się bardzo dużo badań związanych z samoagregacją związków. Zwłaszcza opis termodynamiczny oraz kinetyczny reakcji agregacji jest bardzo cenny w zrozumieniu oddziaływań jakie zachodzą pomiędzy molekułami. Opis taki umożliwia również opracowanie mechanizmu procesu samoasocjacji.

Jedną z technik, która umożliwia wyznaczenie parametrów termodynamicznych reakcji (np. stałej agregacji) jest spektrofotometria absorpcyjna, jeżeli widma absorpcyjne monomeru i dimeru różnią się. W takim przypadku dla większości długości fal nie jest spełnione prawo Lamberta-Beera, a zależność pomiędzy absorbancją a stężeniem całkowitym badanego związku przyjmuje formę nieliniową. Widma substancji ulegających dimeryzacji lub tworzących większe asocjaty przedstawione w skali ekstynkcji molowej stają się zależne od stężenia. Ze wzrostem stężenia badanej substancji zazwyczaj zmienia się wysokość maksimum absorpcji (występuje efekt hypochromowy, czyli obniżenie maksimum widma) oraz ulega ono przesunięciu w kierunku fal dłuższych (efekt bathochromowy) lub krótszych (efekt hipsochromowy). Wyznaczenie całkowitego stężenia

substancji na podstawie pomiarów spektrofotometrycznych jest wtedy możliwe jedynie w punktach izosbestycznych.

Samoistna agregacja związków może stanowić istotny problem w interpretacji wyników oddziaływania ligandu z DNA. Podczas śledzenia oddziaływania ligand/DNA mamy zwykle do czynienia z układem monomer-DNA. Jeśli cząsteczki związku agregują, w roztworze pojawiają się ich dodatkowe formy, a tym samym dochodzi do wzrostu komplikacji badanego układu : monomer-agregat (dimer, trimer, tetramer,..., agregat) - DNA. Dodatkowo agregacja ma wpływ na efektywne stężenie wolnego ligandu w roztworze (wielkość L we wzorach (5) i (6)). Przy badaniu oddziaływania agregującego ligandu z DNA metodami spektroskopowymi, w otrzymanym widmie obserwuje się dodatkową formę spektralną, która powoduje komplikacje w interpretacji wyników. Inną metodą stosowaną do śledzenia oddziaływań ligand/DNA jest izotermiczna kalorymetria miareczkująca ITC. W metodzie tej stężenie ligandu w strzykawce może być na tyle wysokie, że niektóre związki mogą występować w formie zagregowanej. Podczas takiego miareczkowania oprócz tradycyjnego egzotermicznego oddziaływania związku z DNA pojawia się dodatkowy efekt cieplny związany z endotermiczną deagregacją związku. W ramach eksperymentu mamy więc do czynienia z dwoma równoległe zachodzącymi procesami termicznymi, co może powodować niewłaściwą interpretację wyników. Dlatego, z wyżej wymienionych powodów konieczne staje się uwzględnienie procesu agregacji i deagregacji przy analizie wyników oddziaływania ligand/DNA.

Agregacja jest zazwyczaj procesem wieloetapowym, dlatego też opis matematyczny jest dosyć skomplikowany. Poniżej zostaną omówione typowe, uproszczone modele stosowane do opisu tego procesu.

II.4.1. Dimeryzacja

Najprostszym przykładem agregacji jest dimeryzacja.

Proces dimeryzacji można zapisać za pomocą następującego równania:



Na jego podstawie można zdefiniować stałą dimeryzacji K_D jako:

$$K_D = [D]/[M]^2 \quad (15)$$

Oznaczając odpowiednio przez C_m , C_d i C_t stężenie monomeru ($[M]$), stężenie dimeru ($[D]$) oraz stężenie całkowite związku, z bilansu liczby cząsteczek wynika, że:

$$C_t = C_m + 2C_d \quad (16)$$

Wówczas wzór (15) przyjmie postać:

$$K_D = \frac{C_t - C_m}{2C_m^2} \quad (17)$$

lub przy użyciu ułamka molowego monomeru (x_m):

$$K_D = \frac{1 - x_m}{2C_t x_m^2} \quad (18)$$

Są to równania kwadratowe ze względu na C_m lub x_m . Można je również zapisać w postaci [138]:

$$2K_D C_m^2 + C_m - C_t = 0 \quad \text{lub} \quad 2K_D C_t x_m^2 + x_m - 1 = 0 \quad (19)$$

Korzystając z prawa addytywności można przyjąć, że całkowita absorbancja roztworu (A_t) dla danej długości fali równa się sumie absorbancji poszczególnych składników roztworu, w tym wypadku monomeru (A_m) i dimeru (A_d) [139]:

$$A_t = A_m + A_d \quad (20)$$

Korzystając zaś z prawa Lamberta-Beera dla drogi optycznej równej 1 cm można przekształcić powyższy wzór do postaci:

$$\varepsilon_t C_t = \varepsilon_m C_m + \varepsilon_d C_d = \varepsilon_m C_m + \varepsilon_d (C_t - C_m) \quad (21)$$

$$\varepsilon_t = \varepsilon_m \frac{C_m}{C_t} + \varepsilon_d \left(\frac{C_t - C_m}{C_t} \right) = \varepsilon_m x_m + \varepsilon_d (1 - x_m) \quad (22)$$

gdzie dla określonej długości fali ε_t , ε_m , ε_d to współczynniki ekstynkcji molowej odpowiednio mierzonej próbki, monomeru i dimeru (w tym przypadku stężenie dimeru liczone jest w jednostkach monomeru).

Wyliczając C_m z równania (19) i wstawiając do równania (22) otrzymujemy:

$$\varepsilon_t = \varepsilon_m \frac{\sqrt{1 + 8K_D C_t} - 1}{4K_D C_t} + \varepsilon_d \left(1 - \frac{\sqrt{1 + 8K_D C_t} - 1}{4K_D C_t} \right) \quad (23)$$

Granice tego wyrażenia przy C_t dążącym do 0 (maksymalnie rozcieńczony roztwór, w którym występuje tylko monomer) oraz do ∞ (nieskończenie stężony roztwór, gdzie związek występuje tylko w formie dimeru) wynoszą odpowiednio ε_m oraz ε_d .

$$\lim_{C_t \rightarrow 0^+} \varepsilon_t(C_t) = \varepsilon_m \quad (24)$$

$$\lim_{C_t \rightarrow \infty} \varepsilon_t(C_t) = \varepsilon_d \quad (25)$$

Pozwala to wyznaczyć widmo monomeru przez ekstrapolację zależności $\varepsilon_t(C_t)$ do $C_t \rightarrow 0$

(przecięcie wykresu z osią Y) dla każdej długości fali. Nie jest jednak możliwe zastosowanie ekstrapolacji do wyliczenia widma dimeru, głównie dlatego, że nie wiadomo, czy w bardzo wysokich stężeniach nie zachodzą dalsze procesy agregacji.

Stałą dimeryzacji K_D można wyznaczyć różnymi sposobami. W pierwszym z nich, opracowanym przez Schwarza [140] i współpracowników, wykorzystuje się połączone wzory (17) i (22) przekształcone do postaci liniowej:

$$\sqrt{\frac{\varepsilon_m - \varepsilon_t}{C_t}} = \sqrt{\frac{2K_D}{|\varepsilon_m - \varepsilon_d|}}(|\varepsilon_m - \varepsilon_d|) - \sqrt{\frac{2K_D}{|\varepsilon_m - \varepsilon_d|}}(\varepsilon_m - \varepsilon_t) \quad (26)$$

Wykres zależności $\sqrt{\frac{\varepsilon_m - \varepsilon_t}{C_t}}$ od $(\varepsilon_m - \varepsilon_t)$ przecina oś poziomą w punkcie o wartości

$(\varepsilon_m - \varepsilon_d)$, zaś współczynnik nachylenia prostej równy jest $-\sqrt{\frac{2K_D}{|\varepsilon_m - \varepsilon_d|}}$. W metodzie tej

nie jest niezbędne wyznaczanie ani widma monomeru ani widma dimeru. Wartości K_d wyznaczone tą metodą będą obarczone najmniejszymi błędami dla tych długości fal, dla których istnieją największe różnice pomiędzy widmami absorpcyjnymi formy monomerycznej i zasocjowanej (wyrażone w skali ekstynkcji molowej).

Zgodnie z drugim sposobem [141], należy najpierw wyznaczyć ekstynkcję molową monomeru ε_m przez ekstrapolację zależności $\varepsilon_t = f(C_t)$ do $C_t = 0$. Wzór (23) można przekształcić do postaci pozwalającej na wyznaczenie współczynnika ekstynkcji molowej dimeru:

$$\varepsilon_d = \frac{\varepsilon_t - \varepsilon_m \frac{\sqrt{1 + 8K_D C_t} - 1}{4K_D C_t}}{1 - \frac{\sqrt{1 + 8K_D C_t} - 1}{4K_D C_t}} \quad (27)$$

Można teraz na drodze obliczeń numerycznych dobrać taką wartość K_D by suma kwadratów różnic SKR, pomiędzy wartością średnią $\bar{\varepsilon}_d$ i wartościami dla poszczególnych stężeń był jak najmniejsza.

$$SKR = \sum_{i=1}^n [\bar{\varepsilon}_d - \varepsilon_d(C_{ii})] \quad (28)$$

$\varepsilon_d(C_{ii})$ - współczynnik ekstynkcji molowej dimeru obliczony ze wzoru (27) dla i -tego stężenia C_{ii} , $\bar{\varepsilon}_d$ - średnia z wartości $\varepsilon_d(C_{ii})$.

Stała równowagi procesu dimeryzacji powiązana jest ze zmianą entalpii swobodnej reakcji, którą można określić wykorzystując równanie Gibasa:

$$\Delta G_0 = -RT \ln K_D \quad (29)$$

gdzie: ΔG_0 - jest zmianą standardowej entalpii swobodnej,

R – stała gazowa,

T – temperatura bezwzględna.

Zmiana standardowej entalpii swobodnej procesu dotyczy sytuacji gdy stężenia wszystkich indywiduów biorących udział w procesie są sobie równe i wynoszą 1 mol/l. Jeżeli proces, np. dimeryzacji, przebiega przy innych stężeniach to obowiązuje bardziej rozbudowany wzór:

$$\Delta G = -RT \ln K_D + RT \ln ([D])/[M]^2 \quad (30)$$

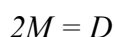
Zmiana entalpii swobodnej procesu zależy od 2 czynników:

- zmiany standardowej entalpii swobodnej, która jest charakterystyczna dla danego procesu
- rzeczywistych warunków przebiegu procesu, a w szczególności od stężeń indywiduów chemicznych biorących udział w procesie.

Tak więc o kierunku przebiegu procesu decyduje zmiana aktualnej, a nie standardowej entalpii swobodnej.

II.4.2. Trimeryzacja

Dimeryzacja jest najprostszym przykładem agregacji. Trochę bardziej skomplikowanym przypadkiem jest proces łączenia się trzech cząsteczek - trimeryzacja. Zjawisko trymeryzacji [142] można opisać w dwojaki sposób: jako reakcję jednoetapową, w której trzy cząsteczki spotykają się i łączą w nową formę – trimer. Jednoczesne spotkanie się 3 cząsteczek, czyli tzw. zderzenie trójcentrowe, jest z punktu widzenia termodynamiki statystycznej zdarzeniem bardzo mało prawdopodobnym. Dużo bardziej prawdopodobny jest ciąg zdarzeń polegający na utworzeniu najpierw dimeru [D], a w kolejnym etapie utworzeniu trimera [T] na skutek przyłączenia kolejnej cząsteczki monomeru [M]:



W procesie tym występują dwie stałe równowagi: stała dimeryzacji K_d (pierwsze równanie) i stała przyłączenia monomeru K_m (drugie równanie). Można jednak założyć,

że stałe te są sobie równe i traktuje się je jako stałe agregacji K_A . Stężenie dimeru oraz trimeru można wtedy wyrazić jako:

$$[D] = K_A[M]^2 \quad (32)$$

$$[T] = K_A[M][D] = K_A^2[M]^3 \quad (33)$$

Wykorzystując następnie wzór na ogólne stężenie związku:

$$C = [M] + 2[D] + 3[T] = [M] + 2K_A[M]^2 + 3K_A^2[M]^3 \quad (34)$$

logarytmując równanie (34), można z wykresu zależności $\log C = f(\log[M])$ wyznaczyć stałą agregacji związku, K_A .

II.4.3. Agregacja nieograniczona

W wielu przypadkach proces agregacji nie zatrzymuje się na etapie małych agregatów (dimerów, trimerów, itp.), lecz tworzy się całe spektrum agregatów [143,144]. Opis matematyczny takiego procesu jest bardziej skomplikowany.

Najprostszy model nieograniczonej agregacji zakłada etapowy przebieg tego procesu, w którym cząsteczki monomeru dołączają się do większych tworów, z założeniem jednakowej stałej agregacji:

$$\begin{aligned} M + M &= D = A_2 & A_2 &= K_A M^2 \\ M + A_2 &= T = A_3 & A_3 &= K_A A_2 M = K_A^2 M^3 \\ M + A_3 &= A_4 & A_4 &= K_A A_3 M = K_A^3 M^4 \\ \dots & & \dots & \\ M + A_{n-1} &= A_n & A_n &= K_A^{n-1} M^n \\ \dots & & \dots & \end{aligned} \quad (35)$$

Wykorzystując równanie (35) można następnie określić bilans cząsteczkowy c oraz:

$$c = M + 2K_A M^2 + 3K_A^2 M^3 + \dots + nK_A^{n-1} M^n + \dots \quad (36)$$

oraz molowy z :

$$z = M + K_A M^2 + K_A^2 M^3 + \dots + K_A^{n-1} M^n + \dots \quad (37)$$

Równanie (35) definiuje tzw. funkcję podziału, z .

W przypadku bilansu molowego mamy do czynienia z szeregiem geometrycznym o ilorazie $q = K_A M$, oraz pierwszym wyrazie $a_1 = M$. Bilans molowy można więc przekształcić do wzoru:

$$z = \frac{M}{1 - K_A M} \quad (38)$$

Suma ta ma skończoną wartość w przypadku gdy $|q| < 1$, a więc $K_A M < 1 \rightarrow M < 1/K_A$. Zależność ta pokazuje, że stężenie monomeru nie rośnie nieograniczenie, jak w przypadku dimeryzacji czy trymeryzacji, lecz istnieje jego graniczna wartość $MMC = 1/K_A$, (ang. *Maximal Monomer Concentration*, MMC).

Bilans cząsteczkowy można wyznaczyć korzystając z zależności między stężeniem całkowitym c a funkcją podziału z :

$$c = M \frac{\partial z}{\partial M} \quad (39)$$

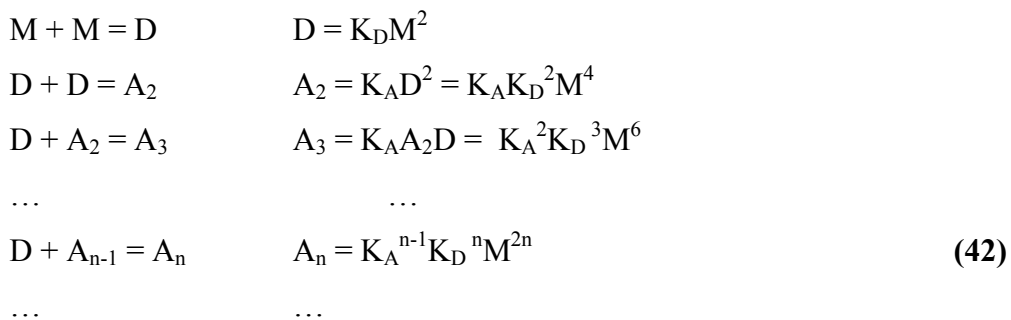
Wstawiając równanie (38) do równania (39) otrzymujemy równanie (40):

$$c = M \frac{\partial}{\partial M} \left(\frac{M}{1 - K_A M} \right) = \frac{M}{(1 - K_A M)^2} \quad (40)$$

Średni stopień agregacji można opisać zależnością (39). W momencie, gdy stężenie monomeru M dąży do granicznej wartości MMC, wartość mianownika w tym równaniu dąży do 0. Oznacza to, że w tym przypadku stopień agregacji dąży do nieskończoności.

$$v = \frac{c}{z} = \frac{M(1 - K_A M)}{(1 - K_A M)^2 M} = \frac{1}{1 - K_A M} \quad (41)$$

Nie zawsze jednak założenie, że stałe wartości agregacji mają identyczne wartości jest prawdziwe. Często mamy do czynienia z reakcją dwuetapową, w której początkowo łączą się ze sobą dwa monomery tworząc dimer, a w kolejnych etapach agregują już nie pojedyncze cząsteczki (monomery), lecz dimery [145,146]. Zwykle w tego typu reakcjach w układach biologicznych obserwuje się tendencję, gdzie stała równowagi pierwszego etapu (dimeryzacji) jest dużo większa niż następne. Model takiego procesu można przedstawić następująco:



Funkcję podziału tego procesu możemy zapisać następująco:

$$z = M + K_D M^2 + K_A K_D^2 M^4 + K_A^2 K_D^3 M^6 \dots + K_A^{n-1} M^n + \dots \quad (43)$$

Podobnie jak w reakcji nieograniczonej agregacji etapowej, począwszy od drugiego wyrazu wyrażenia (43) mamy do czynienia z szeregiem geometrycznym o ilorazie

$q = K_A K_D M$, oraz pierwszym wyrazie $a_1 = K_D M^2$. Funkcje podziału można więc przekształcić do wzoru:

$$z = M + \frac{K_D M^2}{1 - K_A K_D M^2} \quad (44)$$

Z warunku skończonej sumy szeregu geometrycznego również przy agregacji dimerów pojawia się MMC wynosząca odpowiednio:

$$MMC = \frac{M}{\sqrt{K_A K_D}} \quad (45)$$

Oszacowanie stałych K_D oraz K_A wymaga zastosowania numerycznego dopasowania krzywej do danych doświadczalnych.

Całkowite stężenie związku można wyznaczyć na podstawie zależności (39):

$$c = M \frac{\partial z}{\partial M} = M + \frac{2K_D M}{(1 - K_A K_D M^2)^2} \quad (46)$$

Dla związków powierzchniowo czynnych stosuje się nieco odmienny model agregacji zwany agregacją micelną [147]. Model ten zakłada jeden etap agregacji, w którym n cząsteczek monomeru tworzy agregat zwany micellą:

$$nM = A \quad (47)$$

ze stałą agregacji K_A^n . Stężenie micelli można wtedy określić z zależności:

$$A = K_A^n M^n \quad (48)$$

natomiast całkowite stężenie związku wynosi:

$$c = M + nA = M + n K_A^n M^n \quad (49)$$

Po zlogarytmowaniu tej zależności otrzymujemy:

$$\log c = \log M + \log (1 + K_A^n M^{n-1}) \quad (50)$$

Jednoznaczne odróżnienie agregacji micellarnej dla n większego niż kilkanaście od agregacji nieograniczonej jednoetapowej i dwuetapowej jest w zasadzie niemożliwe. Wynika to po pierwsze z faktu występowania nieuniknionych błędów pomiarowych. Po drugie, należy pamiętać, że wszystkie 3 modele są tylko przybliżonymi modelami rzeczywistego procesu agregacji w którym upraszczające założenia poczynione przy konstruowaniu modeli nie muszą być spełnione.

III. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

W Katedrze Technologii Leków i Biochemii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej prowadzone są poszukiwania nowych związków o właściwościach przeciwnowotworowych. W kręgu zainteresowań znajdują się między innymi pochodne akrydyny. Akrydynanależy do grupy policyklicznych związków heteroaromatycznych, a jej pochodne wykazują szeroki zakres aktywności biologicznej obejmujący aktywność przeciwpierwotniakową, przeciwbakteryjną, przeciwwirusową i przeciwnowotworową. Pochodne akrydyny o działaniu przeciwnowotworowym wykazują zróżnicowany mechanizm działania na poziomie molekularnym. Z uzyskanych dotychczas danych wynika, że etap tworzenia fizykochemicznych kompleksów z DNA wydaje się być niezbędny dla aktywności biologicznej badanych pochodnych, ponieważ umożliwia dostatecznie bliski kontakt tych związków z DNA.

Poważnym utrudnieniem w badaniach nad oddziaływaniami pochodnych akrydyny z DNA jest fakt, że związki te wykazują silną tendencję do agregacji w roztworach wodnych.

Celem niniejszej pracy doktorskiej jest opracowanie procedury badawczej i sposobu opracowywania wyników doświadczalnych, które łącznie pozwoliłyby na wyznaczenie parametrów termodynamicznych procesu oddziaływania z DNA związków ulegających agregacji w roztworach wodnych. Zakres tego zagadnienia obejmował wykonanie pomiarów spektrofotometrycznych oraz mikrokalorymetrycznych dla sześciu, różnie podstawionych cząsteczek akrydyny.

Do swoich badań wybrałam 5 analogów przeciwnowotworowego imidazoakrydonu C-1311, syntetyzowanego w Katedrze Technologii Leków i Biochemii i znajdującego się obecnie po drugim etapie badań klinicznych oraz związek referencyjny: proflawinę. Proces agregacji badanych związków oraz ich oddziaływanie z DNA zamierzałam badać wykorzystując spektroskopię absorpcyjną w zakresie widzialnym oraz izotermiczną mikrokalorymetrię miareczkową ITC. Do analizy uzyskanych danych doświadczalnych wykorzystane zostaną różnorodne modele fizykochemiczne pozwalające opisać proces oddziaływania badanych związków na poziomie molekularnym. Szczególnie interesujące wyniki spodziewam się uzyskać dzięki bezpośrednim pomiarom wielkości termodynamicznych techniką ITC [148,149]. Ważna może okazać się informacja na temat tego, jakie człony składają się na całkowitą zmianę entalpii swobodnej związanej z tworzeniem kompleksów z DNA. Na tej podstawie będzie możliwe ustalenie, które

fragmenty struktury badanych związków odpowiadają za ich zdolność do oddziaływania z DNA.

Podczas realizacji głównego celu mojej pracy doktorskiej możliwe będzie zbadanie i wyjaśnienie szeregu nieznanych dotychczas właściwości badanych związków, takich jak:

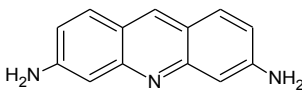
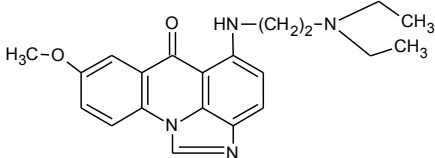
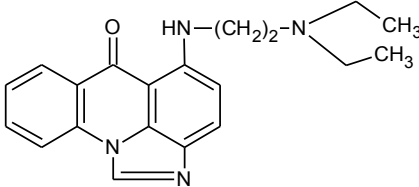
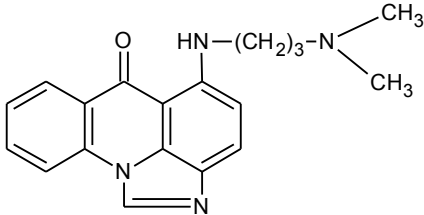
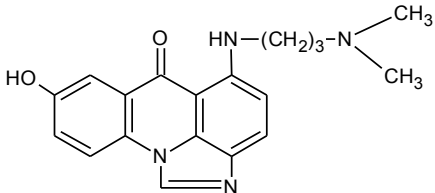
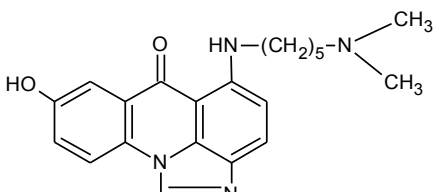
- określenie rodzaju procesu samoagregacji pochodnych imidazoakrydonu roztworach wodnych,
- określenie wpływu siły jonowej oraz temperatury na agregację wybranych imidazoakrydonów
- określenie wpływu siły jonowej oraz temperatury na oddziaływanie wybranych pochodnych z DNA, a tym samym ocenę znaczenia oddziaływań elektrostatycznych w tworzeniu się kompleksów
- wykrycie ewentualnych różnic jakościowych w mechanizmie niekowalencyjnego oddziaływania badanych związków z DNA w buforach o różnej sile jonowej

IV. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

IV.1. Materiały

W badaniach wykorzystano 5 pochodnych imidazoakrydonu oraz barwnik akrydynowy – proflawinę jako związek referencyjny. Symbole, nazwy systematyczne oraz struktury chemiczne stosowanych związków przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Nazwy i struktury chemiczne badanych związków.

Związek	Wzór strukturalny	Nazwa systematyczna
proflawina		3,6-diaminoakrydyna
C-1330		8-metoksy-5- [(dietyloaminoetylo)amino]imidazo [4,5,1-de]akrydyn-6-on
C-1415		5-[(dietyloaminoetylo)amino] imidazo[4,5,1-de]akrydyn-6-on
C-1212		5-[(dimetyloaminopropylo)amino] imidazo[4,5,1-de]akrydyn-6-on
C-1371		8-hydroksy-5- [(dimetyloaminopropylo)amino] imidazo[4,5,1-de]akrydyn-6-on
C-1492		8-hydroksy-5- [(dimetyloaminopentylo)amino] imidazo[4,5,1-de]akrydyn-6-on

IV.2. Odczynniki chemiczne i biochemiczne

- Kwas dezoksyrybonukleinowy, DNA z grasicy cielęcej (calf thymus, ct DNA) – Sigma Chemical Company, St.Louis, MO, USA,
- NaCl – Chempur, Piekary Śląskie, Polska
- Hepes – Serva Feinbiochemica Heidelberg, Nowy Jork, USA
- EDTA – Sigma Chemical Company, St.Louis, MO, USA

IV.3. Roztwory wyjściowe

- Roztwór DNA przygotowywano w buforze i przechowywano w temperaturze -4°C
- Roztwory badanych związków przygotowywane były bezpośrednio przed analizą poprzez rozpuszczenie związku w odpowiedniej ilości buforu.
- 5 mM bufor Hepes o składzie: 1 mM EDTA, pH 7, oraz różnej zawartości chlorku sodu (5 mM NaCl, 25 mM NaCl, 50 mM NaCl, 75 mM NaCl, 100 mM NaCl, 125 mM NaCl, 150 mM NaCl, 200 mM NaCl, 250 mM NaCl, 300 mM NaCl).

IV.4. Aparatura

Pomiary absorpcji światła zostały wykonane przy użyciu Spektrofotometru UV-Vis Perkin Elmer, λ 45. Do pomiarów mikrokalorymetrycznych wykorzystano Izotermiczny Mikrokalorymetr Miareczkujący firmy Calorimetry Sciences Corp, model Nano – ITC III CSC 5300. Ponadto w trakcie analizy korzystano z wagi analitycznej, vortexu oraz pH-metru.

IV.5. Stosowane metody

IV.5.1. Pomiar stężenia kwasu nukleinowego

Stężenie kwasu dezoksyrybonukleinowego oznaczałam metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem znanych wartości ekstynkcji molowej DNA oraz prawa Lamberta-Beera:

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} cl \quad (51)$$

gdzie: A_{λ} – absorbancja przy danej długości fali λ wyrażonej w nanometrach

ε_{λ} – współczynnik ekstynkcji molowej przy danej długości fali λ

c – stężenie molowe

l – długość drogi optycznej wyrażonej w centymetrach.

Dla DNA z grasicy cielęcej mierzona była absorbancja przy długości fali $\lambda = 260$ nm, odpowiadający tej długości fali współczynnik ekstynkcji molowej wynosi $\varepsilon_{(360)} = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [150] (stężenie podane jest w molach zasad na objętość, dlatego w przypadku dwuniciowych kwasów nukleinowych uzyskaną wartość stężenia należy podzielić przez dwa, by uzyskać stężenie w molach par zasad na objętość). Wszystkie próbki kwasów nukleinowych do pomiaru były przygotowywane wg zaleceń dostawców, tak by była zachowana struktura dwuniciowa.

IV.5.2. Spektrofotometryczne badania stanu pochodnych akrydyny w roztworach wodnych

Pomiary spektrofotometryczne wykonane zostały przy użyciu Spektrofotometru UV-Vis Perkin Elmer, $\lambda 45$ w zakresie długości fal 600 – 350 nm. Kolejne roztwory związków przygotowywane były bezpośrednio przed pomiarem wykorzystując metodę rozcieńczeń seryjnych. Jako odnośnik stosowany był bufor Hepes z odpowiednią zawartością chlorku sodu (5 i 150 mM NaCl). Wyniki rejestrowano w formie cyfrowej z gęstością próbkowania 1 nm. Stosowano kuwety o długości drogi optycznej 2; 1; 0,5 i 0,1 cm dobrane odpowiednio w zależności od badanych stężeń związku.

IV.5.3. Analiza zestawów widm pochodnych akrydyny w roztworach wodnych

Wartość ekstynkcji molowej uzyskanych widm wyznaczana była z wykorzystaniem prawa Lamberta-Berra (punkt IV.5.1.). Utworzona w ten sposób macierz \mathbf{Z} , złożona z n wierszy (długości fal) i m kolumn (widma uzyskane dla kolejnych stężeń związku) była poddawana analizie przy użyciu technik chemometrycznych. Zastosowano metodę głównych składowych PCA [151] (ang. *Principal Component Analysis*) oraz numeryczną dekompozycję widm [152].

Każde z widm poddano standaryzacji (autoskalowaniu) zgodnie z poniższym wzorem:

$$w_{ij} = \frac{s_{ij} - \mu_j}{\sigma_j} \quad (52)$$

gdzie: s_{ij} – molowy współczynnik ekstynkcji dla i -tej długości fali j -tego widma

μ_j – wartość średnia molowych współczynników ekstynkcji j -tego widma

σ_j – odchylenie standardowe molowych współczynników ekstynkcji j -tego widma

uzyskując w efekcie znormalizowaną macierz \mathbf{Z} .

Widmo po autoskalowaniu potraktować można jako wektor o długości jednostkowej. Zestaw widm tworzy pęk wektorów o wspólnym początku w k -wymiarowej hiperprzestrzeni, gdzie k jest liczbą form spektralnych obecnych w analizowanych próbkach. Pęk wektorów zarejestrowanych widm ograniczony jest wektorami reprezentującymi widma czystych składników.

Końce wektorów autoskalowanych widm znajdują się przy tym na k -wymiarowej hipersferze. Przykład dla mieszaniny dwuskładnikowej ($k = 2$) pokazano na Ryc. 17A. Analiza głównych składowych pozwala ustalić tzw. wymiar wewnętrzny macierzy autoskalowanych widm. Jest on równy liczbie istotnych głównych składowych tej macierzy. Jeżeli widma form spektralnych nie są nadmiernie skorelowane, to jest on jednocześnie równy liczbie form spektralnych obecnych w próbkach. Niestety w przypadku, gdy formy spektralne mają bardzo podobne widma, a ma to zwykle miejsce w przypadku agregacji, do ustalenia liczby form spektralnych należy zastosować analizę widm resztowych.

Główne składowe i ich ładunki pozwalają na całkowite odtworzenie macierzy autoskalowanych widm zgodnie z równaniem:

$$\mathbf{W}_{nm} = \mathbf{P}_{nm}\mathbf{L}_{nm} \quad (53)$$

gdzie: \mathbf{P}_{nm} – macierz m głównych składowych,

\mathbf{L}_{nm} - macierz ładunków.

Jeżeli przy odtwarzaniu widm zastosujemy tylko j pierwszych głównych składowych to otrzymamy zależność:

$$\mathbf{W}_{nm} = \mathbf{P}_{nj}\mathbf{L}_{jm} + \mathbf{E}^{(j)} \quad (54)$$

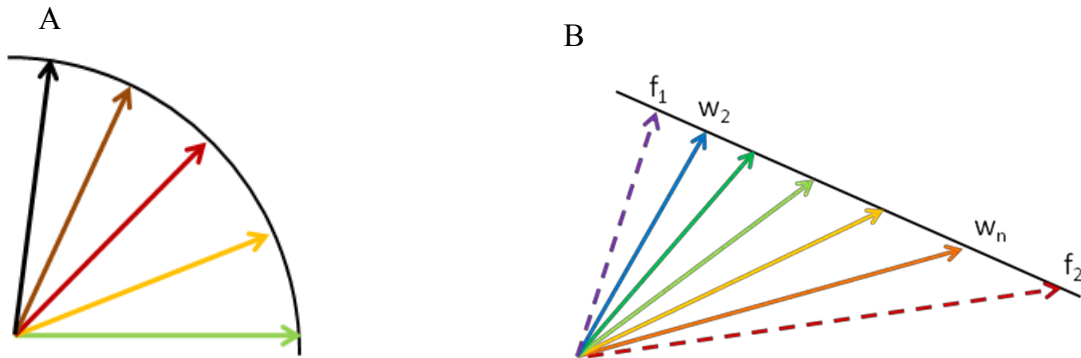
Macierz $\mathbf{E}^{(j)}$ zawiera tzw. widma resztowe rzędu j . Widma resztowe dla $j < k$ mają przy tym charakter widm różnicowych. Dopiero dla $j \geq k$ widma resztowe mają postać szumu losowego. Tym samym analiza widm resztowych kolejnych rzędów pozwala określić poprawną wartość k .

Macierz widm \mathbf{Z} , można zaprezentować w postaci iloczynu dwóch innych macierzy: macierzy składników \mathbf{B} , w której kolumny przedstawiają widma czystych form spektralnych oraz macierzy \mathbf{X} , której kolumny zawierają ułamki molowe poszczególnych form.

$$\mathbf{W} = \mathbf{B}\mathbf{X} \quad (55)$$

Analiza głównych składowych umożliwia ustalenie ilości niezależnych tworów spektralnych oraz pierwszego przybliżenia ich widm, nie pozwala jednakich wyznaczyć

poszczególnych tworów, gdyż główne składowe uzyskuje się przy założeniu ich idealnej ortogonalności, co w przypadku widm tworów spektralnych nie jest prawdziwe.



Rycina 17. Schemat rozłożenia wektorów widm mieszanin dwuskładnikowych w płaszczyźnie dwóch głównych składowych: A) widma autoskalowane, B) widma centrowane.

Końce wektorów centrowanych, ale nie autoskalowanych widm mieszanin dwuskładnikowych leżą na jednej prostej (Ryc. 17B). Nie znamy jednak położenia widm czystych składników na tej prostej. Dlatego, w celu rozwiązania równania (55) wymagane jest zastosowanie techniki określanej mianem iteracyjnej procedury samouzgadniania, w skrócie NSD (ang. *Numerical SpectrumDecomposition*).

Skrajne wektory pęku, w_1 i w_m , mają największe udziały widm form spektralnych zgodnie z zależnością:

$$w_1 = x_{11}f_1 + x_{21}f_2 \quad x_{11} \approx 1, x_{21} \approx 0 \quad (56)$$

$$w_m = x_{1m}f_1 + x_{2m}f_2 \quad x_{1m} \approx 1, x_{2m} \approx 0 \quad (57)$$

Ponadto, w mieszaninach dwuskładnikowych suma ułamków molowych obu form musi być równa 1:

$$x_{11} + x_{21} = 1 \quad (58)$$

$$x_{1m} + x_{2m} = 1 \quad (59)$$

Z zależności (57) i (58) można wyznaczyć odpowiednie ułamki molowe x_{11} i x_{2m} :

$$x_{11} = 1 - x_{21} \quad (60)$$

$$x_{2m} = 1 - x_{1m} \quad (61)$$

Po podstawieniu tych ułamków do wzorów (56) oraz (57) otrzymujemy układ równań:

$$\begin{cases} w_1 = x_{11}f_1 + (1 - x_{11})f_2 \\ w_m = (1 - x_{2m})f_1 + x_{2m}f_2 \end{cases} \quad (62)$$

Układ ten można rozwiązać ze względu na widma czystych form. Przyjmując dodatkowe oznaczenia:

$$\alpha = \frac{1}{x_{11}} > 1 \quad (63)$$

$$\beta = \frac{1}{x_{2m}} > 1 \quad (64)$$

otrzymujemy zależności:

$$f_1 = \frac{\alpha w_m - (\alpha - 1)\beta w_m}{1 - (\alpha - 1)(\beta - 1)} \quad (65)$$

$$f_2 = \frac{\beta w_m - \alpha(\beta - 1)w_1}{1 - (\alpha - 1)(\beta - 1)} \quad (66)$$

Wartości współczynników α i β dobierane są numerycznie podczas dopasowywania modelu agregacji nieograniczonej (p. II.4.3.) metodą simpleksów Neldera-Meada [153,154]. Uzyskanie optymalnych wartości α i β równoważne jest określeniu widm czystych form spektralnych. Umożliwia to rozwiązanie równania macierzowego (55) ze względu na ułamki molowe.

Uzyskane tą metodą ułamki molowe poszczególnych składników w roztworach o różnych stężeniach wykorzystałam do wyznaczenia stałej agregacji związku K_A . Przekształciłam w tym celu wzór (38) (p.II.4.3) uzyskując zależność:

$$K_{Ai} = \frac{1 - \sqrt{x_{mi}}}{C_{ti} x_{mi}} \quad (67)$$

gdzie: C_{ti} - stężenie całkowite związku w i-tym roztworze,

x_{mi} - ułamek molowy monomeru obliczony z równania (55).

Uzyskałam w ten sposób m oszacowań wartości stałej agregacji – po jednym dla każdego z roztworów. Następnie obliczyłam wartość średnią i jej odchylenie standardowe.

IV.5.4. Pomiary mikrokalorymetryczne procesu agregacji

Pomiary mikrokalorymetryczne prowadzone były za pomocą mikrokalorymetru N-ITC III, firmy CSC, będącego wyposażeniem laboratorium badawczego Centrum Doskonałości „ChemBioFarm”, którego zakup został częściowo sfinansowany z funduszy strukturalnych Unii Europejskiej w ramach Sektorowego Programu Operacyjnego – Wzrost Konkurencyjności Przedsiębiorstw.

W komorze porównawczej znajdowała się woda, zaś w pomiarowej 1,3 ml bufor. Wszystkie próbki przed pomiarem były odgazowywane pod próżnią. Za pomocą strzykawki

hamiltonowskiej sterowanej komputerowo do komory pomiarowej wprowadzane były małe 10 μl objętości roztworu związku o stężeniu: 2mM dla związków C-1330, C-1415, C-1212, C-1371, C-1492, oraz 1mM dla proflawiny w założonych odstępach czasu - 300 s. Po każdej dodanej porcji związku następował pomiar mocy wymaganej do utrzymania stałej temperatury komór. Dane miareczkowania kalorymetrycznego przedstawione są na termogramie zależności mocy [$\mu\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$] od czasu [s]. Wykres przedstawia serię pików, które odpowiadają kolejnym etapom miareczkowania. Powierzchnia piku jest proporcjonalna do efektu cieplnego przemiany. Ciepło procesu deagregacji zostało oszacowane na podstawie cyklu następujących doświadczeń [155]:

1. miareczkowanie buforu roztworem ligandu w buforze,
2. miareczkowanie buforu buforem (poprawka wynikająca z różnicy temperatur pomiędzy titrantem i próbki w komorze).

Po odjęciu drugiego efektu cieplnego od pierwszego uzyskuje się ciepło procesu. Do uzyskanych w ten sposób danych eksperymentalnych dopasowano model matematyczny agregacji.

IV.5.5. Analiza danych mikrokalorymetrycznych agregacji akrydyn

Model matematyczny opracowano zakładając, że mamy do czynienia z agregacją nieorganiczną, przyjmując przy tym, że stałe agregacji na każdym etapie są takie same (p.II.4.3):

$$c = \frac{M}{(1 - K_A M)^2} \quad (68)$$

Rozwiązując powyższe równanie ze względu na stężenie monomeru otrzymujemy wzór:

$$M = \frac{1 + 2K_A c - \sqrt{1 + 4K_A c}}{2K_A^2 c} \quad (69)$$

Liczbę moli monomeru można opisać następująco:

$$n_{M_0} = M_0 \cdot v \quad (70)$$

gdzie: M_0 – stężenie monomeru w strzykawce,

v – objętość nastrzyku,

Ciepło molowe reakcji można obliczyć ze wzoru:

$$Q = \Delta H \frac{\Delta n_M}{n} \quad (71)$$

gdzie: ΔH - zmiana entalpii

n – całkowita liczba moli

Δn_M - przyrost moli monomeru w celce pomiarowej

$$\Delta n_M = MV - i n_{M_0} \quad (72)$$

Następnie korzystając z numerycznego dopadowania danych na zasadzie simpleksu szacowana była stała agregacji oraz ciepło molowe reakcji.

Wyznaczone parametry termodynamiczne wykorzystano do obliczenia zmiany entalpii swobodnej (ΔG) i entropii procesów (ΔS), zgodnie z wzorem:

$$\Delta G = -RT \ln K = \Delta H - T\Delta S \quad (73)$$

gdzie: R – stała gazowa

T – temperatura w stopniach Kelwina

IV.5.6. Pomiary kalorymetryczne oddziaływania ligand-DNA

Analogicznie jak w punkcie IV.5.4. wykonano szereg doświadczeń:

1. miareczkowanie buforu roztworem ligandu w buforze (poprawka na efekt rozcieńczenia),
2. miareczkowanie buforu buforem (poprawka wynikająca z różnicy temperatur pomiędzy titrantem i próbki w komorze),
3. miareczkowanie roztworu DNA buforem (poprawka na efekt rozcieńczenia),
4. miareczkowanie roztworu DNA roztworem ligandu w buforze.

W analizie danych odejmowałam średnie efekty cieplne miareczkowania buforu buforem, oraz roztworu DNA buforem, w ten sposób uzyskałam ciepło reakcji.

W komorze porównawczej znajdowała się woda, w pomiarowej bufor bądź roztwór DNA w tym buforze, w objętości 1,3 ml. Do komory pomiarowej wprowadzane były, za pomocą strzykawki hamiltonowskiej sterowanej programem komputerowym, małe, 10 μ l objętości drugiego odczynnika w założonych odstępach czasu - 300 s. Wszystkie próbki przed pomiarem były odgazowywane pod próżnią.

Po dodaniu każdorazowo objętości drugiego odczynnika następował pomiar mocy wymaganej do utrzymania stałej temperatury między komorami, która następnie

przeliczana była na ciepło reakcji. Dane miareczkowania kalorymetrycznego przedstawione są na termogramie zależności mocy [$\mu\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$] od czasu [s]. Wykres przedstawia serię pików, które odpowiadają kolejnym etapom miareczkowania. Powierzchnia pików jest proporcjonalna do efektu cieplnego przemiany. Do uzyskanych w ten sposób danych eksperymentalnych dopasowano model oddziaływań.

IV.5.7. Analiza danych mikrokalorymetrycznych oddziaływania akrydyn z DNA

Otrzymane metodą ITC dane eksperymentalne ciepła oddziaływania ligandów z DNA zostały dopasowane do rozwiniętej wersji modelu McGhee i von Hippel [54]. W modelu tym założono występowanie następujących rodzajów procesów:

1. wiązanie do liniowej matrycy z wykluczeniem sąsiedztwa zgodnie z równaniem McGhee i von Hippel bez uwzględnienia kooperatywności wiązania:

$$\frac{v_1}{[L]} = K_1(1 - nv_1) \left(\frac{(1 - nv_1)}{(1 - (n-1)v_1)} \right)^{n-1} \quad (74)$$

gdzie: [L] – molowe stężenie wolnego liganda, v_1 – gęstość wiązania, czyli średnia liczba cząsteczek liganda związana przez jednostkę matrycy ($v_1 = [L]_T / [M]_T$, $[L]_T$ – stężenie molowe związanego liganda, $[M]_T$ – ogólne molowe stężenie jednostek matrycy), K_1 – mikroskopowa stała kompleksowania, n – wielkość miejsca wiązania (ilość jednostek matrycy wyeliminowanych jako potencjalne miejsca wiązania, wyrażona w parach zasad).

2. oddziaływanie elektrostatyczne zagregowanej formy liganda z grupami fosforanowymi DNA:

$$\frac{v_2}{[A]} = K_2(1 - v_2) \quad (75)$$

gdzie: [A] – molowe stężenie form zagregowanych liganda przeliczone na pojedyncze cząsteczki, v_2 - gęstość wiązania, czyli średnia liczba cząsteczek liganda związana przez zdysocjowaną grupę fosforanową, K_2 – mikroskopowa stała wiązania.

3. deagregację liganda na skutek rozcieńczenia nastrzyku zgodnie ze wzorem (68).

W celu wyznaczenia parametrów zastosowanego modelu (n , K_1 , ΔH_1 , K_2 , ΔH_2 , K_A i ΔH_A) zastosowano numeryczne dopasowanie modelu do danych doświadczalnych z wykorzystaniem metody simpleksów.

Wyznaczone parametry termodynamiczne wykorzystano do obliczenia zmiany entalpii swobodnej (ΔG) i entropii procesów (ΔS), zgodnie z wzorem:

$$\Delta G_i = -RT \ln K_i = \Delta H_i - T\Delta S_i \quad (76)$$

gdzie: i – 1, 2 lub A odpowiednio dla stałej wiązania, monomerów, stałej wiązania agregatów, oraz de agregacji cząsteczek

R – stała gazowa

T – temperatura w stopniach Kelwina

V. WYNIKI

W literaturze można znaleźć przesłanki, że niektóre pochodne akrydyny mogą agregować w roztworach wodnych [156,157,158]. Dlatego przed przystąpieniem do badań fizykochemicznego oddziaływania tych związków z DNA, należało sprawdzić czy zjawisko to występuje również w przypadku badanych w tej pracy związków. Agregacja stanowi bowiem istotne utrudnienie przy badaniu oddziaływania małowcząsteczkowych, aromatycznych ligandów z kwasami nukleinowymi. Bez uwzględnienia tego zjawiska opis oddziaływania jest zafałszowany i może prowadzić do błędnej interpretacji uzyskanych wyników. Jako pierwsze podejście do badania zjawiska agregacji zastosowałam chemometryczną analizę widm uzyskanych dla kolejnych stężeń związków. Z danych tych ustaliłam liczbę form spektralnych obecnych w roztworach oraz wyznaczyłam stałą agregacji związków. Następnie podjęłam próbę termodynamicznej analizy tego zjawiska wykorzystując izotermiczną mikrokalorymetrię miareczkową ITC. Korzystając z algorytmu opracowanego w trakcie studium, mogłam oszacować wartość stałej agregacji, a także zmianę entalpii molowej oraz inne parametry termodynamiczne towarzyszące temu procesowi. Analiza ta jest istotna, ponieważ pozwala rozwiązać problem agregacji związków wiążących się do DNA.

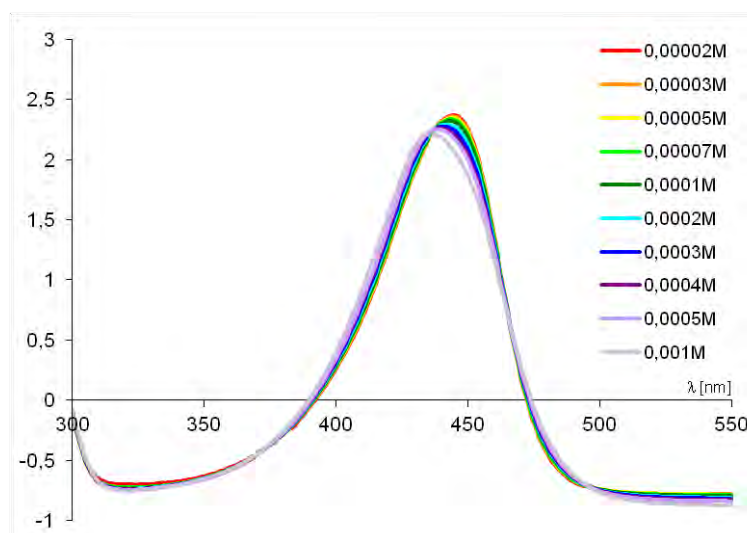
V.1. Analiza spektroskopowa reakcji agregacji

Badanie przebiegu procesu agregacji badanych związków przeprowadziłam w oparciu o spektroskopię absorpcyjną UV-VIS. Serię widma różnych stężeń związków w buforze HEPES rejestrowano w zakresie długości fal charakterystycznych dla chromoforu akrydynowego (300÷550 nm dla proflawiny, C-1330, C-1371 oraz C-1492 i 310-510 nm dla pochodnych C-1415 oraz C-1212). Pomiary wykonywane były w kuwetach kwarcowych o różnej długości drogi optycznej (2; 1; 0,5 i 0,1 cm). Droga optyczna dobrana była odpowiednio w zależności od badanych stężeń związku. Pomiary przeprowadzane były w temperaturze pokojowej przy użyciu spektrofotometru UV-VIS Lambda 45, Perkin-Elmer. Metodyka pomiarów została szczegółowo opisana w punkcie IV.5.2.

V.1.1. Analiza spektroskopowa agregacji proflawiny

Analizę spektroskopową agregacji badanych związków rozpoczęłam od związku referencyjnego - proflawiny. Aby sprawdzić, czy barwnik agreguje w buforze z 5 mM zawartością NaCl wykonałam za pomocą spektrofotometru UV/VIS serię widm różnych stężeń tego związku. Wizualna analiza serii widm pozwoliła mi stwierdzić, iż kształt kolejnych widm jest bardzo podobny. Dodatkowo intensywność poszczególnych widm jest zbliżona do siebie. Kolejne krzywe przesuwają się w kierunku fal krótszych.

Kolejnym etapem analizy była standaryzacja widm, (p.IV.5.3, równanie (52)). Zestaw widm standaryzowanych został przedstawiony na Ryc. 18. Widać wyraźnie, że wraz ze wzrostem stężenia maleje nieznacznie intensywność pasma absorpcji, a jego maksimum przesuwa się w kierunku fal krótszych. Dochodzi również do nieznacznej zmiany kształtu widm dla wyższych stężeń związku.



Rycina 18. Zestaw standaryzowanych widm dla proflawiny w roztworze 5 mM NaCl.

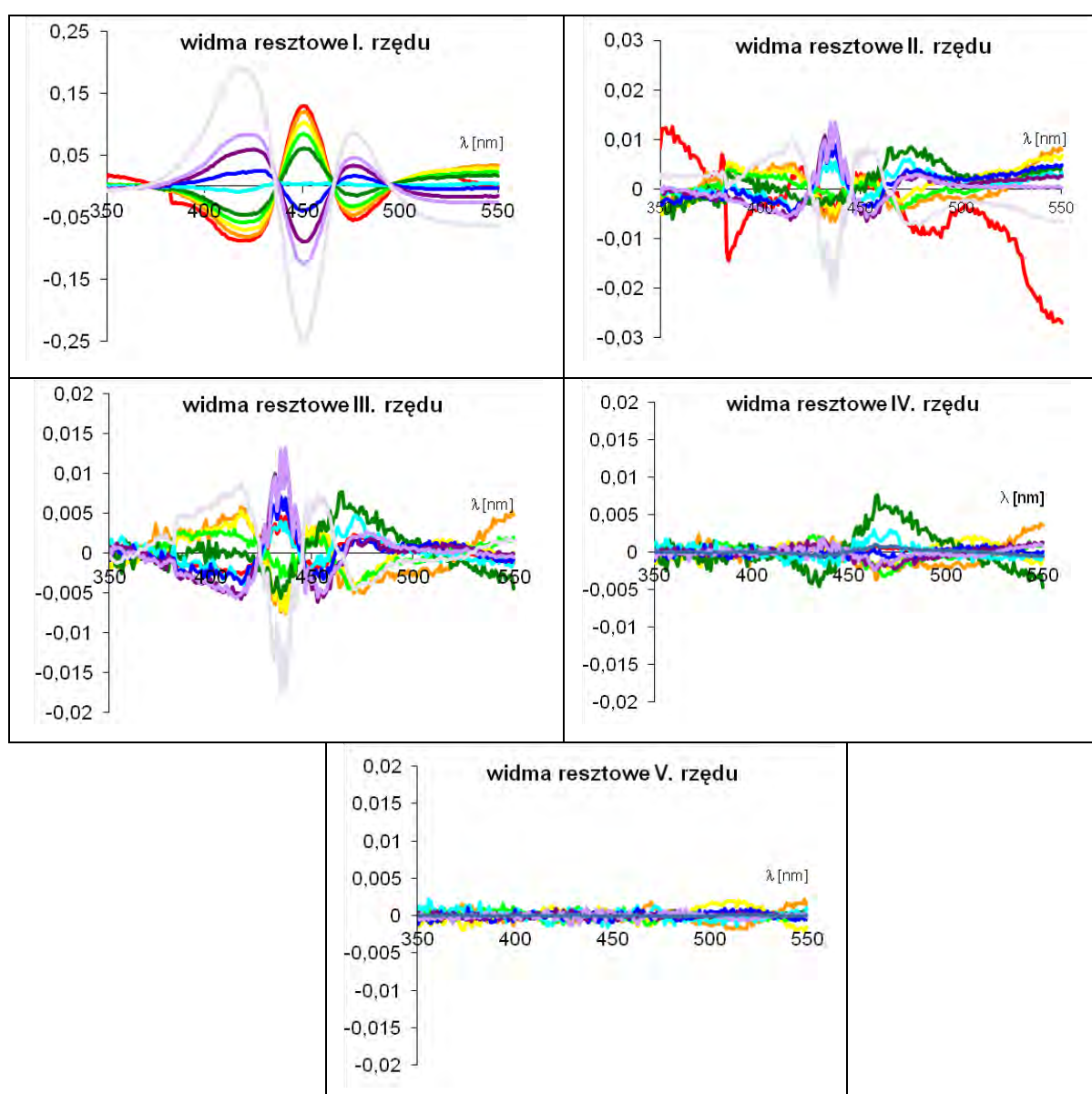
Numeryczną analizę widm rozpoczęłam od ustalenia liczby form spektralnych obecnych w roztworze. W Tabeli 2 przedstawiam dane uzyskane dzięki zastosowaniu programu PCAMAX. Przedstawione poniżej wartości sugerują (Tabela 2), że dwie pierwsze główne składowe (wyjaśniające łącznie 99,99 % zmienności) są istotne. Wskazuje to, że w roztworze znajdują się dwie formy spektralne: monomer i forma zagregowana.

Podobne wyniki uzyskałam po wnikliwej analizie widm resztowych (Ryc. 19). Stwierdziłam obecność dwóch form spektralnych: monomeru i agregatu związku.

Na widmach resztowych III, IV i V rzędu nie obserwuje się już pasm absorpcyjnych, a jedynie szum.

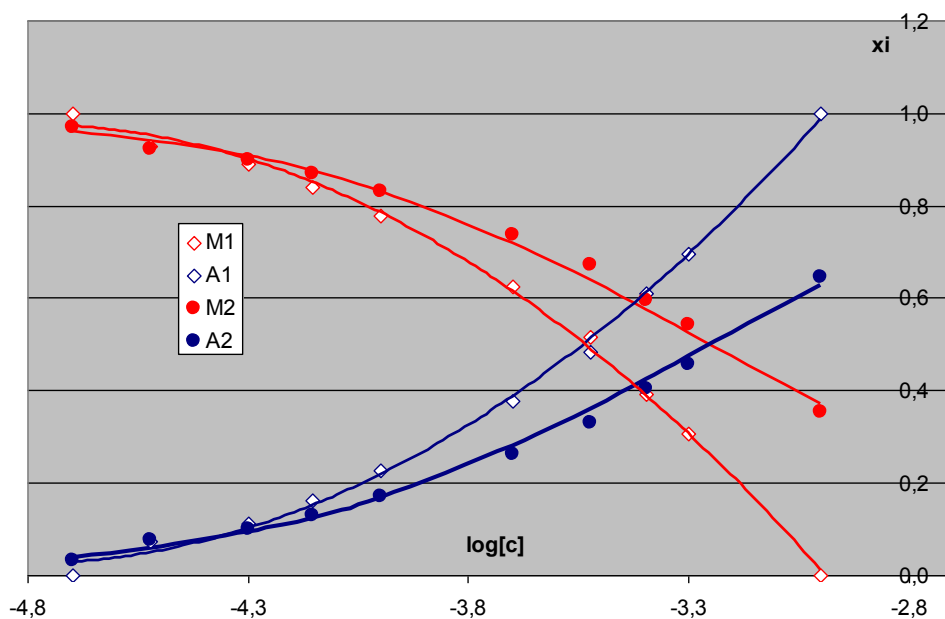
Tabela 2. Zestawienie danych dotyczących głównych składowych uzyskanych z wykorzystaniem metody PCA dla proflawiny w buforze z 5 mM NaCl

	Główne składowe				
	1	2	3	4	5
wartości własne	9,9827	0,0170	0,0002	0,0001	0,0000
% informacji	99,83	0,16	0,01	0,00	0,00
sumaryczny %	99,83	99,99	100,00	100,00	100,00



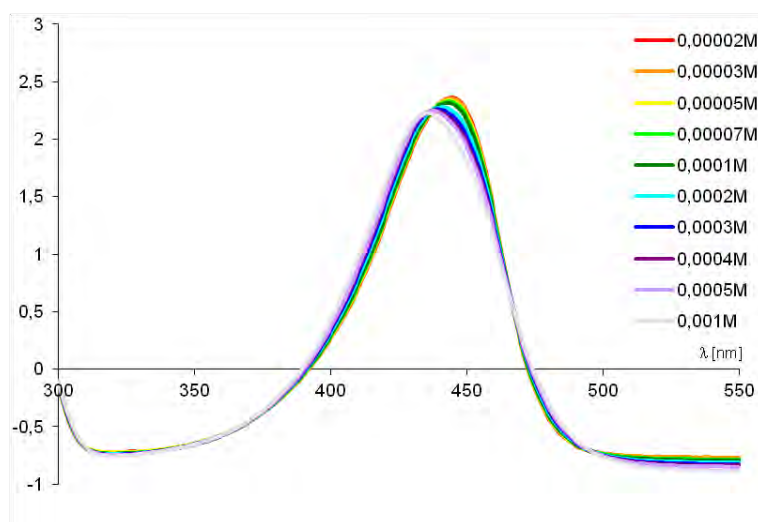
Rycina 19. Kolejne widma resztowe uzyskane w oparciu o metodę PCA dla proflawiny w roztworze 5 mM NaCl.

Zastosowanie metody samouzgodnienia oraz opracowanego modelu (opisanego w Części Doświadczalnej IV.5.3.) dla dwóch form spektralnych pozwoliło mi ustalić zawartość molową monomeru oraz formy zagregowanej w poszczególnych roztworach związku. Wykres zależności ułamka molowego od logarytmu ze stężenia barwnika przedstawiłam na Ryc. 20. W miarę wzrostu stężenia związku w roztworze pojawia się więcej formy zagregowanej barwnika, przy czym już w początkowo niskich stężeniach mamy do czynienia zarówno z formą monomeru jak i agregatem. Analiza danych z wykorzystaniem zależności (67) pozwoliła mi wyznaczyć stałą agregacji, która wyniosła $K_A = (1,044 \pm 0,105) \cdot 10^3 \text{ [M}^{-1}\text{]}$.



Rycina 20. Zależność ułamka molowego od logarytmu ze stężenia proflawiny dla poszczególnych form spektralnych w roztworze z 5 mM zawartością NaCl, M1,A1 – pierwotne ułamki molowe monomeru i agregatu M2,A2 – ułamki molowe monomeru i agregatu po dopasowaniu modelu

Kolejnym etapem badań było zweryfikowanie, czy siła jonowa buforu ma wpływ na zjawisko agregacji proflawiny. W tym celu przeprowadziłam analogiczną analizę widm spektroskopowych w buforze zawierającym 150 mM chlorku sodu. Zestaw widm sporządzonych identycznie jak dla buforu niskosolnego przedstawiony został na Ryc. 21. Krzywe widmowe charakteryzują się podobną zmianą intensywności jak w przypadku buforu niskosolnego.



Rycina 21. Zestaw standaryzowanych widm dla proflawiny w roztworze 150 mM NaCl

Analiza metodą PCA oraz wnikliwa obserwacja widm resztowych pozwoliły mi stwierdzić, że mamy do czynienia z dwiema formami spektralnymi: monomerem i agregatem. 99.99% sumarycznej zmienności jest wyjaśniane przez dwie pierwsze główne składowe. Natomiast na widmach resztowych III, IV i V rzędu nie obserwuje się już pasm absorpcyjnych, a jedynie szum. Dodatkowo, przy użyciu metody samouzgodnienia wyznaczyłam stałą agregacji związku równą $K_A = (1,226 \pm 0,098) \cdot 10^3 [M^{-1}]$. Wartość ta nie jest istotnie różna od uzyskanej dla buforu niskosolnego na poziomie istotności $\alpha=0,05$.

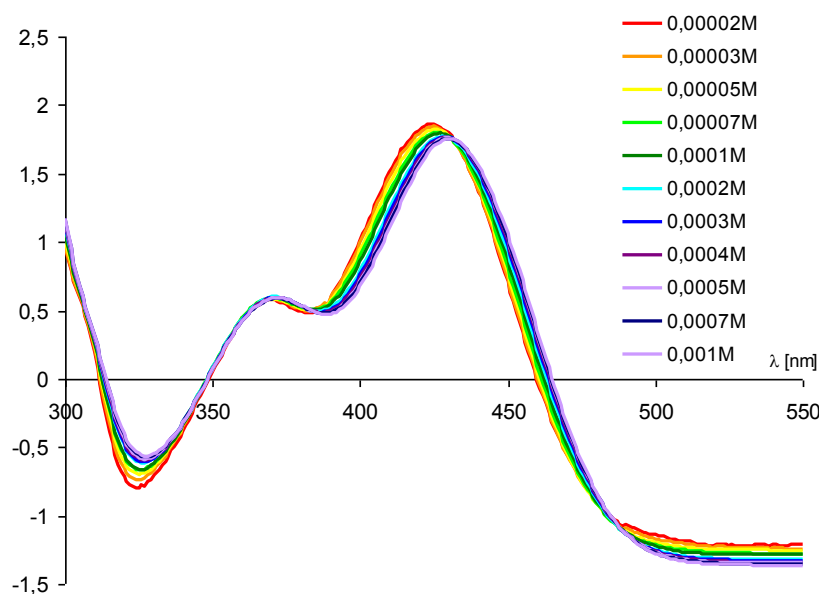
Podsumowując spektroskopową analizę agregacji barwnika akrydynowego proflawiny mogę stwierdzić, że związek ten ulega agregacji w roztworach wodnych w interesującym mnie przedziale stężeń. Metoda NDS pozwoliła określić zawartości poszczególnych form znajdujących się w roztworze, dzięki temu możliwe było również wyznaczenie stałych agregacji związku. Dla proflawiny, która nie jest związkiem jonowym na zjawisko agregacji nie ma wpływu siła jonowa buforu, zarówno w przypadku zastosowania buforu nisko- jak i wysokosolnego stała agregacji jest praktycznie taka sama.

V.1.2. Analiza spektroskopowa agregacji C-1330

Analogicznie jak dla proflawiny przeprowadziłam analizę dla pochodnej akrydyny C-1330 zawierającej grupę metoksyłową w pozycji 8 układu akrydynowego oraz aminoalkilowy łańcuch boczny w pozycji 5 (budowa związku przedstawiona jest w rozdziale IV.1.). Obecna w strukturze związku alifatyczna grupa aminowa na końcu

łańcucha bocznego jest w buforze o $\text{pH} = 7$ sprotonowana i nadaje całej cząsteczce wypadkowy ładunek dodatni.

Na Ryc. 22 przedstawiłam zestaw widm standaryzowanych uzyskany dla różnych stężeń związku C-1330 w buforze niskosolnym.



Rycina 22. Zestaw standaryzowanych widm dla C-1330 w roztworze 5 mM NaCl

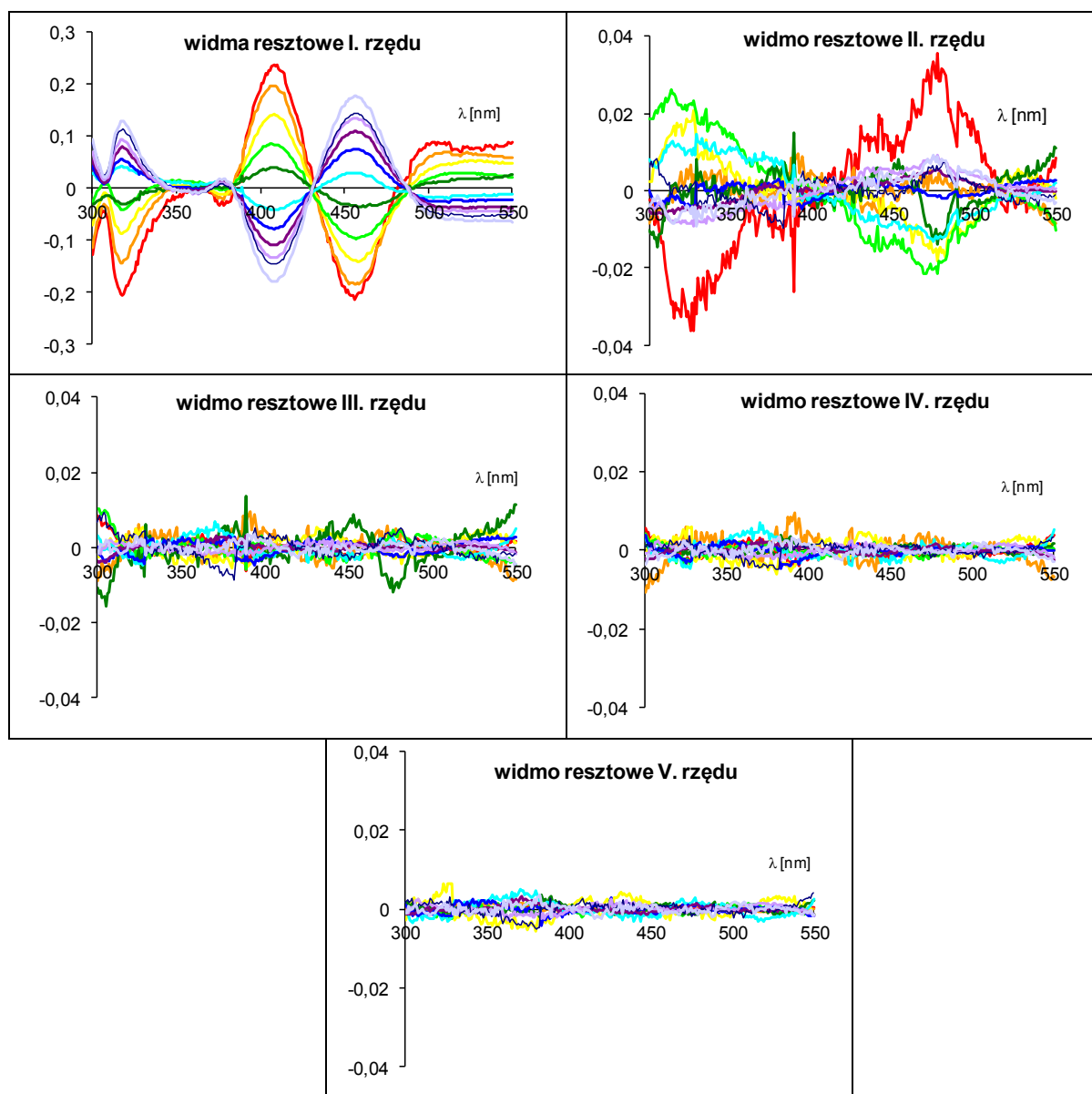
Związek wykazuje silne pasma absorpcji w widzialnym zakresie widma. W widmie można zauważyć dwa maksima. Dla najniższego stężenia związku zlokalizowane są one przy $\lambda = 371$ nm oraz $\lambda = 423$ nm. W widmach rzeczywistych występują dwa punkty izosbesticzne przy długości fali $\lambda = 383$ nm, oraz $\lambda = 431$ nm. W celu zidentyfikowania liczby tworów spektralnych obecnych w roztworze zastosowałam metodę PCA.

Tabela 3. Zestawienie danych dotyczących głównych składowych uzyskanych z wykorzystaniem metody PCA dla pochodnej C-1330 w buforze z 5 mM NaCl

	Główne składowe				
	1	2	3	4	5
wartości własne	10,9491	0,0503	0,0006	0,0000	0,0000
% informacji	99,54	0,45	0,01	0,00	0,00
sumaryczny %	99,54	99,99	100,00	100,00	100,00

Klasyczna analiza wartości własnych, przedstawiona w Tabeli 3, pokazuje, że 99,99% zmienności wyjaśniane jest przez pierwsze dwie główne składowe, co sugeruje,

że w roztworze obecne są dwie formy spektralne. Wnikliwa analiza widm resztowych (Ryc. 23) potwierdziła, że w roztworze o niskiej sile jonowej występują 2 typy tworów spektralnych.

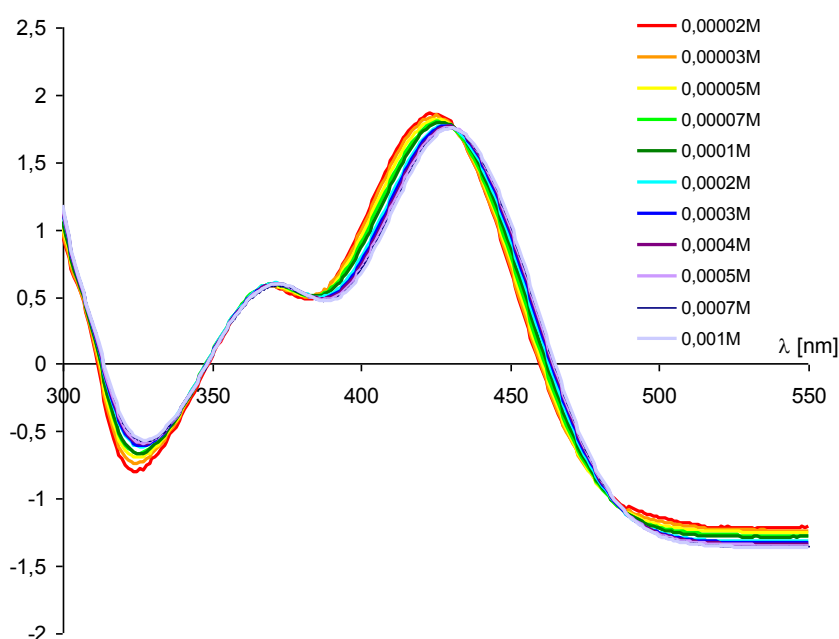


Rycina 23. Kolejne widma resztowe uzyskane w oparciu o metodę PCA dla C-1330 roztworze 5 mM NaCl.

Kolejnym krokiem było przeprowadzenie analizy NDS dla 2 form spektralnych, co pozwoliło mi oszacować zawartość molową monomeru oraz formy zagregowanej w poszczególnych roztworach związku. Wyzaczyłam również stałą agregacji, która wyniosła $K_A = (6,327 \pm 0,218) \cdot 10^3 [M^{-1}]$.

Następnie, aby sprawdzić czy na proces agregacji związku C-1330 mają wpływ oddziaływania elektrostatyczne przeprowadziłam analogiczne badania w buforze

o większej sile jonowej (150mM NaCl). Zestaw widm sporządzonych identycznie jak dla buforu o zawartości 5mM NaCl przedstawiony jest na Ryc. 24. W przebiegu kolejnych widm związku, podobnie jak w przypadku doświadczeń w buforze niskosolnym, występują dwa maksima odpowiednio przy $\lambda = 371$ nm oraz $\lambda = 423$ nm. Obserwuje się przesunięcie batochromowe (przesunięcie maksimum widma w kierunku fal dłuższych) kolejnych widm $\Delta\lambda = 6$ nm. W widmach rzeczywistych występują również dwa punkty izosbestyczne (przy takich samych długościach fali jak w buforze niskosolnym) sugerujące istnienie dwóch form związku w roztworze.



Rycina 24. Zestaw standaryzowanych widm dla C-1330 w roztworze 150 mM NaCl

Analiza głównych składowych i widm resztowych potwierdziła występowanie dwóch form spektralnych, pokazała, że istotne są dwie pierwsze składowe, które wyjaśniają 99,99% sumarycznej zmienności. Zastosowanie analizy chemometrycznej, zgodnie z procedurą opisaną w p.IV.5.3. pozwoliło na wyznaczenie ułamków molowych poszczególnych form spektralnych oraz na uzyskanie widm monomeru i agregatu, których charakterystyki spektralne przedstawiłam w Tabeli 4. Wyznaczona stała agregacji wynosi $K_A = (7,669 \pm 0,745) \cdot 10^3$ [M⁻¹], jest ona istotnie wyższa niż dla związku w buforze niskosolnym. Wskazuje to, że ograniczenie odpychania elektrostatycznego jednoimiennie naładowanych cząsteczek monomeru poprzez zwiększenie siły jonowej roztworu potęgują zjawisko agregacji związku C-1330 w roztworze.

Tabela 4. Charakterystyki spektralne monomeru i agregatu pochodnej C-1330 w buforze Hepes o 150 mM stężeniu NaCl

C-1330	λ_{\max} [nm]	ϵ_{\max} [M ⁻¹ cm ⁻¹]
Monomer	422	4028
Agregat	433	3205

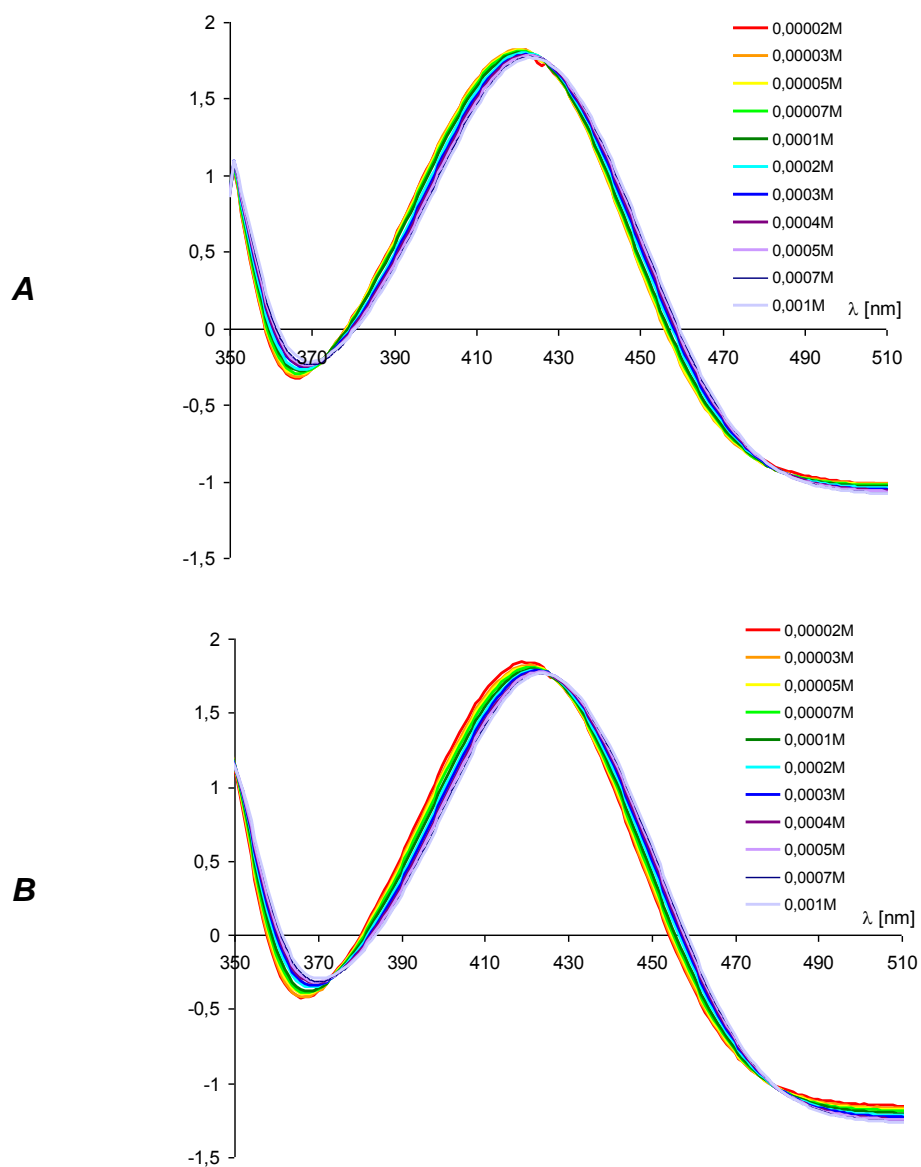
V.1.3. Analiza spektroskopowa agregacji C-1415

Kolejną analizowaną pochodną akrydyny był związek o nazwie kodowanej C-1415. Od C-1330 różni się on brakiem podstawnika w pozycji 8 pierścienia akrydynowego. Badanie przebiegu procesu agregacji tego związku przeprowadziłam w oparciu o spektroskopię absorpcyjną UV-VIS. Porównanie dwóch zestawów widm odpowiednio dla buforu nisko i wysokosolnego przedstawiłam na Ryc. 25.

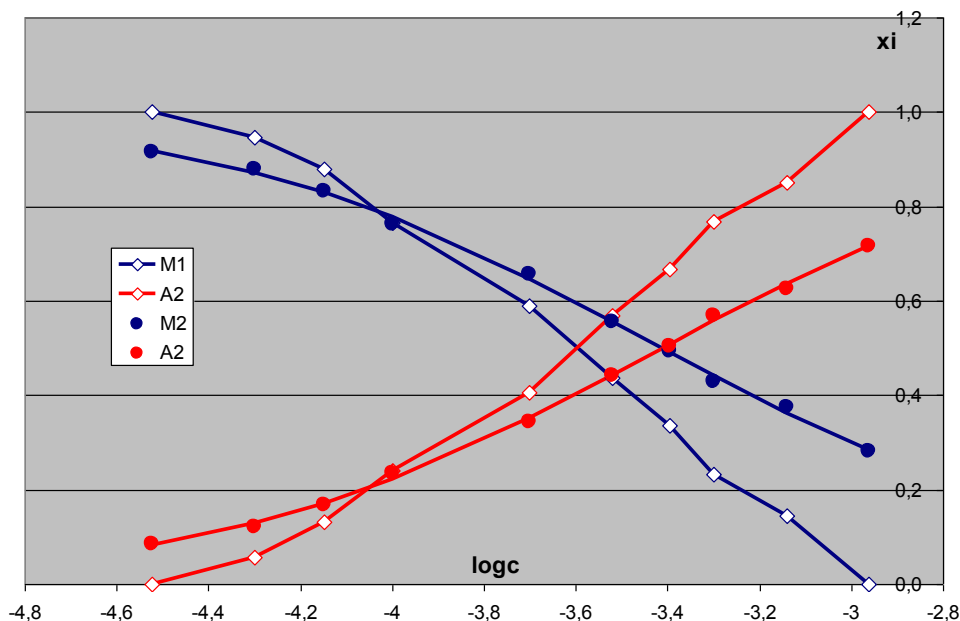
Zestaw widm uzyskany dla imidazoakrydonu C-1415 ma odmienny charakter niż w przypadku C-1330. W obydwu przypadkach związek wykazuje silne pasma absorpcji w widzialnym zakresie widma, jednak w przebiegu widm można zauważyć tylko jedno maksimum, dla najniższego stężenia związku pojawia się ono przy długości fali $\lambda = 420$ nm. W widmach rzeczywistych występują również dwa punkty izosbestyczne przy długości fali $\lambda = 373$ nm, oraz $\lambda = 425$ nm, co może sugerować, że w roztworze mamy do czynienia z dwiema formami spektralnymi. W buforze o wyższej sile jonowej bardziej widoczne jest przesunięcie batochromowe widm.

Analiza PCA oraz analiza widm resztowych sugerują, że mamy do czynienia z dwiema istotnymi głównymi składowymi. Zarówno w buforze nisko- jak i wysokosolnym występują dwie formy związku: monomer i agregat.

Zastosowanie analizy NDS dla 2 form spektralnych, pozwolił mi wyznaczyć zawartość molową monomeru oraz formy zagregowanej w poszczególnych roztworach związku. Wykres zależności ułamka molowego od logarytmu ze stężenia przedstawiłam na Ryc. 26.

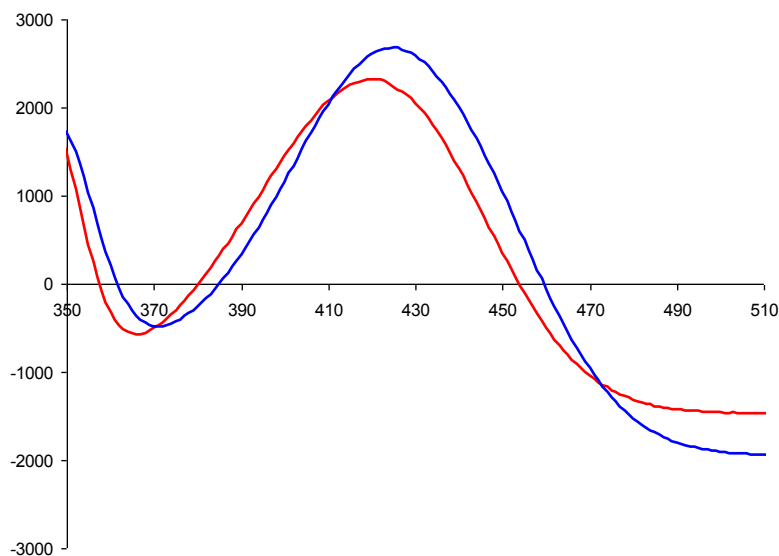


Rycina 25. Zestawy widm standaryzowanych pochodnej C-1415 w buforze Hepes: A - 5 mM NaCl i B - 150 mM NaCl, pH=7



Rycina 26. Zależność ułamka molowego od logarytmu ze stężenia C-1331415 dla poszczególnych form spektralnych w roztworze z 5 mM zawartością NaCl, M1,A1 – ułamki molowe monomeru i agregatu pierwotne M2,A2 – ułamki molowe monomeru i agregatu po dopasowaniu modelu

Zastosowanie procedury samouzgodnienia widm, pozwoliło mi również na uzyskanie widm monomeru i agregatu, które przedstawiłam na Ryc. 27.



Rycina 27. Widmo monomeru (linia czerwona) oraz agregatu (linia niebieska) uzyskane metodą samouzgodnienia dla zestawu widm w buforze Hepes z 5mM NaCl

Wyznaczone stałe agregacji wynoszą odpowiednio: dla 5 mM NaCl $(1,512 \pm 0,077) \cdot 10^3$ [M⁻¹], dla 150 mM NaCl $(2,568 \pm 0,073) \cdot 10^3$ [M⁻¹]. Stała agregacji dla imidazoakrydonu C-1415 jest niższa niż w przypadku C-1330. Wzrost siły jonowej

buforu podwyższa stałą agregacji pochodnej C-1415, tak więc i w przypadku tego związku oddziaływania elektrostatyczne wpływają istotnie na proces agregacji.

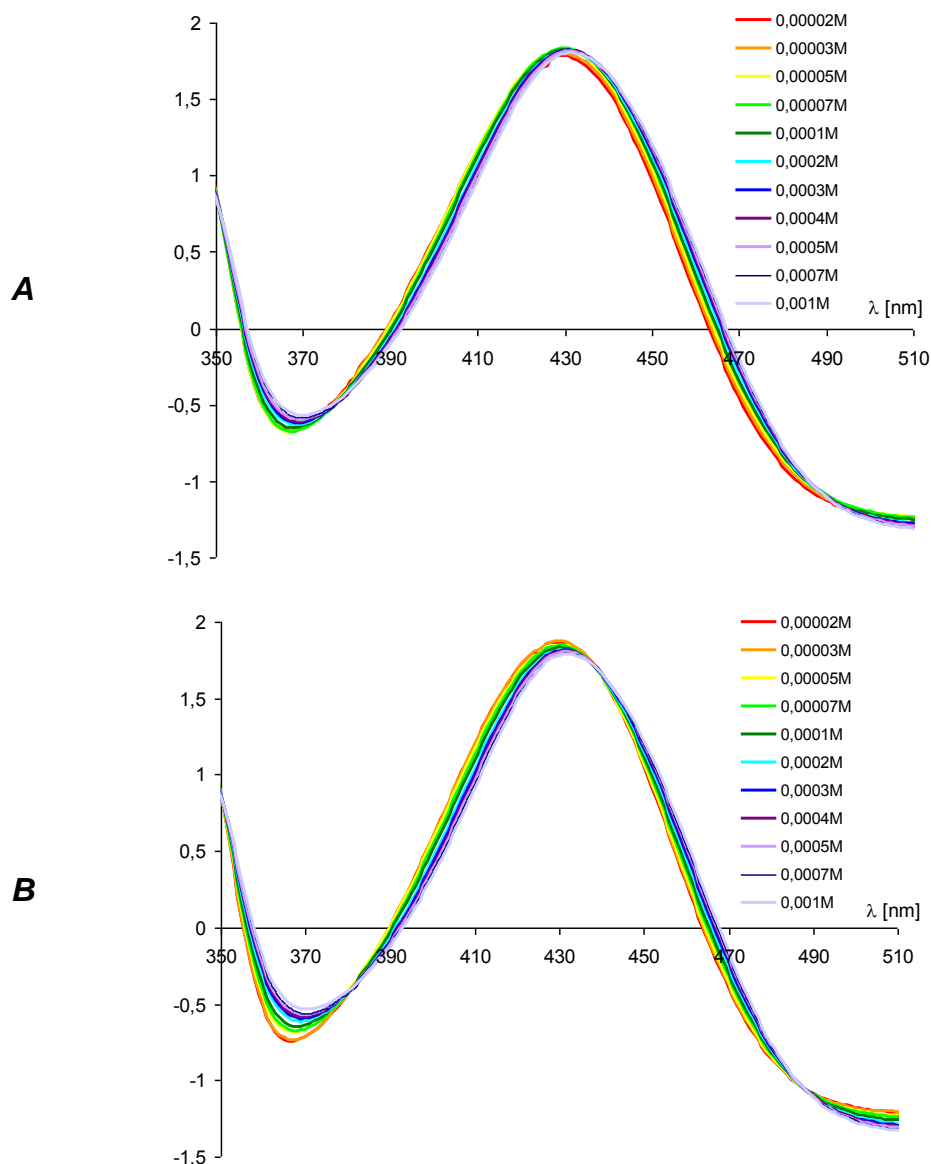
V.1.4. Analiza spektroskopowa agregacji C-1212

Związek C-1212 jest analogiem C-1415. Różnica w budowie tych dwóch związków polega na obecności różnych podstawników w pozycji 5 pierścienia akrydynowego, odpowiednio dla C-1212 jest to podstawnik (dimetyloaminopropyl)aminowy, natomiast dla C-1415 podstawnik (dietyloaminoetylo)aminowy. Widma tych związków są bardzo podobne. Zestawy otrzymanych przebiegów w buforze nisko i wysokosolnym przedstawione są na Ryc. 28.

Dla C-1212 w przebiegu widm występuje tylko jedno maksimum przy długości fali $\lambda = 429$ nm. W buforze o wyższej sile jonowej bardziej widoczne jest przesunięcie batochromowe widm.

Klasyczna analiza wartości własnych, pokazuje, że 99,99% zmienności wyjaśniane jest przez pierwsze dwie główne składowe, co sugeruje, że w roztworze obecne są dwie formy spektralne. Wnikliwa analiza widm resztowych potwierdziła, że w roztworach obecne są 2 typy tworów. Na widmach resztowych III, IV i V rzędu nie obserwuje się już pasm absorpcyjnych, a jedynie szum.

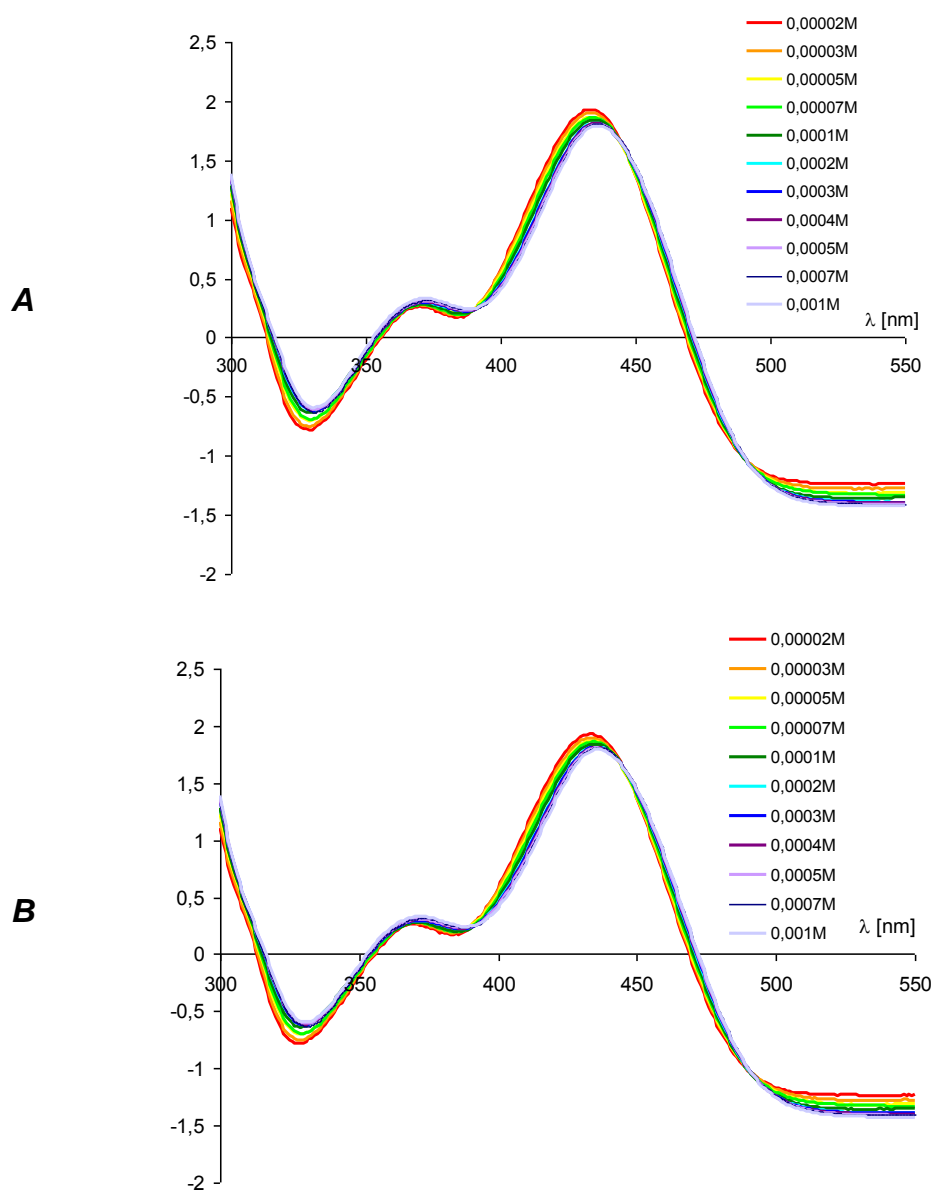
Zastosowanie analizy chemometrycznej, pozwoliło wyznaczyć ułamki molowe poszczególnych form spektralnych, oraz oszacować stałą agregacji. Wartości stałych agregacji wynoszą odpowiednio: dla związku w buforze z 5 mM zawartością NaCl $(4,333 \pm 0,246) \cdot 10^3$ [M⁻¹], dla 150 mM NaCl $(5,163 \pm 0,409) \cdot 10^3$ [M⁻¹]. Wartości obydwu stałych są zdecydowanie wyższe niż dla związku C-1415, co sugeruje, że na zdolność pochodnych imidazoakrydonu do agregacji ma wpływ nie tylko budowa części aromatycznej, ale również struktura łańcucha bocznego. Podobnie jak dla pochodnej C-1415 wzrost siły jonowej buforu podwyższa stałą agregacji związku C-1212.



Rycina 28. Zestawy widm standaryzowanych pochodnej C-1212 w buforze Hepes: A - 5 mM NaCl i B - 150 mM NaCl, pH=7

V.1.5. Analiza spektroskopowa agregacji C-1371

Imidzoakrydon C-1371 jest pochodną związku C-1212 posiadającą dodatkową grupę hydroksylową w pozycji 8 pierścienia akrydynowego. Grupa hydroksylowa stwarza dodatkową możliwość do tworzenia wiązań między molekułami. Badanie przebiegu procesu agregacji tego związku przeprowadziłam analogicznie jak dla poprzednich związków. Na Ryc. 29 przedstawiłam zestawy widm odpowiednio dla buforu nisko i wysokosolnego. W obydwu buforach widoczny jest wyraźnie efekt batochromowy (przesunięcie maksimum widma w kierunku fal dłuższych).



Rycina 29. Zestawy widm standaryzowanych pochodnej C-1371 w buforze Hepes:
A - 5 mM NaCl i B - 150 mM NaCl, pH=7

Numeryczną analizę widm C-1371 rozpoczęłam od ustalenia liczby form spektralnych obecnych w roztworze. W Tabeli 5 przedstawiam wyniki analizy głównych składowych uzyskane dzięki zastosowaniu programu PCAMAX dla zestawu widm zarejestrowanych w buforze z 150 mM NaCl. Analogiczne wyniki uzyskałam dla widm roztworów w buforze niskosolnym. Wyniki te wskazują, że istotne są jedynie dwie pierwsze główne składowe wyjaśniające łącznie 99,99 % zmienności. Podobne wyniki uzyskałam po analizie widm resztowych. Sugeruje to występowanie w roztworach C-1371 jedynie dwóch form spektralnych: monomeru i agregatu związku.

Tabela 5. Zestawienie danych dotyczących głównych składowych uzyskanych z wykorzystaniem metody PCA dla pochodnej C-1371 w buforze z 150 mM NaCl

	Główne składowe				
	1	2	3	4	5
wartości własne	9,9635	0,0350	0,0012	0,0002	0,0000
% informacji	99,64	0,35	0,01	0,00	0,00
sumaryczny %	99,64	99,99	100,00	100,00	100,00

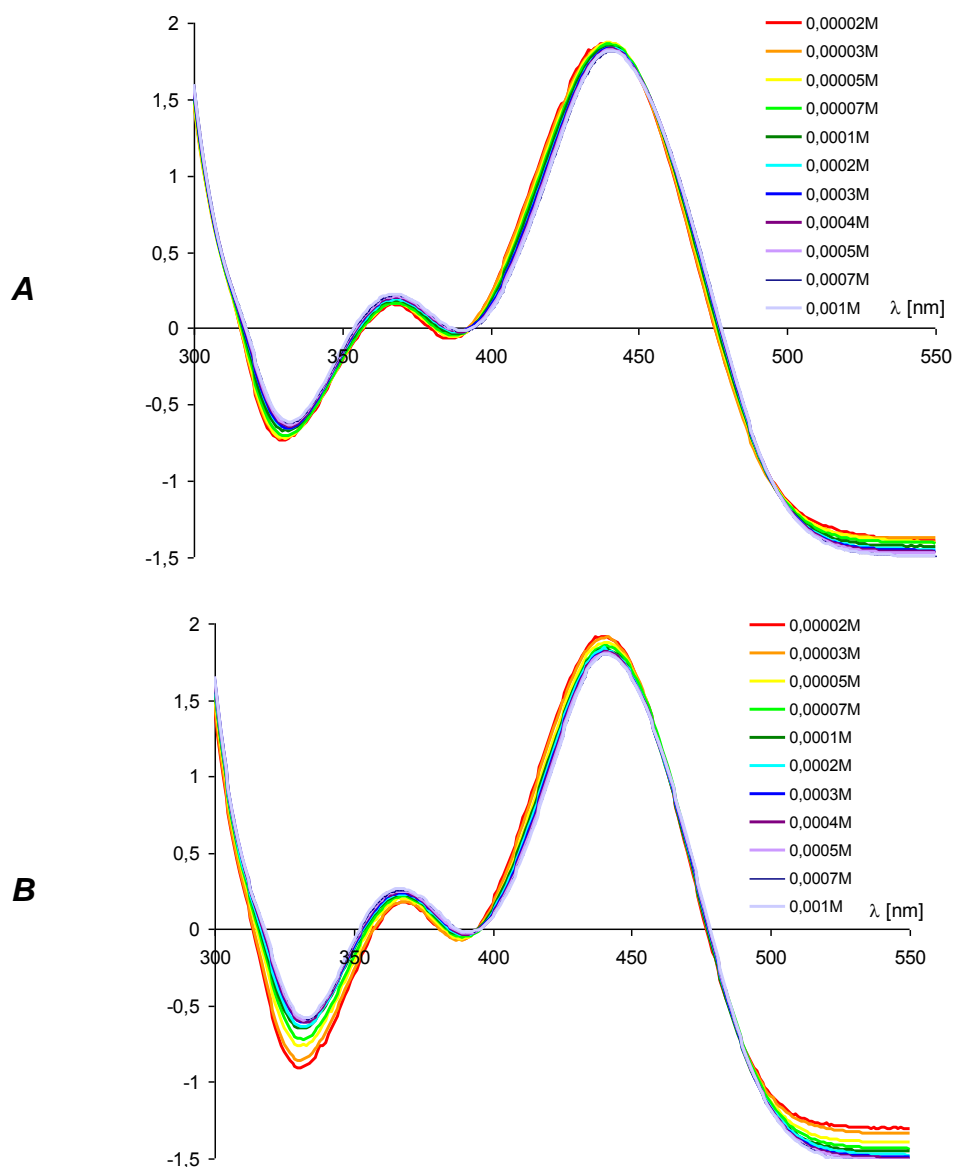
Do uzyskanych zestawów widm zastosowałam iteracyjną procedurę samouzgodnienia, co pozwoliło wyznaczyć widma form spektralnych (charakterystyki widm przedstawione są w Tabeli 6), oszacować wartości ułamków molowych tych form w badanych roztworach oraz obliczyć stałe agregacji. Wyznaczone stałe agregacji wynoszą odpowiednio: dla 5 Mm NaCl $(6,809 \pm 0,602) \cdot 10^3$ [M⁻¹], dla 150 mM NaCl $(8,363 \pm 0,82) \cdot 10^3$ [M⁻¹]. Wartość stałych jest podobna, jak w przypadku pochodnej C-1330, co sugeruje, że pochodne akrydyny posiadające w pozycji 5 pierścienia akrydynowego polarną grupę hydroksylową łatwiej ulegają agregacji w roztworze wodnym, a osłabienie oddziaływania elektrostatycznego w roztworach o dużej sile jonowej potęgują to zjawisko.

Tabela 6. Właściwości spektralne monomeru i agregatu pochodnej C-1371 w buforze Hepses o 5 mM stężeniu NaCl

C-1371	λ_{\max} [nm]	ϵ_{\max} [M ⁻¹ cm ⁻¹]
Monomer	433	3533
Agregat	437	2305

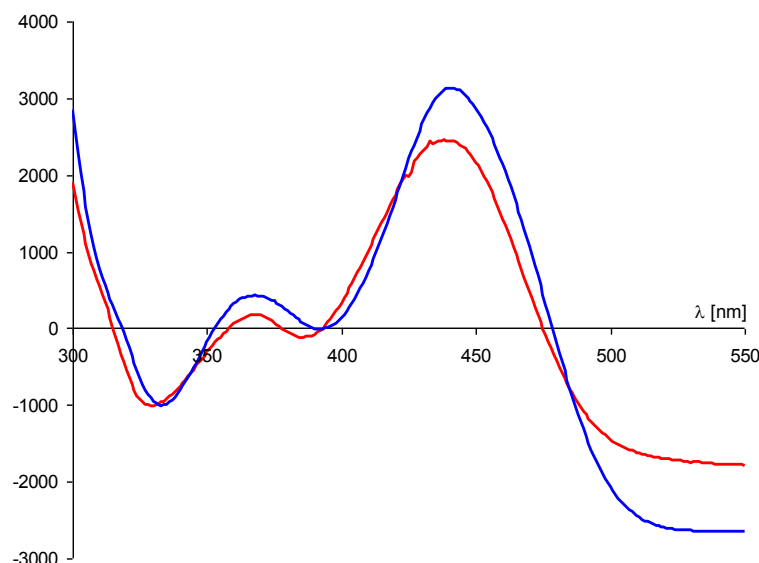
V.1.6. Analiza spektroskopowa agregacji C-1492

Związek C-1492 jest homologiem pochodnej C-1371 zawierającym dłuższy, bo (dimetyloaminopentylo)aminowy łańcuch boczny. Jego widmo (Ryc. 30) posiada dwa maksima w zakresie długofalowym ($\lambda = 367$ nm oraz $\lambda = 442$ nm). W widmach rzeczywistych obserwuje się również dwa punkty izosbestyczne ($\lambda = 392$ nm oraz $\lambda = 463$ nm).



Rycina 30. Zestawy widm standaryzowanych pochodnej C-1492 w buforze Hepes:
A - 5 mM NaCl i B - 150 mM NaCl, pH=7

Analiza głównych składowych i widm resztowych potwierdziła występowanie w zestawach widm jedynie dwóch form spektralnych. Zastosowanie procedury samouzgodnienia widm pozwoliło na wyznaczenie ułamków molowych obydwu form spektralnych w poszczególnych badanych roztworach oraz oszacowanie stałej agregacji. Pozwoliło mi również uzyskać widma monomeru i agregatu, Ryc. 31. Wyznaczona stała agregacji wynosi $K_A = (2,634 \pm 0,291) \cdot 10^3 \text{ [M}^{-1}\text{]}$ dla roztworu z 5 mM NaCl i $K_A = (5,022 \pm 0,644) \cdot 10^3 \text{ [M}^{-1}\text{]}$ dla 150 mM chlorku sodu. W przypadku tej pochodnej zwraca uwagę duża różnica między stałymi agregacji, co świadczy o dużym wpływie oddziaływań elektrostatycznych na proces agregacji.



Rycina 31. Widmo monomeru (linia czerwona) oraz agregatu (linia niebieska) dla związku C-1492 w buforze zawierającym 5 mM NaCl uzyskane metodą samouzgodnienia widm

V.2. Podsumowanie analizy spektroskopowej agregacji pochodnych akrydyny

Analiza spektroskopowa procesu agregacji badanych pochodnych akrydyny pokazała, że wszystkie badane związki ulegają agregacji w roztworach wodnych. We wszystkich przypadkach dwie pierwsze składowe wyjaśniają ok. 99,99% zmienności, a widma resztowe III. IV. i V. rzędu nie wykazują pasm absorpcyjnych, a jedynie zmienność losową.

Porównując uzyskane wartości stałych agregacji dla badanych związków, Tab. 7, można stwierdzić, że budowa chemiczna pochodnych imidazoakrydonu ma wpływ na wartość stałej agregacji. Związki C-1330 i C-1371, które posiadają podstawnik hydroksylowy lub metoksyłowy w pozycji 8 układu imidazoakrydonowego oraz krótki łańcuch boczny wykazują wyższą stałą agregacji niż ich analogi pozbawione takich podstawników (C-1415 i C-1212). Na wartość stałej agregacji ma również wpływ budowa i długość łańcucha bocznego w pozycji 5. Np. wydłużenie łańcucha z 3 (C-1371) do 5 atomów węgla (C-1492) skutkuje wyraźnym spadkiem stałej agregacji.

Charakterystyczny jest również wpływ siły jonowej roztworu na wartość stałej agregacji. Dla związku referencyjnego, proflawiny, nie posiadającego w pH 7 wypadkowego ładunku cząsteczki nie stwierdziłam wpływu siły jonowej roztworu na wartość stałej agregacji. Wpływ taki występuje jednak dla wszystkich badanych pochodnych imidazoakrydonu, których alifatyczna grupa aminowa w łańcuchu bocznym

jest sprotonowana w pH 7. Wartości stałych agregacji tych związków są istotnie większe w roztworach o większej sile jonowej. Wskazuje to, że na proces agregacji ma wpływ odpychanie elektrostatyczne dodatnio naładowanych czasteczek. Te oddziaływania elektrostatyczne maleją wraz ze wzrostem siły jonowej roztworu. Charakterystyczne jest przy tym, że największa różnica w wartościach stałej agregacji występuje dla pochodnej C-1492, w której sprotonowana grupa aminowa jest najbardziej odsunięta od układu imidzoakrydynowego.

Tabela 7. Zestawienie oszacowanych stałych agregacji badanych pochodnych w roztworach o różnej sile jonowej

Związek	$K_A \cdot 10^{-3} [M^{-1}]$	
	5 mM NaCl	150 mM NaCl
Proflawina	1,044 ± 0,165	1,226 ± 0,098
C-1330	6,327 ± 0,218	7,669 ± 0,745
C-1415	1,512 ± 0,077	2,568 ± 0,73
C-1212	4,333 ± 0,246	5,163 ± 0,409
C-1371	6,809 ± 0,602	8,363 ± 0,823
C-1492	2,634 ± 0,291	5,022 ± 0,644

V.3. Analiza termodynamiczna procesu agregacji pochodnych akrydyny

V.3.1. Analiza termodynamiczna procesu agregacji proflawiny

Analizę termodynamiczną rozpoczęłam od badań mikrokalorymetrycznych związku referencyjnego proflawiny. Zbadałam wpływ stężenia soli NaCl oraz temperatury na zjawisko rozpadu agregatów na pojedyncze cząsteczki na skutek rozcieńczania roztworu. Dla każdego badanego układu przeprowadziłam dwie odrębne serie doświadczeń, bowiem na zmiany cieplne obserwowane podczas miareczkowania buforu roztworem związku składać się mogą efekty cieplne dwóch zachodzących jednocześnie procesów: efekt cieplny rozcieńczania roztworu związku buforem oraz efekt cieplny rozcieńczania buforu buforem. We wszystkich badanych układach rozcieńczanie buforu buforem dawało bardzo małe efekty termiczne, dlatego pominęłam je w dalszych rozważaniach.

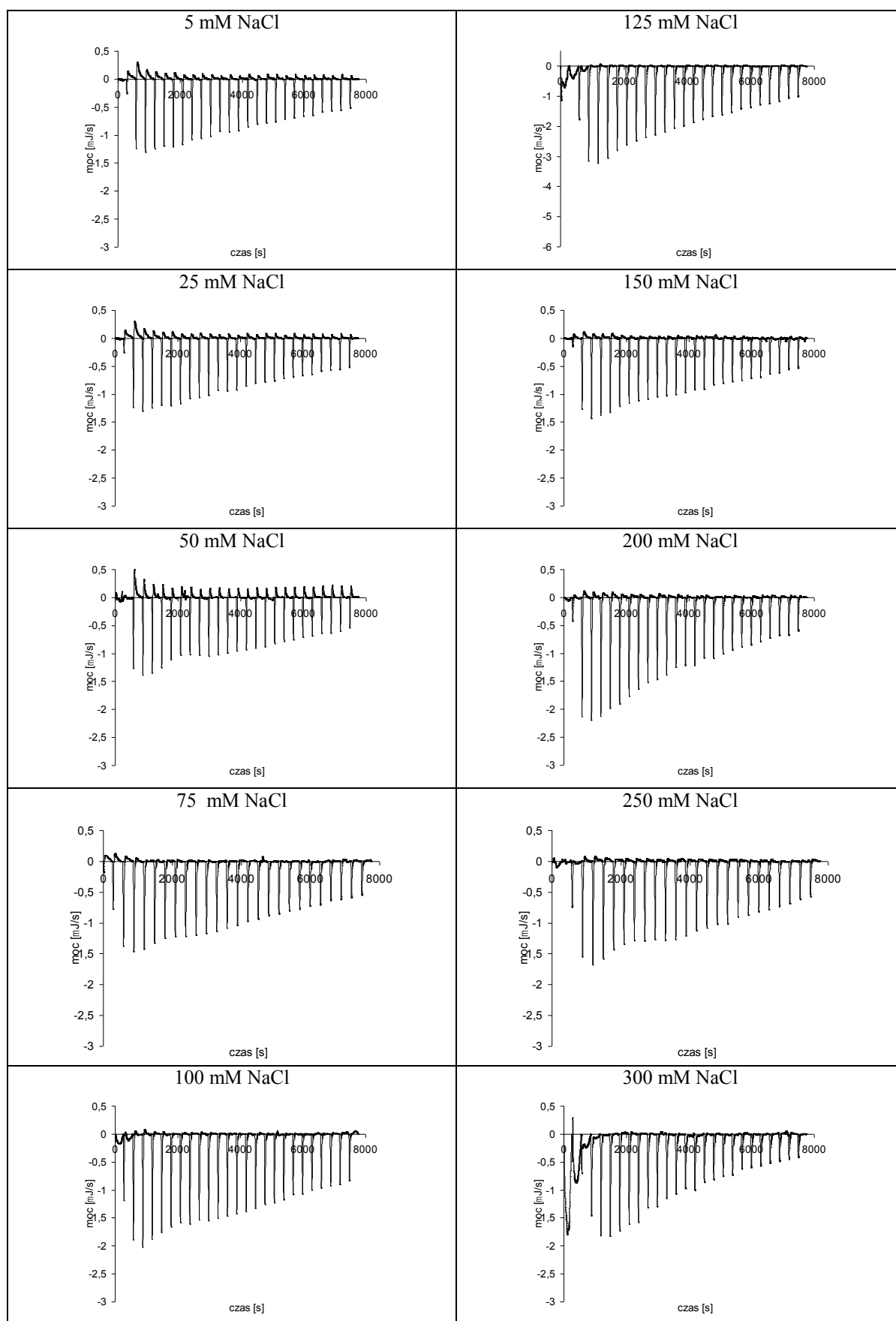
Wyniki uzyskane dla rozcieńczania roztworu związku buforem o różnej sile jonowej (5 mM NaCl, 25 mM NaCl, 50 mM NaCl, 100 mM NaCl, 125 mM NaCl,

150 mM NaCl, 200 mM NaCl, 250 mM NaCl, 300 mM NaCl) w pH 7,0 przedstawiłam na Ryc.32. Podczas badań spektroskopowych roztworów proflawiny o różnym stężeniu stwierdziłam (p. V.1.1), iż związek ten w wyższych stężeniach ma tendencję do tworzenia agregatów. W przypadku badań mikrokalorymetrycznych zaobserwowałam istotny, endotermiczny efekt rozcieńczania roztworu związku buforem. Efekt cieplny towarzyszący kilku pierwszym nastrzykom roztworu barwnika (w porcjach po 10 μ l) do naczynka pomiarowego zawierającego na początku tylko bufor jest najsilniejszy. Jest to związane z początkowo prawie całkowitą deagregacją związku. Efekt ten stopniowo maleje i pod koniec miareczkowania utrzymuje się na mniej więcej na stałym poziomie. W naczynku pomiarowym tworzy się bowiem równowaga pomiędzy formą monomeryczną i zagregowaną i pod koniec miareczkowania stopień rozcieńczania jest zdecydowanie mniejszy niż na początku. Analizując termogramy rozcieńczania w buforach o różnej zawartości soli NaCl można zauważyć, że wraz ze wzrostem siły jonowej buforu, obserwujemy nieznaczny wzrost efektów termicznych w początkowej fazie doświadczenia (z 5 kJ/mol dla buforu z 5 mM NaCl do 7 kJ/mol dla buforu z 200-300 mM NaCl). Wszystkie zarejestrowane termogramy (Ryc. 32) mają charakter monotoniczny, co świadczy o zachodzeniu w naczynku pomiarowym tylko jednego procesu.

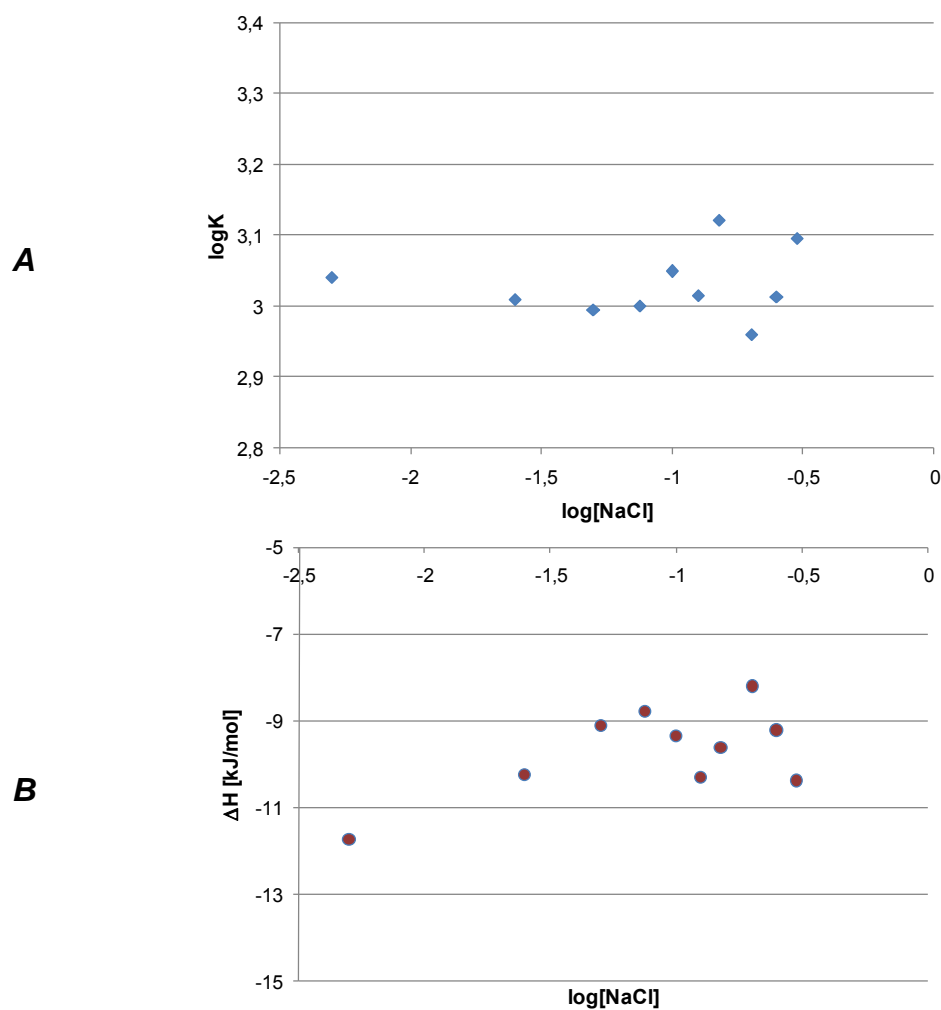
Na podstawie zmierzonych efektów cieplnych oraz wykorzystując opracowany wcześniej model agregacji (p. VI.5.5.) wyznaczyłam stałą agregacji oraz zmianę entalpii towarzyszące temu procesowi w każdym z wyżej zaprezentowanych układów. Zebrane wyniki dla wszystkich buforów przedstawiłam na Ryc. 33. i w Tab. 8.

Z przedstawionych danych można wnioskować, że siła jonowa buforu nie ma wpływu na stałą agregacji proflawiny. Jest to zgodne z wynikiem uzyskanym metodą spektroskopową (p. V.1.1). Ujemna wartość zmiany entalpii procesu, ΔH , świadczy o tym, że reakcja jest egzotermiczna we wszystkich badanych warunkach. Efekt cieplny wydaje się przy tym wzrastać wraz ze wzrostem siły jonowej buforu, przynajmniej w zakresie stężenia soli od 25 do 300 mM.

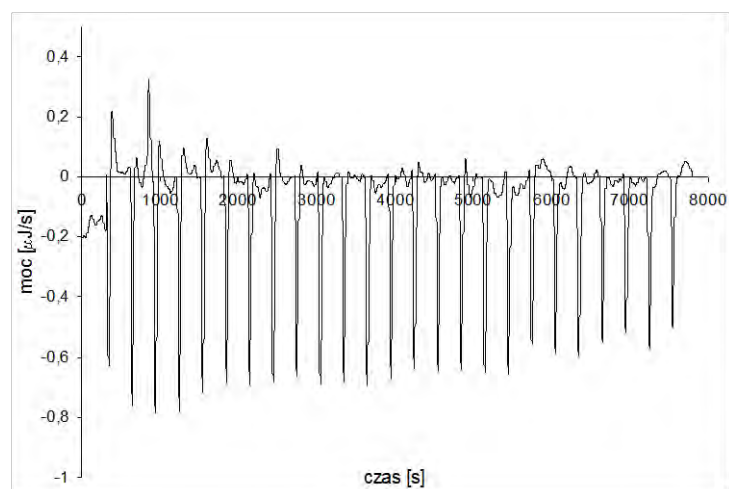
Zbadałam również wpływ temperatury na przebieg procesu deagregacji proflawiny. W temperaturze 35°C (Ryc. 34) w przebiegu termogramu obserwujemy praktycznie stały efekt endotermiczny, towarzyszący kolejnym nastrzykom. Jest on prawdopodobnie związany ze zwykłym rozcieńczaniem miareczkowanego związku. W tej sytuacji określenie parametrów termodynamicznych deagregacji było niemożliwe.



Rycina 32. Miareczkowanie mikrokalorymetryczne buforu HEPES o różnej sile jonowej proflawiną o stężeniu 1 mM, 25°C, pH 7,0.



Rycina 33. Wykresy zależności: A – logarytmu ze stałej agregacji, B – zmiany entalpii od logarytmu ze stężenia chlorku sodu dla proflawiny we wszystkich badanych buforach



Rycina 34. Miareczkowanie mikrokalorymetryczne buforu Hepes proflawiną o stężeniu 1 mM, pH 7,0, w temperaturze 35°C. Miareczkowanie nastrzykami po 10 μ l roztworu barwnika.

Na podstawie uzyskanych danych wyznaczyłam resztę parametrów termodynamicznych procesu w każdym z wyżej zaprezentowanych miareczkowań (Tabela 8). Agregacji towarzyszy wzrost entropii układu i jest on prawdopodobnie siłą napędową tego procesu. Wobec znacznych efektów cieplnych wzrost ten przekłada się na spadek entalpii swobodnej. Na podstawie wartości parametrów termodynamicznych przedstawionych w Tabeli 8. stwierdziłam, iż proces rozpadu zagregowanej formy proflawiny nie jest zależny od siły jonowej buforu, natomiast podwyższenie temperatury do 35°C całkowicie zaburza ten proces.

Tabela 8. Parametry termodynamiczne procesu agregacji proflawiny w buforach o różnym składzie.

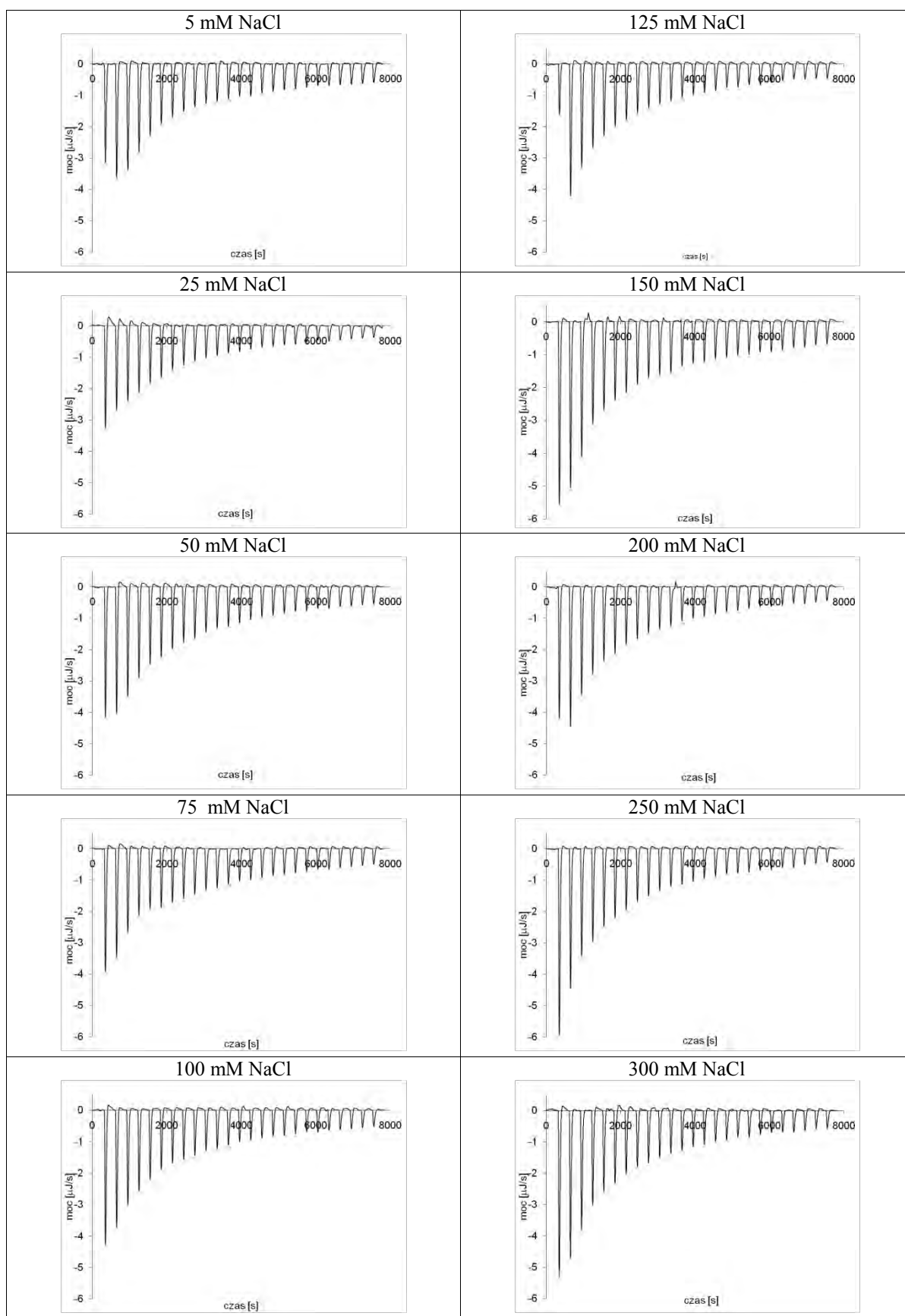
Parametry procesu	$K_A \cdot 10^{-3} [M^{-1}]$	$\Delta H [kJ/mol]$	$\Delta G [kJ/mol]$	$T\Delta S [kJ/mol]$
5 mM NaCl, 25°C, pH 7	(1,10 ± 0,1)	(-11,75 ± 1,1)	(-17,35 ± 0,09)	(5,60 ± 1,2)
25 mM NaCl, 25°C, pH 7	(1,02 ± 0,09)	(-10,25 ± 1,5)	(-17,17 ± 0,09)	(6,92 ± 1,6)
50 mM NaCl, 25°C, pH 7	(0,98 ± 0,08)	(-9,12 ± 1,0)	(-17,09 ± 0,08)	(7,96 ± 1,1)
75 mM NaCl, 25°C, pH 7	(1,0 ± 0,07)	(-8,79 ± 0,91)	(-17,12 ± 0,07)	(8,33 ± 1,0)
100 mM NaCl, 25°C, pH 7	(1,12 ± 0,11)	(-9,36 ± 0,92)	(-17,40 ± 0,1)	(8,03 ± 1,0)
125 mM NaCl, 25°C, pH 7	(1,03 ± 0,10)	(-10,32 ± 1,2)	(-17,20 ± 0,1)	(6,88 ± 1,3)
150 mM NaCl, 25°C, pH 7	(1,32 ± 0,11)	(-9,62 ± 1,0)	(-17,81 ± 0,08)	(8,19 ± 1,1)
200 mM NaCl, 25°C, pH 7	(0,91 ± 0,1)	(-8,21 ± 0,91)	(-16,89 ± 0,1)	(8,68 ± 1,01)
250 mM NaCl, 25°C, pH 7	(1,03 ± 0,09)	(-9,22 ± 0,98)	(-17,19 ± 0,09)	(7,98 ± 1,1)
300 mM NaCl, 25°C, pH 7	(1,25 ± 0,12)	(-10,39 ± 1,0)	(-17,67 ± 0,1)	(7,30 ± 1,1)
25 mM NaCl, 35°C, pH 7	(0,12 ± 0,02)	nw	nw	nw

nw - nie wyznaczone

V.3.2. Analiza termodynamiczna procesu agregacji pochodnej C-1330

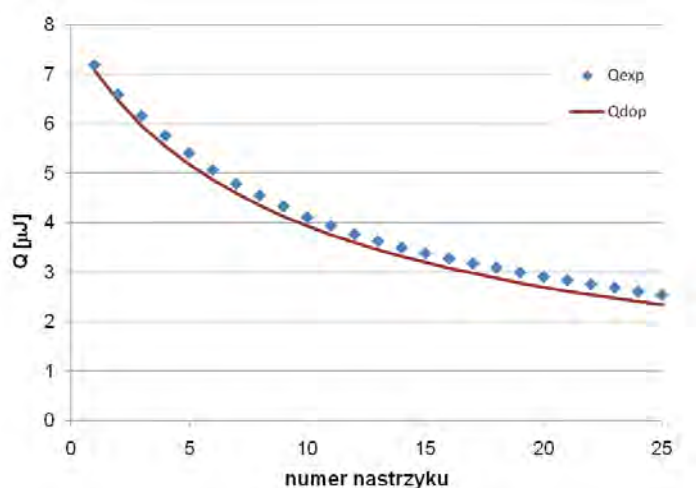
Z badań spektroskopowych pochodnej C-1330 (p. V.1.2) wynika, iż związek w wyższych stężeniach ma tendencję do tworzenia agregatów. Badania mikrokalorymetryczne przeprowadziłam zgodnie z procedurą opisaną w punkcie IV.5.4. Zbadałam wpływ stężenia soli (NaCl) na proces rozpadu agregatów na cząsteczki

monomeru. Wyniki uzyskane dla rozcieńczania roztworu związku o stężeniu 2 mM buforem o różnej sile jonowej (5 mM NaCl, 25 mM NaCl, 50 mM NaCl, 100 mM NaCl, 125 mM NaCl, 150 mM NaCl, 200 mM NaCl, 250 mM NaCl, 300 mM NaCl) w temperaturze 25°C, pH 7,0 przedstawiłam na Ryc. 35. Efekt cieplny towarzyszący kilku pierwszym nastrzykom roztworu związku do buforu z 5 mM NaCl (w porcjach po 10 µl) jest rzędu 7 kJ/mol. Jest on związany z początkowo silną deagregacją związku. Efekt ten stopniowo maleje i na końcu utrzymuje się mniej więcej na stałym poziomie, tworzy się bowiem równowaga pomiędzy formą monomeryczną i zagregowaną. Analizując termogramy rozcieńczania w buforach o różnej zawartości soli NaCl można zauważyć, że wraz ze wzrostem siły jonowej buforu, obserwujemy wzrost efektu termicznego w początkowej fazie doświadczenia (z 7 kJ/mol dla buforu z 5 mM NaCl do 10 kJ/mol dla buforu z 300 mM NaCl).



Rycina 35. Miareczkowanie mikrokalorymetryczne buforu HEPES o różnej sile jonowej pochodną C-1330 o stężeniu 2 mM, 25°C, pH 7,0.

Zarejestrowane termogramy scałkowałam oddzielnie dla każdego nastrzyku uzyskując wartości efektów cieplnych wywołanych przez każdy z nich. Na podstawie uzyskanych efektów cieplnych oraz wykorzystując opracowany wcześniej model agregacji (p.IV.5.5.) wyznaczyłam stałą agregacji oraz zmianę entalpii towarzyszące temu procesowi w każdym z wyżej zaprezentowanych miareczkowań. Przykładowy wynik dopasowania modelu do danych eksperymentalnych przedstawiłam na Ryc.36.

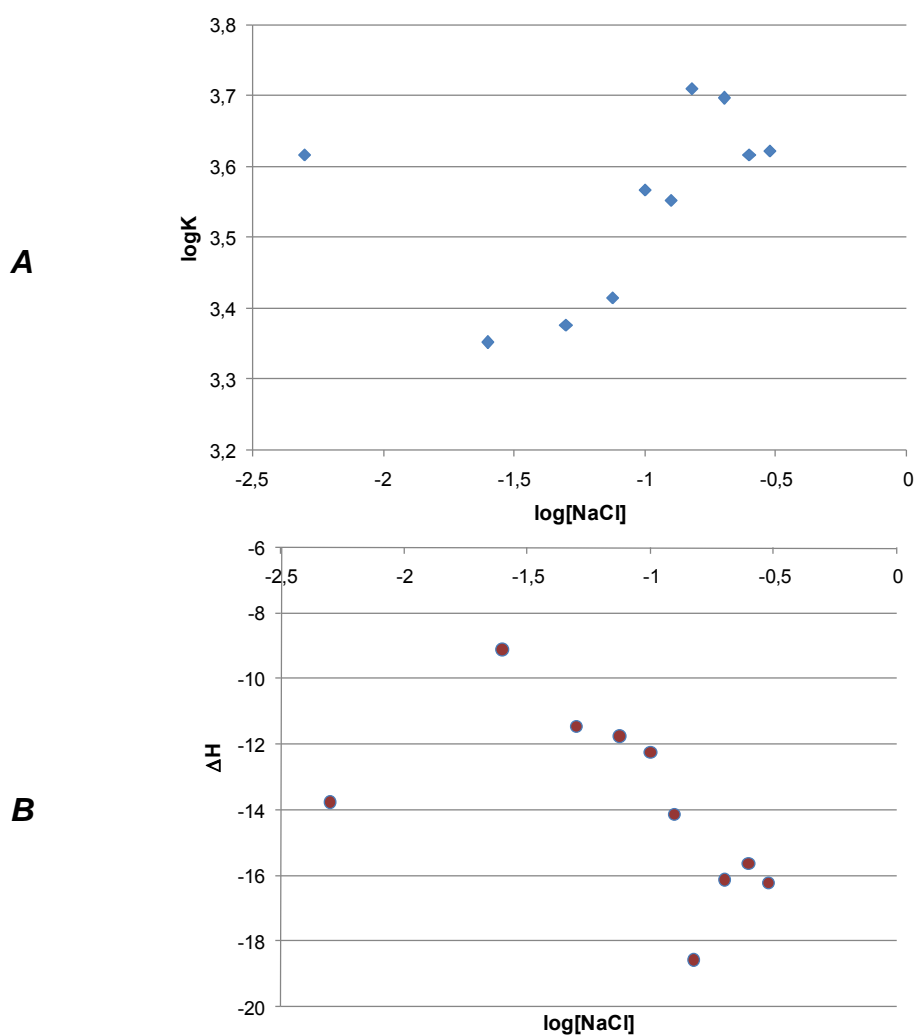


Rycina 36. Dopasowanie modelu do danych eksperymentalnych dla 2 mM C-1330, w buforze HEPES, 25 mM NaCl

Zebrane wyniki dla wszystkich buforów przedstawiłam na Ryc. 37. Z przedstawionych danych, można wnioskować, że siła jonowa buforu ma wpływ na agregację związku C-1330. Począwszy od buforu z 25 mM chlorkiem sodu do buforu ze 150 mM NaCl wraz ze wzrostem siły jonowej wzrasta również stała agregacji związku, co świadczy o tym, że oddziaływania elektrostatyczne mają wpływ na agregację pochodnej C-1330. Dla buforów o wyższej zawartości soli stała agregacji utrzymuje się już na tym samym poziomie. Punktem odbiegającym od reszty jest zarówno stała agregacji jak i zmiana entalpii dla reakcji w buforze niskosolnym (Rys. 37 A i B). Może być to spowodowane obecnością dodatkowych oddziaływań zachodzących w tych warunkach, lub inną strukturą związku powstającego agregatu.

Zbadałam również wpływ zmiany temperatury na przebieg miareczkowania. W wyższej temperaturze (35°C) dochodzi do zmiany profilu efektów termicznych, nie ma tak bardzo widocznego etapu ustabilizowania się przebiegu. W tej temperaturze nadal obserwuje się zjawisko deagregacji związku w czasie miareczkowania. Na podstawie termogramów wnioskuję, że proces agregacji pochodnej C-1330 zachodzi również w wyższej temperaturze, jednak jest on zdecydowanie słabszy.

Na podstawie uzyskanych danych wyznaczyłam resztę parametrów termodynamicznych towarzyszących temu procesowi w każdym z wyżej zaprezentowanych miareczkowań (Tabela 9). Agregacji C-1330 towarzyszy w temperaturze 25°C wyraźny wzrost entropii układu. Jednak sytuacja zmienia się w temperaturze 35°C: oszacowana wartość zmiany entropii jest praktycznie równa zero. Wskazuje to, że w tych warunkach siłą napędową procesu są jedynie efekty energetyczne oddziaływań międzycząsteczkowych.



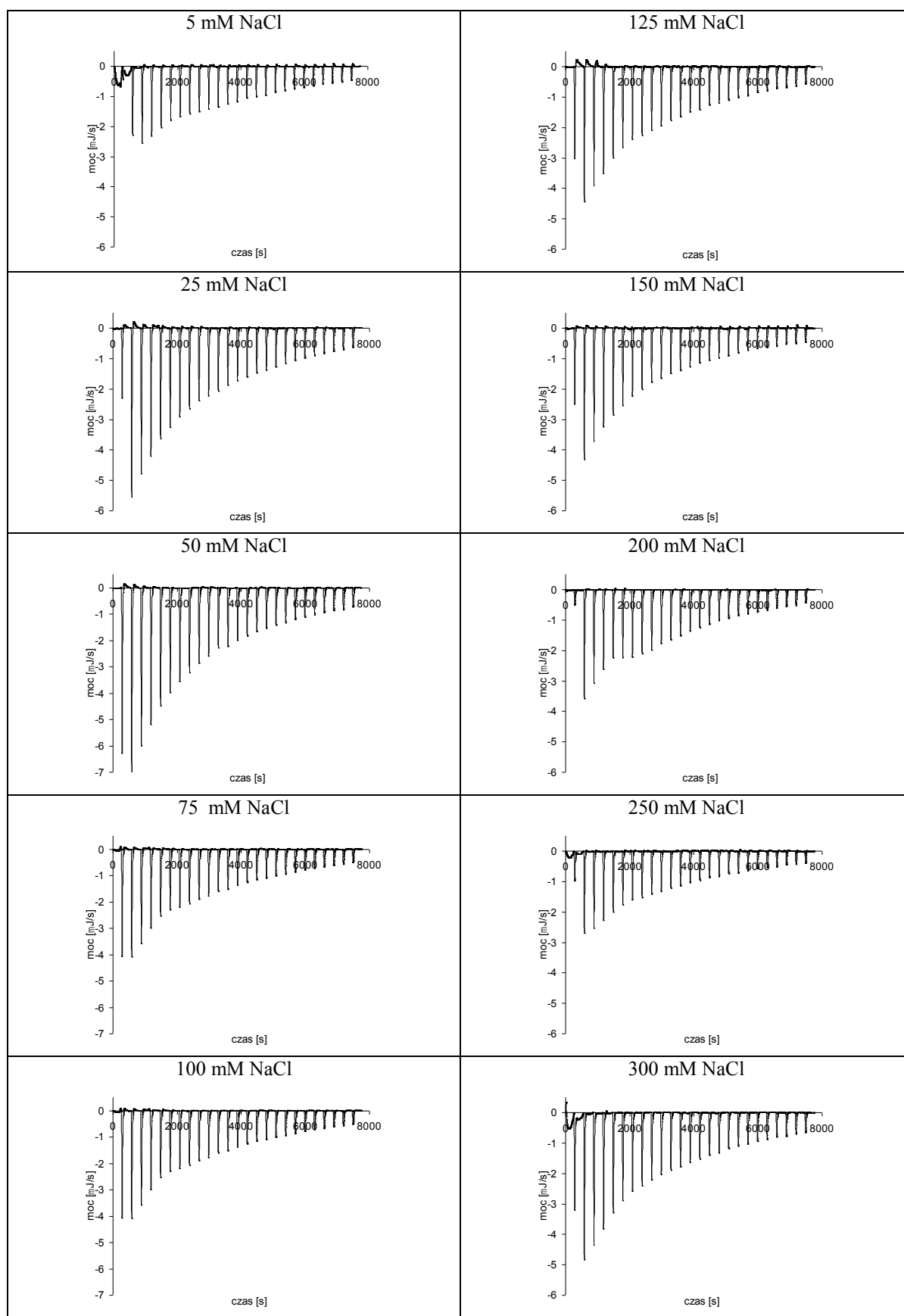
Rycina 37. Wykresy zależności: A – logarytmu ze stałej agregacji, B – zmiany entalpii od logarytmu ze stężenia chlorku sodu dla wszystkich badanych buforów.

Tabela 9. Parametry termodynamiczne procesu agregacji pochodnej C-1330 w buforach o różnym składzie.

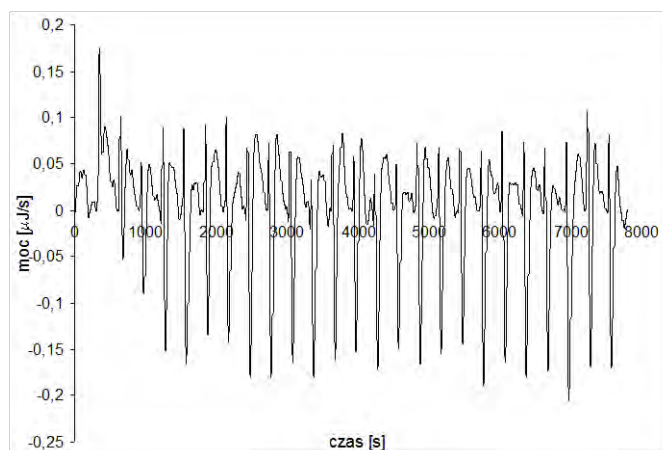
Parametry procesu	$K_A \cdot 10^{-3} [M^{-1}]$	$\Delta H [kJ/mol]$	$\Delta G [kJ/mol]$	$T\Delta S [kJ/mol]$
5 mM NaCl, 25°C, pH 7	(4,14 ± 0,01)	(-13,75 ± 0,1)	(-20,64 ± 0,002)	(6,88 ± 0,102)
25 mM NaCl, 25°C, pH 7	(2,25 ± 0,02)	(-9,12 ± 0,6)	(-19,13 ± 0,008)	(10,1 ± 0,608)
50 mM NaCl, 25°C, pH 7	(2,38 ± 0,03)	(-11,45 ± 0,1)	(-19,27 ± 0,08)	(7,82 ± 0,18)
75 mM NaCl, 25°C, pH 7	(2,59 ± 0,01)	(-11,75 ± 0,3)	(-19,48 ± 0,004)	(7,74 ± 0,304)
100 mM NaCl, 25°C, pH 7	(3,70 ± 0,01)	(-12,25 ± 0,4)	(-20,36 ± 0,003)	(8,11 ± 0,403)
125 mM NaCl, 25°C, pH 7	(3,57 ± 0,009)	(-14,15 ± 0,15)	(-20,27 ± 0,002)	(6,12 ± 0,152)
150 mM NaCl, 25°C, pH 7	(5,15 ± 0,1)	(-18,57 ± 0,9)	(-21,17 ± 0,001)	(2,60 ± 0,901)
200 mM NaCl, 25°C, pH 7	(4,98 ± 0,02)	(-16,13 ± 0,12)	(-21,09 ± 0,005)	(4,96 ± 0,125)
250 mM NaCl, 25°C, pH 7	(4,15 ± 0,03)	(-15,6 ± 0,18)	(-20,64 ± 0,01)	(5,0 ± 0,19)
300 mM NaCl, 25°C, pH 7	(4,20 ± 0,01)	(-16,3 ± 0,36)	(-20,67 ± 0,01)	(4,45 ± 0,37)
25 mM NaCl, 35°C, pH 7	(1,21 ± 0,1)	(-17,5 ± 0,21)	(-17,59 ± 0,1)	(0,09 ± 0,31)

V.3.3. Analiza termodynamiczna procesu agregacji pochodnej C-1415

Kolejnym analizowanym związkiem była pochodna C-1415. Dla tego związku przeprowadziłam analogiczne doświadczenia mikrokalorymetryczne jak dla związków poprzednich. Proces rozcieńczania roztworu tego związku wykazuje silny charakter endotermiczny. Jednak efekty cieplne są mniejsze niż dla pochodnej C-1330. Otrzymane termogramy przedstawione zostały na Ryc. 38. Analizowałam również wpływ zmiany temperatury na przebieg miareczkowania. W wyższej temperaturze (35°C) dochodzi do całkowitej zmiany profilu termodynamicznego (Ryc. 39). Nie obserwuje się w ogóle efektów cieplnych w początkowej fazie eksperymentu.

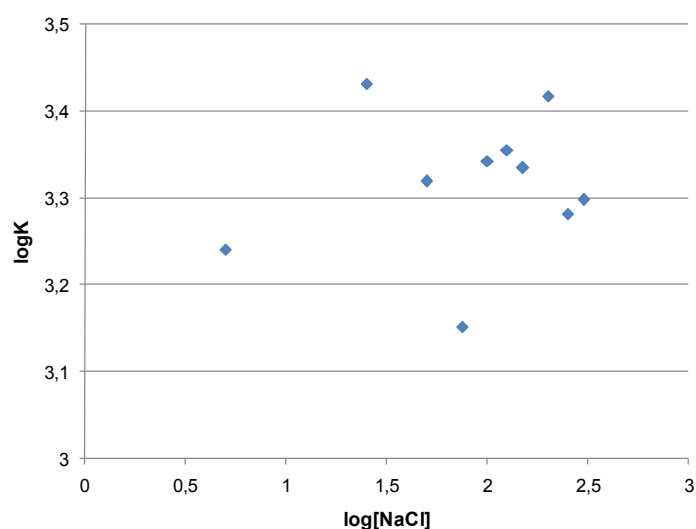


Rycina 38. Miareczkowanie mikrokalorymetryczne buforu HEPES o różnej sile jonowej pochodną C-1415 o stężeniu 2 mM, 25°C, pH 7,0.



Rycina 39. Miareczkowanie mikrokalorymetryczne buforu Hepes pochodną C-1415 o stężeniu 2 mM, pH 7,0, w temperaturze 35°C. Miareczkowanie nasyzkami po 10 μ l roztworu związku.

Oszacowane stałe agregacji oraz parametry termodynamiczne przedstawiłam w Tabeli 10. Wraz ze wzrostem siły jonowej roztworu wzrasta nieznacznie stała agregacji (Ryc. 40). Dla reakcji przy wyższej temperaturze nie udało mi się wyznaczyć stałych termodynamicznych ponieważ całkowicie zaburzony został termogram reakcji rozcieńczania. Ciepło molowe reakcji oraz stałe agregacji są niższe niż w przypadku pochodnej C-1330.



Rycina 40. Wykresy zależności logarytmu ze stałej agregacji od logarytmu ze stężenia chlorku sodu dla wszystkich badanych buforów

Tabela 10. Parametry termodynamiczne procesu agregacji pochodnej C-1415 w buforach o różnym składzie.

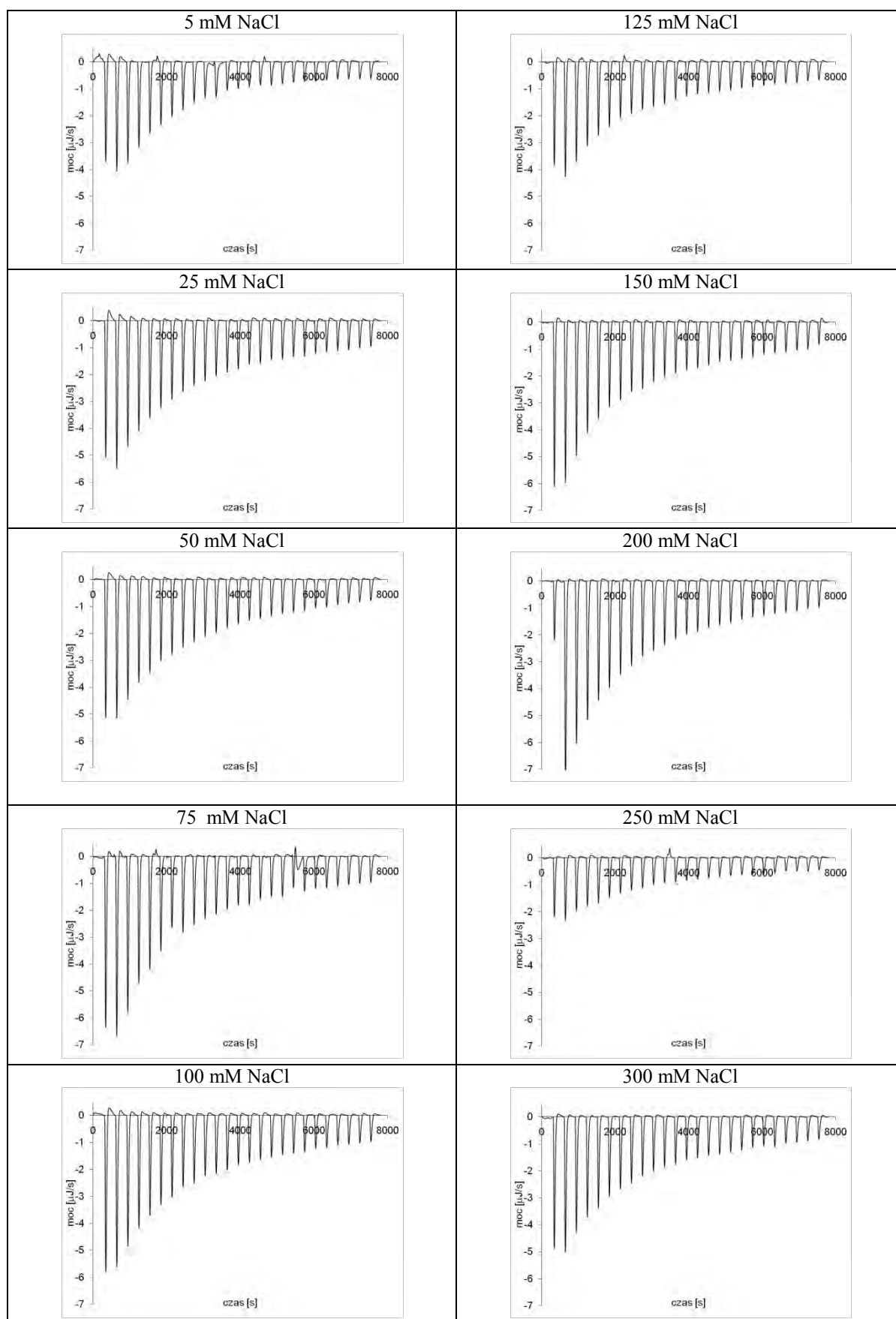
Parametry procesu	$K_A \cdot 10^{-3} [M^{-1}]$	$\Delta H [kJ/mol]$	$\Delta G [kJ/mol]$	$T\Delta S [kJ/mol]$
5 mM NaCl, 25°C, pH 7	(1,74 ± 0,1)	(-9,12 ± 0,1)	(-18,49 ± 0,2)	(6,88 ± 0,3)
25 mM NaCl, 25°C, pH 7	(2,70 ± 0,2)	(-10,1 ± 0,2)	(-19,58 ± 0,06)	(10,1 ± 0,26)
50 mM NaCl, 25°C, pH 7	(2,08 ± 0,6)	(-7,23 ± 0,3)	(-18,94 ± 0,4)	(7,82 ± 0,7)
75 mM NaCl, 25°C, pH 7	(1,41 ± 0,3)	(-9,12 ± 0,8)	(-17,98 ± 0,04)	(7,74 ± 0,84)
100 mM NaCl, 25°C, pH 7	(2,20 ± 0,1)	(-8,73 ± 0,9)	(-19,07 ± 0,3)	(8,11 ± 1,2)
125 mM NaCl, 25°C, pH 7	(2,27 ± 0,08)	(-5,36 ± 0,1)	(-19,14 ± 0,1)	(6,12 ± 0,2)
150 mM NaCl, 25°C, pH 7	(2,16 ± 0,1)	(-10,89 ± 0,3)	(-19,03 ± 0,001)	(2,60 ± 0,301)
200 mM NaCl, 25°C, pH 7	(2,61 ± 0,3)	(-8,41 ± 1,0)	(-19,50 ± 1,2)	(4,96 ± 2,2)
250 mM NaCl, 25°C, pH 7	(1,91 ± 0,05)	(-5,45 ± 0,7)	(-18,73 ± 0,3)	(5,0 ± 1,0)
300 mM NaCl, 25°C, pH 7	(1,98 ± 0,1)	(-10,86 ± 0,6)	(-18,82 ± 0,2)	(4,45 ± 0,8)
25 mM NaCl, 35°C, pH 7	nw	nw	nw	nw

nw – nie wyznaczone

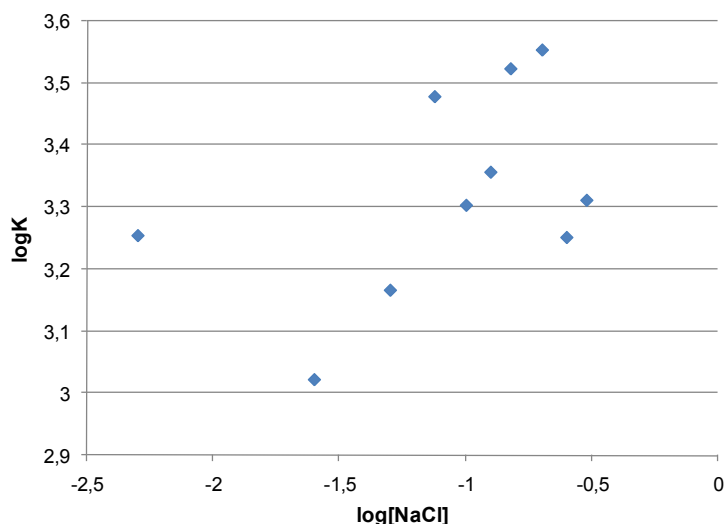
V.3.4. Analiza termodynamiczna procesu agregacji pochodnej C-1212

Analizę mikrokalorymetryczną pochodnej C-1212 przeprowadziłam analogicznie jak powyżej opisaną pochodną. Miareczkowanie wykonałam w dziesięciu buforach różniących się stężeniem NaCl. Termogramy przedstawiłam na Rys.41. Proces rozcieńczania roztworu tego związku wykazuje silny charakter endotermiczny. Efekt cieplny towarzyszący kilku pierwszym nastrzykom związku do buforu z 5 mM NaCl (w porcjach po 10 μ l) jest rzędu 7 kJ/mol. Wzrost stężenia soli w buforze powoduje większe efekty termiczne początkowego etapu reakcji odpowiedzialnego za proces deagregacji (rzędu 11 kJ/mol dla 200 mM NaCl). Przebieg reakcji w wyższej temperaturze ma również charakter monotoniczny, jednak ciepła reakcji są tu znacznie mniejsze.

Na podstawie uzyskanych efektów cieplnych oraz wykorzystując opracowany wcześniej model agregacji (p.IV.5.5) wyznaczyłam stałą agregacji. Zebrane wyniki dla wszystkich buforów prezentuję na Ryc. 42. Wyraźnie zauważalny jest wzrost stałej agregacji wraz ze wzrostem siły jonowej buforu w przedziale stężeń NaCl od 25 do 300 mM. Dla buforu niskojonowego (5 mM NaCl) znowu obserwuje się wyraźne odstępstwo od tego trendu.



Rycina 41. Miareczkowanie mikrokalorymetryczne buforu HEPES o różnej sile jonowej pochodną C-1212 o stężeniu 2 mM, 25°C, pH 7,0.



Rycina 42. Wykres zależności logarytmu ze stałej agregacji od logarytmu ze stężenia chlorku sodu dla związku C-1212

Oszacowane parametry termodynamiczne procesu agregacji przedstawiłam w Tabeli 11. Na uwagę zasługuje spadek entropii procesu w podwyższonej temperaturze.

Tabela 11. Parametry termodynamiczne procesu agregacji pochodnej C-1212 w buforach o różnym składzie.

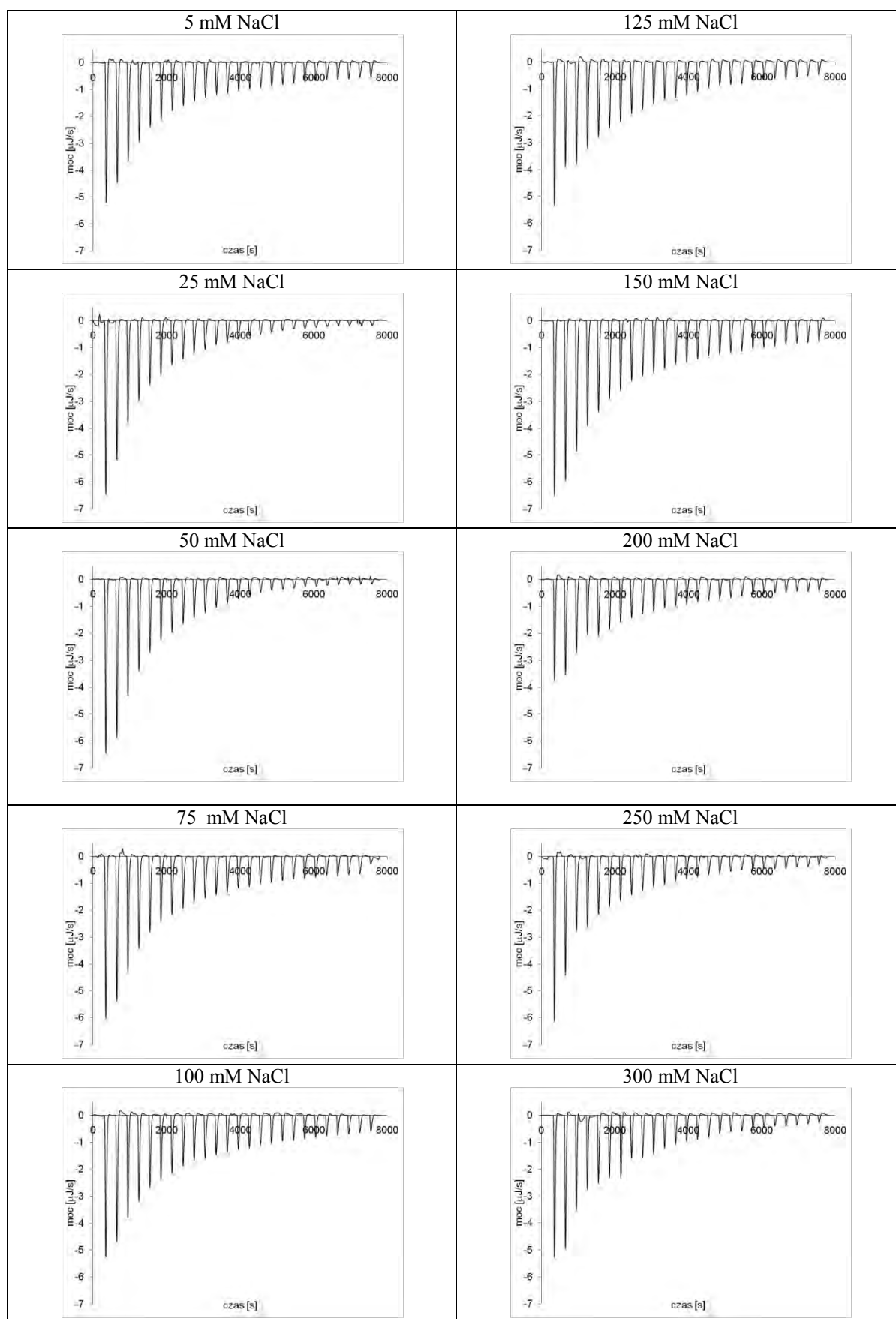
Parametry procesu	$K_A \cdot 10^{-3} [M^{-1}]$	$\Delta H [kJ/mol]$	$\Delta G [kJ/mol]$	$T\Delta S [kJ/mol]$
5 mM NaCl, 25°C, pH 7	(1,79 ± 0,2)	(-14,63 ± 0,2)	(-18,57 ± 0,1)	(3,94 ± 0,3)
25 mM NaCl, 25°C, pH 7	(1,05 ± 0,1)	(-17,33 ± 0,2)	(-17,24 ± 0,08)	(-0,09 ± 0,28)
50 mM NaCl, 25°C, pH 7	(1,47 ± 0,05)	(-15,07 ± 0,2)	(-18,07 ± 0,2)	(2,99 ± 0,4)
75 mM NaCl, 25°C, pH 7	(3,01 ± 0,3)	(-20,33 ± 0,2)	(-19,84 ± 0,05)	(-0,48 ± 0,25)
100 mM NaCl, 25°C, pH 7	(2,01 ± 0,2)	(-16,2 ± 1,0)	(-18,85 ± 0,3)	(2,65 ± 1,3)
125 mM NaCl, 25°C, pH 7	(2,27 ± 0,12)	(-12,31 ± 1,3)	(-19,15 ± 1,1)	(6,84 ± 2,4)
150 mM NaCl, 25°C, pH 7	(3,33 ± 0,31)	(-17,65 ± 0,2)	(-20,10 ± 0,09)	(2,46 ± 0,29)
200 mM NaCl, 25°C, pH 7	(3,57 ± 0,32)	(-26,59 ± 1,9)	(-20,27 ± 0,3)	(-6,31 ± 2,2)
250 mM NaCl, 25°C, pH 7	(1,78 ± 0,18)	(-7,11 ± 0,7)	(-18,55 ± 1,1)	(11,44 ± 1,8)
300 mM NaCl, 25°C, pH 7	(2,05 ± 0,2)	(-15,98 ± 1,2)	(-18,89 ± 0,5)	(2,91 ± 1,7)
25 mM NaCl, 35°C, pH 7	(1,1 ± 0,2)	(-6,12 ± 0,1)	(-0,24 ± 0,02)	(-5,88 ± 0,102)

V.3.5. Analiza termodynamiczna procesu agregacji pochodnej C-1371

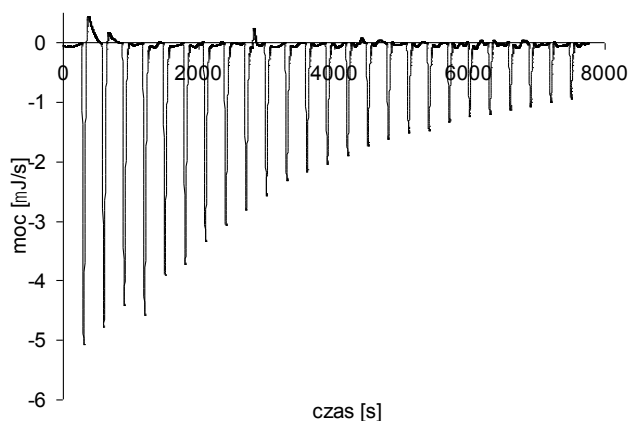
Imidazoakrydon C-1371 jest pochodną związku C-1212 posiadającą dodatkową grupę hydroksylową w pozycji 8 pierścienia akrydynowego. Tak dołączona grupa hydroksylowa stwarza dodatkową możliwość do tworzenia wiązań między molekułami w roztworze. Na Ryc.43. przedstawiłam termogramy uzyskane dla miareczkowań związku w buforach o różnej sile jonowej (5 mM NaCl – 300 mM NaCl) w temperaturze 25°C, pH 7,0. Dla imidazoakrydonu C-1371 wszystkie miareczkowania mają przebieg monotoniczny świadczący o deagregacji związku do buforu. Proces rozcieńczania wykazuje silny charakter endotermiczny, przy czym dla kilku początkowych nastrzyków w kolejnych buforach jest on rzędu 10 kJ/mol.

Wszystkie przebiegi są monotoniczne, jednak w przypadku reakcji w podwyższonej temperaturze (Ryc. 44), można zauważyć wolniejszy efekt końcowej stabilizacji reakcji deagregacji. Co można tłumaczyć tym, że podczas całego eksperymentu mamy do czynienia z deagregacją związku, a nie jak w przypadku dwóch wcześniejszych miareczkowań, gdzie deagregacji zachodziła tylko w początkowej fazie doświadczenia.

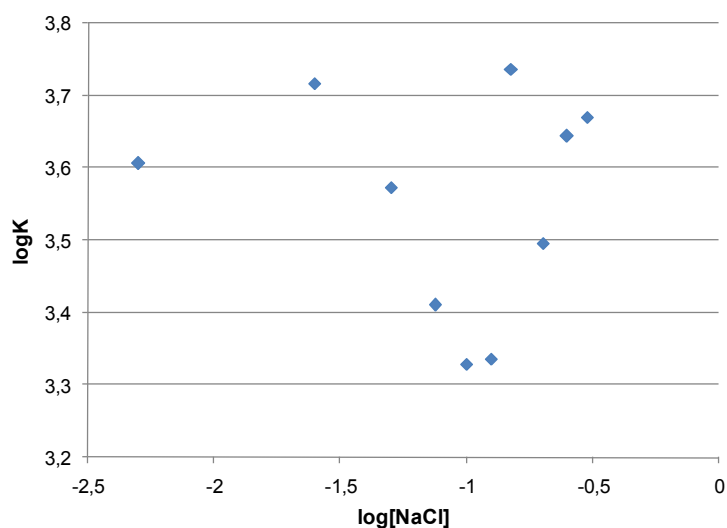
Analizując oszacowane stałe agregacji (Ryc. 45, Tabela 12) można zauważyć, że przebieg zmian tego parametru agregacji dla związku C-1371 jest odmienny od wcześniej badanych związków. Wraz ze wzrostem stężenia soli w przedziale 25 mM NaCl – 125 mM NaCl obserwuje się spadek stałej agregacji, natomiast dla kolejnych stężeń soli jej wzrost.



Rycina 43. Miareczkowanie mikrokalorymetryczne buforu HEPES o różnej sile jonowej pochodną C-1371 o stężeniu 2 mM, 25°C, pH 7,0.



Rycina.44. Miareczkowanie mikrokalorymetryczne buforu Hepes pochodną C-1371 o stężeniu 2 mM, pH 7,0, w temperaturze 35°C. Miareczkowanie nastrzykami po 10 μ l roztworu związku.



Rycina 45. Wykres zależności logarytmu ze stężenia chlorku sodu od logarytmu ze stałej agregacji dla związku C-1371

Uzyskane wartości parametrów termodynamicznych procesu przedstawiłam w Tabeli 12. Widać wyraźny wpływ siły jonowej na wartości parametrów, co świadczy o tym, że oddziaływania elektrostatyczne mają wpływ na agregację pochodnej C-1371. Na uwagę zasługuje zmiana znaku członu entropowego dla roztworów o stężeniu soli powyżej 50 mM. Może to tłumaczyć niemonotoniczny przebieg zmian wartości stałej agregacji wraz ze wzrostem siły jonowej.

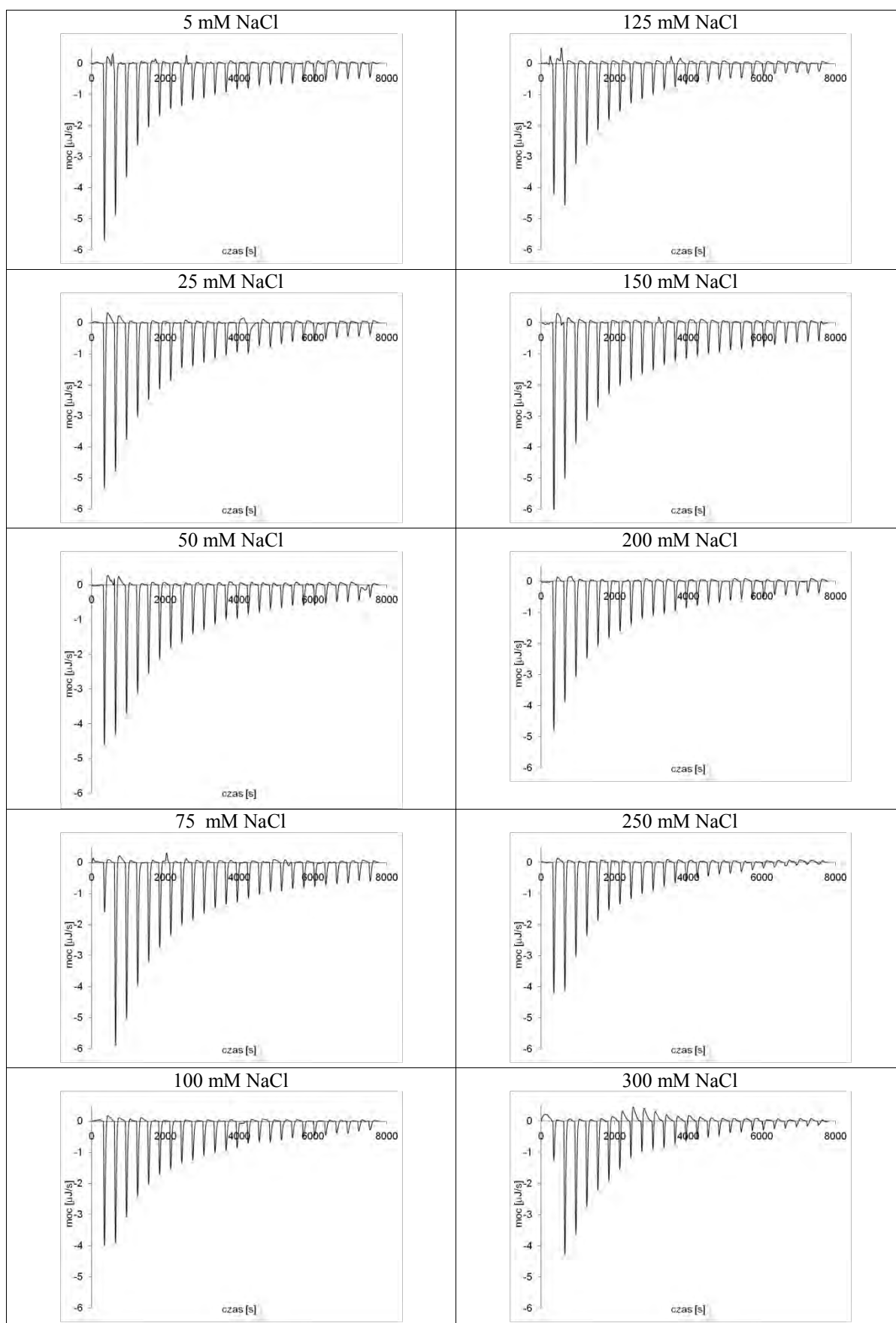
Natomiast wzrost temperatury pomiaru osłabia zdolność C-1371 do tworzenia agregatów, jednak zjawisko to zachodzi. Procesowi agregacji w tych warunkach towarzyszy dodatni przyrost entropii (odmiennie niż w temp. 25°C), chociaż jest on niewielki.

Tabela.12. Parametry termodynamiczne procesu agregacji pochodnej C-1371 w buforach o różnym składzie.

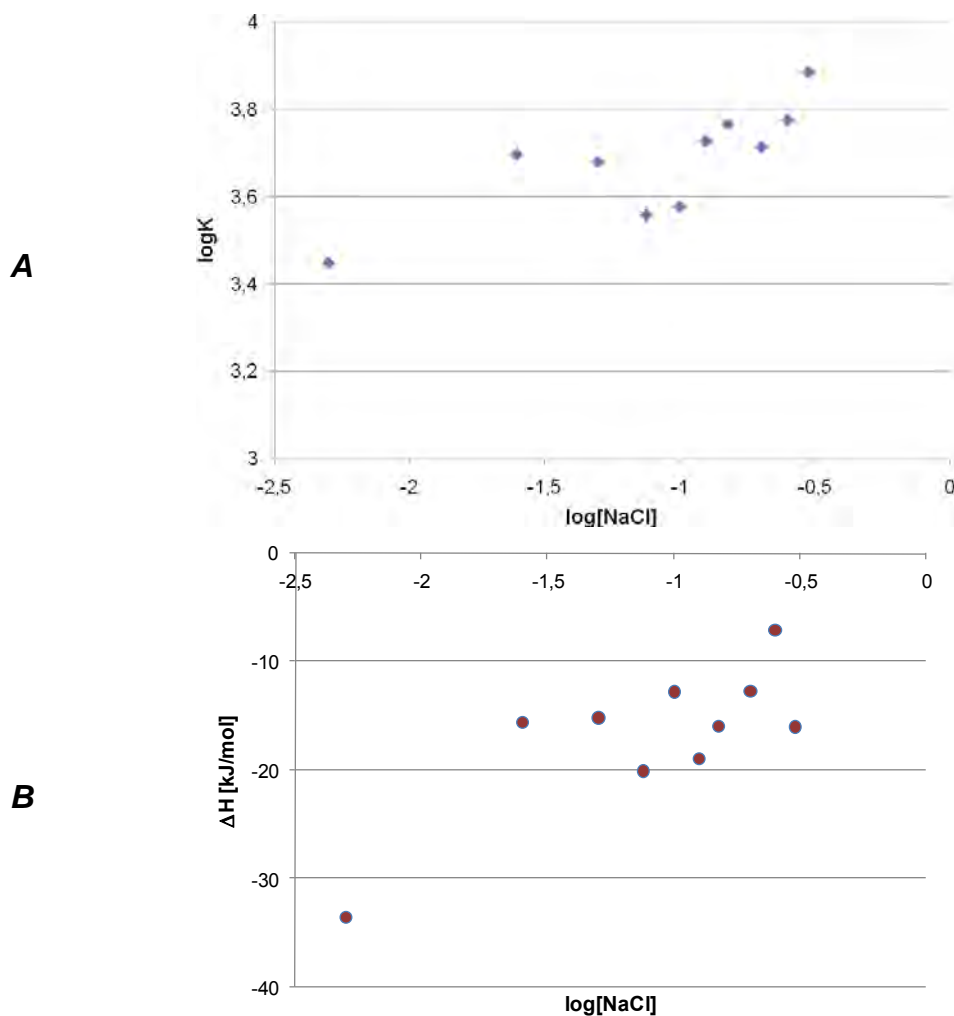
Parametry procesu	$K_A \cdot 10^{-3} [M^{-1}]$	$\Delta H [kJ/mol]$	$\Delta G [kJ/mol]$	$T\Delta S [kJ/mol]$
5 mM NaCl, 25°C, pH 7	(4,04 ± 0,3)	(-21,04 ± 0,1)	(-20,58 ± 0,02)	(-0,46 ± 0,12)
25 mM NaCl, 25°C, pH 7	(5,20 ± 0,5)	(-22,42 ± 0,3)	(-21,20 ± 0,01)	(-1,22 ± 0,31)
50 mM NaCl, 25°C, pH 7	(3,74 ± 0,3)	(-22,95 ± 0,5)	(-20,39 ± 0,02)	(-2,57 ± 0,52)
75 mM NaCl, 25°C, pH 7	(2,57 ± 0,09)	(-17,24 ± 0,6)	(-19,46 ± 0,04)	(2,22 ± 0,604)
100 mM NaCl, 25°C, pH 7	(2,13 ± 0,1)	(-13,85 ± 0,7)	(-18,99 ± 0,003)	(5,14 ± 0,703)
125 mM NaCl, 25°C, pH 7	(2,17 ± 0,1)	(-15,34 ± 1,2)	(-19,03 ± 0,001)	(3,69 ± 1,201)
150 mM NaCl, 25°C, pH 7	(5,46 ± 0,4)	(-17,88 ± 0,8)	(-21,32 ± 0,002)	(3,44 ± 0,802)
200 mM NaCl, 25°C, pH 7	(3,14 ± 0,3)	(-11,09 ± 1,0)	(-19,95 ± 0,003)	(8,85 ± 1,003)
250 mM NaCl, 25°C, pH 7	(4,41 ± 0,15)	(-14,31 ± 0,2)	(-20,79 ± 0,05)	(6,48 ± 0,25)
300 mM NaCl, 25°C, pH 7	(4,68 ± 0,3)	(-17,32 ± 0,1)	(-20,67 ± 0,01)	(3,61 ± 0,11)
25 mM NaCl, 35°C, pH 7	(2,94 ± 0,2)	(-15,2 ± 0,2)	(-19,79 ± 0,1)	(4,59 ± 0,3)

V.3.6. Analiza termodynamiczna procesu agregacji pochodnej C-1492

Kolejną badaną pochodną akrydyny był związek o nazwie kodowanej C-1492. Jest to pochodna imidazoakrydonu zawierająca grupę hydroksylową w pozycji 8, lecz w pozycji 5 podstawnik (dimetyloaminopentylo)aminowy – zdecydowanie dłuższy niż w pozostałych pochodnych. Badania mikrokalorymetryczne przeprowadziłam zgodnie z procedurą opisaną w punkcie IV.5.4. Wyniki uzyskane dla rozcieńczania roztworu związku buforem o różnej sile jonowej przedstawiłam na Ryc. 46. Dla wszystkich badanych buforów profile mają przebieg monotoniczny, co świadczy o początkowej deagregacji związku w buforze. Śledząc kolejne rozcieńczenia związku można zauważyć (podobnie jak dla pochodnej C-1330) stopniowy wzrost agregacji do stężenia 300 mM chlorku sodu. Podobny obraz dają oszacowane na podstawie ciepła stałe agregacji przedstawione na Ryc. 47 oraz Tabeli 13.



Rycina 46. Miareczkowanie mikrokalorymetryczne buforu HEPES o różnej sile jonowej pochodną C-1492 o stężeniu 2 mM, 25°C, pH 7,0.



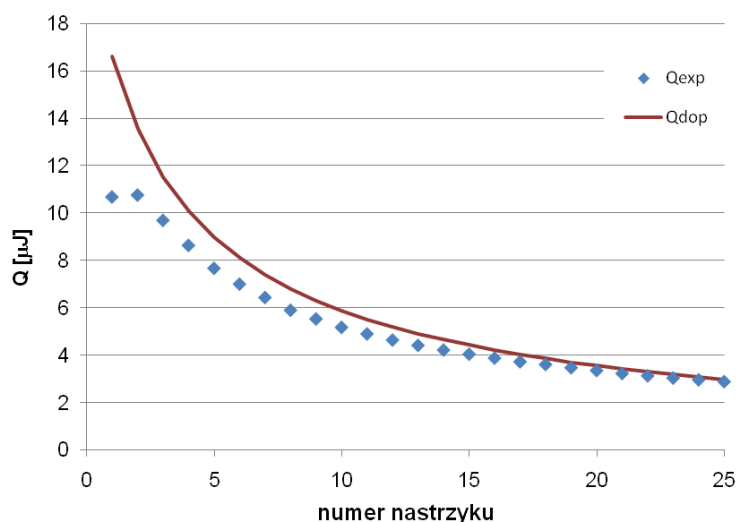
Rycina 47. Wykresy zależności logarytmu ze stężenia chlorku sodu od: A – logarytmu ze stałej agregacji C-1492 i, B – zmiany entalpii C-1492, dla wszystkich badanych buforów

Wykres w panelu B ryciny 45 mógłby sugerować, że w przypadku pochodnej C-1492, wzrost stężenia soli w buforze powoduje wzrost zmian entalpii procesu. Wrażenie to wynika z faktu, że oszacowana wartość zmian entalpii w buforze niskosolnym (5 mM NaCl) ma zdecydowanie najmniejszą wartość. Oszacowanie tej wartości obarczone jest jednak dużą niepewnością, z powodu słabego dopasowania modelu do danych eksperymentalnych (Ryc. 48).

W Tabeli 13 zamieściłam parametry termodynamiczne otrzymane przy pomocy modelu agregacji (p.IV.5.5). Wzrost siły jonowej roztworu powoduje zmiany wartości parametrów termodynamicznych, co świadczy o tym, że oddziaływania elektrostatyczne mają wpływ na agregację pochodnej C-1371. Procesowi agregacji towarzyszą małe, dodatnie wartości zmian entropii. Może to sugerować udział oddziaływań hydrofobowych

w powstawaniu agregatów. Jedynie dla buforu niskosolnego otrzymałam spadek entropii układu. Jak wspomniałam powyżej może to być jednak artefakt obliczeniowy.

Podwyższenie temperatura nie ma istotnego wpływu na agregację C-1492. Stała agregacji w temperaturze 35°C nie jest istotnie różna od uzyskanej w temp. 25°C.



Rycina 48. Dopasowanie modelu do danych eksperymentalnych dla rozcieńczania 2 mM roztworu C-1492 buforem Hepes, 5 mM NaCl

Tabela 13. Parametry termodynamiczne procesu agregacji pochodnej C-1492 w buforach o różnym składzie.

Parametry procesu	$K_A \cdot 10^{-3} [M^{-1}]$	$\Delta H [kJ/mol]$	$\Delta G [kJ/mol]$	$T\Delta S [kJ/mol]$
5 mM NaCl, 25°C, pH 7	(2,81 ± 0,4)	(-33,48 ± 0,1)	(-19,67 ± 0,02)	(-13,81 ± 0,12)
25 mM NaCl, 25°C, pH 7	(4,98 ± 0,5)	(-15,54 ± 0,2)	(-21,10 ± 0,01)	(1,55 ± 0,3)
50 mM NaCl, 25°C, pH 7	(4,78 ± 0,3)	(-15,16 ± 0,1)	(-20,99 ± 0,02)	(5,83 ± 0,12)
75 mM NaCl, 25°C, pH 7	(3,60 ± 0,2)	(-20,06 ± 0,1)	(-20,29 ± 0,04)	(0,23 ± 0,14)
100 mM NaCl, 25°C, pH 7	(3,77 ± 0,3)	(-12,75 ± 0,3)	(-20,41 ± 0,003)	(7,56 ± 0,303)
125 mM NaCl, 25°C, pH 7	(5,33 ± 0,7)	(-18,93 ± 0,2)	(-21,26 ± 0,001)	(2,33 ± 0,201)
150 mM NaCl, 25°C, pH 7	(5,83 ± 0,9)	(-15,92 ± 0,8)	(-21,49 ± 0,002)	(5,57 ± 0,802)
200 mM NaCl, 25°C, pH 7	(5,17 ± 0,4)	(-12,71 ± 0,1)	(-21,19 ± 0,003)	(8,48 ± 0,103)
250 mM NaCl, 25°C, pH 7	(5,96 ± 0,1)	(-7,11 ± 0,1)	(-21,54 ± 0,05)	(14,43 ± 1,05)
300 mM NaCl, 25°C, pH 7	(7,67 ± 0,2)	(-15,98 ± 0,1)	(-22,19 ± 0,01)	(6,18 ± 0,11)
25 mM NaCl, 35°C, pH 7	(5,12 ± 0,1)	(-15,2 ± 0,2)	(-21,16 ± 0,3)	(5,96 ± 0,4)

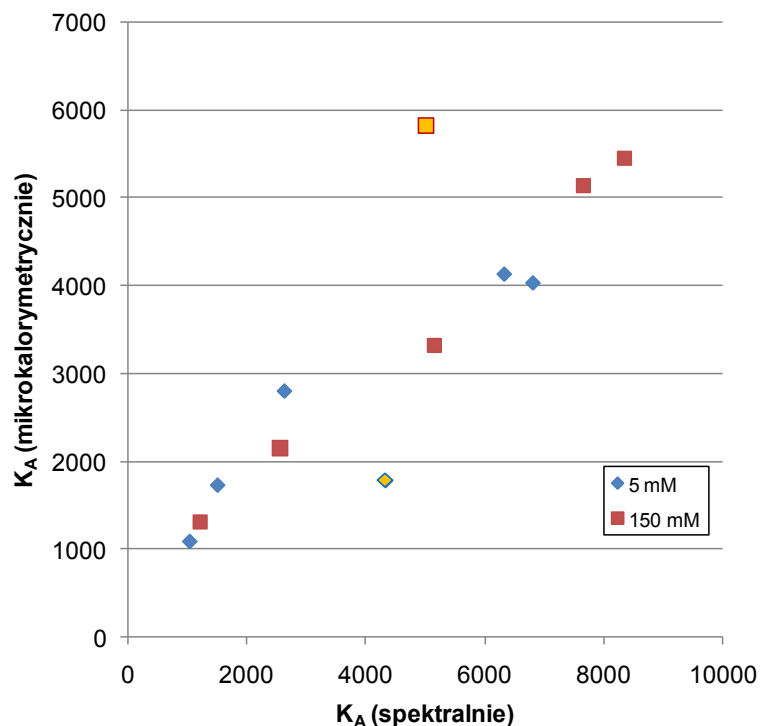
V.4. Podsumowanie analizy termodynamicznej agregacji pochodnych akrydyny

Analiza termodynamiczna procesu agregacji pochodnych akrydyny, potwierdziła, że badane związki ulegają agregacji w roztworach wodnych. Dla wszystkich pochodnych imidazoakrydonu stwierdziłam, że siła jonowa roztworu ma wpływ na wartości parametrów termodynamicznych agregacji. Jest to niewątpliwie związane z faktem, że w warunkach pomiaru cząsteczki związków są sprotonowane. Wpływ siły jonowej jest szczególnie wyraźny dla związków posiadających grupę hydroksylową (C-1492, C-1371) lub metoksyłową (C-1330) w pozycji 8 rdzenia imidazoakrydonu. Tym samym wykazałam, że oddziaływania elektrostatyczne odgrywają istotną rolę w procesie agregacji. Wzrost siły jonowej prowadzący do osłabienia oddziaływań elektrostatycznych sprzyja przy tym procesowi agregacji. Proces agregacji proflawiny, która w warunkach pomiaru nie posiada wypadkowego ładunku elektrycznego, nie jest zależny od siły jonowej buforu.

W przypadku co najmniej 3 pochodnych imidazoakrydonu (C-1330, C-1212 i C-1371) wyniki uzyskane w buforze niskosolnym (5 mM NaCl) wyraźnie odbiegają od trendu wpływu siły jonowej na stałą agregacji i inne parametry termodynamiczne obserwowanego przy wyższej sile jonowej. Może to sugerować, że przy bardzo niskiej sile jonowej roztworu agregacja zachodzi według odmiennego modelu lub powstają agregaty o odmiennym budowie.

Podwyższenie temperatury pomiaru prowadzi do obniżenia zdolności agregacyjnej badanych związków (C-1330, C-1212, C-1371 i C-1492) lub do całkowitego zaniku agregacji (proflawina, C-1415). Temperatura ma również wpływ na zmiany entropii procesu.

Porównując stałe agregacji uzyskane metodą spektroskopową i mikrokalorymetryczną stwierdzić można dużą zbieżność uzyskanych wartości tego parametru zarówno w buforze nisko- jak i wysokosolnym, Ryc. 49.



Rycina 49. Wykres korelacyjny wartości stałych agregacji uzyskanych metodą spektralną i mikrokalorymetryczną

Jedynie w dwóch przypadkach (C-1212 w buforze niskosolnym i C-1492 w buforze wysokosolnym) obserwuje się odchylenia od linii trendu dla wartości stałych agregacji uzyskanych różnymi metodami.

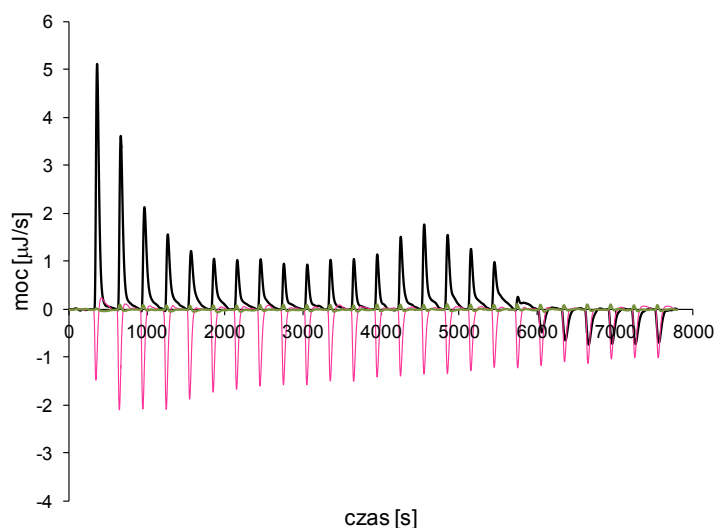
Z przedstawionych powyżej wyników widać wyraźnie, że oddziaływania elektrostatyczne mają istotny wpływ na zachowanie się związku w buforze. Dlatego efekt ten należy uwzględnić przy badaniu oddziaływań pochodnych imidazoakrydonu z DNA.

V.5. Analiza termodynamiczna oddziaływań ligandów z DNA

Na podstawie wcześniejszych pomiarów spektrofotometrycznych oraz mikrokalorymetrycznych dokonałam wstępnej charakterystyki właściwości fizykochemicznych pochodnych imidazoakrydonu w roztworach wodnych, a w szczególności ich zdolności do agregacji. Badania oddziaływania związków z DNA wykonałam z wykorzystaniem izotermicznej kalorymetrii miareczkowej, ITC. Analiza termodynamiczna oddziaływania tych pochodnych z DNA jest uzupełnieniem badań prowadzonych w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej nad istotą niekowalencyjnych oddziaływań pochodnych akrydyny z DNA.

V.5.1. Analiza termodynamiczna oddziaływań proflawiny z ctDNA

Analizę termodynamiczną oddziaływań małych ligandów z ctDNA rozpoczęłam od zbadania procesu tworzenia kompleksu proflawiny z DNA. Proflawina jest jednym z najlepiej poznanych interkalatorów DNA może więc być potraktowana jako związek referencyjny. Zbadałam wpływ stężenia NaCl na proces tworzenia kompleksu związku z ctDNA. Dla każdego badanego układu przeprowadziłam trzy odrębne doświadczenia, ponieważ na całkowity efekt cieplny miareczkowania DNA roztworem związku składają się z efektów cieplnych kilku zachodzących jednocześnie procesów: rozcieńczenia związku, kwasu dezoksyrybonukleinowego oraz oddziaływania związku z ctDNA. Wyniki uzyskane dla miareczkowania ctDNA roztworem związku w buforze niskosolnym (5mM NaCl) w temperaturze 25°C przedstawiłam na Ryc. 50.



Rycina 50. Pomiary mikrokalorymetryczne oddziaływania proflawiny z ctDNA w 25°C, kolor czarny – miareczkowanie ctDNA roztworem proflawiny, kolor różowy – miareczkowanie buforu roztworem proflawiny, kolor zielony – miareczkowanie ctDNA buforem. Stężenie wyjściowego roztworu roztworu proflawiny 1mM, ctDNA 0,06 mM pz, bufor Hepes o 5 mM stężeniu NaCl.

Miareczkowanie nastrzykami po 10 µl roztworu proflawiny

Z wcześniejszych badań roztworów proflawiny wynika (p.V.3.1), że w roztworze o stężeniu 1 mM obecna jest zarówno monomeryczna jak i zagregowana forma tego związku. Formy te znajdują się w stanie równowagi określonej przez ogólne stężenie związku i jego stałą agregacji. Po nastrzyku dochodzi do około 100-krotnego rozcieńczenia związku, podczas którego zachodzi rozpad znaczącej części agregatów i uwolnienia formy monometycznej. Procesowi temu towarzyszą znaczące efekty cieplne (krzywa różowa na Ryc. 50). Obecna w naczynku pomiarowym proflawina oddziałuje teraz z DNA.

Oddziaływanie to zachodzić może na kilku różnych drogach. Przede wszystkim monomeryczna forma proflawiny tworzyć będzie kompleksy interkalacyjne z DNA. Przy opisie tego procesu istotne jest uwzględnienie aktualnego stężenia formy monomerycznej, zwłaszcza że pod koniec miareczkowania znacząca część związku występuje w formie zagregowanej. Proflawina w pH 7 nie posiada wypadkowego ładunku elektrycznego, jednak obecne w cząsteczce dwie aromatyczne grupy aminowe i heterocykliczny atom azotu powodują, że jest ona dipolem. Nie można więc wykluczyć występowania oddziaływań elektrostatycznych typu dipol-ładunek z polianionem DNA. Z literatury wynika, że w oddziaływaniu takim uczestniczą najczęściej ligandy polarne lub jonowe w formie zagregowanej [157].

Jakościowa analiza termogramu przedstawionego na Ryc. 50 sugeruje, że mamy do czynienia z dwoma typami oddziaływań. Pierwsze oddziaływanie (11 pierwszych nastrzyków) jest najsilniejsze przy niskim stężeniu proflawiny występującej prawdopodobnie w formie monomerycznej. W kolejnych nastrzykach efekt cieplny tego oddziaływania następnie zanika. Niestety nie jest do końca jasne, czy oddziaływanie to dotyczy formy monomerycznej czy zagregowanej. Następnie, w miarę wzrostu stężenia monomeru i ogólnego stężenia ligandu ujawnia się drugi typ oddziaływania. Mianowicie dochodzi prawdopodobnie do interkalacji cząsteczek pomiędzy pary zasad helisy DNA. W chwili, gdy wszystkie możliwe miejsca wiązania zostały wysyczone. Pod koniec miareczkowania (po 20 nastrzyku) na termogramie obserwowany jest efekt cieplny rozpadu agregatów. Na tym etapie analizy przypisanie efektów cieplnych obserwowanych w początkowej i środkowej części miareczkowania jest niemożliwe. Jednoznacznie można jedynie zidentyfikować końcowy fragment termogramu jako efekty cieplne deagregacji.

Analiza termodynamiczna takiego termogramu nie jest rzeczą trywialną. Postanowiłam dokonać tego budując odpowiedni model oddziaływań i dopasowując go do zmierzonych efektów cieplnych każdego nastrzyku. Przeprowadziłam symulacje numeryczne szeregu różnych modeli oddziaływań. Ostatecznie wybrałam model, który najlepiej odtwarzał typowe przebiegi zmian efektów termicznych podczas miareczkowania ctDNA przez różne ligandy i przy różnym stężeniu soli. W modelu tym (p. IV.5.7) założyłam jednoczesne występowanie trzech następujących procesów:

1. wiązanie liganda do liniowej matrycy z wykluczeniem sąsiedztwa zgodnie z równaniem McGhee i von Hippel bez uwzględnienia kooperatywności wiązania (proces interkalacji)

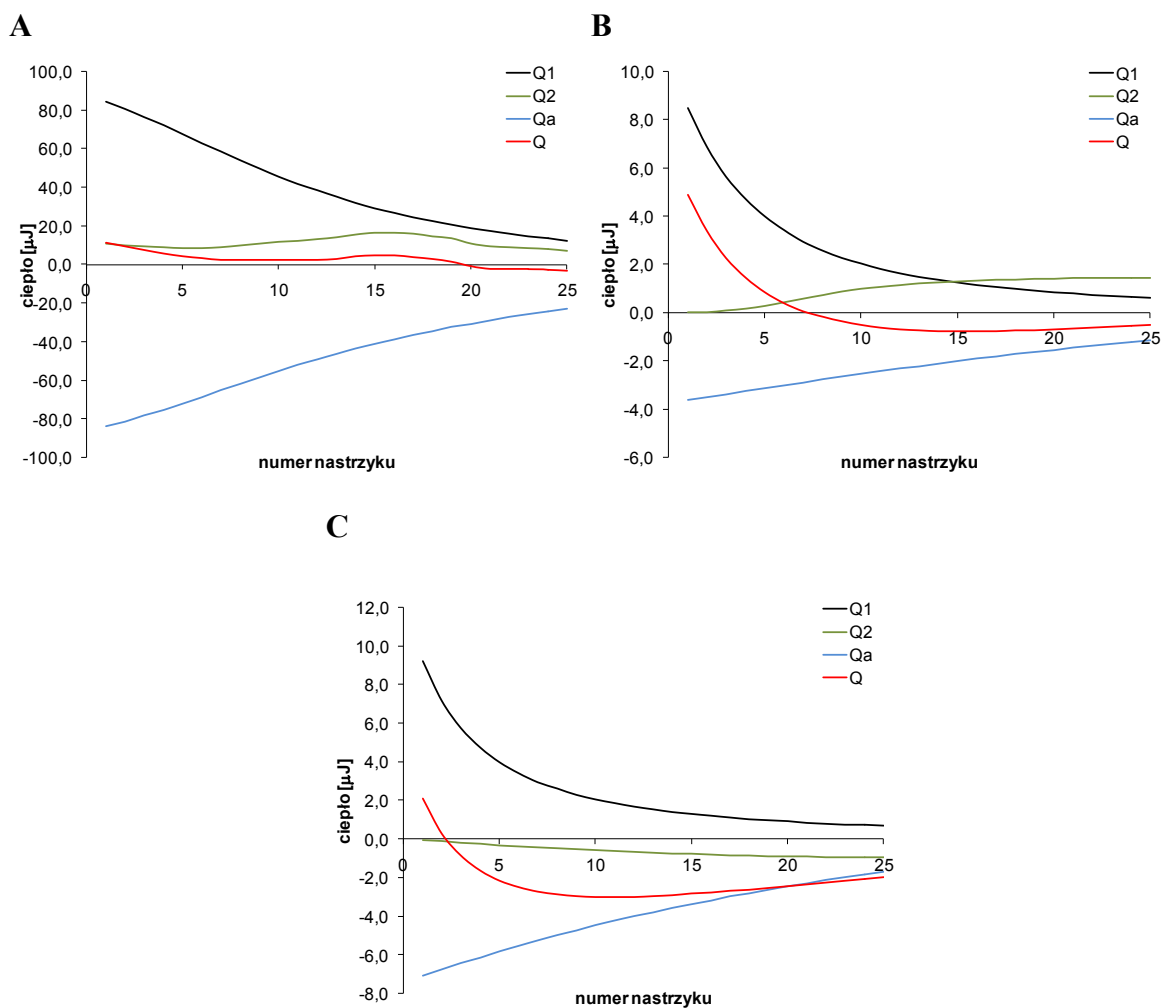
2. oddziaływanie elektrostatyczne zagregowanej formy liganda z grupami fosforanowymi DNA:

3. deagregację liganda na skutek rozcieńczenia nastrzyku zgodnie z modelem agregacji nieograniczonej.

W modelu tym występuje 7 parametrów: n , K_1 i ΔH_1 opisujące proces wiązania się liganda do liniowej matrycy, K_2 i ΔH_2 opisujące elektrostatyczne oddziaływanie agregatów z polianionem DNA oraz K_A i ΔH_A opisujące deagregację liganda. Model ten dopasowywany był do danych doświadczalnych poprzez dobór optymalnych wartości parametrów metodą simpleksów z wykorzystaniem algorytmu Nelder-Meada. Po wyznaczeniu wartości parametrów modelu możliwa była dekompozycja całkowitych efektów cieplnych na efekty poszczególnych oddziaływań. Przykład takiej dekompozycji dla termogramu z ryciny 51 przedstawia panel A) ryciny 51.

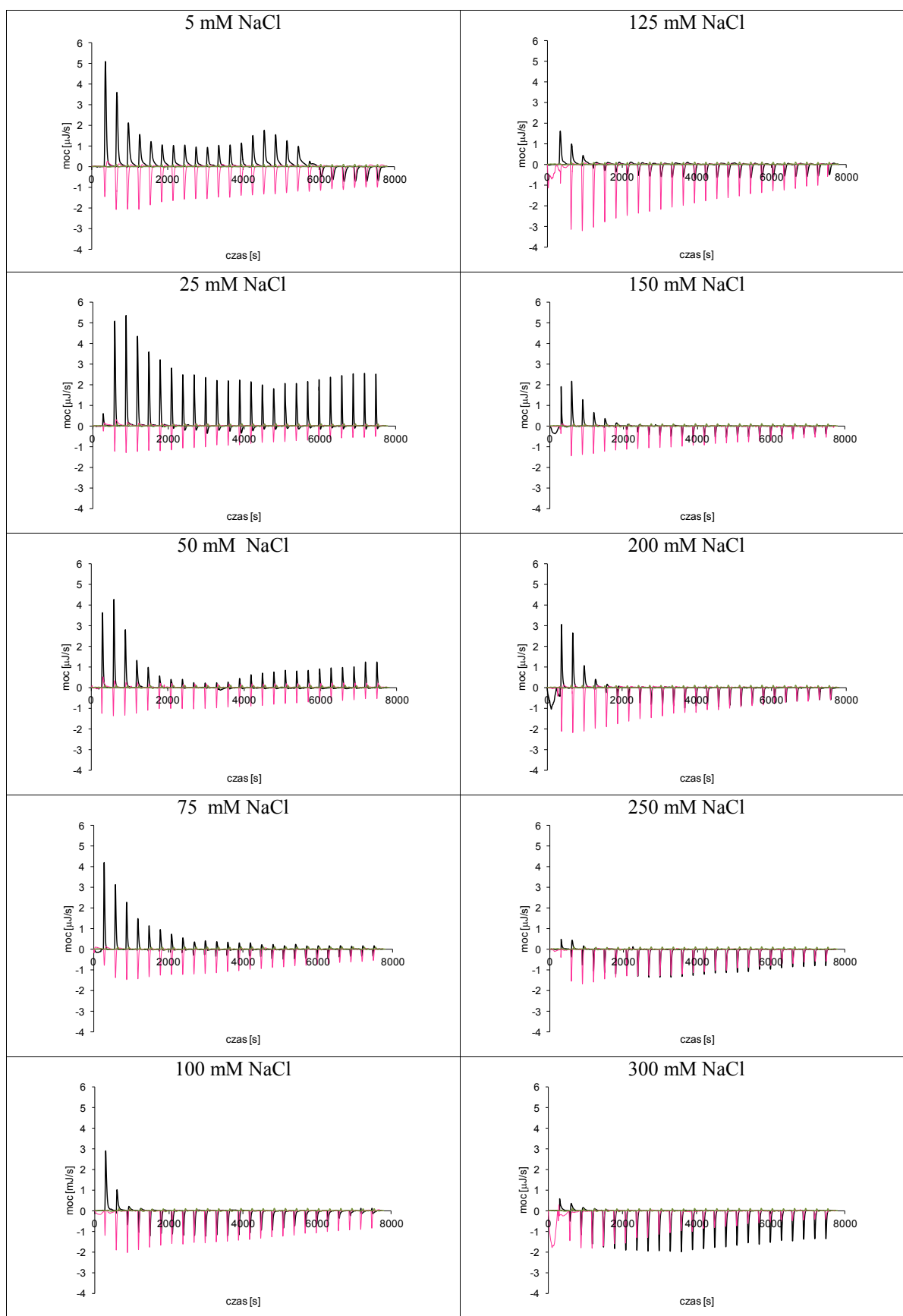
Dzięki przeprowadzonej dekompozycji całkowitych efektów cieplnych stała się możliwa pełniejsza interpretacja termogramu. Po kilku pierwszych nastrzykach dochodzi do prawie całkowitej deagregacji proflawiny, a jej forma monomeryczna tworzy kompleks interkalacyjny z DNA. Po wysyceniu większości miejsc wiązania proces deagregacji ulega zahamowaniu i po kolejnych nastrzykach wzrasta stężenie agregatów w roztworze. Agregaty te oddziałują elektrostatycznie z polianionem DNA. W efekcie całkowite efekty cieplne kolejnych nastrzyków wzrastają. W końcowej fazie miareczkowania szybkość przyrostu stężenia obu rodzajów kompleksów maleje i w całkowitym efekcie cieplnym przewagę zdobywa efekt cieplny deagregacji.

Kolejnym krokiem było sprawdzenie czy na oddziaływanie proflawiny z ctDNA ma wpływ siła jonowa buforu. Przeprowadziłam serię analogicznych miareczkowań dla dziesięciu buforów różniących się stężeniem chlorku sodu (5 mM NaCl, 25 mM NaCl, 50 mM NaCl, 100 mM NaCl, 125 mM NaCl, 150 mM NaCl, 200 mM NaCl, 250 mM NaCl, 300 mM NaCl). Uzyskane termogramy dla wszystkich doświadczeń przedstawiłam na Ryc. 52. Wraz ze wzrostem siły jonowej buforu zaobserwować można wyraźne zmiany kształtu termogramów.

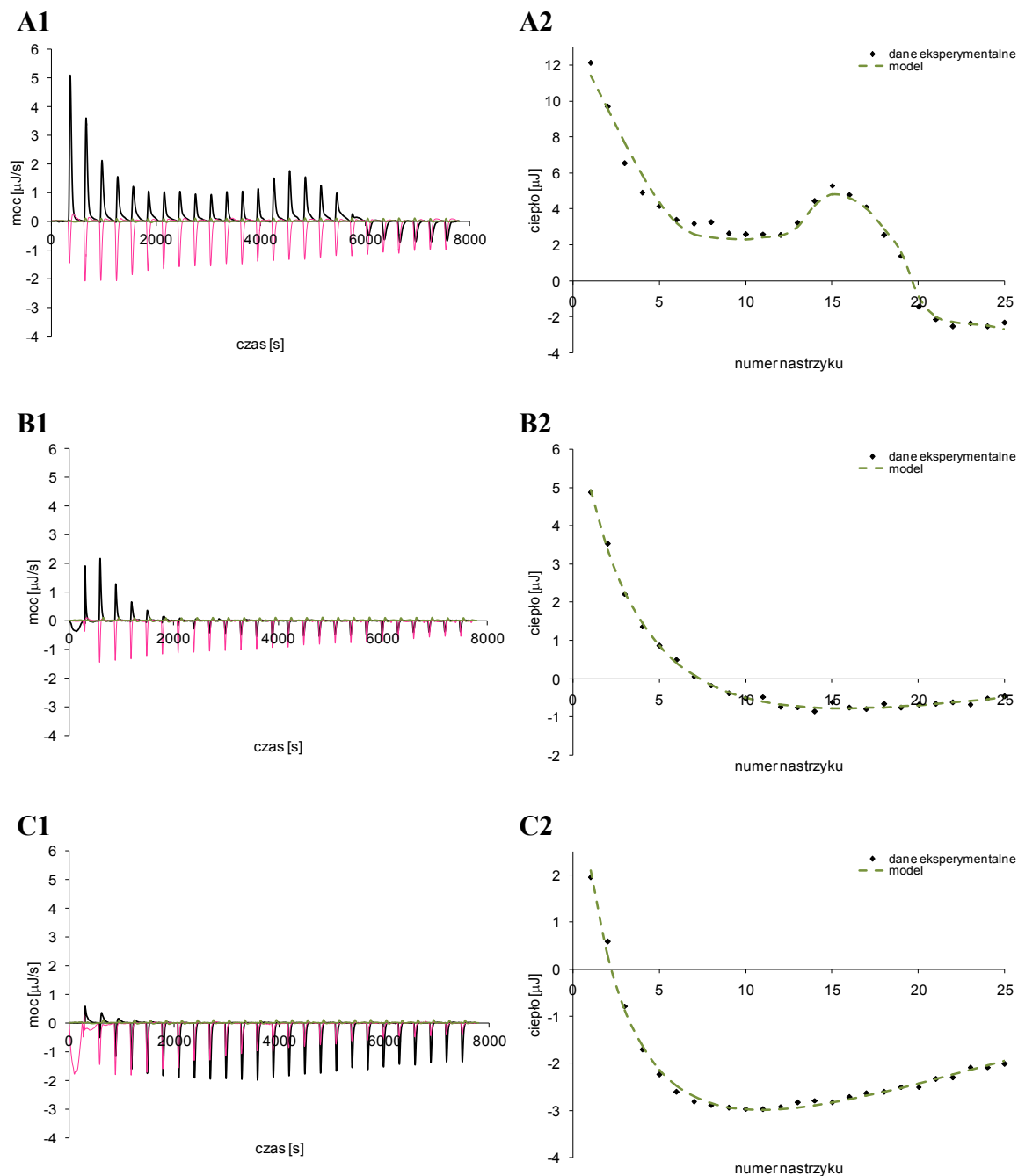


Rycina. 51. Udział efektów cieplnych poszczególnych oddziaływań w całkowitych efektach cieplnych miareczkowania ctDNA roztworem proflawiny: **kolor czarny** – efekt cieplny interkalacji (Q_1), **kolor zielony** – efekt cieplny elektrostatycznego wiązania agregatów (Q_2), **kolor niebieski** – efekt cieplny deagregacji (Q_a), **kolor czerwony** - całkowity efekt cieplny nastrzyku (Q). Stężenie wyjściowego roztworu proflawiny 1 mM, stężenie ctDNA 0,06 mM pz, bufor Hepes o 5 mM (A), 150 mM (B) oraz 300 mM (C) stężeniu NaCl

Do danych eksperymentalnych uzyskanych w trakcie pomiarów mikrokalorymetrycznych został następnie dopasowany wcześniej opracowany model oddziaływań, zgodnie z procedurą opisaną p. IV.5.7 (Ryc. 53 A2, B2, C2). W ten sposób zostały wyznaczone podstawowe parametry termodynamiczne oddziaływania monomerów (K_1 , ΔH_1 , n) oraz agregatów (K_2 , ΔH_2) proflawiny z DNA oraz parametry procesu deagregacji (K_A , ΔH_A) w buforach z różną zawartością chlorku sodu. Następnie korzystając z zależności opisanej równaniem (76) wyznaczone zostały zmiana entalpii swobodnej oraz entropii towarzyszące oddziaływaniom. Otrzymane wartości stałych zebrane zostały w Tabeli 14.



Rycina 52. Termogramy oddziaływania proflawiny z ctDNA w 25°C, **kolor czarny** – miareczkowanie ctDNA roztworem proflawiny, **kolor różowy** – miareczkowanie buforu roztworem proflawiny, **kolor zielony** – miareczkowanie ctDNA buforem. Stężenie wyjściowego roztworu proflawiny 1mM, stężenie ctDNA 0,06mM pz, bufor Hepes o wzrastającym stężeniu NaCl. Miareczkowanie nastrzykami po 10 μl roztworu proflawiny



Rycina 53. A1, B1, C1: Pomiary mikrokalorymetryczne oddziaływania proflawiny z ctDNA w 25°C, kolor czarny – miareczkowanie ctDNA roztworem proflawiny, kolor różowy – miareczkowanie buforu roztworem proflawiny, kolor zielony – miareczkowanie ctDNA buforem. Stężenie wyjściowego roztworu proflawiny 1 mM, stężenie ctDNA 0,06 mM pz, bufor HEPES o 5 mM (A1), 150 mM (B1) oraz 300 mM (C1) stężeniu NaCl. Miareczkowanie nastrzykami po 10 μl roztworu proflawiny. A2, B2 C2: dopasowanie modelu do izoterm oddziaływania proflawiny z cudna w 25°C odpowiadających termogramom A1, B1 i C1

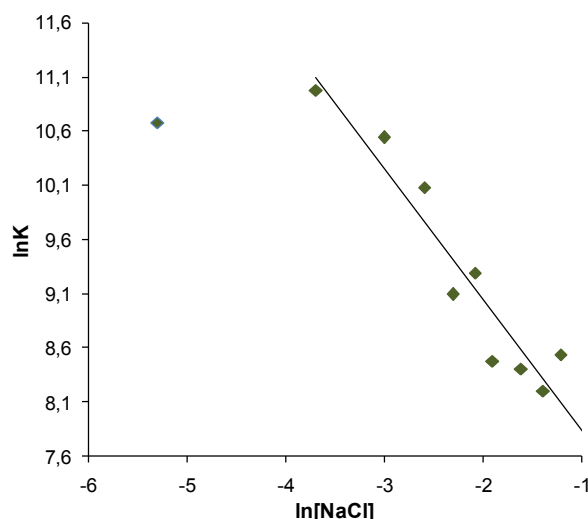
Tabela 14. Parametry termodynamiczne oddziaływania proflawiny z ctDNA w buforach o różnym stężeniu NaCl i w różnej temperaturze

Warunki procesu	Parametry termodynamiczne procesu								
	$K_1 \cdot 10^{-4}$ [M ⁻¹]	n	ΔH_1 [kJ/mol]	ΔG_1 [kJ/mol]	$T\Delta S_1$ [kJ/mol]	$K_2 \cdot 10^{-4}$ [M ⁻¹]	ΔH_2 [kJ/mol]	ΔG_2 [kJ/mol]	$T\Delta S_2$ [kJ/mol]
5 mM NaCl, 25°C	4,33 ± 0,62	0,64 ± 0,1	-28,42 ± 3,27	-26,46 ± 0,02	-1,97 ± 0,04	0,51 ± 0,05	-40,23 ± 1,80	-21,19 ± 0,02	-19,04 ± 0,08
25 mM NaCl, 25°C	5,86 ± 0,88	0,88 ± 0,02	-27,43 ± 0,88	-27,20 ± 0,07	-0,22 ± 0,01	0,33 ± 0,14	-41,33 ± 1,09	-20,08 ± 0,69	-21,25 ± 0,23
50 mM NaCl, 25°C	3,78 ± 0,21	1,71 ± 0,2	-31,83 ± 2,71	-26,11 ± 0,12	-5,72 ± 0,02	0,14 ± 0,02	-42,10 ± 2,31	-17,96 ± 1,32	-24,14 ± 0,02
75 mM NaCl, 25°C	2,38 ± 0,01	1,28 ± 0,12	-28,23 ± 1,38	-24,98 ± 1,34	-3,25 ± 1,24	0,12 ± 0,01	-28,17 ± 1,87	-17,47 ± 0,62	-11,30 ± 1,07
100 mM NaCl, 25°C	0,89 ± 0,10	1,21 ± 0,2	-48,68 ± 0,24	-22,52 ± 0,98	-26,44 ± 1,24	0,17 ± 0,04	-20,42 ± 0,10	-18,45 ± 0,21	-16,04 ± 2,01
125 mM NaCl, 25°C	1,08 ± 0,07	1,85 ± 0,23	-31,13 ± 1,89	-23,02 ± 0,74	-8,11 ± 0,14	0,21 ± 0,01	-10,49 ± 1,19	-33,99 ± 1,54	-6,43 ± 0,03
150 mM NaCl, 25°C	0,48 ± 0,01	1,26 ± 0,15	-60,40 ± 0,15	-21,01 ± 1,00	-39,39 ± 0,53	0,33 ± 0,07	-20,46 ± 0,20	-20,10 ± 0,83	-0,36 ± 0,01
200 mM NaCl, 25°C	0,44 ± 0,07	1,49 ± 0,30	-51,52 ± 1,37	-20,33 ± 0,56	-30,69 ± 0,81	0,06 ± 0,03	-29,38 ± 2,22	-15,97 ± 1,09	-13,41 ± 0,43
250 mM NaCl, 25°C	0,36 ± 0,01	1,51 ± 0,36	-46,77 ± 1,73	-20,33 ± 0,34	-26,44 ± 1,02	0,05 ± 0,01	-27,61 ± 0,20	-15,72 ± 0,98	-11,89 ± 1,01
300 mM NaCl, 25°C	0,52 ± 0,06	1,81 ± 0,20	-34,52 ± 1,79	-21,15 ± 0,13	-13,38 ± 0,95	0,04 ± 0,01	-34,65 ± 1,35	-14,67 ± 0,23	-19,98 ± 0,30
25 mM NaCl, 35°C	3,04 ± 0,50	1,53 ± 0,39	-30,90 ± 2,41	-26,44 ± 0,67	-4,46 ± 0,45	0,15 ± 0,04	-46,12 ± 3,45	-18,82 ± 1,02	-27,30 ± 0,25

Analizując uzyskane wyniki (Tabela 14), można zauważyć, że wraz ze wzrostem siły jonowej buforu, zarówno oddziaływanie monomerów jak i form zagregowanych proflawiny z ctDNA jest coraz słabsze (spadek stałej K_1 oraz K_2). Stałe wiązania monomeru z DNA w buforach niskosolnych są rzędu 10^4 , podczas gdy stałe wiązania agregatów rzędu 10^3 . Na oddziaływanie profawina-ctDNA na również wpływ temperatura układu. W doświadczeniach przeprowadzonych w wyższej temperaturze (35°C) obserwuje się spadek stałych wiązania o połowę.

Kolejnym krokiem było wyznaczenie zmian entalpii swobodnej, ΔG_1 , dla poszczególnych stężeń soli w buforze.

W momencie wiązania silnie polarnego liganda z DNA dochodzić może do uwolnienia jednego lub więcej kationów z elektrycznej warstwy podwójnej. Oznacza to, że tworzenie kompleksu ligand/DNA oraz skład elektrycznej warstwy podwójnej wokół DNA są powiązane termodynamicznie i mogą być przedstawione jako liniowa zależność stałej wiązania od logarytmu ze stężenia soli w buforze [159]. Zastosowanie dziesięciu buforów różniących się siłą jonową, pozwoliło mi wyznaczyć udział zmian entalpii swobodnej oddziaływań elektrostatycznych, ΔG_{pe} , w całkowitej zmianie entalpii swobodnej podczas tworzenia danego rodzaju kompleksu. Do wyznaczenia entalpii swobodnej oddziaływań elektrostatycznych ΔG_{pe} wykorzystałam liniową zależność między logarytmem ze stałej wiązania oraz stężeniem soli w buforze (Rys. 54) zgodnie ze wzorem (11). Wyznaczony współczynnik nachylenia prostej SK wynosi $-1,21 \pm 0,10$ i mieści się w zakresie wartości od $-0,80$ do $-1,24$ wyznaczonych dla ligandów wiążących się do DNA [160,161,162]. Podczas wyznaczania współczynnika nachylenia prostej odrzuciłam punkt odpowiadający buforowi niskosolnemu, ponieważ stała wiązania w tym buforze różniła się znacznie od trendu zmian reprezentowanego przez pozostałe wartości $\ln K_1$ (Rys. 54). Odrzucenie tego punktu znajduje również potwierdzenie w danych spektroskopowych – w tym buforze mamy prawdopodobnie do czynienia z inną strukturą kompleksu. Tak wyznaczona wartość SK pozwoliła na oszacowanie udziału zmian entalpii swobodnej oddziaływań elektrostatycznych (Tabela 15). Wraz ze wzrostem stężenia soli w buforze wyznaczona wartość ΔG_{pe} systematycznie maleje. Zmiany entalpii swobodnej oddziaływań pozaelektrostatycznych utrzymują się natomiast na zbliżonym poziomie i stanowią ok. 60-80 % udziału w całkowitej zmianie entalpii swobodnej.

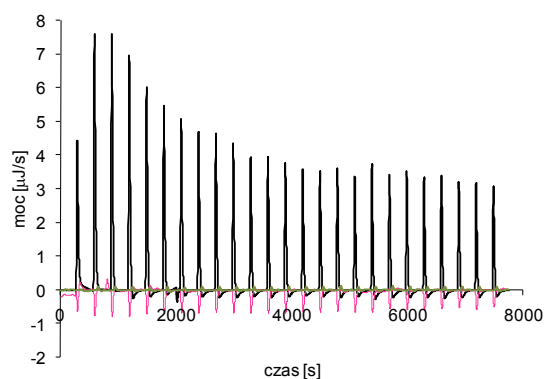


Rycina 54. Zależność logarytmu naturalnego ze stałej wiązania proflawiny K_1 od logarytmu naturalnego ze stężenia soli, $[\text{NaCl}]$

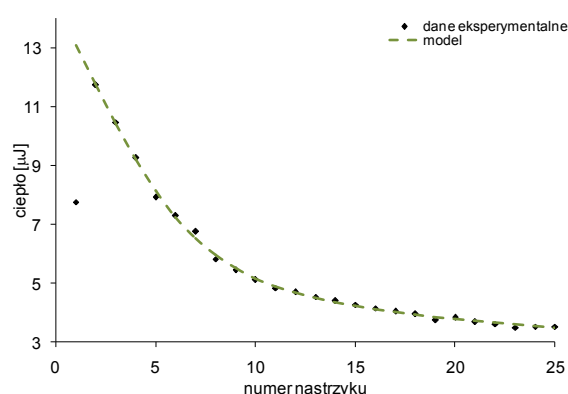
Aby wyznaczyć pojemność cieplną układu, dla jednego z buforów przeprowadziłam analogiczne miareczkowanie w temperaturze 35°C . Zgodnie z danymi literaturowymi w tej temperaturze, w buforze Hepes DNA występuje w postaci dwuniciowej [163]. Uzyskany termogram przestawiłam na Ryc. 55 A1. Dopasowany model oddziaływań (Ryc. 55 A2) pozwolił na oszacowanie stałej wiązania oraz zmiany entalpii interkalacji (Tabela. 14.). Dla tak uzyskanych wartości została obliczona pojemność cieplna układu zgodnie z równaniem (8) (Tabela. 15.). Mając oszacowaną wartość ΔC_p interkalacji mogłam wyznaczyć zmianę entalpii swobodnej oddziaływań hydrofobowych [128] wykorzystując do tego następującą zależność:

$$\Delta G_{\text{hyd}} = 80(\pm 10) * \Delta C_p$$

A1



A2



Rycina 55. Cykl pomiarów mikrokalorymetrycznych oddziaływania proflawiny z ctDNA w 35°C , kolor czarny – miareczkowanie ctDNA roztworem proflawiny, kolor różowy – miareczkowanie buforu roztworem proflawiny, kolor zielony – miareczkowanie ctDNA buforem. Stężenie wyjściowego roztworu proflawiny 1 mM , ctDNA $0,06 \text{ mM}$ pz, bufor Hepes o 25 mM stężeniu NaCl (A1). Miareczkowanie nastrzykami po $10 \mu\text{l}$ roztworu proflawiny; A2: dopasowanie modelu do izotermy oddziaływania proflawiny z ctDNA w 35°C

Tabela 15. Zmiany entalpii swobodnych oddziaływania monomerów proflawiny z ctDNA w buforach o różnym stężeniu NaCl i w różnej temperaturze

Warunki procesu	Parametry termodynamiczne procesu				
	ΔG_{obs} [kJ/mol]	ΔG_{pe} [kJ/mol]	ΔG_{t} [kJ/mol]	ΔC_p [J/(molK)]	ΔG_{hyd} [kJ/mol]
5 mM NaCl, 25°C	-26,46 ± 0,02	nw	nw	-247,42 ± 50,23	-19,79 (±10)
25 mM NaCl, 25°C	-27,20 ± 0,07	-11,06 ± 1,01	-16,14 ± 1,60		
50 mM NaCl, 25°C	-26,11 ± 0,12	-8,98 ± 0,98	-17,13 ± 0,09		
75 mM NaCl, 25°C	-24,98 ± 1,34	-7,77 ± 0,12	-17,21 ± 0,23		
100 mM NaCl, 25°C	-22,52 ± 0,98	-6,90 ± 0,14	-15,763 ± 1,06		
125 mM NaCl, 25°C	-23,02 ± 0,74	-6,23 ± 0,01	-16,79 ± 0,53		
150 mM NaCl, 25°C	-21,01 ± 1,00	-5,69 ± 0,14	-15,33 ± 0,34		
200 mM NaCl, 25°C	-20,33 ± 0,56	-4,82 ± 0,02	-16,00 ± 0,24		
250 mM NaCl, 25°C	-20,33 ± 0,34	-4,15 ± 0,42	-16,17 ± 0,92		
300 mM NaCl, 25°C	-21,15 ± 0,13	-3,61 ± 0,20	-17,54 ± 1,03		
25 mM NaCl, 35°C	-26,44 ± 0,67	-16,42 ± 1,24	10,02 ± 0,47		

nw – nie wyznaczone

W trakcie wnikliwego przeszukiwania literatury nie natknęłam się na informacje pokazujące, że podczas wiązania się interkalatora z DNA może dochodzić do zmian konformacyjnych w strukturze liganda. Dlatego w mojej pracy zakładam, że zmiana entalpii swobodnej przekształceń konformacyjnych jest związana tylko ze zmianami konformacyjnymi makromolekuły. Podczas interkalacji konieczne jest dostarczenie energii pozwalającej na lokalną zmianę kąta skręcenia podwójnej helisy. Ilość energii potrzebnej do takiej zmiany zależy głównie od struktury kwasu nukleinowego, sekwencji zasad oraz rodzaju interkalatora [76]. Według literatury, dla klasycznych interkalatorów ΔG_{konf} wynosi 16,72 kJmol⁻¹ (ΔG_{konf} wyznaczone jest na podstawie równowagowej stałej konformacyjnych zmian ctDNA, równowagowa stała konformacyjnych zmian DNA wynosi 10⁻³) [121,164].

Kolejną składową całkowitej zmiany entalpii swobodnej jest zmiana entalpii swobodnej wynikająca z utraty swobody rotacji i translacji podczas kompleksowania, $\Delta G_{\text{r+t}}$, [23,75] wyznaczana ze wzoru:

$$\Delta G_{\text{r+t}} = T\Delta S_{\text{r+t}}$$

Właściwa wartość ΔS_{r+t} była w ostatnich latach tematem wielu publikacji [165,166,167]. Jednak najczęściej stosowaną w ostatnich latach wartością jest wartość ΔS_{r+t} równa $209(\pm 10) \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$ [164]. Obliczona wartość ΔG_{r+t} dla temperatury 298 K wynosi wtedy $62,28 \text{ kJmol}^{-1}$.

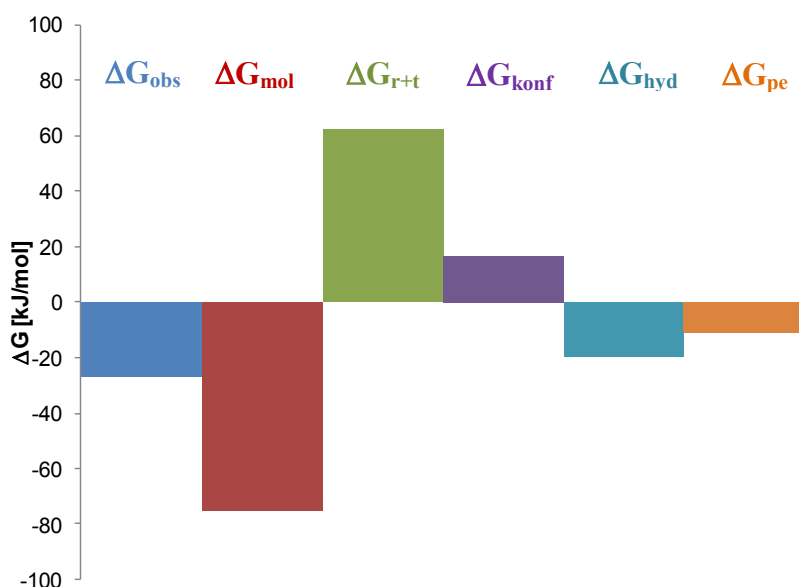
Wstawiając wyżej wymienione zmiany entalpii swobodnych do równania opisującego całkowitą zmianę entalpii swobodnej:

$$\Delta G_{obs} = \Delta G_{pe} + \Delta G_{konf} + \Delta G_{r+t} + \Delta G_{hyd} + \Delta G_{mol}$$

otrzymujemy:

$$\Delta G_{obs} = -11,06 + 16,72 + 62,28 + (-19,79) + \Delta G_{mol} = -27,20$$

Zmiana entalpii swobodnej słabych oddziaływań niekowalencyjnych w buforze z 25 mM chlorkiem sodu wynosi wtedy $\Delta G_{mol} = -75,35 \text{ kJmol}^{-1}$.

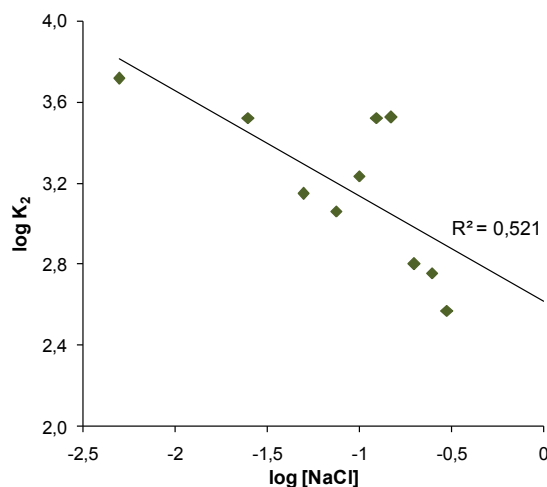


Rycina 56. Wkład poszczególnych zmian entalpii swobodnej do całkowitej, obserwowanej zmiany entalpii swobodnej dla interkalacji proflawiny do ctDNA w buforze Hepes o 25 mM stężeniu NaCl w temperaturze 25°C

Analizując diagram przedstawiony na Ryc. 56 można stwierdzić, że podczas oddziaływania proflawiny z ctDNA utworzenie kompleksu następuje głównie w wyniku uwolnienia energii podczas powstawania nowych oddziaływań niekowalencyjnych, ΔG_{mol} , przede wszystkim oddziaływań van der Waalsa oraz oddziaływań typu π - π . Korzystny udział w tym procesie ma również energia wynikająca z przeniesienia aromatycznej cząsteczki z roztworu wodnego do hydrofobowego wnętrza podwójnej helisy DNA, ΔG_{hyd} , oraz oddziaływania elektrostatyczne polarnego liganda z polianionem DNA, ΔG_{pe} .

Szczegółowa analiza termodynamiki elektrostatycznych oddziaływań zagregowanych cząsteczek proflawiny z polianionem DNA nie była przedmiotem moich

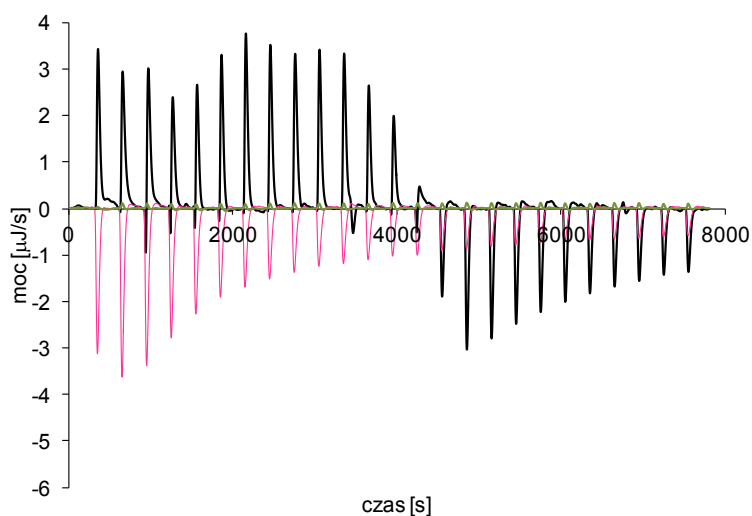
badania. Jednak analizując Tabelę 14 oraz Ryc. 57 można zauważyć, że wraz ze wzrostem siły jonowej buforu obserwuje się spadek stałej wiązania agregatów do ctDNA. Jedynie dwa punkty (bufor z 125 mM oraz 150 mM NaCl) odbiegają od tego ogólnego trendu.



Rycina. 57. Zależność logarytmu naturalnego ze stałej wiązania zagregowanych cząsteczek proflawiny K_2 od logarytmu ze stężenia soli, $[NaCl]$

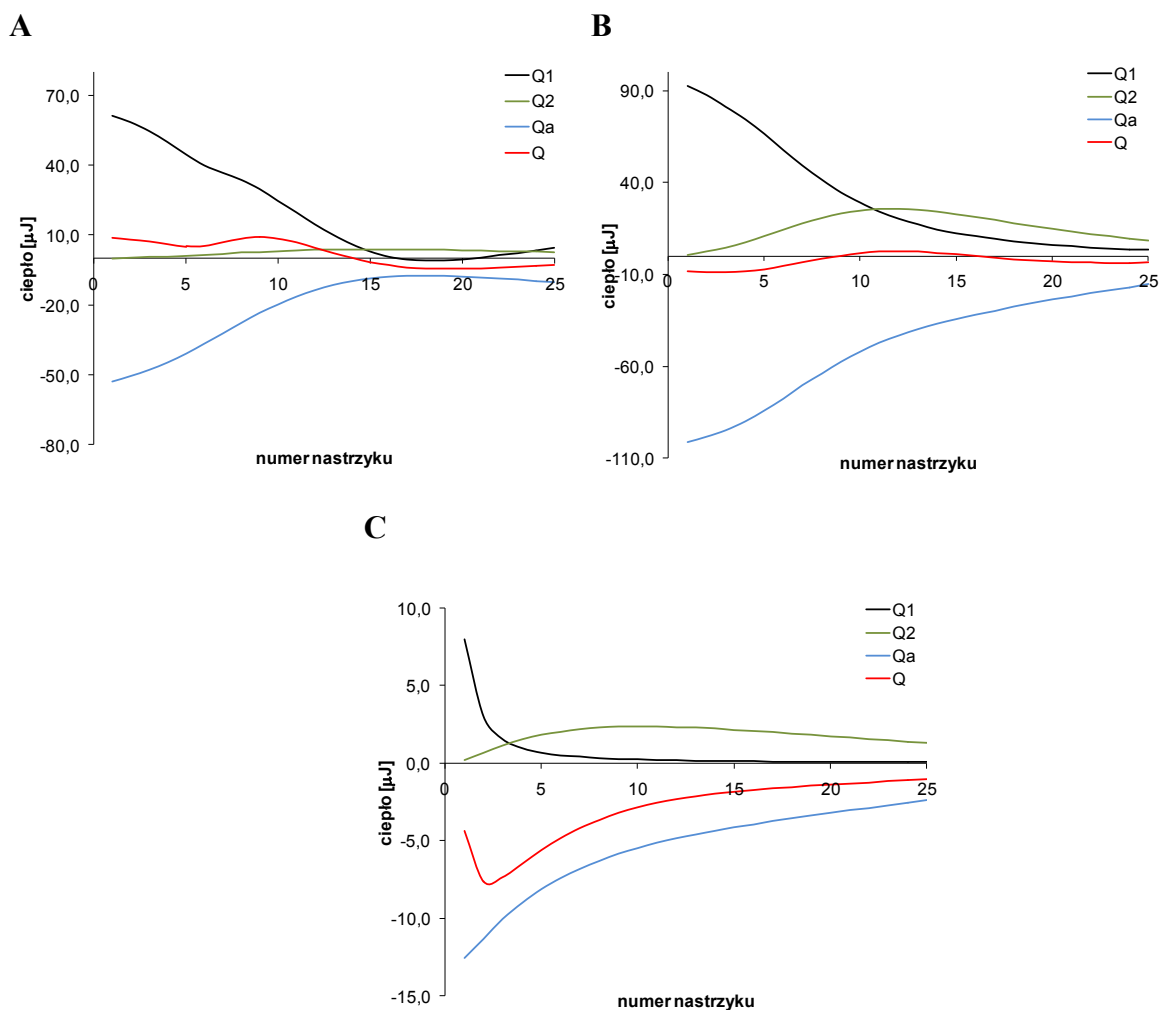
V.5.2. Analiza termodynamiczna oddziaływań imidzoakrydonu C-1330 z ctDNA

Analogicznie jak dla proflawiny, wykonałam pomiary mikrokalorymetryczne dla oddziaływań pochodnej C-1330 z ctDNA. Przedstawiony na Ryc. 58 termogram oddziaływania C-1330 z ctDNA sugeruje, że podobnie jak w przypadku proflawiny, mamy tutaj do czynienia z dwoma typami oddziaływań.



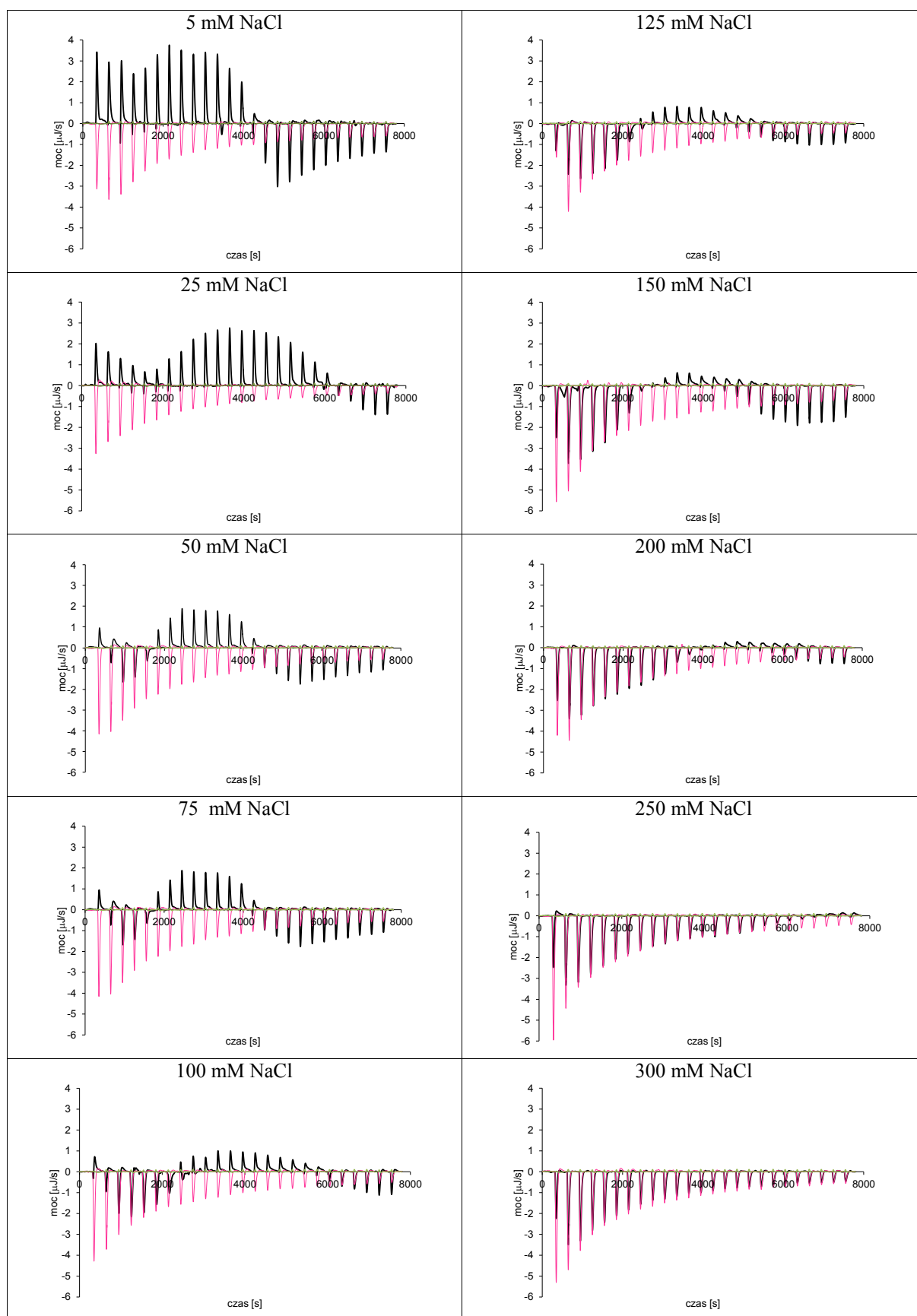
Rycina 58. Cykl pomiarów mikrokalorymetrycznych oddziaływania pochodnej C-1330 z ctDNA w 25°C, **kolor czarny** – miareczkowanie ctDNA roztworem pochodnej C-1330, **kolor różowy** – miareczkowanie buforu roztworem pochodnej C-1330, **kolor zielony** – miareczkowanie ctDNA buforem. Stężenie wyjściowego roztworu C-1330 2 mM, ctDNA 0,1 mM pz, bufor HEPES o 5 mM stężeniu NaCl. Miareczkowanie nastrzykami po 10 µl roztworu pochodnej C-1330

Analogicznie jak dla proflawiny na Ryc. 59.A przedstawiłam profile efektów cieplnych poszczególnych rodzajów oddziaływań występujących podczas miareczkowania (efekt cieplny odpowiadający interkalacji, efekt cieplny wiązania agregatów, efekt cieplny deagregacji, całkowity efekt cieplny nastrzyku) w buforze niskosolnym. Jak widać z zaprezentowanych profili, na całkowity efekt cieplny przeprowadzonego doświadczenia składają się jednocześnie trzy rodzaje oddziaływań, dlatego interpretacja termodynamiczna takiego przebiegu bez jego dekompozycji jest praktycznie niemożliwa.



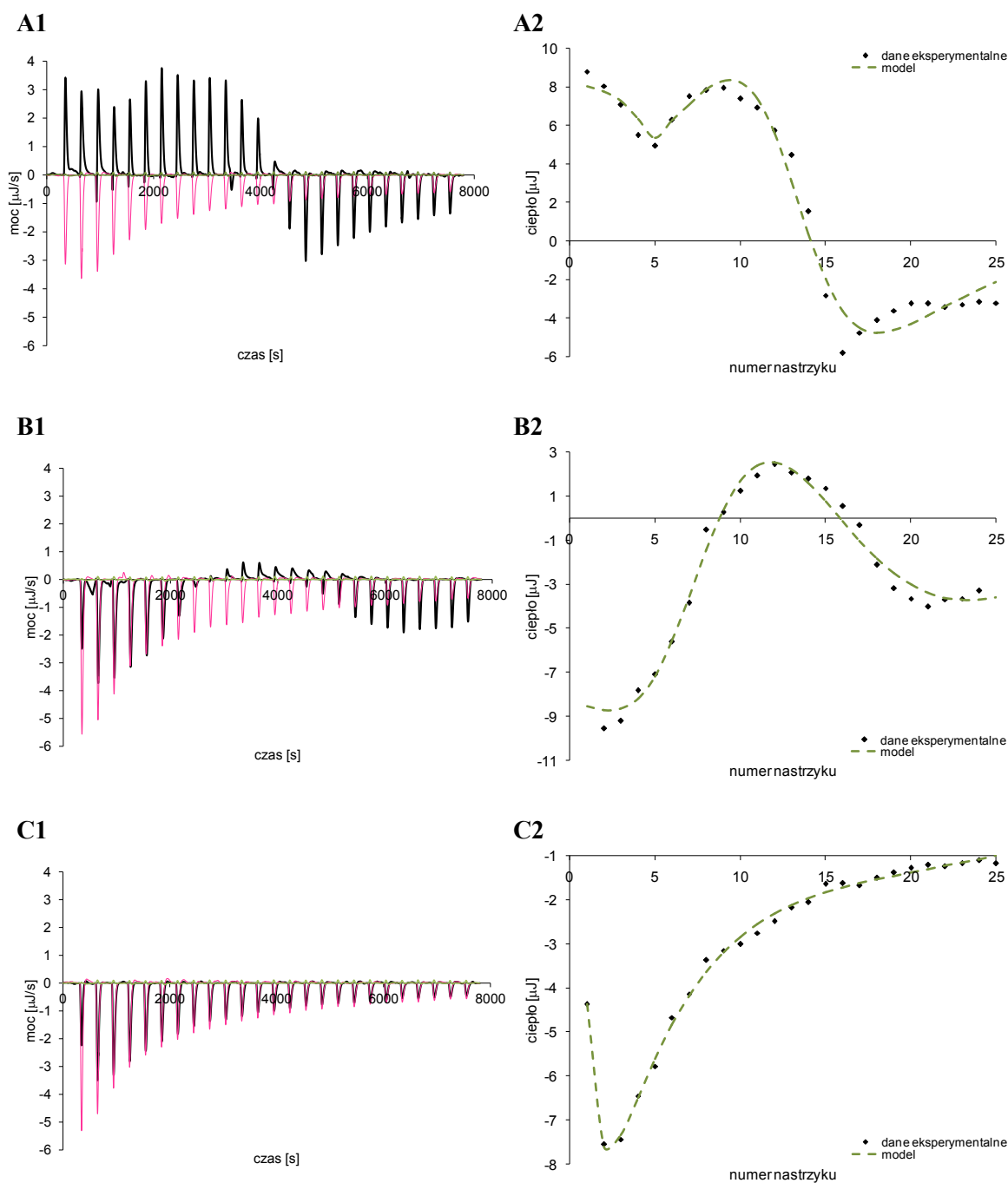
Rycina 59. Udział poszczególnych efektów cieplnych: **kolor czarny** – efekt cieplny interkalacji (Q1), **kolor zielony** – efekt cieplny wiązania agregatów (Q2), **kolor niebieski** – efekt cieplny deagregacji (Qa), **kolor czerwony** - całkowity efekt cieplny nastrzyku (Q). Stężenie wyjściowego roztworu C-1330 2 mM, ctDNA 0,1 mM pz, bufor Hepes o 5 mM (A), 150 mM (B) oraz 300 mM (C) stężeniu NaCl

Oddziaływanie ligand - DNA śledziłam w dziesięciu buforach różniących się stężeniem chlorku sodu. Otrzymane termogramy dla wszystkich badanych roztworów przedstawiłam na Ryc. 60.



Rycina 60. Cykl pomiarów mikrokalorymetrycznych oddziaływania pochodnej C-1330 z ctDNA w 25°C, **kolor czarny** – miareczkowanie ctDNA roztworem pochodnej C-1330, **kolor różowy** – miareczkowanie buforu roztworem pochodnej C-1330, **kolor zielony** – miareczkowanie ctDNA buforem. Siężenie wyjściowego roztworu C-1330 2 mM, ctDNA 0,1 mM pz, bufor Hepes. Miareczkowanie nastrzykami po 10 µl roztworu pochodnej C-1330

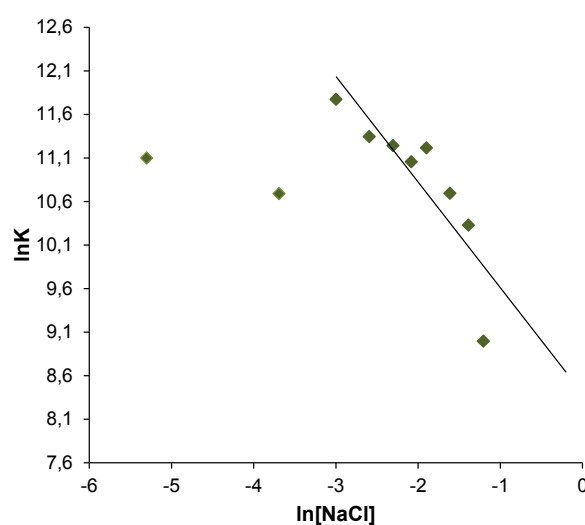
Do uzyskanych danych eksperymentalnych został następnie dopasowany przedstawiony wcześniej model oddziaływań, zgodnie z procedurą opisaną p. IV.5.7. Izoterm dopasowania modelu przedstawiłam na Ryc. 61 w panelach A2, B2, C2.



Rycina 61. A1, B1, C1: cykl pomiarów mikrokalorymetrycznych oddziaływania C-1330 z ctDNA w 25°C, kolor czarny – miareczkowanie ctDNA roztworem C-1330, kolor różowy – miareczkowanie buforu roztworem C-1330, kolor zielony – miareczkowanie ctDNA buforem. Stężenie wyjściowego roztworu C-1330 2mM, ctDNA 0,1 mM pz, bufor Hepes o 5 mM (A1), 150 mM (B1) oraz 300 mM (C1) stężeniu NaCl. Miareczkowanie nastrzykami po 10 µl roztworu proflawiny. A2, B2 C2: dopasowanie modelu do izoterm oddziaływania C-1330 z ctDNA w 25°C odpowiadających termogramom A1, B1 i C1

Oszacowane zostały w ten sposób parametry termodynamiczne oddziaływania monomerów (K_1 , ΔH_1 , n) oraz agregatów (K_2 , ΔH_2) C-1330 z DNA w dziesięciu buforach. Uzyskane wartości parametrów zebrane zostały w Tabeli 16. Wraz ze wzrostem siły jonowej buforu obserwuje się spadek stałej wiązania monomerów z ctDNA (K_1), przy jednoczesnym wzroście stałej wiązania zagregowanych cząsteczek do ctDNA (K_2), (Tabela 16). Odmiennie niż w przypadku proflawiny, oddziaływaniu monomerów z ctDNA towarzyszy dodatni przyrost entropii, z jednoczesnym spadkiem entalpii. Taki profil termodynamiczny jest charakterystyczny dla związków wiążących się w małym rowku DNA. Można więc wnioskować, że łańcuch boczny pochodnej C-1330 lokuje się w rowku podwójnej helisy.

Aby wyznaczyć zmianę entalpii oddziaływań elektrostatycznych wyznaczyłam nachylenie prostej, opisującej zależność funkcję $\ln K = f(\ln[\text{NaCl}])$, Ryc. 62. Podczas wyznaczania współczynnika nachylenia prostej odrzuciłam punkt odpowiadający buforowi z 5 i 25 mM chlorkiem sodu, ponieważ stała wiązania w tych buforach odbiegała znacznie od pozostałych wartości (Ryc. 62). Wyznaczony współczynnik nachylenia prostej SK wynosi $-1,21 \pm 0,15$. Następnie na podstawie wartości SK oszacowałam udziały zmian entalpii swobodnej oddziaływań elektrostatycznych (Tabela 17). Wraz ze wzrostem stężenia soli w buforze wyznaczona wartość ΔG_{pe} maleje. Zmiany entalpii swobodnej oddziaływań pozaelektrostatycznych utrzymują się natomiast na zbliżonym poziomie i stanowią ok. 69-84 % udziału całkowitej entalpii swobodnej.



Rycina 62. Zależność logarytmu naturalnego ze stałej wiązania K_1 dla C-1330 od logarytmu naturalnego ze stężenia soli, $[\text{NaCl}]$

Tabela 16. Parametry termodynamiczne oddziaływania C-1330 z ctDNA w buforach o różnym stężeniu NaCl i w różnej temperaturze

Warunki procesu	Parametry termodynamiczne procesu								
	$K_1 \cdot 10^{-4}$ [M ⁻¹]	n	ΔH_1 [kJ/mol]	ΔG_1 [kJ/mol]	$T\Delta S_1$ [kJ/mol]	$K_2 \cdot 10^{-4}$ [M ⁻¹]	ΔH_2 [kJ/mol]	ΔG_2 [kJ/mol]	$T\Delta S_2$ [kJ/mol]
5 mM NaCl, 25°C	6,60 ± 0,58	0,62 ± 0,01	-26,39 ± 7,54	-27,50 ± 1,09	1,11 ± 0,90	2,22 ± 0,55	-20,01 ± 3,43	-24,80 ± 1,07	-24,73 ± 0,25
25 mM NaCl, 25°C	4,34 ± 0,20	0,75 ± 0,03	-24,54 ± 9,21	-26,49 ± 0,20	1,95 ± 0,35	1,27 ± 0,36	-43,61 ± 3,50	-23,41 ± 0,39	-20,19 ± 1,90
50 mM NaCl, 25°C	12,97 ± 0,20	1,02 ± 0,13	-52,09 ± 1,21	-29,17 ± 0,87	6,88 ± 0,21	3,71 ± 0,03	-51,21 ± 0,21	-26,08 ± 0,26	-24,88 ± 1,03
75 mM NaCl, 25°C	8,46 ± 0,56	1,08 ± 0,05	-23,08 ± 1,41	-28,11 ± 1,06	5,02 ± 0,21	6,10 ± 0,32	-59,24 ± 1,42	-27,30 ± 0,18	-31,94 ± 0,14
100 mM NaCl, 25°C	7,62 ± 0,85	0,99 ± 0,01	-19,66 ± 3,63	-27,86 ± 0,79	8,20 ± 0,15	5,99 ± 0,17	-42,21 ± 7,03	-27,26 ± 0,01	-15,25 ± 0,65
125 mM NaCl, 25°C	6,32 ± 0,26	0,98 ± 0,33	-17,54 ± 0,75	-27,39 ± 0,89	9,86 ± 0,92	7,26 ± 1,38	-27,71 ± 3,43	-27,73 ± 0,13	-0,03 ± 0,01
150 mM NaCl, 25°C	7,34 ± 1,64	0,69 ± 0,03	-15,55 ± 1,63	-27,79 ± 1,54	12,24 ± 1,03	8,99 ± 0,51	-31,74 ± 1,45	-28,27 ± 0,02	-3,48 ± 0,15
200 mM NaCl, 25°C	1,41 ± 0,19	0,71 ± 0,01	-15,83 ± 10,41	-23,67 ± 0,58	7,85 ± 0,01	6,07 ± 0,36	-19,54 ± 1,21	-27,29 ± 0,19	7,75 ± 0,02
250 mM NaCl, 25°C	3,06 ± 0,56	1,35 ± 0,18	-13,04 ± 0,18	-25,59 ± 1,02	12,55 ± 1,03	0,47 ± 0,07	-58,51 ± 2,18	-20,60 ± 0,76	-37,91 ± 0,12
300 mM NaCl, 25°C	0,81 ± 0,13	1,32 ± 0,12	-12,96 ± 1,37	-22,29 ± 0,34	9,33 ± 0,21	1,41 ± 0,50	-15,15 ± 0,73	-23,67 ± 0,28	8,52 ± 1,00
25 mM NaCl, 35°C	4,23 ± 0,34	1,53 ± 0,11	-28,93 ± 1,09	-27,28 ± 0,62	-1,65 ± 0,38	2,44 ± 0,09	-48,90 ± 1,09	-25,87 ± 0,12	-23,03 ± 1,98

Tabela 17. Zmiany entalpii swobodnych oddziaływania monokationów C-1330 z ctDNA w buforach o różnym stężeniu NaCl i w różnej temperaturze

Warunki procesu	Parametry termodynamiczne procesu				
	ΔG_{obs} [kJ/mol]	ΔG_{pe} [kJ/mol]	ΔG_t [kJ/mol]	ΔC_p [J/(molK)]	ΔG_{hyd} [kJ/mol]
5 mM NaCl, 25°C	-27,50 ± 1,09	nw	nw	-253,99 ± 51,96	-20,32 (±10)
25 mM NaCl, 25°C	-26,49 ± 0,20	nw	nw		
50 mM NaCl, 25°C	-29,17 ± 0,87	-9,00 ± 0,10	-20,16 ± 0,12		
75 mM NaCl, 25°C	-28,11 ± 1,06	-7,79 ± 0,90	-20,33 ± 0,19		
100 mM NaCl, 25°C	-27,86 ± 0,79	-6,92 ± 0,23	-20,93 ± 1,09		
125 mM NaCl, 25°C	-27,39 ± 0,89	-6,25 ± 0,50	-21,14 ± 1,26		
150 mM NaCl, 25°C	-27,79 ± 1,54	-5,70 ± 0,52	-22,09 ± 0,91		
200 mM NaCl, 25°C	-26,50 ± 0,58	-4,84 ± 1,09	-21,66 ± 0,24		
250 mM NaCl, 25°C	-25,59 ± 1,02	-4,16 ± 0,25	-21,43 ± 1,04		
300 mM NaCl, 25°C	-22,29 ± 0,34	-3,62 ± 0,27	-18,67 ± 0,79		
25 mM NaCl, 35°C	-27,28 ± 0,62	-15,92 ± 0,82	-11,35 ± 0,56		

nw – nie wyznaczone

Podobnie jak w badaniach proflawiny, dla pochodnej C-1330 udało mi się również wyznaczyć stałe wiązania i zmianę entalpii dla reakcji zachodzącej w 35°C. Dzięki temu możliwe było wyznaczenie wartości zmian pojemności cieplnej układu, ΔC_p , co z kolei pozwoliło określić udział oddziaływań hydrofobowych w procesie, ΔG_{hyd} .

Analogicznie jak w przypadku proflawiny założyłam, że w trakcie wiązania monokationów C-1330 nie dochodzi do zmian konformacyjnych w strukturze liganda. Nie ma jednak aktualnie danych wartości funkcji termodynamicznej ΔG_{konf} dla interkalatorów, które w swojej strukturze posiadają dodatkowe łańcuchy boczne, dlatego też w tej pracy założyłam, taką samą wartość ΔG_{konf} jak dla klasycznych interkalatorów: $\Delta G_{konf} = 16,72 \text{ kJmol}^{-1}$ [121, 164]. Założenie to prawdopodobnie obarczone jest błędem.

Wstawiając wyżej wymienione zmiany entalpii swobodnych dla buforu z 50 mM chlorkiem sodu do równania:

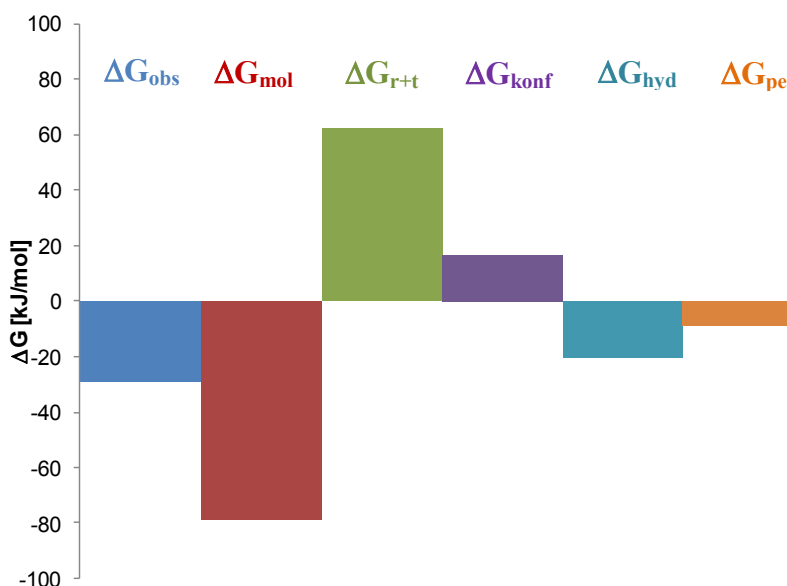
$$\Delta G_{obs} = \Delta G_{pe} + \Delta G_{konf} + \Delta G_{r+t} + \Delta G_{hyd} + \Delta G_{mol}$$

otrzymujemy:

$$\Delta G_{\text{obs}} = -9,00 + 62,28 + 16,72 + \Delta G_{\text{mol}} + (-20,32) = -29,17$$

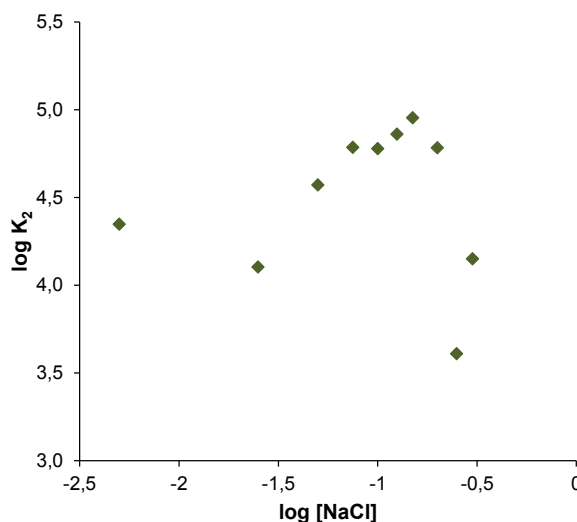
$$\Delta G_{\text{mol}} = -78,85 \text{ kJmol}^{-1}$$

Podobnie jak w przypadku proflawiny, utworzenie kompleksu interkalacyjnego C-1330 z ctDNA następuje głównie wskutek tworzenia nowych wiązań niekowalencyjnych, ΔG_{mol} , oraz energii uzyskanej z przeniesienia aromatycznej cząsteczki z roztworu wodnego do wnętrza podwójnej helisy DNA, ΔG_{hyd} , (Ryc. 63). Niewielki udział mają również oddziaływania elektrostatyczne, ΔG_{pe} .



Rycina 63. Wkład poszczególnych zmian entalpii swobodnej w całkowitej, obserwowanej zmianie entalpii swobodnej dla oddziaływania C-1330 z ctDNA w buforze HEPES o 50mM stężeniu NaCl w temperaturze 25°C

Analizując oddziaływanie elektrostatyczne agregatów C-1330 z ctDNA (Tabela 16 oraz Ryc. 64) można zauważyć, że dla tej pochodnej wraz ze wzrostem stężenia soli w buforze w przedziale stężeń soli od 25 do 200 mM obserwujemy wzrost stałej wiązania agregatów z ctDNA. Odstępstwa od tego trendu dla dwóch najwyższych stężeń mogą być wynikiem niepewności oszacowania odpowiednich parametrów termodynamicznych.

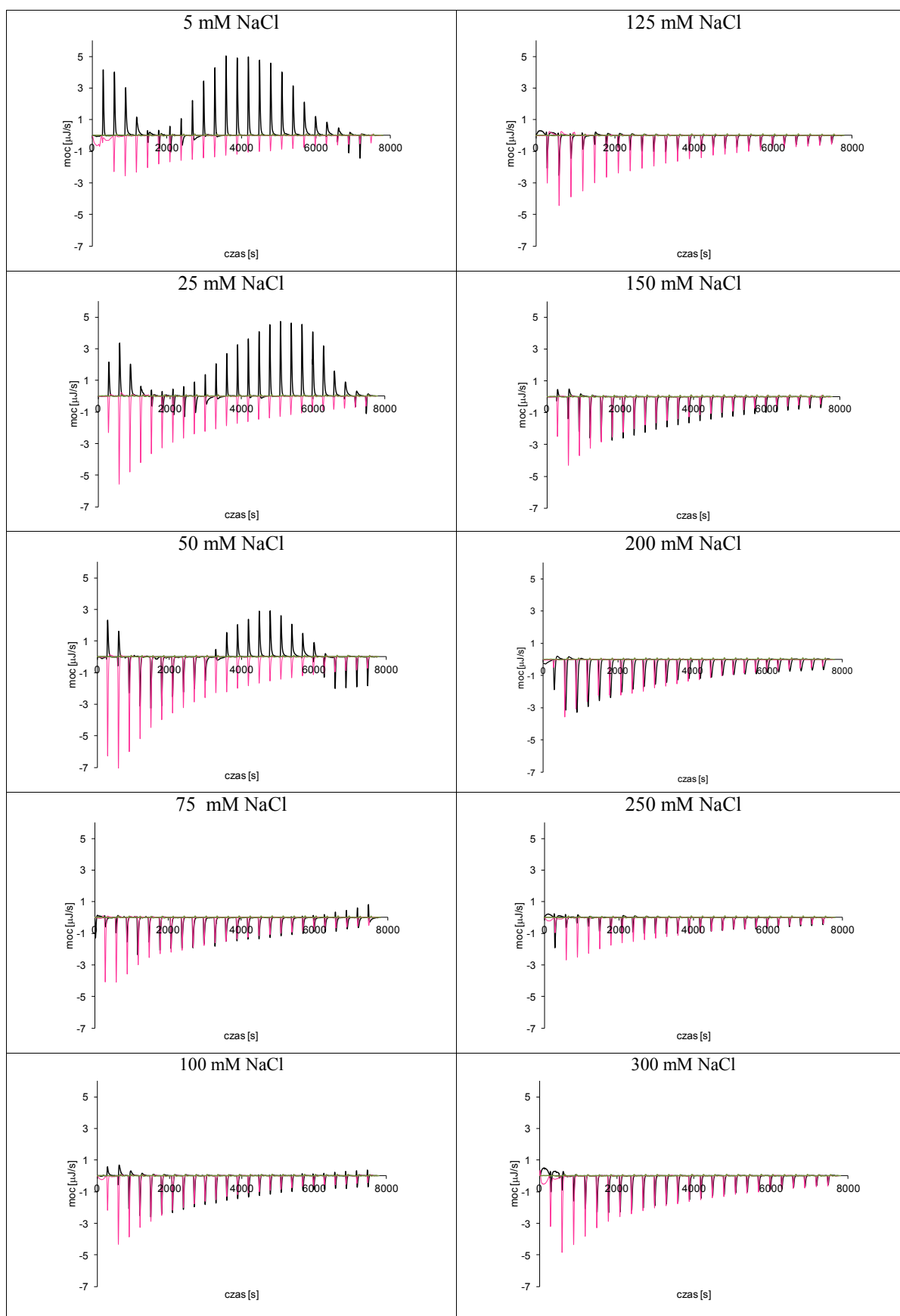


Rycina 64. Zależność logarytmu naturalnego ze stałej wiązania zagregowanych cząsteczek C-1330 K_2 od logarytmu ze stężenia soli, $[\text{NaCl}]$

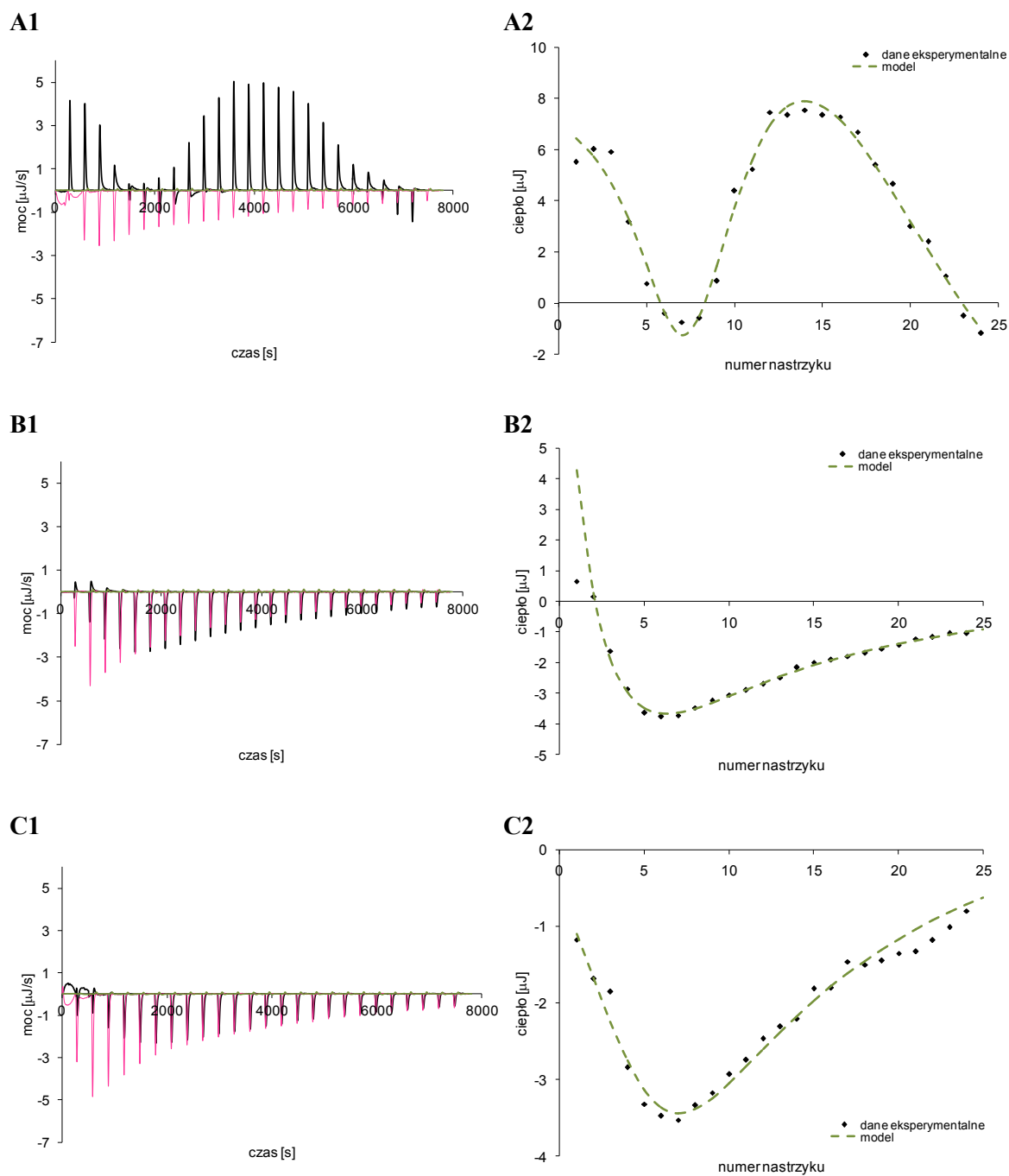
V.5.3. Analiza termodynamiczna oddziaływań imidazoakrydonu C-1415 z ctDNA

Kolejnym badanym związkiem był imidazoakrydon C-1415. Pomiary mikrokalorymetryczne wykonałam zgodnie z procedurą zamieszczoną w p.IV.5.6. Przeprowadziłam serię miareczkowań roztworu DNA roztworem związku w buforach o różnej sile jonowej (5 - 300 mM NaCl). Uzyskane przebiegi miareczkowań przedstawiłam na Ryc. 65.

Do uzyskanych danych doświadczalnych dopasowałam następnie opracowany model oddziaływań, zgodnie z procedurą opisaną p. IV.5.7. przykłady dopasowania modelu do trzech przykładowych izoterm oddziaływania przedstawiłam na Ryc. 66. W wyniku dopasowania modelu oszacowane zostały wartości parametrów modelu w dziesięciu buforach o różnych stężeniach soli (Tabela 18). Analogicznie jak dla pochodnej C-1330 siła jonowa buforu ma wpływ na stałą wiązania cząsteczek do DNA. Wraz ze wzrostem siły jonowej buforu obserwuje się spadek stałej wiązania monomerów z ctDNA (K_1), przy jednoczesnym wzroście stałej wiązania zagregowanych cząsteczek (K_2), (Tabela 18). Stałe wiązania są rzędu 10^4 , jednak są one wyraźnie niższe niż w przypadku pochodnej C-1330. Parametry termodynamiczne dla reakcji prowadzonych w buforze w podwyższonej temperaturze wyznaczone w wyniku dopasowania modelu oddziaływań obarczone były tak dużym błędem oszacowania, że nie uwzględniłam ich w dalszych rozważaniach. Wartości tych nie umieściłam również w Tabeli 18.



Rycina 65. Cykl pomiarów mikrokalorymetrycznych oddziaływania pochodnej C-1415 z ctDNA w 25°C, **kolor czarny** – miareczkowanie ctDNA roztworem pochodnej C-1415, **kolor różowy** – miareczkowanie buforu roztworem pochodnej C-1415, **kolor zielony** – miareczkowanie ctDNA buforem. Stężenie wyjściowego roztworu C-1415 2 mM, ctDNA 0,1 mM pz, bufor Hepes. Miareczkowanie nastrzykami po 10 μl roztworu pochodnej C-1415



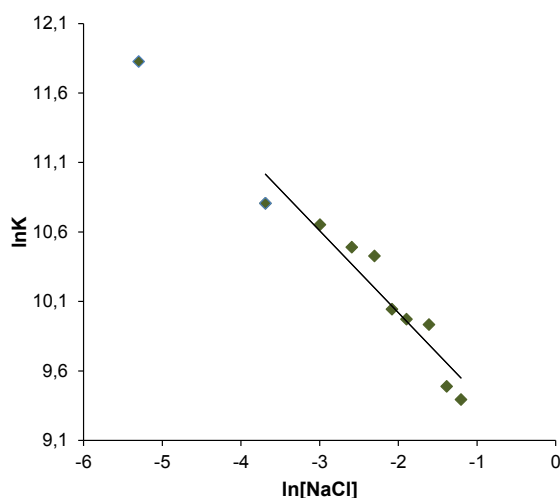
Rycina 66. A1, B1, C1: Cykl pomiarów mikrokalorymetrycznych oddziaływania C-1415 z ctDNA w 25°C, kolor czarny – miareczkowanie ctDNA roztworem C-1415, kolor różowy – miareczkowanie buforu roztworem C-1415, kolor zielony – miareczkowanie ctDNA buforem. Stężenie wyjściowego roztworu C-1415, 1 mM, ctDNA 0,06 mM, bufor HEPES o 5 mM (A1), 150 mM (B1) oraz 300 mM (C1) stężeniu NaCl. Miareczkowanie nastrzykami po 10 µl roztworu C-1415. A2, B2, C2: dopasowanie modelu do izoterm oddziaływania C-1415 z ctDNA w 25°C odpowiadających termogramom A1, B1 i C1

Tabela 18. Parametry termodynamiczne oddziaływania C-1415 z ctDNA w buforach o różnym stężeniu NaCl i w różnej temperaturze

Warunki procesu	Parametry termodynamiczne procesu								
	$K_1 \cdot 10^{-4}$ [M ⁻¹]	n	ΔH_1 [kJ/mol]	ΔG_1 [kJ/mol]	$T\Delta S_1$ [kJ/mol]	$K_2 \cdot 10^{-4}$ [M ⁻¹]	ΔH_2 [kJ/mol]	ΔG_2 [kJ/mol]	$T\Delta S_2$ [kJ/mol]
5 mM NaCl, 25°C	13,68 ± 0,20	0,80 ± 0,01	-24,95 ± 1,87	-29,30 ± 0,23	4,35 ± 0,12	0,75 ± 0,10	-38,46 ± 1,71	-12,13 ± 1,07	-16,33 ± 1,02
25 mM NaCl, 25°C	4,93 ± 0,43	0,98 ± 0,04	-21,62 ± 1,94	-26,78 ± 0,54	5,15 ± 2,09	3,96 ± 0,10	-38,48 ± 6,13	-26,24 ± 2,00	-12,24 ± 0,68
50 mM NaCl, 25°C	4,23 ± 0,40	1,16 ± 0,38	-22,12 ± 1,15	-26,39 ± 0,48	4,28 ± 1,05	0,99 ± 0,38	-37,97 ± 1,72	-22,81 ± 1,01	-15,16 ± 1,04
75 mM NaCl, 25°C	3,59 ± 0,34	1,37 ± 0,33	-20,04 ± 1,23	-25,99 ± 1,02	5,59 ± 0,23	0,38 ± 0,10	-27,11 ± 8,66	-20,44 ± 0,57	-6,67 ± 0,66
100 mM NaCl, 25°C	3,37 ± 0,97	1,68 ± 0,13	-17,34 ± 3,72	-25,83 ± 0,79	7,49 ± 2,01	0,47 ± 0,16	-9,71 ± 1,37	-20,97 ± 0,24	11,96 ± 1,03
125 mM NaCl, 25°C	2,30 ± 0,97	1,39 ± 0,15	-15,10 ± 4,54	-24,89 ± 0,29	9,79 ± 0,12	3,46 ± 0,32	-14,46 ± 2,06	-25,90 ± 0,36	11,43 ± 0,83
150 mM NaCl, 25°C	2,14 ± 0,81	1,71 ± 0,25	-14,49 ± 2,06	-24,71 ± 1,03	10,22 ± 1,89	2,87 ± 0,13	-5,57 ± 0,14	-25,44 ± 0,52	19,87 ± 1,92
200 mM NaCl, 25°C	2,06 ± 0,31	2,50 ± 0,50	-15,90 ± 1,90	-24,61 ± 0,92	8,71 ± 2,09	3,09 ± 0,76	-13,98 ± 1,98	-25,62 ± 1,00	11,66 ± 1,19
250 mM NaCl, 25°C	1,32 ± 0,09	2,2 ± 0,44	-14,46 ± 2,08	-23,51 ± 1,05	9,05 ± 1,08	3,99 ± 0,17	-10,10 ± 1,53	-26,25 ± 1,05	16,15 ± 1,52
300 mM NaCl, 25°C	1,21 ± 0,08	1,34 ± 0,38	-10,47 ± 1,05	-23,28 ± 1,21	12,81 ± 2,04	4,14 ± 0,31	-20,41 ± 1,45	-26,77 ± 0,90	6,66 ± 0,15
25 mM NaCl, 35°C	nw	nw	nw	nw	nw	nw	nw	nw	nw

nw – nie wyznaczone

Aby wyznaczyć zmianę entalpii oddziaływań elektrostatycznych wyznaczyłam nachylenie prostej zależności logarytmu naturalnego ze stałej wiązania K_1 do logarytmu naturalnego ze stężenia soli NaCl w buforze, Ryc. 67. Wyznaczony współczynnik nachylenia prostej SK wynosi $-0,59 \pm 0,07$. Następnie, na podstawie wartości SK oszacowałam udziały zmian entalpii swobodnej oddziaływań elektrostatycznych (Tabela 19). Wraz ze wzrostem stężenia soli w buforze wyznaczona wartość ΔG_{pe} maleje. Zmiany entalpii swobodnej oddziaływań pozaelektrostatycznych utrzymują się natomiast na zbliżonym poziomie i stanowią ok. 73-92 % udziału całkowitej zmiany entalpii swobodnej.



Rycina 67. Zależność logarytmu naturalnego ze stałej wiązania C-1415 K_1 od logarytmu naturalnego ze stężenia soli, [NaCl]

Analogicznie jak w przypadku proflawiny i C-1330 założyłam, że w trakcie wiązania monokationów C-1415 nie dochodzi do zmian konformacyjnych w strukturze liganda, w tym wypadku wartość ΔG_{konf} jest generowana przez zmiany w strukturze podwójnej helisy. Wartość ΔG_{konf} wynosi wtedy $16,72 \text{ kJmol}^{-1}$ [121, 164].

Wstawiając wyżej wymienione zmiany entalpii swobodnych dla buforu z 25 mM chlorkiem sodu do równania:

$$\Delta G_{obs} = \Delta G_{pe} + \Delta G_{konf} + \Delta G_{r+t} + \Delta G_{hyd} + \Delta G_{mol}$$

otrzymujemy:

$$\Delta G_{obs} = -5,39 + 62,28 + 16,72 + \Delta G_{hyd} + \Delta G_{mol} = -26,78$$

Ponieważ nie udało mi się wyznaczyć doświadczalnie zmian pojemności cieplnej układu, ΔC_p , byłam w stanie oszacować jedynie łączną zmianę entalpii oddziaływań hydrolobowych i niekowalencyjnych:

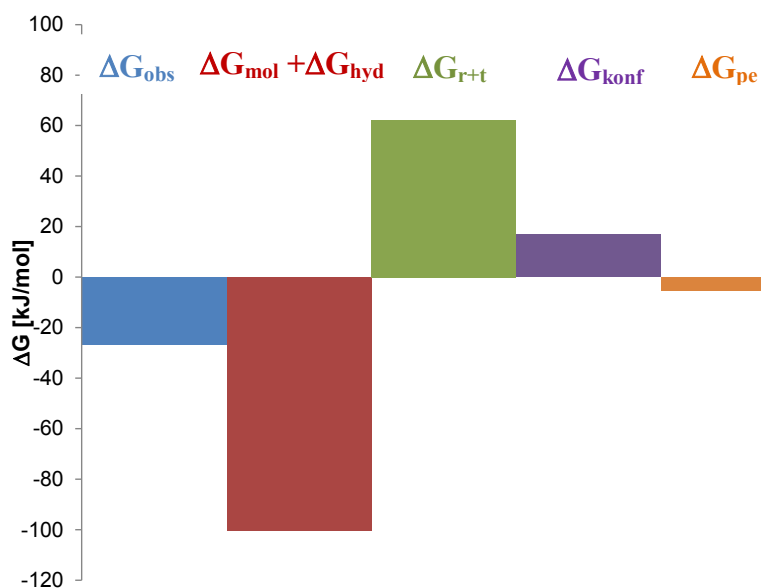
$$(\Delta G_{hyd} + \Delta G_{mol}) = -100,39 \text{ kJmol}^{-1}$$

Tabela 19. Zmiany entalpii swobodnych oddziaływania monokationów C-1415 z ctDNA w buforach o różnym stężeniu NaCl i w różnej temperaturze

Warunki procesu	Parametry termodynamiczne procesu				
	ΔG_{obs} [kJ/mol]	ΔG_{pe} [kJ/mol]	ΔG_{t} [kJ/mol]	ΔC_p [J/(molK)]	ΔG_{hyd} [kJ/mol]
5 mM NaCl, 25°C	-29,30 ± 0,23	nw	nw	nw	nw
25 mM NaCl, 25°C	-26,78 ± 0,54	-5,39 ± 0,06	-2,38 ± 1,34		
50 mM NaCl, 25°C	-26,39 ± 0,48	-4,38 ± 0,03	-22,01 ± 0,78		
75 mM NaCl, 25°C	-25,99 ± 1,02	-3,79 ± 0,21	-22,20 ± 0,31		
100 mM NaCl, 25°C	-25,83 ± 0,79	-3,04 ± 0,08	-22,47 ± 0,38		
125 mM NaCl, 25°C	-24,89 ± 0,29	-2,77 ± 0,29	-21,85 ± 0,56		
150 mM NaCl, 25°C	-24,71 ± 1,03	-2,35 ± 0,14	-21,93 ± 0,12		
200 mM NaCl, 25°C	-24,61 ± 0,92	-2,35 ± 0,02	-22,26 ± 1,95		
250 mM NaCl, 25°C	-23,51 ± 1,05	-2,03 ± 0,17	-21,48 ± 0,57		
300 mM NaCl, 25°C	-23,28 ± 1,21	-1,76 ± 0,01	-21,52 ± 1,26		
25 mM NaCl, 35°C	nw	nw	nw		

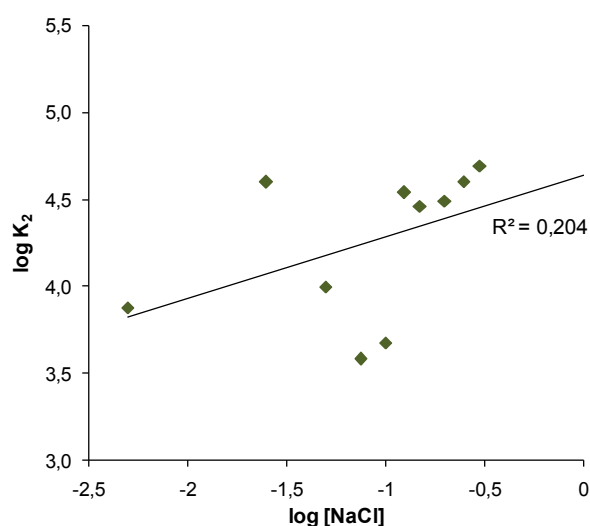
nw – nie wyznaczone

Analizując diagram wkładów poszczególnych zmian entalpii swobodnych (Ryc. 68) można zauważyć, że podobnie jak w przypadku proflawiny oraz C-1330, tworzenie kompleksu C-1415 z ctDNA następuje głównie wskutek tworzenia nowych wiązań niekowalencyjnych i energii uzyskanej dzięki przeniesieniu aromatycznej cząsteczki z roztworu wodnego do wnętrza podwójnej helisy DNA, ($\Delta G_{\text{hyd}} + \Delta G_{\text{mol}}$). Udział zmian entalpii swobodnej oddziaływań elektrostatycznych jest w przypadku tej pochodnej wyjątkowo mały.



Rycina 68. Wkład poszczególnych zmian entalpii swobodnej w całkowitej, obserwowanej zmianie entalpii swobodnej dla oddziaływania C-1415 z ctDNA w buforze Hepes o 25mM stężeniu NaCl w temperaturze 25°C

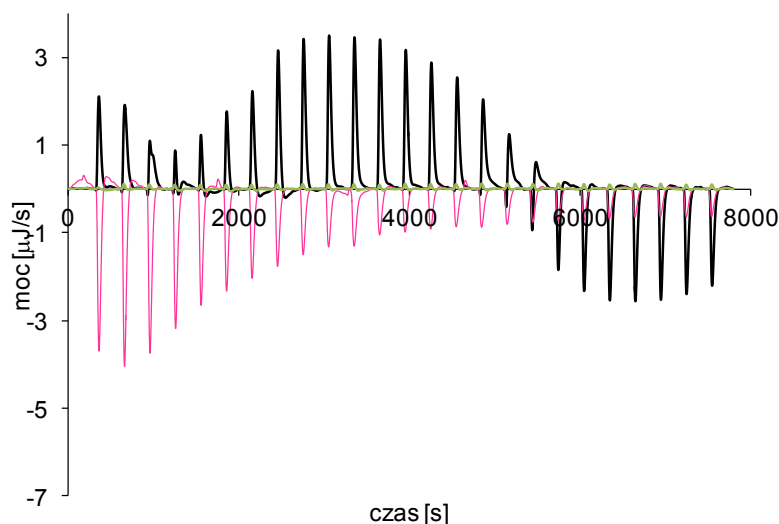
Dla oddziaływania agregatów z ctDNA podobnie jak dla pochodnej C-1330 obserwuje się nieznaczny wzrost stałej wiązania K_2 wraz ze wzrostem siły jonowej buforu, (Tabela 18, Ryc 69).



Rycina 69. Zależność logarytmu naturalnego ze stałej wiązania zagregowanych cząsteczek C-1415 K_2 od logarytmu ze stężenia soli, $[NaCl]$

V.5.4. Analiza termodynamiczna oddziaływań imidzoakrydonu C-1212 z ctDNA

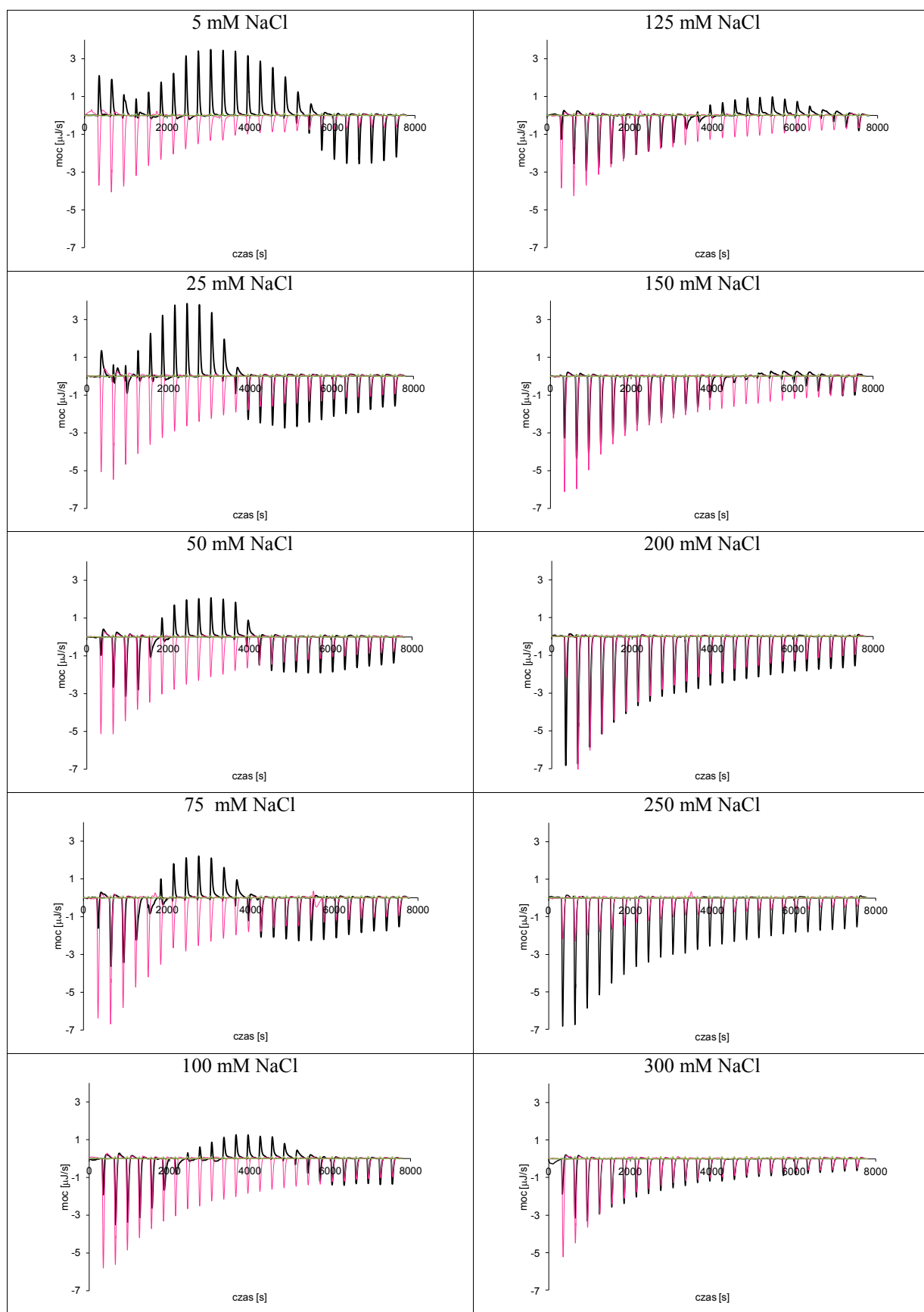
Kolejnym badanym związkiem była pochodna C-1212. Wyniki uzyskane podczas miareczkowania ctDNA tym związkiem w buforze niskosolnym (5 mM NaCl) w temperaturze 25°C przedstawiłam na Ryc 70.



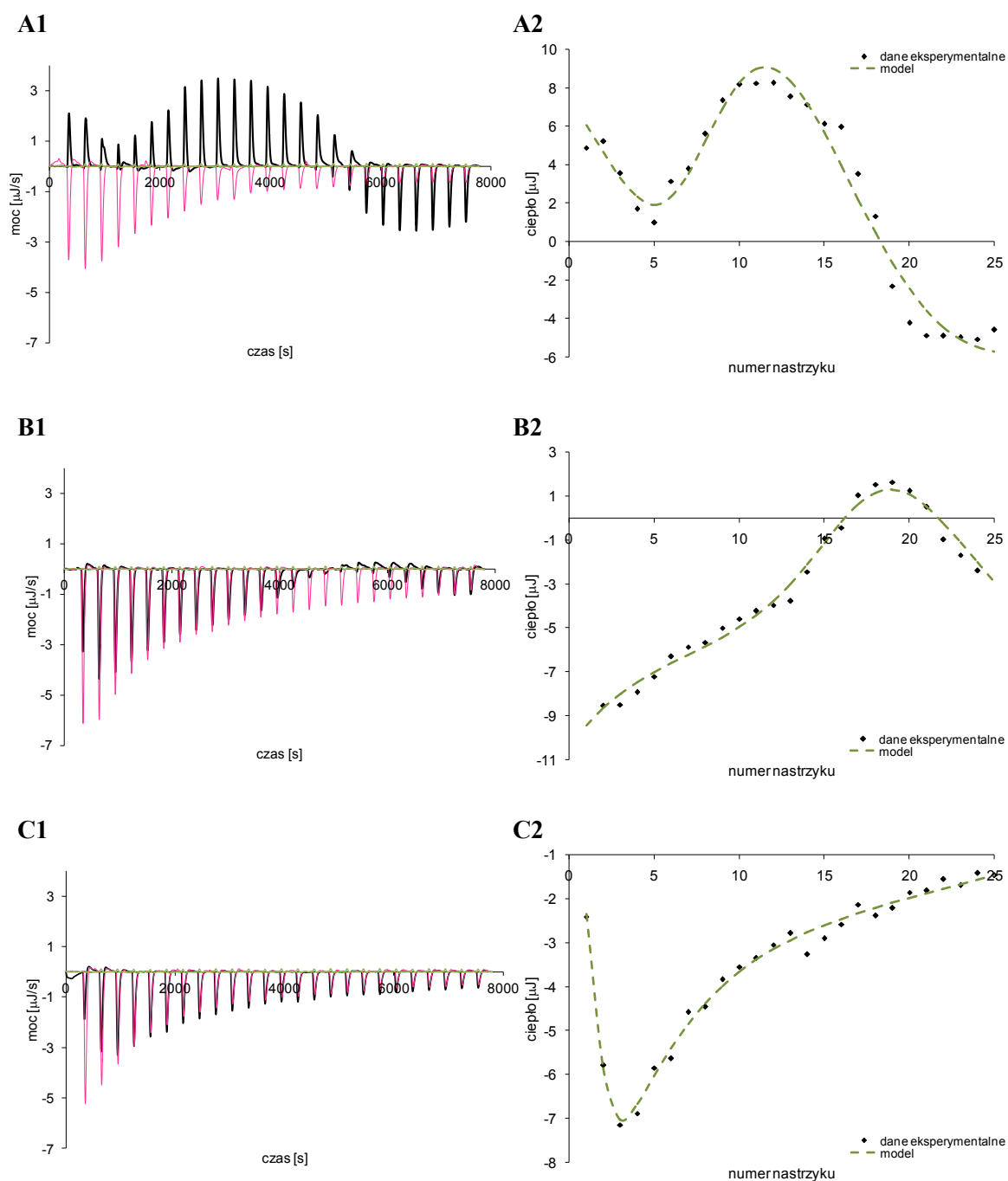
Rycina 70. Cykl pomiarów mikrokalorymetrycznych oddziaływania pochodnej C-1212 z ctDNA w 25°C, **kolor czarny** – miareczkowanie ctDNA roztworem pochodnej C-1212, **kolor różowy** – miareczkowanie buforu roztworem pochodnej C-1212, **kolor zielony** – miareczkowanie ctDNA buforem. Stężenie wyjściowego roztworu C-1212 2 mM, ctDNA 0,1 mM pz, bufor Hepes o 5 mM stężeniu NaCl. Miareczkowanie nstrzykami po 10 µl roztworu pochodnej C-1212

Aby sprawdzić jak siła jonowa buforu wpływa na oddziaływania ligand-DNA, wykonałam analogiczne doświadczenia w dziesięciu buforach różniących się stężeniem chlorku sodu w zakresie stężeń 5 – 300 mM. Zestaw uzyskanych termogramów przedstawiłam na Ryc 71.

Aby wyznaczyć parametry termodynamiczne oddziaływania pochodnej C-1212 z ctDNA do danych doświadczalnych dopasowałam opracowany model oddziaływań, zgodnie z procedurą opisaną p. IV.5.7. Dopasowanie modelu do wybranych izoterm oddziaływania przedstawiłam na Ryc. 72. Oszacowane stałe zamieściłam w Tabeli 20. Dla tej pochodnej można zaobserwować również wpływ siły jonowej buforu oraz temperatury reakcji na parametry termodynamiczne. Parametry termodynamiczne oddziaływania agregatów z ctDNA dla reakcji prowadzonej w buforze w podwyższonej temperaturze obarczone były dużym błędem oszacowania i dlatego nie uwzględniłam ich w dalszych rozważaniach, wartości te nie zostały również umieszczone w Tabeli 20.



Rycina 71. Cykl pomiarów oddziaływania pochodnej C-1212z ctDNA w 25°C, **kolor czarny** – miareczkowanie ctDNA roztworem pochodnej C-1212, **kolor różowy** – miareczkowanie buforu roztworem pochodnej C-1212, **kolor zielony** – miareczkowanie ctDNA buforem. Stężenie wyjściowego roztworu C-1212 2 mM, ctDNA 0,1 mM pz, bufor Hepes. Miareczkowanie nastrzykami po 10 μ l roztworu pochodnej C-1212



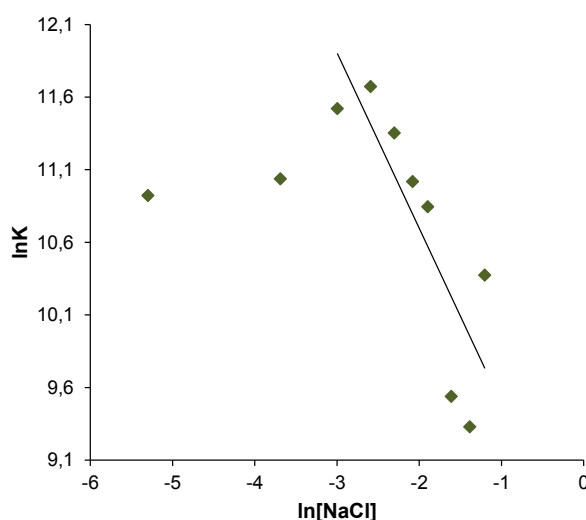
Rycina 72. A1, B1, C1: Cykl pomiarów mikrokalorymetrycznych oddziaływania C-1212 z ctDNA w 25°C, kolor czarny – miareczkowanie ctDNA roztworem C-1212, kolor różowy – miareczkowanie buforu roztworem C-1212, kolor zielony – miareczkowanie ctDNA buforem. Stężenie wyjściowego roztworu C-1212, 1 mM, ctDNA 0,06 mM pz, bufor HEPES o 5 mM (A1), 150 mM (B1) oraz 300 mM (C1) stężeniu NaCl. Miareczkowanie nastrzykami po 10 μl roztworu C-1212. A2, B2, C2: dopasowanie modelu do zoterm oddziaływania C-1212 z ctDNA w 25°C odpowiadających termogramom A1, B1 i C1

Tabela 20. Parametry termodynamiczne oddziaływania C-1212 z ctDNA w buforach o różnym stężeniu NaCl i w różnej temperaturze

Warunki procesu	Parametry termodynamiczne procesu								
	$K_1 \cdot 10^{-4}$ [M ⁻¹]	n	ΔH_1 [kJ/mol]	ΔG_1 [kJ/mol]	$T\Delta S_1$ [kJ/mol]	$K_2 \cdot 10^{-4}$ [M ⁻¹]	ΔH_2 [kJ/mol]	ΔG_2 [kJ/mol]	$T\Delta S_2$ [kJ/mol]
5 mM NaCl, 25°C	5,54 ± 0,61	0,79 ± 0,03	-23,58 ± 1,32	-27,06 ± 0,89	3,49 ± 2,09	5,19 ± 0,16	-91,78 ± 14,75	-26,90 ± 0,94	-64,88 ± 4,07
25 mM NaCl, 25°C	6,21 ± 0,11	0,80 ± 0,01	-21,81 ± 7,97	-27,35 ± 0,35	5,54 ± 0,78	3,33 ± 7,97	-31,62 ± 2,48	-25,80 ± 0,73	-5,82 ± 0,72
50 mM NaCl, 25°C	10,07 ± 0,98	0,93 ± 0,01	-20,52 ± 1,90	-28,54 ± 0,23	8,02 ± 0,99	2,99 ± 0,02	-99,07 ± 10,07	-25,54 ± 0,12	-73,53 ± 6,08
75 mM NaCl, 25°C	11,72 ± 0,07	0,89 ± 0,00	-20,75 ± 6,88	-28,92 ± 0,87	8,17 ± 1,25	4,55 ± 0,19	-66,74 ± 3,33	-26,58 ± 1,78	-40,16 ± 0,37
100 mM NaCl, 25°C	8,51 ± 1,16	0,66 ± 0,07	-18,18 ± 3,16	-28,13 ± 1,09	9,95 ± 0,76	7,05 ± 1,15	-39,15 ± 4,90	-27,66 ± 0,94	-11,49 ± 0,83
125 mM NaCl, 25°C	6,09 ± 0,35	0,49 ± 0,01	-15,33 ± 2,06	-27,30 ± 0,93	11,97 ± 0,92	10,51 ± 0,66	-34,65 ± 1,57	-28,65 ± 0,28	-6,00 ± 0,98
150 mM NaCl, 25°C	5,13 ± 0,11	0,40 ± 0,01	-14,17 ± 4,29	-26,87 ± 0,24	12,70 ± 0,37	7,50 ± 0,24	-39,85 ± 7,29	-27,82 ± 0,93	-12,04 ± 1,07
200 mM NaCl, 25°C	1,39 ± 0,33	1,06 ± 0,15	-15,07 ± 2,1	-23,63 ± 0,97	8,56 ± 0,72	1,85 ± 0,01	-24,60 ± 0,62	-24,36 ± 1,39	-0,25 ± 0,01
250 mM NaCl, 25°C	1,12 ± 0,21	1,20 ± 0,21	-17,87 ± 1,23	-23,11 ± 0,28	5,24 ± 1,06	2,59 ± 0,23	-15,61 ± 0,12	-25,18 ± 0,23	-9,51 ± 0,67
300 mM NaCl, 25°C	3,20 ± 0,16	2,05 ± 0,13	-12,86 ± 2,90	-25,70 ± 1,02	12,84 ± 1,87	1,46 ± 0,06	-12,91 ± 6,15	-23,76 ± 0,57	-9,15 ± 0,26
25 mM NaCl, 35°C	9,81 ± 0,87	1,12 ± 0,12	-28,89 ± 2,24	-29,44 ± 0,23	0,55 ± 0,12	nw	nw	nw	nw

nw – nie wyznaczone

Kolejnym krokiem było oszacowanie zmiany entalpii oddziaływań elektrostatycznych. W tym celu wyznaczyłam nachylenie zależności $\ln K = f(\ln[\text{NaCl}])$, Ryc. 73. Wyznaczony współczynnik nachylenia prostej SK wynosi $-1,21 \pm 0,18$. Podczas wyznaczania współczynnika nachylenia prostej odrzuciłam punkty odpowiadające buforom z 5 i 25 mM chlorkiem sodu, ponieważ wartość stałej wiązania w tych buforach odbiegała znacznie od trendu obserwowanego dla pozostałych wartości (Ryc. 70). Na podstawie wartości SK oszacowałam udziały zmian entalpii swobodnej oddziaływań elektrostatycznych (Tabela 21).



Rycina 73. Zależność logarytmu naturalnego ze stałej wiązania C-1212 K_1 od logarytmu naturalnego ze stężenia soli, $[\text{NaCl}]$

Analogicznie jak w przypadku powyżej opisanych związków założyłam, że w trakcie wiązania się monokationów C-1212 nie dochodzi do zmian konformacyjnych w strukturze liganda. Wartość ΔG_{konf} dla klasycznych interkalatorów wynosi wtedy $16,72 \text{ kJmol}^{-1}$. Wartość $\Delta G_{\text{r+t}}$ dla temperatury 298 K przyjąłam $62,28 \text{ kJmol}^{-1}$.

Wstawiając wyżej wymienione zmiany entalpii swobodnych dla buforu z 25 mM chlorkiem sodu do równania:

$$\Delta G_{\text{obs}} = \Delta G_{\text{pe}} + \Delta G_{\text{konf}} + \Delta G_{\text{r+t}} + \Delta G_{\text{hyd}} + \Delta G_{\text{mol}}$$

otrzymujemy:

$$\Delta G_{\text{obs}} = -8,96 + 62,28 + 16,72 + (-42,51) + \Delta G_{\text{mol}} = -28,54$$

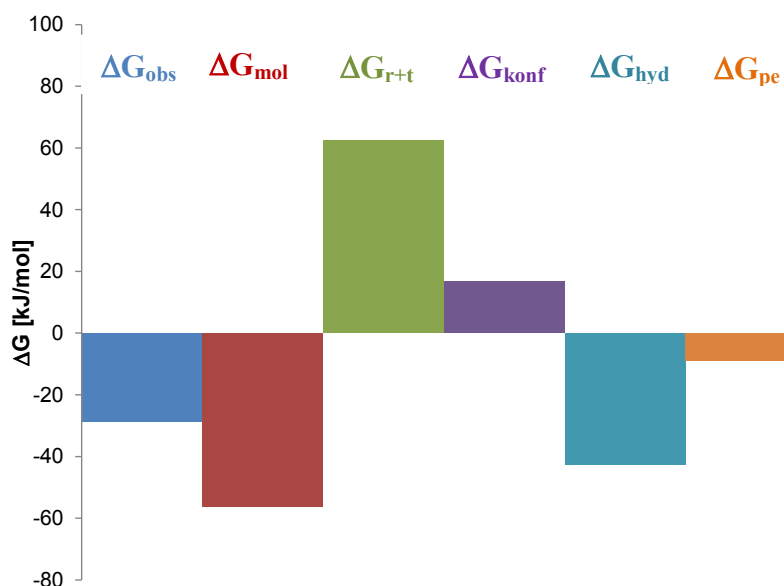
$$\Delta G_{\text{mol}} = -56,07 \text{ kJmol}^{-1}$$

Tabela 21. Zmiany entalpii swobodnych oddziaływania monokationów C-1212 z ctDNA w buforach o różnym stężeniu NaCl i w różnej temperaturze

Warunki procesu	Parametry termodynamiczne procesu				
	ΔG_{obs} [kJ/mol]	ΔG_{pe} [kJ/mol]	ΔG_{t} [kJ/mol]	ΔC_p [J/(molK)]	ΔG_{hyd} [kJ/mol]
5 mM NaCl, 25°C	-27,06 ± 0,89	nw	nw	-531,37 ± 41,22	-42,51 (±10)
25 mM NaCl, 25°C	-27,35 ± 0,35	nw	nw		
50 mM NaCl, 25°C	-28,54 ± 0,23	-8,96 ± 0,78	-19,58 ± 1,03		
75 mM NaCl, 25°C	-28,92 ± 0,87	-7,75 ± 1,09	-21,17 ± 1,90		
100 mM NaCl, 25°C	-28,13 ± 1,09	-6,89 ± 0,32	-21,24 ± 1,28		
125 mM NaCl, 25°C	-27,30 ± 0,93	-6,22 ± 0,65	-21,08 ± 1,21		
150 mM NaCl, 25°C	-26,87 ± 0,24	-5,67 ± 0,31	-21,20 ± 0,92		
200 mM NaCl, 25°C	-23,63 ± 0,97	-4,81 ± 1,03	-18,82 ± 0,26		
250 mM NaCl, 25°C	-23,11 ± 0,28	-4,14 ± 0,84	-18,97 ± 0,68		
300 mM NaCl, 25°C	-25,70 ± 1,02	-3,60 ± 0,27	-22,10 ± 0,23		
25 mM NaCl, 35°C	-29,44 ± 0,23	-15,84 ± 1,73	-13,59 ± 0,24		

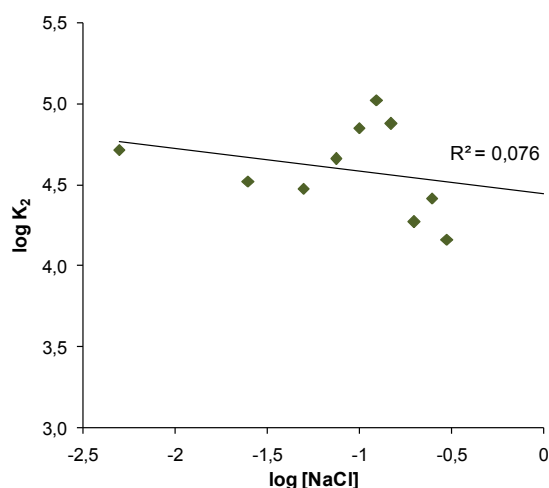
nw – nie wyznaczone

Profil termodynamiczny tworzenia kompleksu interkalacyjnego C-1212 z ctDNA, Ryc. 74, jest zbliżony do profili uzyskanych dla wcześniej badanych związków: Ryc. 56 i Ryc. 63. Różnica dotyczy przede wszystkim zmniejszenia wkładu zmiany entalpii swobodnej oddziaływań niekowalencyjnych, ΔG_{mol} , i zwiększenia wpływu zmiany entalpii swobodnej oddziaływań hydrofobowych, ΔG_{hyd} , do ogólnej zmiany entalpii swobodnej interkalacji.



Rycina 74. Wkład poszczególnych zmian entalpii swobodnej do całkowitej, obserwowanej zmiany entalpii swobodnej interkalacji dla oddziaływania C-1212 z ctDNA w buforze Hepes o 50 mM stężeniu NaCl w temperaturze 25°C

Analiza termodynamiczna oddziaływania agregatów z ctDNA nie była przedmiotem niniejszej pracy, jednak analizując Tabelę 20, oraz wykres Ryc. 75 można stwierdzić, że stałe wiązania agregatów z ctDNA utrzymują się mniej więcej na stałym poziomie (są rzędu 10^4) niezależnie od siły jonowej, stałe te. Wraz ze wzrostem siły jonowej buforu maleje natomiast zmiana entalpii tworzenia tego kompleksu, Tab. 20.



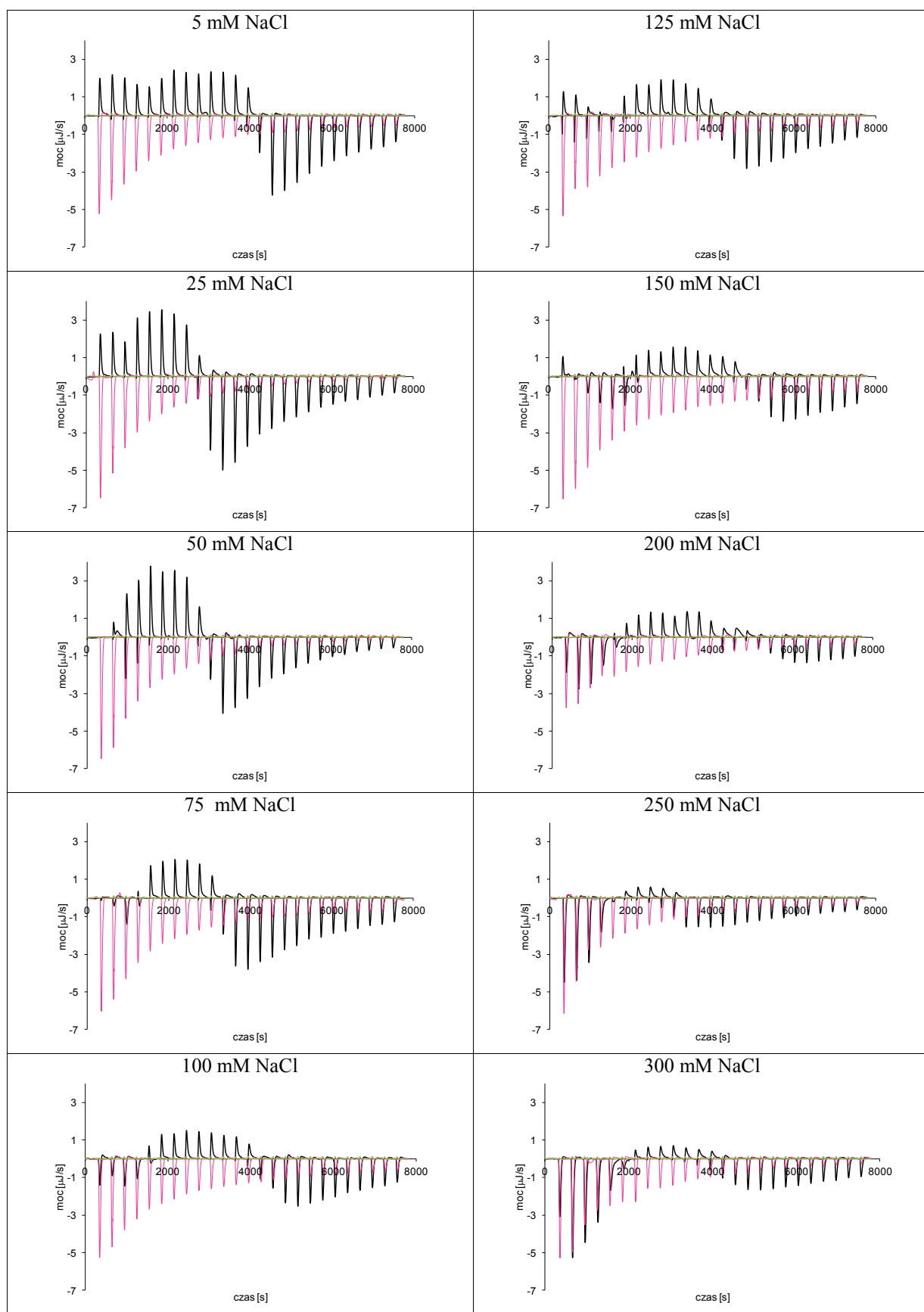
Rycina 75. Zależność logarytmu naturalnego ze stałej wiązania zagregowanych cząsteczek C-1212 K_2 od logarytmu ze stężenia soli, [NaCl]

V.5.5. Analiza termodynamiczna oddziaływań imidazoakrydonu C-1371 z ctDNA

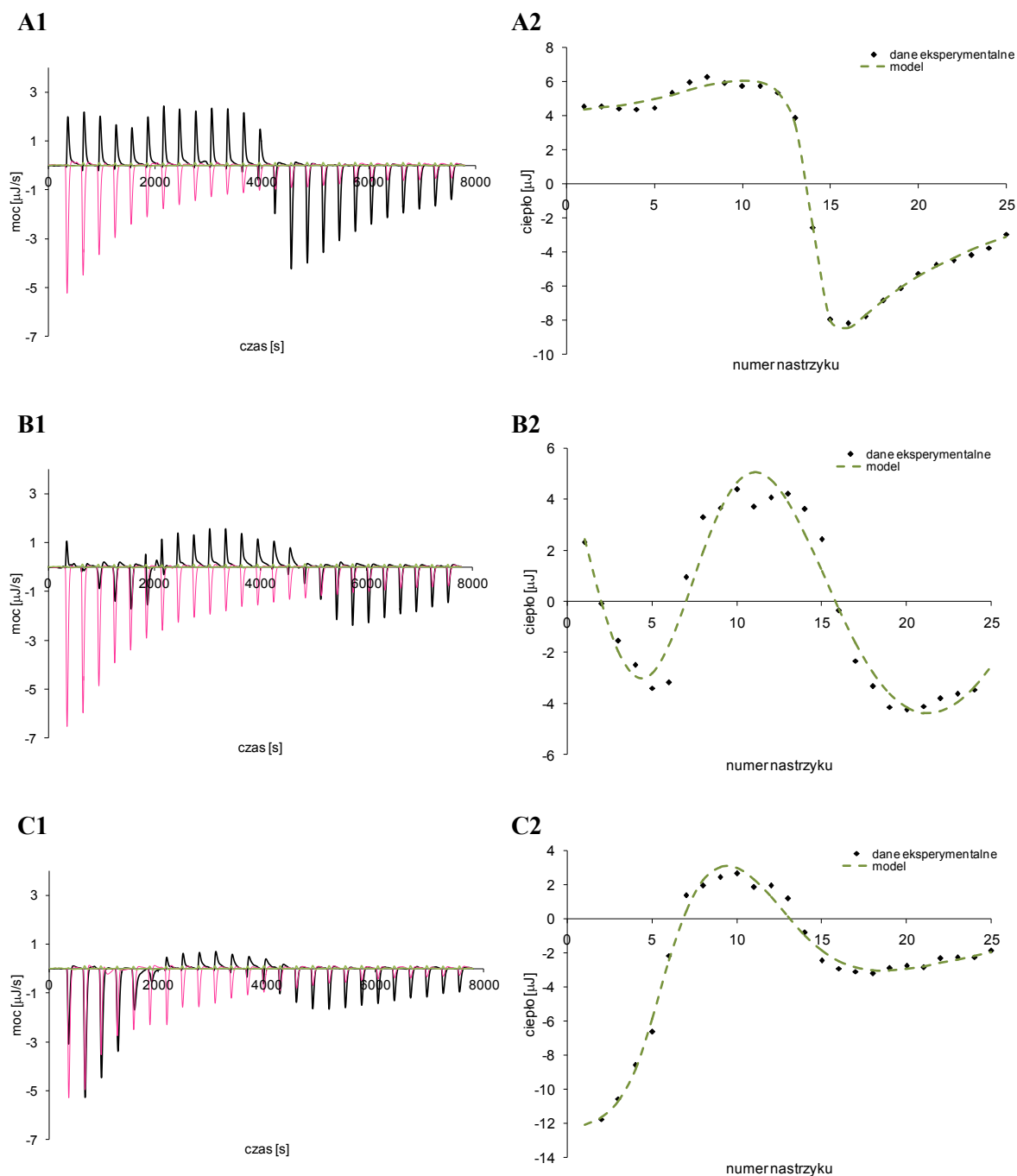
Analizę mikrokalorymetryczną pochodnej C-1371 przeprowadziłam analogicznie jak dla powyżej opisanych związków. Miareczkowanie wykonałam w dziesięciu buforach różniących się stężeniem chlorku sodu. Otrzymane termogramy dla wszystkich badanych roztworów przedstawiłam na Ryc. 76. Proces rozcieńczania związku wykazuje silny charakter endotermiczny, natomiast oddziaływanie C-1371 z DNA charakter egzotermiczny.

Do uzyskanych danych eksperymentalnych został dopasowany opracowany model oddziaływań, zgodnie z procedurą opisaną p. IV.5.7. Izotermy dopasowania modelu przedstawiłam na Ryc. 77 A2, B2, C2. Wyznaczone zostały parametry termodynamiczne oddziaływania monomerów (K_1 , ΔH_1 , n) oraz agregatów (K_2 , ΔH_2) C-1371 z DNA w dziesięciu buforach. Oszacowane wartości parametrów zebrane zostały w Tabeli 22. Wraz ze wzrostem siły jonowej buforu obserwuje się spadek stałej wiązania monomerów z ctDNA (K_1), przy jednoczesnym wzroście stałej wiązania zagregowanych cząsteczek do ctDNA (K_2), (Tabela 22). Stałe wiązania monomerów są rzędu 10^5 , natomiast stałe wiązania agregatów 10^4 . Oddziaływaniu monomerów z ctDNA towarzyszy dodatni przyrost entropii, z jednoczesnym spadkiem entalpii.

Do wyznaczenia entalpii swobodnej oddziaływań elektrostatycznych ΔG_{pe} wykorzystałam liniową zależność między logarytmem ze stałej wiązania oraz stężeniem soli w buforze (Ryc. 78) zgodnie ze wzorem (11). Wyznaczony współczynnik nachylenia prostej SK wynosi $-1,31 \pm 0,12$ i jest zbliżony do wartości wyznaczonych dla innych monokationów wiążących się do DNA [161,162,166]. Podczas wyznaczenia współczynnika nachylenia prostej odrzuciłam punkt odpowiadający buforowi niskosolnemu, ponieważ stała wiązania w tym buforze odbiegała znacznie od trendu obserwowanego dla pozostałych wartości (Rys. 78). Tak wyznaczona wartość SK pozwoliła na oszacowanie udziały zmian entalpii swobodnej oddziaływań elektrostatycznych (Tabela 22). Wraz ze wzrostem stężenia soli w buforze wyznaczona wartość ΔG_{pe} maleje. Zmiany entalpii swobodnej oddziaływań pozaelektrostatycznych utrzymują się natomiast na zbliżonym poziomie i stanowią ok. 67-87 % udziału całkowitej entalpii swobodnej.



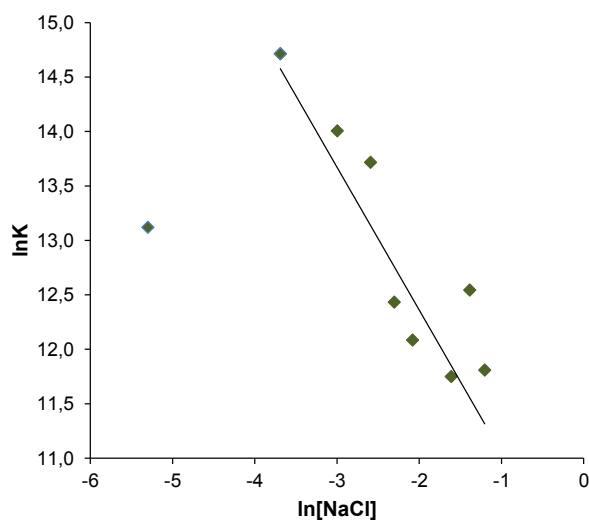
Rycina 76. Cykl pomiarów oddziaływania pochodnej C-1371 z ctDNA w 25°C, **kolor czarny** – miareczkowanie ctDNA roztworem pochodnej C-1371, **kolor różowy** – miareczkowanie buforu roztworem pochodnej C-1371, **kolor zielony** – miareczkowanie ctDNA buforem. Stężenie wyjściowego roztworu C-1371 2 mM, ctDNA 0,1 mMpZ, bufor Hepes. Miareczkowanie nastrzykami po 10 μl roztworu pochodnej C-1371



Rycina 77. A1, B1, C1: Cykl pomiarów mikrokalorymetrycznych oddziaływania C-1371 z ctDNA w 25°C, kolor czarny – miareczkowanie ctDNA roztworem C-1371, kolor różowy – miareczkowanie buforu roztworem C-1371, kolor zielony – miareczkowanie ctDNA buforem. Stężenie wyjściowego roztworu C-1371, 1 mM, ctDNA 0,06 mM pz, bufor Hepes o 5 mM (A1), 150 mM (B1) oraz 300 mM (C1) stężeniu NaCl. Miareczkowanie nastrzykami po 10 μ l roztworu C-1371. A2, B2 C2: dopasowanie modelu do izoterm oddziaływania C-1371 z ctDNA w 25°C odpowiadających termogramom A1, B1 i C1

Tabela 22. Parametry termodynamiczne oddziaływania C-137Iz ctDNA w buforach o różnym stężeniu NaCl i w różnej temperaturze

Warunki procesu	Parametry termodynamiczne procesu								
	$K_1 \cdot 10^{-5}$ [M ⁻¹]	n	ΔH_1 [kJ/mol]	ΔG_1 [kJ/mol]	$T\Delta S_1$ [kJ/mol]	$K_2 \cdot 10^{-4}$ [M ⁻¹]	ΔH_2 [kJ/mol]	ΔG_2 [kJ/mol]	$T\Delta S_2$ [kJ/mol]
5 mM NaCl, 25°C	4,98 ± 0,11	0,57 ± 0,01	-28,48 ± 3,50	-32,51 ± 2,09	3,67 ± 0,05	0,29 ± 0,08	-20,79 ± 3,6	-19,80 ± 0,35	-0,99 ± 0,07
25 mM NaCl, 25°C	24,5 ± 1,72	1,33 ± 0,02	-25,91 ± 2,69	-36,46 ± 3,90	10,55 ± 0,02	1,02 ± 0,37	-10,54 ± 2,62	-22,87 ± 1,20	12,33 ± 1,02
50 mM NaCl, 25°C	12,09 ± 1,04	1,15 ± 0,10	-21,61 ± 7,57	-34,70 ± 1,64	13,09 ± 0,05	1,34 ± 0,49	-11,38 ± 4,63	-23,63 ± 1,94	12,25 ± 1,20
75 mM NaCl, 25°C	9,06 ± 1,04	0,91 ± 0,05	-24,21 ± 4,68	-33,99 ± 0,97	9,78 ± 1,00	2,81 ± 0,24	-22,34 ± 1,04	-25,38 ± 0,86	3,04 ± 0,24
100 mM NaCl, 25°C	2,51 ± 0,26	0,73 ± 0,01	-20,88 ± 1,23	-30,81 ± 1,24	9,93 ± 0,04	2,51 ± 0,13	-22,16 ± 1,54	-25,01 ± 1,05	2,95 ± 1,00
125 mM NaCl, 25°C	1,70 ± 0,36	0,75 ± 0,02	-16,39 ± 1,74	-29,94 ± 2,70	13,56 ± 1,20	5,01 ± 0,87	-57,57 ± 3,89	-26,84 ± 1,39	-30,73 ± 1,04
150 mM NaCl, 25°C	0,36 ± 0,02	0,67 ± 0,01	-14,63 ± 5,60	-26,01 ± 1,28	11,38 ± 0,45	1,61 ± 0,07	-26,45 ± 7,63	-24,01 ± 0,24	-2,44 ± 0,10
200 mM NaCl, 25°C	1,27 ± 0,47	0,91 ± 0,05	-10,21 ± 1,68	-29,11 ± 0,92	18,69 ± 0,01	2,81 ± 0,24	-22,34 ± 1,04	-28,27 ± 1,78	-3,40 ± 0,23
250 mM NaCl, 25°C	2,79 ± 0,27	1,43 ± 0,23	-11,69 ± 2,85	-31,08 ± 0,86	19,69 ± 0,97	6,05 ± 0,65	-39,51 ± 1,60	-27,28 ± 1,17	-12,33 ± 2,03
300 mM NaCl, 25°C	1,34 ± 0,11	0,84 ± 0,01	-10,38 ± 1,37	-29,26 ± 0,02	18,88 ± 0,42	8,23 ± 0,31	-26,13 ± 4,00	-28,05 ± 1,07	1,93 ± 0,78
25 mM NaCl, 35°C	2,22 ± 1,11	0,96 ± 0,11	-32,88 ± 3,01	-31,53 ± 1,03	-1,35 ± 0,98	4,55 ± 0,23	-22,72 ± 1,28	-27,47 ± 1,20	4,75 ± 0,01



Rycina 78. Zależność logarytmu naturalnego ze stałej wiązania C-1371 K_1 od logarytmu naturalnego ze stężenia soli, $[\text{NaCl}]$

Tabela 23. Zmiany entalpii swobodnych oddziaływania monokationów C-1371 z ctDNA w buforach o różnym stężeniu NaCl i w różnej temperaturze

Warunki procesu	Parametry termodynamiczne procesu				
	ΔG_{obs} [kJ/mol]	ΔG_{pe} [kJ/mol]	ΔG_{t} [kJ/mol]	ΔC_p [J/(molK)]	ΔG_{hvd} [kJ/mol]
5 mM NaCl, 25°C	$-32,51 \pm 2,09$	nw	nw	$-403,93 \pm 34,90$	$-32,31(\pm 10)$
25 mM NaCl, 25°C	$-36,46 \pm 3,90$	$-11,99 \pm 0,19$	$-24,46 \pm 0,01$		
50 mM NaCl, 25°C	$-34,70 \pm 1,64$	$-9,74 \pm 1,02$	$-24,96 \pm 0,92$		
75 mM NaCl, 25°C	$-33,99 \pm 0,97$	$-8,42 \pm 0,29$	$-25,57 \pm 0,95$		
100 mM NaCl, 25°C	$-30,81 \pm 1,24$	$-7,49 \pm 0,92$	$-23,32 \pm 0,03$		
125 mM NaCl, 25°C	$-29,94 \pm 2,70$	$-6,76 \pm 0,74$	$-23,18 \pm 0,20$		
150 mM NaCl, 25°C	$-26,01 \pm 1,28$	$-6,17 \pm 0,38$	$-19,84 \pm 0,32$		
200 mM NaCl, 25°C	$-29,11 \pm 0,92$	$-5,23 \pm 0,27$	$-23,88 \pm 0,55$		
250 mM NaCl, 25°C	$-31,08 \pm 0,86$	$-4,50 \pm 0,16$	$-26,57 \pm 0,29$		
300 mM NaCl, 25°C	$-29,26 \pm 0,02$	$-3,91 \pm 0,12$	$-25,35 \pm 0,35$		
25 mM NaCl, 35°C	$-31,53 \pm 1,03$	$-17,80 \pm 0,15$	$-13,73 \pm 0,25$		

nw – nie wyznaczone

Następnie, zakładając wartości $\Delta G_{\text{konf}} = -16,72 \text{ kJmol}^{-1}$, oraz $\Delta G_{\text{r+t}} = 62,28 \text{ kJmol}^{-1}$ wyznaczyłam zmianę entalpii swobodnej słabych oddziaływań niekowalencyjnych ΔG_{mol} korzystając z zależności:

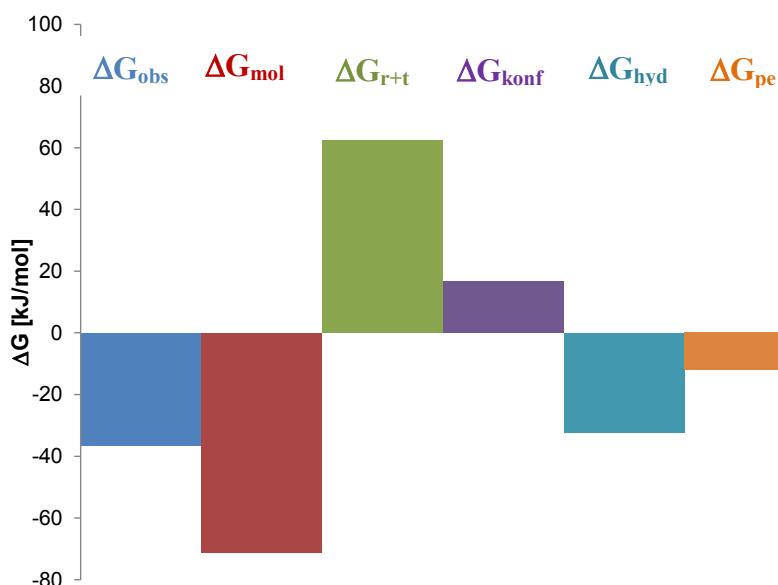
$$\Delta G_{\text{obs}} = \Delta G_{\text{pe}} + \Delta G_{\text{konf}} + \Delta G_{\text{r+t}} + \Delta G_{\text{hyd}} + \Delta G_{\text{mol}}$$

otrzymujemy:

$$\Delta G_{\text{obs}} = -11,99 + 62,28 + 16,72 + (-32,31) + \Delta G_{\text{mol}} = -36,46$$

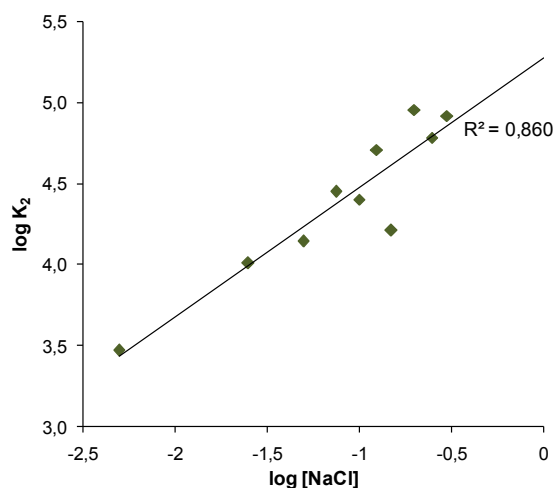
$$\Delta G_{\text{mol}} = -71,16 \text{ kJmol}^{-1}$$

Zgodnie z zamieszczonym poniżej wykresem, Ryc. 79, można stwierdzić, że tworzenie kompleksu monomerów pochodnej C-1371 z ctDNA następuje dzięki tworzenia nowych wiązań niekowalencyjnych, ΔG_{mol} , oraz efektów hydrofobowych wynikających z przejścia aromatycznej cząsteczki z roztworu wodnego do wnętrza podwójnej helisy DNA, ΔG_{hyd} .



Rycina 79. Wkład poszczególnych zmian entalpii swobodnej do całkowitej, obserwowanej zmiany entalpii swobodnej interkalacji dla oddziaływania C-1371 z ctDNA w buforze Hepes o 25mM stężeniu NaCl w temperaturze 25°C

Analizując oddziaływanie agregatów pochodnej C-1371 z ctDNA można zaobserwować, podobnie jak dla pochodnej C-1330, wzrost stałej wiązania wraz ze wzrostem siły jonowej buforu. Wyższe stężenie chlorku sodu w buforze powoduje również większe efekty cieplne procesu (Tabela 22 oraz Ryc. 80.)

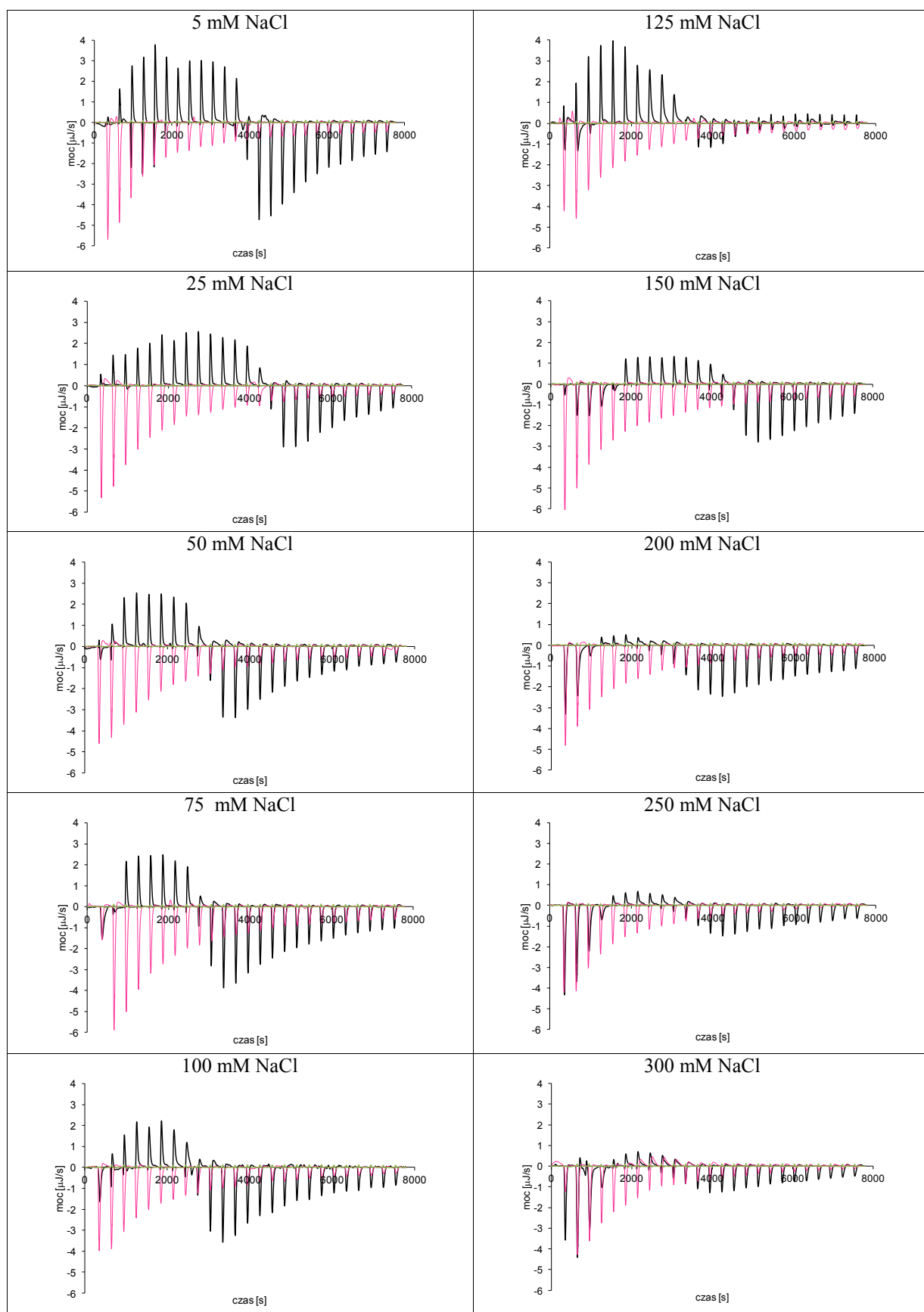


Rycina 80. Zależność logarytmu ze stałej wiązania zagregowanych cząsteczek C-1371 K_2 od logarytmu ze stężenia soli, $[NaCl]$

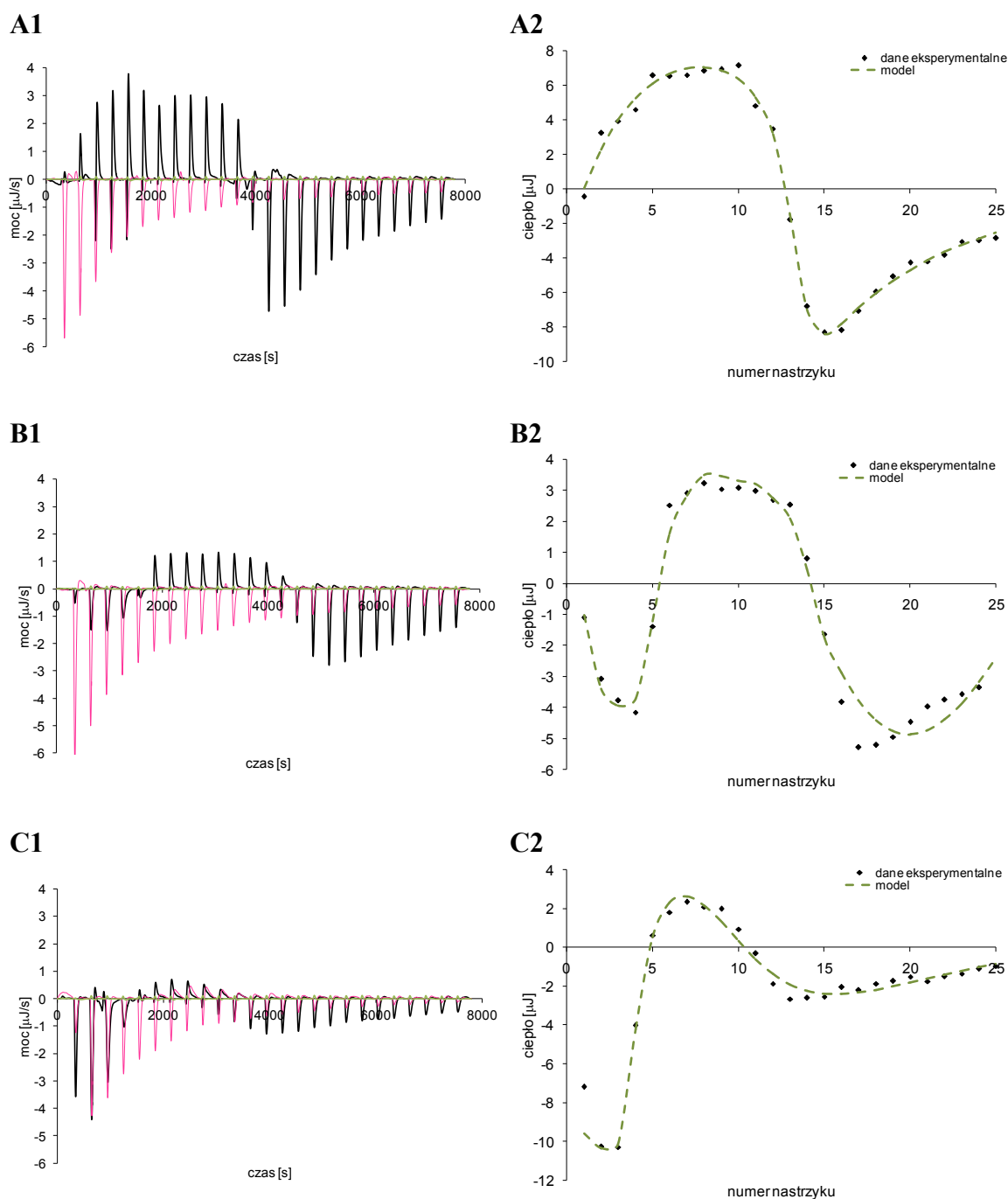
V.5.6. Analiza termodynamiczna oddziaływań imidazoakrydonu C-1492 z ctDNA

Analogicznie jak dla poprzednio badanych związków wykonałam pomiary mikrokalorymetryczne dla oddziaływań pochodnej C-1492 z ctDNA. Miareczkowanie wykonałam w dziesięciu buforach różniących się stężeniem chlorku sodu. Otrzymane termogramy dla wszystkich badanych roztworów przedstawiłam na Ryc. 81.

Do uzyskanych danych eksperymentalnych został następnie dopasowany model oddziaływań, zgodnie z procedurą opisaną p. IV.5.7. Przykłady dopasowania modelu do doświadczalnych izoterm oddziaływania przedstawiłam na Ryc. 82, panele A2, B2, C2. Wyznaczone zostały parametry termodynamiczne oddziaływania monomerów (K_1 , ΔH_1 , n) oraz agregatów (K_2 , ΔH_2) pochodnej C-1492 z DNA w dziesięciu buforach. Oszacowane wartości stałych zebrane zostały w Tabeli 24. Wraz ze wzrostem siły jonowej buforu obserwuje się spadek stałej wiązania monomerów z ctDNA (K_1), przy jednoczesnym wzroście stałej wiązania zagregowanych cząsteczek do ctDNA (K_2), (Tabela 24). Wyższa temperatura nie hamuje procesu, jednak stałe wyznaczone dla oddziaływania agregatów z DNA były obarczone dużym błędem oszacowania, dlatego nie uwzględniłam ich w dalszych obliczeniach.



Rycina 81. Cykl pomiarów oddziaływania pochodnej C-1492 z ctDNA w 25°C, **kolor czarny** – miareczkowanie ctDNA roztworem pochodnej C-1492, **kolor różowy** – miareczkowanie buforu roztworem pochodnej C-1492, **kolor zielony** – miareczkowanie ctDNA buforem. Stężenie wyjściowego roztworu C-1492 2 mM, ctDNA 0,1 mM pz, bufor Hepes. Miareczkowanie nastrzykami po 10 μ l roztworu pochodnej C-1492

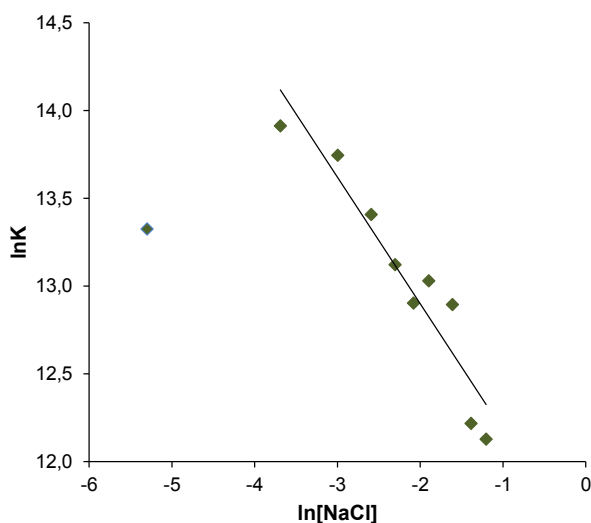


Rycina 82. A1, B1, C1: Cykl pomiarów mikrokalometrycznych oddziaływania C-1492 z ctDNA w 25°C, kolor czarny – miareczkowanie ctDNA roztworem C-1492, kolor różowy – miareczkowanie buforu roztworem C-1492, kolor zielony – miareczkowanie ctDNA buforem. Stężenie wyjściowego roztworu C-1492, 1 mM, ctDNA 0,06 mM pz, bufor Hepes o 5 mM (A1), 150 mM (B1) oraz 300 mM (C1) stężeniu NaCl. Miareczkowanie nastrzykami po 10 μl roztworu C-1371. A2, B2 C2: dopasowanie modelu dozoterm oddziaływania C-1492 z ctDNA w 25°C odpowiadających termogramom A1, B1 i C1

Tabela 24. Parametry termodynamiczne oddziaływania C-1492 z ctDNA w buforach o różnym stężeniu NaCl i w różnej temperaturze

Warunki reakcji	Parametry termodynamiczne procesu								
	$K_1 \cdot 10^{-5}$ [M ⁻¹]	n	ΔH_1 [kJ/mol]	ΔG_1 [kJ/mol]	$T\Delta S_1$ [kJ/mol]	$K_2 \cdot 10^{-4}$ [M ⁻¹]	ΔH_2 [kJ/mol]	ΔG_2 [kJ/mol]	$T\Delta S_2$ [kJ/mol]
5 mM NaCl, 25°C	6,12 ± 0,01	0,66 ± 0,11	-28,71 ± 0,20	-33,02 ± 0,90	4,30 ± 0,03	3,59 ± 0,12	-13,51 ± 0,02	-25,99 ± 0,53	12,48 ± 0,34
25 mM NaCl, 25°C	11,01 ± 0,99	0,55 ± 0,02	-24,53 ± 1,69	-33,49 ± 0,23	9,94 ± 0,32	3,90 ± 0,33	-17,57 ± 4,61	-26,19 ± 1,02	8,63 ± 0,23
50 mM NaCl, 25°C	9,31 ± 1,28	0,93 ± 0,02	-28,90 ± 4,89	-34,06 ± 1,89	5,16 ± 1,31	3,00 ± 0,13	-11,59 ± 1,11	-25,55 ± 0,28	13,95 ± 0,32
75 mM NaCl, 25°C	6,65 ± 0,51	1,06 ± 0,01	-23,31 ± 0,41	-33,22 ± 0,34	9,91 ± 1,92	7,16 ± 0,16	-11,66 ± 0,04	-27,70 ± 1,80	16,64 ± 1,90
100 mM NaCl, 25°C	4,99 ± 0,08	1,33 ± 0,01	-21,91 ± 0,01	-32,51 ± 1,09	10,60 ± 2,89	1,74 ± 0,15	-7,66 ± 0,00	-24,19 ± 0,11	16,53 ± 0,78
125 mM NaCl, 25°C	4,01 ± 0,50	0,81 ± 0,15	-20,43 ± 0,15	-31,97 ± 1,04	11,54 ± 0,12	1,16 ± 0,49	-21,18 ± 5,65	-23,19 ± 0,14	2,02 ± 0,48
150 mM NaCl, 25°C	4,55 ± 0,03	1,72 ± 0,17	-17,53 ± 1,07	-32,28 ± 2,11	14,76 ± 0,98	5,36 ± 0,81	-16,38 ± 4,55	-26,93 ± 1,19	10,60 ± 1,87
200 mM NaCl, 25°C	3,98 ± 0,43	2,49 ± 0,84	-16,66 ± 2,76	-31,95 ± 0,56	15,29 ± 0,73	8,08 ± 0,13	-27,96 ± 3,53	-28,90 ± 1,27	0,04 ± 0,09
250 mM NaCl, 25°C	2,02 ± 0,12	1,27 ± 0,13	-15,67 ± 1,25	-30,27 ± 0,48	14,60 ± 1,90	7,59 ± 0,33	-30,10 ± 8,00	-27,85 ± 0,67	-2,25 ± 0,06
300 mM NaCl, 25°C	1,85 ± 0,16	1,61 ± 0,03	-11,51 ± 1,70	-30,05 ± 0,12	18,54 ± 1,47	5,34 ± 0,62	-24,73 ± 3,67	-27,00 ± 0,67	2,26 ± 0,68
25 mM NaCl, 35°C	7,61 ± 0,87	1,42 ± 0,12	-32,39 ± 3,24	-34,68 ± 0,23	2,29 ± 0,22	nw	nw	nw	nw

W kolejnym kroku oszacowałam zmiany entalpii oddziaływań elektrostatycznych. W tym celu wyznaczyłam nachylenie zależności $\ln K_1 = f(\ln[\text{NaCl}])$, Ryc. 83. Oszacowany współczynnik nachylenia prostej, SK, wynosi $-0,72 \pm 0,10$. Podczas wyznaczania współczynnika nachylenia prostej odrzuciłam punkt odpowiadający buforowi niskosolnemu (Ryc. 83). Następnie, na podstawie wartości SK oszacowałam udziały zmian entalpii swobodnej oddziaływań elektrostatycznych (Tabela 25). Wraz ze wzrostem stężenia soli w buforze wyznaczona wartość ΔG_{pe} maleje. Zmiany entalpii swobodnej oddziaływań pozaelektrostatycznych utrzymują się natomiast na zbliżonym poziomie i stanowią ok. 85-92 % udziału całkowitej entalpii swobodnej.



Rycina 83. Zależność logarytmu naturalnego ze stałej wiązania C-1492 K_1 od logarytmu naturalnego ze stężenia soli, $[\text{NaCl}]$

Tak jak w przypadku pozostałych związków również dla pochodnej C-1492 założyłam, że w trakcie wiązania monokationów nie dochodzi do zmian konformacyjnych w strukturze liganda, w tym wypadku wartość ΔG_{konf} jest generowana przez zmiany w strukturze podwójnej helisy. Wartość ΔG_{konf} wynosi wtedy $16,72 \text{ kJmol}^{-1}$ [121, 164]. Wstawiając wyżej wymienione zmiany entalpii swobodnych oszacowane dla buforu z 25 mM chlorkiem sodu do równania:

$$\Delta G_{obs} = \Delta G_{pe} + \Delta G_{konf} + \Delta G_{r+i} + \Delta G_{hyd} + \Delta G_{mol}$$

otrzymujemy:

$$\Delta G_{obs} = -6,59 + 62,28 + 16,72 + (-29,40) + \Delta G_{mol} = -34,47$$

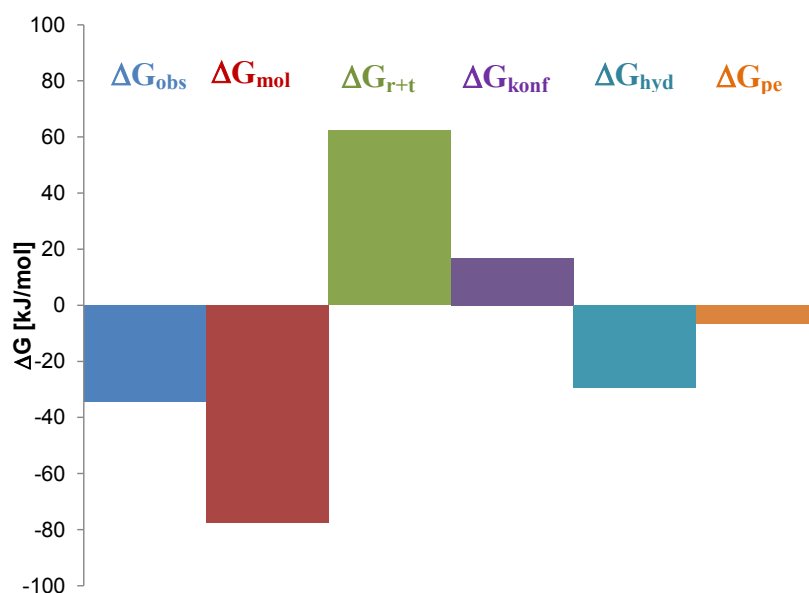
$$\Delta G_{mol} = -77,48 \text{ kJmol}^{-1}$$

Tabela 25. Zmiany entalpii swobodnych oddziaływania monokationów C-1492 z ctDNA w buforach o różnym stężeniu NaCl i w różnej temperaturze

Warunki procesu	Parametry termodynamiczne procesu				
	ΔG_{obs} [kJ/mol]	ΔG_{pe} [kJ/mol]	ΔG_{t} [kJ/mol]	ΔC_p [J/(molK)]	ΔG_{hyd} [kJ/mol]
5 mM NaCl, 25°C	-33,02 ± 0,90	nw	nw	-367,54 ± 42,95	-29,40 (±10)
25 mM NaCl, 25°C	-33,47 ± 0,23	-6,59 ± 0,08	-27,88 ± 1,47		
50 mM NaCl, 25°C	-34,06 ± 1,89	-5,35 ± 0,29	-28,70 ± 0,42		
75 mM NaCl, 25°C	-33,22 ± 0,34	-4,63 ± 0,13	-28,59 ± 0,28		
100 mM NaCl, 25°C	-32,51 ± 1,09	-4,11 ± 0,24	-28,40 ± 0,26		
125 mM NaCl, 25°C	-31,97 ± 1,04	-3,72 ± 0,18	-28,25 ± 0,27		
150 mM NaCl, 25°C	-32,28 ± 2,11	-3,39 ± 0,23	-28,89 ± 0,25		
200 mM NaCl, 25°C	-31,95 ± 0,56	-2,88 ± 0,37	-29,07 ± 0,74		
250 mM NaCl, 25°C	-30,27 ± 0,48	-2,48 ± 0,25	-27,80 ± 0,26		
300 mM NaCl, 25°C	-30,05 ± 0,12	-2,15 ± 0,43	-27,90 ± 1,76		
25 mM NaCl, 35°C	-34,68 ± 0,23	-9,47 ± 0,78	-25,21 ± 0,45		

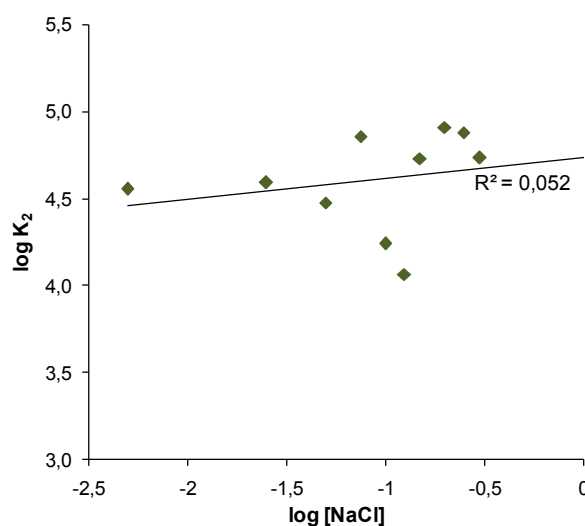
nw – nie wyznaczone

Podobnie jak dla wcześniej analizowanych pochodnych imidazoakrydonu tworzenie kompleksu C-1492 z ctDNA następuje wskutek tworzenia nowych wiązań niekowalencyjnych, ΔG_{mol} , oraz energii uzyskanej z przeniesienia aromatycznej cząsteczki z roztworu wodnego do wnętrza podwójnej helisy DNA, (Ryc. 84).



Rycina 84. Wkład poszczególnych zmian entalpii swobodnej do całkowitej, obserwowanej zmiany entalpii swobodnej interkalacji dla oddziaływania C-1492 ctDNA w buforze Hepes o 25mM stężeniu NaCl w temperaturze 25°C

Analizując oddziaływanie agregatów pochodnej C-1492 z ctDNA można zaobserwować, że wraz ze wzrostem siły jonowej buforu stałe wiązania agregatów z ctDNA, K_2 , utrzymują się mniej więcej na stałym poziomie niezależnie od stężenia soli. Stałe te są rzędu 3×10^4 (Tabela 24 oraz Ryc. 85.).



Rycina 85. Zależność logarytmu ze stałej wiązania zagregowanych cząsteczek C-1492 K_2 od logarytmu ze stężenia soli, [NaCl]

VI. DYSKUSJA WYNIKÓW

Mechanizm działania większości dotychczas opracowanych leków przeciwnowotworowych wiąże się z ich oddziaływaniem z DNA. W ostatnich latach intensywnie studiowane jest oddziaływanie różnorodnych małowcząsteczkowych ligandów z DNA. Głównym celem tych badań jest nie tylko uzyskanie informacji na temat struktury kompleksów ligand/DNA i dynamiki tworzenia tych kompleksów, ale również wyznaczenie poszczególnych parametrów termodynamicznych procesu. Termodynamiczny opis oddziaływań małowcząsteczkowych ligandów z DNA pozwala bowiem na uzyskanie informacji na temat udziału poszczególnych typów oddziaływań w całkowitej zmianie entalpii swobodnej, która towarzyszy utworzeniu kompleksu związku z kwasem nukleinowym. Porównując parametry termodynamiczne poszczególnych rodzajów oddziaływań dla serii związków można ocenić, które fragmenty struktury związku odpowiadają za jego zdolność do selektywnego oddziaływania z DNA. Liczne związki aromatyczne, w tym również te tworzące silne kompleksy z DNA, ulegają w roztworze wodnym procesowi agregacji. Główną siłą napędową tego procesu są oddziaływania hydrofobowe. Agregacja stanowi istotne utrudnienie przy badaniu oddziaływania małowcząsteczkowych, aromatycznych lub heteroaromatycznych ligandów z kwasem deoksyrybonukleinowym. Istnienie w roztworze kilku form liganda znajdujących się w równowadze wymaga użycia skomplikowanych modeli oddziaływania. Bez uwzględnienia tego zjawiska opis oddziaływania będzie zafałszowany i może prowadzić do błędnej interpretacji uzyskanych wyników. To samo dotyczy wartości wyznaczanych parametrów, np. stałych wiązania. Agregacja liganda w roztworze wodnym może przebiegać na wiele różnych sposobów. Dlatego dla danego rodzaju liganda należy najpierw określić rodzaj agregacji. Dopiero po uzyskaniu tych danych można przystąpić do tworzenia modelu uwzględniającego zarówno agregację jak i oddziaływanie liganda z DNA.

W wielu ośrodkach badawczych zajmujących się fizykochemią lub biofizyką kwasów nukleinowych stosuje się odmienne podejście. Polega ono na znalezieniu takich warunków eksperymentalnych, w których nie występuje agregacja liganda. Warunki te jednak zwykle odbiegają od warunków panujących w komórce. Tym samym przydatność uzyskanych wyników przy projektowaniu nowych leków, których mechanizm działania opiera się na oddziaływaniu z DNA jest bardzo ograniczona.

W Katedrze Technologii Leków i Biochemii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej prowadzone są poszukiwania nowych związków o właściwościach przeciwnowotworowych. W kręgu zainteresowań znajdują się między innymi pochodne akrydyny. Pochodne akrydyny o działaniu przeciwnowotworowym wykazują zróżnicowany mechanizm działania na poziomie molekularnym. Z uzyskanych dotychczas danych wynika jednak, że etap tworzenia fizykochemicznych kompleksów z DNA jest niezbędny dla aktywności biologicznej badanych pochodnych. Poważnym utrudnieniem w badaniach biofizycznych nad oddziaływaniami pochodnych akrydyny z DNA jest fakt, że związki te wykazują silną tendencję do agregacji w roztworach wodnych. Przedmiotem mojej pracy doktorskiej było opracowanie procedury badawczej i sposobu opracowywania wyników doświadczalnych, które łącznie pozwoliłyby na wyznaczenie parametrów termodynamicznych procesu oddziaływania z DNA związków ulegających agregacji w roztworach wodnych. Założyłam przy tym, że warunki pomiaru powinny być możliwie zbliżone do warunków fizjologicznych. Opracowaną procedurę zamierzałam następnie wykorzystać do uzyskania parametrów termodynamicznych oddziaływania serii pochodnych imidazoakrydonu z DNA z grasicy cielęcej, ctDNA.

Najlepszym sposobem wyznaczania parametrów termodynamicznych oddziaływań niekowalencyjnych jest dokonanie bezpośrednich pomiarów kalorymetrycznych efektów cieplnych występujących podczas oddziaływania reagentów [127, 128, 168, 169, 170, 171] Postęp jaki dokonał się w ciągu ostatnich lat w zakresie budowy kalorymetrów umożliwia dokonywanie takich pomiarów w skali mikro: objętość robocza ok. 1 ml, stężenia reagentów na poziomie stężeń mili- a nawet mikromolowych, możliwość precyzyjnej rejestracji efektów cieplnych rzędu ułamka μJ . Dlatego założyłam, że opracowywana przeze mnie procedura badawcza wykorzystywać będzie głównie technikę izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego.

Do swoich badań wybrałam 5 analogów przeciwnowotworowego imidazoakrydonu C-1311, syntetyzowanego w Katedrze Technologii Leków i Biochemii i znajdującego się obecnie po drugim etapie badań klinicznych oraz związek referencyjny: proflawinę. Wybrane imidazoakrydony charakteryzują się zróżnicowaną aktywnością cytotoksyczną. Struktury tych związków przedstawione są w Tab. 1.

Pierwszym etapem moich badań było ustalenie, czy wszystkie z tych związków ulegają agregacji w temp. 25°C w buforze HEPES o $\text{pH} = 7,0$ w zakresie stężeń 1 do 1000 μM . Postanowiłam też zbadać, czy siła jonowa buforu ma wpływ na proces

agregacji. Wykorzystałam w tym celu spektroskopię absorpcyjną w zakresie widzialnym i bliskiego nadfioletu (p. V.1). Numeryczna analiza zarejestrowanych zestawów widm wykazała, że w badanych roztworach, niezależnie od ich siły jonowej, występują dwie formy spektralne których wzajemna proporcja zależna jest od ogólnego stężenia badanego związku. Uznałam, że jedną z tych form spektralnych jest monomer a drugą agregat. Profil zmian stężeń tych form w funkcji stężenia ogólnego był przy tym zgodny z modelem agregacji nieograniczonej (p. II.4.3). Zarejestrowane zestawy widm wykorzystałam więc do wyznaczenia wartości stałych agregacji. Stałe te były rzędu $10^3 - 10^4 [M^{-1}]$, Tab. 7. Wykazałam również, że siła jonowa roztworu ma wpływ na stałą agregacji jedynie w przypadku imidazoakrydonów, które w tym pH występują jako monokationy. Stała agregacji proflawiny, która w pH 7 nie posiada ładunku wypadkowego, była taka sama zarówno w buforze nisko- jak i wysokosolnym.

Porównując widma form zagregowanych w buforze nisko- i wysokosolnym dla żadnego z badanych związków nie stwierdziłam istotnych różnic w położeniu i kształcie najbardziej długofalowego pasma absorpcji. Może to sugerować, że struktura powstających agregatów nie jest zależna od siły jonowej buforu.

Kolejnym etapem badań były pomiary mikrokalorymetryczne efektów cieplnych podczas rozcieńczania roztworów badanych związków w buforach o 10 różnych stężeniach NaCl w zakresie od 5 do 300 mM, p.V.3. Monotoniczny, gładki przebieg wszystkich zarejestrowanych termogramów potwierdził, że agregacja tych związków zachodzi zgodnie z jednym mechanizmem. Przebieg izoterm deagregacji w funkcji stężenia był przy tym zgodny z modelem agregacji nieograniczonej.

Stwierdziłam, że dla wszystkich badanych imidazoakrydonów siła jonowa ma wpływ na parametry termodynamiczne procesu agregacji. Tym samym wykazałam, że oddziaływania elektrostatyczne odgrywają istotną rolę w procesie agregacji badanych imidazoakrydonów. Wzrost siły jonowej prowadzący do osłabienia oddziaływań elektrostatycznych sprzyja przy tym procesowi agregacji. Wpływu takiego nie stwierdziłam w przypadku związku referencyjnego: proflawiny.

Analizując zależność stałej agregacji od siły jonowej buforu zauważyłam, że co najmniej dla 3 pochodnych imidazoakrydonu (C-1330, C-1212 i C-1371) wyniki uzyskane w buforze niskosolnym (5 mM NaCl) wyraźnie odbiegają od trendu wpływu siły jonowej na stałą agregacji obserwowanego przy wyższej sile jonowej. Może to sugerować, że przy bardzo niskiej sile jonowej roztworu agregacja zachodzi pod wpływem innej siły napędowej lub że powstające agregaty znajdują się w otoczeniu lokalnym o odmiennej

strukturze. Biorąc pod uwagę brak istotnych różnic w widmach elektronowych agregatów należy raczej wykluczyć przypuszczenie, że różnią się one przestrzennym rozmieszczeniem cząsteczek liganda.

Głównym etapem moich badań były pomiary kalorymetryczne efektów cieplnych występujących podczas oddziaływania badanych ligandów z DNA. Już pierwsze uzyskane termogramy wykazały, że proces oddziaływania ligand-DNA jest bardziej skomplikowany niż można się było spodziewać. W wielu termogramach można było wyróżnić 3 zakresy miareczkowania, np. Ryc.50. Podczas pierwszych kilku nastrzyków występują silne lecz malejące w kolejnych nastrzykach efekty egzotermiczne. Jednakże po kilku kolejnych nastrzykach efekty te zaczynają ponownie wzrastać osiągając maksimum przy 10 – 15 nastrzyku. Pod koniec miareczkowania efekty cieplne zmieniają znak przechodząc w endotermiczne efekty deagregacji. Taki przebieg izotermi oddziaływania sugeruje, że poza deagregacją ligandu dochodzi do co najmniej dwóch oddziaływań egzotermicznych – prawdopodobnie powstają dwa różne kompleksy ligand-DNA. Nie można również wykluczyć, że w przypadku izoterm o prostszym przebiegu efekty cieplne jednego z potencjalnych oddziaływań „chowają się” w silniejszych efektach cieplnych drugiego z nich.

W tej sytuacji podjęłam obliczenia symulacyjne różnorodnych modeli oddziaływań. W ich wyniku wytypowałam model, który najlepiej odtwarzał kształty uzyskanych przeze mnie izoterm eksperymentalnych. W modelu tym (p. IV.5.7) założyłam jednoczesne występowanie trzech następujących procesów:

1. wiązanie liganda do liniowej matrycy z wykluczeniem sąsiedztwa zgodnie z równaniem McGhee i von Hippel bez uwzględnienia kooperatywności wiązania (proces interkalacji)
2. oddziaływanie elektrostatyczne zagregowanej formy liganda z grupami fosforanowymi DNA:
3. deagregację liganda na skutek rozcieńczenia nastrzyku zgodnie z modelem agregacji nieograniczonej.

W modelu tym występuje 7 parametrów: n , K_1 i ΔH_1 opisujące proces interkalacji, K_2 i ΔH_2 opisujące elektrostatyczne oddziaływanie agregatów z polianionem DNA oraz K_A i ΔH_A opisujące deagregację liganda. Model dopasowywany był do danych doświadczalnych poprzez dobór optymalnych wartości parametrów metodą simpleksów z wykorzystaniem algorytmu Nelder-Mead. Po wyznaczeniu wartości parametrów

modelu możliwa była dekompozycja całkowitych efektów cieplnych na efekty poszczególnych oddziaływań. Przykład takiej dekompozycji dla termogramu z ryciny 50 przedstawia panel A) ryciny 51.

Dzięki przeprowadzonej dekompozycji całkowitych efektów cieplnych stała się możliwa pełniejsza interpretacja uzyskanych izoterm, nawet tych o skomplikowanym przebiegu. Podczas kilku pierwszych nastrzyków dochodzi do prawie całkowitej deagregacji proflawiny, a jej forma monomeryczna tworzy kompleks interkalacyjny z DNA. Po wysyceniu większości miejsc wiązania proces deagregacji ulega zahamowaniu i podczas kolejnych nastrzyków wzrasta stężenie agregatów w roztworze. Agregaty te oddziałują elektrostatycznie z polianionem DNA. W efekcie całkowite efekty cieplne kolejnych nastrzyków wzrastają. W końcowej fazie miareczkowania szybkość przyrostu stężenia obu rodzajów kompleksów maleje i w całkowitym efekcie cieplnym przewagę zdobywa efekt cieplny deagregacji. Obserwowane zróżnicowane kształty izoterm zależą od wzajemnych relacji pomiędzy poszczególnymi oddziaływaniami. Na przykładzie sześciu przebadanych pochodnych akrydyny wykazałam, że model ten dobrze odtwarza kształty izoterm eksperymentalnych zarejestrowanych dla roztworów o różnej sile jonowej i w różnych temperaturach. Zdarzają się jednak sytuacje, gdy jakość oszacowania niektórych parametrów modelu jest niezadawalająca.

Dzięki opracowanemu modelowi oddziaływań możliwe było wyznaczenie interesujących mnie parametrów termodynamicznych procesu interkalacji. Wyznaczone stałe wiązania monomerów, K_1 , (Tabele: 14, 16, 18, 20, 22 oraz 24) są rzędu: 10^5 dla związków C-1492 oraz C-1371, a ok. 10^4 dla analogów C-1212, C-1415, C-1330. Dla związku referencyjnego stała wiązania K_1 jest również rzędu 10^4 , jednak wartości stałej są niższe niż w przypadku innych związków. Proflawina ma w swojej strukturze szkielet trójpierścieniowy (reszta związków - czteropierścieniowy) oraz pozbawiona jest łańcuchów bocznych, wskutek czego ma mniejsze możliwości oddziaływania z makromolekułą. Dodatkowo jako związek niejonowy, cząsteczka proflawiny jest słabiej przyciągana przez ujemnie naładowane reszty grup fosforanowych podwójnej helisy DNA. Analizując wpływ stężenia NaCl na interkalację badanych związków do DNA (Ryc. 54, 62, 67, 73, 78, 83) zauważyłam, że wraz ze wzrostem siły jonowej dochodzi do spadku stałej wiązania monomerów z DNA. Punktami odbiegającymi od tego trendu są stałe wyznaczone dla buforu z 5 mM NaCl (dla proflawiny, C-1415, C-1492, C-1371), oraz dla buforu z 5 mM oraz 25 mM NaCl. Dodatkowo, wraz ze wzrostem siły jonowej

buforu procesowi oddziaływania towarzyszyły coraz to mniej ujemne wartości (o ok. 20%) zmiany entalpii swobodnej ΔG .

Na podstawie profili termodynamicznych zamieszczonych w Tabelach 14, 16, 18, 20, 22 oraz 24 mogłam stwierdzić, że oddziaływanie monomerów wszystkich badanych w tej pracy pochodnych akrydyny jest egzotermiczne. Występują jednak istotne różnice w znaku efektu entropowego tego oddziaływania. Ujemny przyrost entropii stwierdzony dla oddziaływania proflawiny z DNA świadczy o typowej interkalacji cząsteczki proflawiny pomiędzy pary zasad w DNA. Natomiast dodatnia zmiana entropii zaobserwowana dla wszystkich badanych pochodnych imidazoakrydonu interpretowana jest zwykle jako przesłanka oddziaływania związków w małym rowku DNA. Jednakże istotne zmiany widma elektronowego imidazoakrydonów zaobserwowane podczas tworzenia przez nie kompleksów z DNA [172] wskazują na udział fragmentów aromatycznych tych związków w procesie interkalacji. Mogłoby to sugerować, że tylko łańcuchy boczne tych związków lokują się w małym rowku helisy DNA.

Charakterystyczny jest przy tym wpływ siły jonowej buforu na wielkość efektu entropowego. Dla wszystkich badanych imidazoakrydonów wraz ze wzrostem stężenia NaCl w roztworze, w zakresie 5 mM -150 mM NaCl, obserwowałam ponad dwukrotny wzrost dodatniej wartości $T\Delta S$. Dla buforów o większej sile jonowej (200 - 300 mM NaCl) kierunek i zakres zmian wartości członu entropowego zależał od budowy związku. Zgodnie z literaturą występowanie dużego członu entropowego w oddziaływaniu ligandów z DNA związane może być ze zmianą składu otoczki hydratacyjnej i podwójnej warstwy elektrycznej zarówno liganda jak i makromolekuły [170]. Stwierdzenie to może sugerować, że zmiany członu entropowego w różnym zakresie stężeń chlorku sodu mogą być również związane z obecnością aminoalkilowych łańcuchów bocznych w cząsteczkach badanych imidazoakrydonów.

Przeprowadzenie miareczkowania kalorymetrycznego w różnych temperaturach umożliwiło mi wyznaczenie zmiany pojemności cieplnej, ΔC_p , związanej z utworzeniem kompleksu ligand/DNA dla pięciu analizowanych związków (proflawiny, C-1330, C-1212, C-1492 oraz C-1371). Uzyskana duża ujemna wartości ΔC_p może być związana z uwalnianiem podczas oddziaływania cząsteczek wody z otoczki hydratacyjnej liganda, jak również z przeniesieniem części niepolarnych związku (układ pierścieni aromatycznych) do wnętrza helisy DNA [173].

Analizując Ryciny: 56, 63, 68, 74, 79 oraz 84 zaobserwowałam, że dla wszystkich badanych związków wraz ze wzrostem siły jonowej buforu maleje zmiana entalpii

swobodnej oddziaływań elektrostatycznych. Natomiast zmiany entalpii swobodnej oddziaływań pozaelektrostatycznych utrzymują się na zbliżonym poziomie: dla proflawiny stanowią one 60-80 %, 69-84 % dla C-1330, 73-92 % dla C-1415, 72-93 % dla C-1212, 67-87 % dla C-1371 oraz 85-92 % dla C-1492 całkowitej zmiany entalpii swobodnej dla tego oddziaływania.

Wszystkie powyższe wnioski pokazują, że oddziaływania elektrostatyczne mają znaczący wpływ na wiązanie się badanych pochodnych akrydyny z ctDNA i są one korzystne dla tego wiązania. Dotyczy to również proflawiny, która w pH 7 nie posiada wypadkowego ładunku. Ze względu na swoją budowę posiada jednak nierównomierny rozkład gęstości elektronowej i niezerowy wypadkowy moment dipolowy. Tym samym może uczestniczyć w oddziaływaniach elektrostatycznych typu dipol-ładunek lub dipol-dipol.

Wyznaczenie wartości zmiany pojemności cieplnej, ΔC_p , dla proflawiny, C-1330, C-1212, C-1492 oraz C-1371, pozwoliło mi również wykazać, że na proces tworzenia kompleksów badanych związków z DNA mają również wpływ oddziaływania hydrofobowe (Ryciny: 56, 63, 68, 74, 79 oraz 84). Najistotniejszy wpływ tych oddziaływań zauważyłam w przypadku związku C-1212 ($\Delta G_{hyd} = -42,51(\pm 10)$ kJ/mol). Łączny ujemny efekt ΔG_{pe} , ΔG_{hyd} , ΔG_{mol} kompensuje z nadwyżką dodatnią zmianę entalpii wynikającą z utraty swobody rotacji i translacji podczas kompleksowania, ΔG_{r+t} , oraz zmian konformacyjnych w strukturze liganda, ΔG_{konf} . W efekcie ogólna zmiana entalpii swobodnej jest ujemna i proces powstawania kompleksu interkalacyjnego przebiega samorzutnie.

Oszacowanie wartości poszczególnych członów wchodzących w skład obserwowanej zmiany entalpii swobodnej pozwoliło mi ustalić, że siłą napędową tworzenia kompleksu interkalacyjnego badanych akrydyn z DNA jest uwolnienie energii w wyniku tworzenia się nowych słabych oddziaływań międzycząsteczkowych, głównie oddziaływań van der Waalsa i oddziaływań π - π oraz przeniesienia aromatycznych cząsteczek z roztworu wodnego do hydrofobowego środowiska helisy DNA.

Podsumowując, wykonane przez ze mnie badania spektrofotometryczne, mikrokalorymetryczne, oraz zastosowanie opracowanego modelu oddziaływań pozwoliły na szczegółową analizę procesów zachodzących podczas tworzenia kompleksu imidzoakrydyn z ctDNA. Dekompozycja efektów cieplnych zarejestrowanych podczas pomiarów kalorymetrycznych na udziały trzech oddzielnych procesów pozwoliła mi na poprawne oszacowanie parametrów termodynamicznych procesu najbardziej istotnego

z punktu widzenia aktywności biologicznej imidazoakrydonów – tworzenia kompleksów interkalacyjnych. Uzyskane parametry pozwoliły z kolei na określenie siły napędowej oraz efektów wpływających na zmiany tego procesu (siła jonowa buforu, temperatura, budowa liganda). Zgromadzone informacje mogą być istotnym uzupełnieniem badań dotyczących mechanizmu przeciwnowotworowego działania pochodnych imidazoakrydonu prowadzonych w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej.

VII. LITERATURA

- 1** Jagiełło K, Sosnowska (Dopierała) A, Mazerski J, (2010) Termodynamiczne aspekty oddziaływania małowcząsteczkowych ligandów z DNA, *Postępy Biochemii*, 56: 3, 341-349
- 2** Watson JD, Crick FHC, (1953) Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid, *Nature* 171: 737-738.
- 3** Gellert MF, Lipsett NM, Davies DH, (1962) Helix formation by guanylic acid, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 48: 2013-2018.
- 4** Felsenfeld G, Davies DR, Rich A, (1957) Formation of a three-stranded polynucleotide molecule, *J. Am. Chem. Soc.* 79: 2023-2024.
- 5** Fox KR, (2000) Targeting DNA with triplexes, *Curr. Med. Chem.* 7: 17-37.
- 6** Vasquez KM, Wilson JH, (1998) Triplex-directed modification of genes and gene activity, *Trends Biochem. Sci.* 23: 4-9.
- 7** Praseuth D, Guieysse AL, Helene C, (1999) Triple helix formation and the antigene strategy for sequence-specific control of gene expression, *Biochim. Biophys. Acta Gene Struct. Expr.* 1489: 181--206.
- 8** Huppert JL, Balasubramanian S, (2007) G-quadruplexes in promoters throughout the human genome, *Nucleic Acids Res.* 35: 406-413.
- 9** Haq I, (2002) Part II: The thermodynamics of drug-bipolymer interaction. Thermodynamics of drug-DNA interactions. *Arch Bioch Biophys* 403: 1-15
- 10** Neidle S, (2001) DNA minor-groove recognition by small molecules, *Nat. Prod. Rep.* 18: 291-309.
- 11** Cai X, Gray PJ, Von HDD, (2009) DNA minor groove binders: Back in the groove, *Cancer Treat. Rev.* 35: 437-450
- 12** Neto BAD, Lapis AAM, (2009) Recent developments in the chemistry of deoxyribonucleic acid (DNA) intercalators: principles, design, synthesis, applications and trends, *Molecules* 14: 1725-1746.
- 13** Wheate NJ, Brodie CR, Collins JG, Kemp S, Aldrich-Wright JR, (2007) DNA intercalators in cancer therapy: organic and inorganic drugs and their spectroscopic tools of analysis, *Mini-Rev. Med. Chem.* 7: 627-648.
- 14** Wartell RM, Larson JE, Wells RD, (1974) Netropsin: a specific probe for A-T region of duplex deoxyribonucleic acid, *J Biol Chem*, 249: 6719-6731
- 15** Wemmer DE, Dervan PB (1997) Targeting the minor groove of DNA. *Cur. Opin Struct Biol* 7: 355-61
- 16** Cozzi P, (2000) Recent outcome in the field of distamycin-derived minor groove binders, *Farmaco* 55: 168-173
- 17** Wang AHJ, Teng M (1990) Crystallographic and modeling methods in molecular desing. Springer-Verlag New York str.123-150

- 18** Tse WC, Boger DL, (2004) Sequence-selective DNA recognition: natural products and nature's lessons, *Chem. Biol.* 11: 1607–1617
- 19** Wemmer DE, (2000) Designed sequence-specific minor groove ligands. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29: 439-461
- 20** Pelton JG, Wemmer DE, (1989) Structural characterization of a 2:1 distamycin A-d(CGCAAATTGGAC) complex by two-dimensional NMR. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5723-5727
- 21** Wang L, Kumar A, Boykin DW, Bailly C, Wilson WD, (2002) Comparative thermodynamics for monomer and dimer sequence-dependent binding of a heterocyclic dication in the DNA minor groove. *J Mol Biol* 317: 361-374
- 22** Woods CR, Faucher N, Eschgfäller B, Bair KW, Boger DL, (2002) Synthesis and DNA binding properties of saturated distamycin analogues. *Bioorg Med Chem Lett* 12: 2647-2650
- 23** Haq I, Ladbury JE, Chowdhry BZ, Jenkins TC, Chaires JB, (1995) Specific binding of hoechst 33258 to the d(CGCAAATTTGCG)₂ duplex: calorimetric and spectroscopic studies.
- 24** Teng M, Usman N, Frederick CA, Wang AHJ, (1988) The molecular structure of the complex Hoechst 33258 and the DNA ligand dodecamer d(CGCGAATTCGCG)₂ *Nucleic Acids Res* 16: 2671–90.
- 25** <http://www.flickr.com/photos/exothermic/2561140752/>
- 26** Wemmer DE, Dervan PB, (1997) Targeting the minor groove of DNA. *Curr Opin Struct Biol* 7: 355-61
- 27** Luzzati V, Masson F, Lerman LS, (1961) Interaction of DNA and proflavine: a small-angle x-ray scattering study. *J Mol Biol* 3: 634-9
- 28** Lerman LS, (1961) Structural considerations in the interaction of DNA and acridines, *J Mol Biol* 3: 18–30
- 29** Suh D, Chaires JB, (1995) Criteria for the mode of binding of DNA binding agents. *Bioorg Med Chem* 3: 723-28
- 30** Dzięgielewski J, (1998) Badanie mechanizmu działania przeciwnowotworowego imidazoadrydonów. Rozprawa doktorska, Politechnika Gdańska
- 31** Ren J, Chaires JB, (1999) Sequence and structural selectivity of nucleic acid binding ligands. *Biochemistry* 38: 16067-16075
- 32** Tanious FA, Yen SF, Wilson WD, (1991) Kinetic and equilibrium analysis of a threading intercalation mode: DNA sequence and ion effects. *Biochemistry* 30: 1813-9
- 33** Nordén B, Lincoln P, Nordell P, Westerlund F, Wilhelmsson M, (2007) DNA-Threading Intercalation Rate Studies: Dynamics is an Efficient Mechanism for Biomolecular Structure Recognition *Book of abstract: Albany 2007*
- 34** Stańczak A, Szumilak M, (2009) Bisinterkalatory jako potencjalne leki przeciwnowotworowe. *Wiadomości Chemicznych*, 63: 847-875

- 35** Gao Q, Williams LD, Egli M, Rabinovich D, Chen SI, Quigley GJ, Rich A, (1991) Drug-induced DNA repair: X-ray structure of DNA-ditercalinium complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2422-26
- 36** Williams LD, Gao Q, (1992) DNA-ditercalinium interactions: implications for recognition of damaged DNA. *Biochemistry* 31: 4315-24
- 37** Delbarre A, Delepierre M, Garbay C, Igolen J, Le Pacq JB, Roques BP, (1987) Geometry of antitumor drug Ditercalinium bisintercalated into d(CpGpCpG)₂ by ¹H NMR. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 2155-59
- 38** <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1c9z>
- 39** Veal JM, Li Y, Zimmerman SC, Lamberson CR, Cory M, Zon G, Wilson WD, (1990) Interaction of a macrocyclic bisacridine with DNA. *Biochemistry* 29: 10918-27
- 40** Wirth M, Buchardt O, Koch T, Nielsen PE, Norden B, (1998) Interactions between DNA and mono-, bis-, tris-, tetrakis-, and hexakis(aminoacridines). A linear and circular dichroism, electric orientation relaxation, viscometry, and equilibrium study. *J Am Chem Soc* 110: 932-939
- 41** Wilson WD, Tanious FA, Barton HJ, Jones RJ, Fox K, Wydra RL, Streckowski L, (1990) DNA sequence dependent binding modes of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). *Biochemistry* 29: 8452-61.
- 42** Muller W, Crothers DM, (1975) Interactions of heteroaromatic compounds with nucleic acids. 1. The influence of heteroatoms and polarizability on the base specificity of intercalating ligands. *Eur J Biochem* 54: 267-7
- 43** Chaires JB, Leng F, Przewloka T, Fokt I, Ling YH, Perez-Soler R, Priebe W, (1997) Structure-based design of a new bisintercalating anthracycline antibiotic. *J Med Chem* 40: 261-6
- 44** <http://chemweb.bham.ac.uk/~hannonmj/Mike%20page/3wayjunction.htm>
- 45** Dougherty G, Pigram WJ, (1982) Spectroscopy analysis of drug-nucleic acid interactions, *Critic Rev Bioch* 103-132
- 46** Paul P, Hossain M, Yadav RC, Kumar GS, (2010) Biophysical Studies on the Base Specificity and Energetics of the DNA Interaction of Photoactive Dye Thionine: Spectroscopic and Calorimetric Approach, *Biophysical Chemistry*, 148, 1: 93-103.
- 47** Porumb H, (1978) The solution spectroscopy of drugs and the drug-nucleic acid interactions. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 34: 175.
- 48** Sobell HM, Jain SC, (1972) Stereochemistry of actinomycin binding to DNA: II. Detailed molecular model of actinomycin-DNA complex and its implications. *J. Mol. Biol.* 68: 21-28
- 49** Chaires JB, (1998) Drug-DNA interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8: 314-320.
- 50** Wu FY, Xiang YL, Wu YM, Xie FY, (2009) Study of the Interaction of a Fluorescent Probe with DNA, *Journal of Luminescence*, 129, 11: 1286-1291
- 51** Islam MM, Chowdhury SR, Kumar GS, (2009) Spectroscopic and Calorimetric Studies on the Binding of Alkaloids Berberine, Palmatine and Coralyne to Double Stranded RNA Polynucleotides, *Journal of Physical Chemistry B*, 113, 4: 1210-1224

- 52** González-Ruiz V, Olives AI, Martín M, Ribelle P, Ramos M, Menéndez MC, An Overview of Analytical Techniques Employed to Evidence Drug-DNA Interactions. Applications to the Design of Genosensors
- 53** Suh D, Chaires JB., (1995). Criteria for the Mode of Binding of DNA Binding Agents, *Biorganic and Medicinal Chemistry*, 3: 723-728
- 54** McGhee JD, von Hippel PH, (1974) Theoretical Aspects of DNA-Protein Interactions: Co-Operative and Non-Co-Operative Binding of Large Ligands to a One-Dimensional Homogeneous Lattice. *J. Mol. Biol.* 86: 469-489
- 55** Cusumano M, Giannetto A, (1997) The Interaction of Mixed-Ligand Square-Planar Complexes with Calf Thymus DNA. *J Inorg. Biochem.* 65: 137-144.
- 56** Kan Y, Armitage B, Schuster GB, (1997) Selective Stabilization of Triplex DNA by Anthraquinone Sulfonamide Derivatives. *Biochemistry* 3: 1461-1466.
- 57** Mergny JL, Maurizot JC, (2001) Fluorescence resonance energy transfer as a probe for G-quartet formation by a telomeric repeat. *Chembiochem*, 2:124-132
- 58** Rachwal PA, Fox KR, (2007) Quadruplex melting. *Methods*, 43:291-301
- 59** Rich RL, Myszka, DG, (2003) A Survey of the Year 2002 Commercial Optical Biosensor Literature. *J Mol. Recognit.* 16: 351-382.
- 60** Rich RL, Myszka, DG, (2001) BIACORE J: a New Platform for Routine Biomolecular Interaction Analysis. *J Mol. Recognit.* 14: 223-228.
- 61** Davis, TM, Wilson D, (2001) Surface Plasmon Resonance Biosensor Analysis of RNA-Small Molecule Interactions. *Methods Enzymol.* 340: 22-51.
- 62** De Mol NJ, Fisher MJE, (2010) Surface Plasmon Resonance Methods and Protocols, Humana Press / Springer Science Business Media, 978-1-60761-669-6, New York
- 63** Markey, F. (1999) What is SPR anyway? *BIA J.*, 6,1: 14-17.
- 64** Schasfoort RB, Tudos AJ, (2008) Handbook of Surface Plasmon Resonance, The Royal Society of Chemistry, Cambridge. 978-0-85404-267-8
- 65** Davis TM, Wilson WD, (2000) Determination of the Refractive Index Increments of Small Molecules for Correction of Surface Plasmon Resonance Data. *Anal. Biochem.* 284: 348-353.
- 66** Haq I, Ladbury JE, Chowdhry BZ, Jenkins TC, (1996) Molecular Anchoring of Duplex and Triplex DNA by Disubstituted Anthracene-9,10-Diones: Calorimetric, UV Melting, and Competition Dialysis Studies. *J. Am. Chem. Soc.* 11: 10693-10701.
- 67** Haq I, Ladbury JE, Chowdhry BZ, Jenkins TC, Chaires JB, (1997) Specific Binding of Hoechst 33258 to the d(CGCAAATTTGCG)₂ Duplex: Calorimetric and Spectroscopic Studies. *J Mol. Biol.* 271: 244-257.
- 68** Maeda Y, Nunomura K, Ohtsubo E, (1990) Differential Scanning Calorimetric Study of the Effect of Intercalators and Other Kinds of DNA-Binding Drugs on the Stepwise Melting of Plasmid DNA. *J. Mol. Biol.* 215: 321-329

- 69** Zhong W, Yu JS, Liang Y, (2003) Chlorobenzylidene-Herring Sperm DNA Interaction: Binding Mode and Thermodynamic Studies. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 59: 1281-1288
- 70** Plum GE, Breslauer KJ, (1995) Calorimetry of Proteins and Nucleic Acids. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5: 682-690.
- 71** Todd MJ, Gomez J, (2001) Enzyme kinetics determined using calorimetry: a general assay for enzyme activity? *Analytic Biochem* 296: 19-23
- 72** Spencer SD, Raffa RB, (2004) Isothermal titration calorimetric study of Rnase-A kinetics (cCMP→3'-CMP) involving end-product inhibition. *Pharmceutic Reas* 21: 1642-1647
- 73** Naghibi H (1995) Significant discrepancies between van't Hoff and calorimetry enthalpies. *Proc Natl Acad* 92: 5597-5599
- 74** Liu Y, Sturevant JM, (1995) Significant discrepancies between van't Hoff and calorimetry enthalpies. II. *Protein science* 4: 2559-2561
- 75** Chaires JB, (1998) Energetics of Drug-DNA Interactions. *Biopolymers* 44: 201-215
- 76** Velazquez-Campoy A, (2001) The binding energetics of first and second generation HIV-1 protease inhibitors: implications for drug design. *Arch Biochem Biophys* 390: 169-175
- 77** Chaires JB, Satyanarayana S, Suh D, Fokt I, Przewloka T, Priebe W, (1996) Parsing the Free Energy of Anthracycline Antibiotic Binding to DNA. *Biochemistry* 35: 2047-2053
- 78** DeLeys RJ, Jackson DA, (1976) Dye Titrations of Covalently Closed Supercoiled DNA Analyzed by Agarose Gel Electrophoresis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69: 446-454.
- 79** Keppler MD, James PL, Neidle S, Brown T, Fox KR, (2003) DNA Sequence Specificity of Triplex-Binding Ligands. *Eur. J Biochem.* 270: 4982-4992.
- 80** Galas DJ, Schmitz A, (1978) DNAase footprinting- simple method for detection of protein-DNA binding specificity. *Nucleic Acids Research*, 5: 3157-3170
- 81** Cardew AT, Fox KR, (2010) DNase I Footprinting, In: *Methods in Molecular Biology. Drug-DNA Interaction Protocols*, K. R. Fox (ed.), 2nd Ed., Chapter 10, 153-172,
- 82** Hampshire AJ, Rusling DA, Broughton-Head VJ, Fox KR, (2007) Footprinting: A method for determining the sequence selectivity, affinity and kinetics of DNA binding ligands. *Methods*, 42, 2:128-140
- 83** Chaires JB, Leng F, Przewloka T, Fokt I, Ling YH, Perez-Soler R, Priebe W, (1997) Structure-Based Design of a New Bisintercalating Anthracycline Antibiotic. *J Med. Chem.* 40: 261-266.
- 84** Collins JG, Aldrich-Wright JR, Greguric ID, Pellegrini PA, (1999) Binding of the Δ- and Λ- Enantiomers of [Ru(dmphen)₂dpq]²⁺ to the Hexanucleotide d(GTCGAC)₂. *Inorg. Chem.* 38: 5502-5509.
- 85** Tse WC, Boger DL, (2004) A fluorescent intercalator displacement assay for establishing DNA binding selectivity and affinity, *Acc. Chem. Res.* 37: 61-69

- 86** Boger DL, Fink BE, Brunette SR, Tse WC, Hedrick MP, (2001) A simple, high-resolution method for establishing DN Abinding affinity and sequence selectivity, *J. Am. Chem. Soc.* 123: 5878–5891
- 87** Baguley BC, Denny WA, Atwell GJ, Cain BF, (1981) Potential antitumor agents. 34. Quantitative relationships between DNA binding and molecular structure for 9-anilinoacridines substituted in the anilino ring, *J. Med. Chem.* 24: 170–177
- 88** Woody R, (1995) Circular dichroism, *Methods Enzymol.*, 246, 34- 71
- 89** Greenfield NJ, (1999) Applications of circular dichroism in protein and peptide analysis, *Trends Analyt. Chem.*, 18, 236-244.
- 90** Rodger A, (2010) Circular and linear dichroism of drug-DNA systems. *Methods Mol Biol* 613: 37-54
- 91** Kelly SM, Price NC, (1997) The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding *Biochim. Biophys. Acta*, 1338, 161-185.
- 92** Zsila F, Bikadi Z, Simonyi M, (2004) Circular Dichroism Spectroscopic Studies Reveal PH Dependent Binding of Curcumin in the Minor Groove of Natural and Synthetic Nucleic Acids. *Org. Biomol. Chem.* 2: 2902-2910
- 93** Lyng R, Rodger A, Norden B, (1991) The CD of Ligand-DNA Systems. 1. Poly(dG-dC) B-DNA. *Biopolymers* 31: 1709-1720.
- 94** Gmeiner, WH, (1998) NMR Spectroscopy as a Tool to Investigate the Structural Basis of Anticancer Drugs. *Curr. Med. Chem.* 5, 115-135.
- 95** Ducruix, A. and Giege, R. (1992) *Crystallisation of Nucleic Acids and Proteins* (Ducruix, A. and Giege, R., Eds.) pp 73-98, Oxford University Press, Oxford.
- 96** Zidek L, Stefl R, Sklenar V, (2001) NMR methodology for the study of nucleic acids, *Curr Opin Struct Biol.* 11, 3:275-81
- 97** Driscoll PC, Esposito D, Pfuhl M, (2001) NMR of nucleic acids and protein, *Nucl Magn, Reson*, 29: 340-405
- 98** Flinders J, Dieckmann T, (2006) NMR spectroscopy of ribonucleic acids, *Prog NMR spectrosc*, 48: 137-159
- 99** Claridge TD, (1999) *High Resolution NMR Techniques in organic chemistry*, Pergamon Press, Elsevier Science, Amsterdam 1999
- 100** Lin CH, Hill GC, Hurley LH, (1992) Characterization of a 12-mer duplex d(GGCGGAGTTAGG).d(CCTAACTCCGCC) containing a highly reactive (+)-CC-1065 sequence by ¹H and ³¹P NMR, hydroxyl-radical footprinting, and NOESY restrained molecular dynamics calculations, *Chem Res Toxicol.* 5(2):167-82
- 101** Trotta E, Paci M, (1998) Solution Structure of DAPI Selectively Bound in the Minor Groove of a DNA T.T Mismatch-Containing Site: NMR and Molecular Dynamics Studies. *Nucleic Acids Res.* 26: 4706-4713.

- 102** Petersen M, Hamed AA, Pedersen EB, Jacobsen JP, (1999) Bis-Intercalation of Homodimeric Thiazole Orange Dye Derivatives in DNA. *Bioconjug. Chem.*10: 66-74
- 103** Wu W, Vanderwall DE, Turner CJ, Hoehn S, Chen J, Kozarich JW, Stubbe J, (2002) Solution Structure of the Hydroperoxide of Co(III) Phleomycin Complexed with d(CCAGGCCTGG)₂: Evidence for Binding by Partial Intercalation. *Nucleic Acids Res.*30: 4881-4891.
- 104** Bostock-Smith CE, Gimenez-Arnau E, Missailidis S, Laughton, CA, Stevens MF, Searle MS, (1999) Molecular Recognition between a New Pentacyclic Acridinium Salt and DNA Sequences Investigated by Optical Spectroscopic Techniques, Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, and Molecular Modeling. *Biochemistry*, 3: 6723-6731
- 105** Parkinson JA, Ebrahimi SE, McKie H, Douglas KT,(1994) Molecular Design of DNA-Directed Ligands with Specific Interactions: Solution NMR Studies of the Interaction of a M-Hydroxy Analogue of Hoechst 33258 with d(CGCGAATTCGCG)₂. *Biochemistry*,33, 8442-8452.
- 106** Andrews, DH, (1930) The relation between the Raman spectra and the structure of organic molecules. *Phys. Rev.* 36:544-554
- 107** Hill TL, (1946) On steric effects, *J. Chem. Phys.* 14: 465
- 108** Chivian D, Robertson T, Bonneau R, Baker D, (2003) Ab initio methods. *Meth Biochem Anal* 44:547-57
- 109** Finney JL, (1982) Monte Carlo Techniques. *Biochem. Soc. Trans.*10: 305-307
- 110** Duben AJ, Bush CA, (1983) Monte Carlo Calculations on the Conformations of Models for the Glycopeptide Linkage of Glycoproteins. *Arch. Biochem. Biophys.*22: 1-15
- 111** Collier CA, Neidle S, (1988) Synthesis, Molecular Modeling, DNA Binding and Antitumor Properties of Some Substituted Amidoanthraquinones. *J. Med. Chem.* 31: 847-857
- 112** Gallego J, Ortiz AR, Gago F (1993) A Molecular Dynamics Study of the Bis-Intercalation Complexes of Echinomycin with d(ACGT)₂ and d(TCGA)₂: Rationale for Sequence-Specific Hoogsteen Base Pairing. *J Med. Chem.*36: 1548-1561
- 113** Fischer G, Pindur U, (1999) A Molecular Modeling Study of B-DNA-Intercalation Complexes with Amsacrine and Related Anilino-Acridines. *Pharmazie*54: 83-93
- 114** Singh SB, Kollman PA, (1999) Calculating the Absolute Free Energy of Association of Netropsin and DNA. *J. Am. Chem. Soc.*122: 3267-3271
- 115** Aqvist J, Medina C, Samuelsson JE, (1994) A New Method for Predicting Binding Affinity in Computer-Aided Drug Design. *Protein Eng.*7: 385-391
- 116** Hansson T, Aqvist J, (1995) Estimation of Binding Free Energies for HIV Proteinase Inhibitors by Molecular Dynamics Simulations. *Protein Eng.*8: 1137-1144
- 117** Smith RH Jr, Jorgensen WL, Tirado-Rives J, Lamb ML, Janssen PA, Michejda CJ, Kroeger Smith MB, (1998) Prediction of Binding Affinities for TIBO Inhibitors of HIV-1 Reverse Transcriptase Using Monte Carlo Simulations in a Linear Response Method. *J Med. Chem.* 41: 5272-5286
- 118** De Vivo M, Ensing B, Klein ML, (2005) Computational study of phosphatase activity in soluble epoxide hydrolase: High efficiency through a water bridge mediated proton shuttle. *J Am Chem Soc.*,127: 11226–11227

- 119** Lonsdale R, Hoyle S, Grey DT, Ridder L, Mulholland AJ (2012) Determinants of reactivity and selectivity in soluble epoxide hydrolase from quantum mechanics/molecularmechnics modeling. *Biochemistry*, 28, 51, 8: 1774-86
- 120** Chaires JB, (1996) Dissecting the free energy of drug binding to DNA. *Anticancer Drug Des*, 11: 569–580
- 121** Ren J, Jenkins TC, Chaires JB, (2000) Energetics of DNA intercalation reactions. *Biochemistry* 39:8439-8447
- 122** Spolar RS, Record MT Jr. (1994) Coupling of Local Folding to Site-Specific Binding of Proteins to DNA. *Science*, 263: 777-784
- 123** Chaires JB, (2006) A thermodynamic signature for drug-DNA binding mode, *Arch Biochem Biophys*, 453: 26-36
- 124** Manning GS, (1978) The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides. *Q Rev Biophys*, 11, 2:179–246.
- 125** Record MT, Jr, Anderson CF, Lohman TM, (1978) Thermodynamic analysis of ion effects on the binding and conformational equilibria of proteins and nucleic acids: the roles of ion association or release, screening, and ion effects on water activity. *Q Rev Biophys*, 11, 2:103–178.
- 126** Holdgate GA, Ward WHJ, (2005) Measurements of binding thermodynamics in drug discovery. *Drug discovery today* 22: 1543-50
- 127** Mazur S, Tanious FA, Ding D, Kumar A, Boykin DW, Simpson IJ, Neidle S, Wilson WD, (2000) A thermodynamic and structural analysis of DNA minor-groove complex formation, *J Mol Biol* 300: 321-37
- 128** Ha JH, Spolar RS, Record Jr MT, (1989) Role of the hydrophobic effect in stability of site-specific protein-DNA complexes. *J Mol Biol* 209: 801-16
- 129** Ladbury JE, (2002) Isothermal titration calorimetry: application to structure-based drug design. *Thermochimica acta* 380: 209-15
- 130** Zollinger H, (1991) Color chemistry: syntheses, properties and applications of organic dyes and pigments. New York: VCH.
- 131** Wyn-Jones E, Gormally J, (1983) Aggregation processes in solutions. Amsterdam: Elsevier
- 132** Duff DG, Giles C In: Franks F, (1975) Water: comprehensive treatise, vol. 4. New York: Plenum Press, [rozdział 3]
- 133** Lee DL, Mant CT, Hodges RS, (2003) A novel method to measure self-association of small amphipathic molecules: temperature profiling in reversed-phase chromatography. *J Biol Chem*. 25: 22918-27.
- 134** Murakami K, (1998) Cooperative ligand binding to globular protein (I). *Bull Chem Soc Jpn*;71: 2293–8
- 135** Moriyama Y, Takeda K, Murakami K, (2000) Electrophoretic behavior of complexes between sodium dextran sulfate and cationic surfactants. *Langmuir* 16: 7629–33

- 136** Murakami K. "Cooperative ligand binding to globular protein: a statistical mechanical theory based on a simple geometrical model and its application to lysozyme systems. *Langmuir* 15, 4270–5
- 137** Murakami K, Tsurufuji K. (1999) Cooperative ligand binding to globular protein (II). *Bull Chem Soc Jpn* 72: 653–9
- 138** Georges J. (1995) Deviation from Beer's law due to dimerization equilibria: theoretical comparison of absorbance, fluorescence and thermal lens measurement. *Spectrochimica Acta*, 6: 985-994
- 139** Sabat'e R, Estelrich J, (2008) Determination of the dimerization constant of pinacyanol: Role of the thermochromic effect. *Spectrochimica Acta Part A* 70: 471–476
- 140** Schwarz G, Klose, S, Balthasar W, (1970) Cooperative Binding to Linear Biopolymers. 2. Thermodynamic Analysis of the Proflavine-Poly(L-Glutamic Acid) System. *Eur. J Biochem.* 12: 454-460
- 141** Kapuscinski J, Darzynkiewicz Z, (1987) Interactions of Acridine Orange with Double Stranded Nucleic Acids. Spectral and Affinity Studies. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 5: 127-143
- 142** Cioslowski J, Liu G, Moncrieff D, (2000) The concerted trimerization of ethyne to benzene revisited. *Chemical Physics Letters* 316: 536–540
- 143** Bradley DF, Wolf MK, (1959) Aggregation of dyes bound to polyanions. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 45: 944-52
- 144** Bradley DF, Felsenfeld G, (1959) Aggregation of an acridine dye on native and denatured deoxyribonucleates. *Nature*, 184: 1920-2
- 145** Mazerski J, Bolard J, Borowski E, (1982) Self-association of some polyene macrolide antibiotics in aqueous media, *Biochim. Biophys. Acta*, 719: 11-17
- 146** Murakami K, (2002) Thermodynamic and kinetic aspects of self-association of dyes in aqueous solution. *Dyes and Pigments* 53: 31–43
- 147** Moriyama Y, Takeda K, Murakami K. (2000) Electrophoretic behavior of complexes between sodium dextran sulfate and cationic surfactants. *Langmuir* 16: 7629–33
- 148** Naghibi H, (1995) Significant discrepancies between van't Hoff and calorimetry enthalpies, *Proc Natl Acad*, 92: 5597-99
- 149** Liu Y, Sturevant JM, (1995) Significant discrepancies between van't Hoff and calorimetry enthalpies. II, *Protein science*, 4: 2559-61
- 150** Dong C, Wei Y, Wei Y (2005) Study on the interaction between methylene violet and calf thymus DNA by molecular spectroscopy. *J Photochem Photobiol. A: Chemistry* 174:15-22
- 151** Sharaf MA, Ullman DL, Kowalski BR, (1998) *Chemometrics*, Wiley, New York
- 152** Kramer R, (1998) *Chemometric Techniques for Quantitative Analysis*, Marcel Dekker, New York
- 153** Findeisen W, Szymanowski J, Wierzbicki A, (1980) *Teoria i metody obliczeniowe optymalizacji*, W-wa: PWN
- 154** Brandt S, (1998) *Analiza danych*, W-wa: PWN 1998

- 155** Traganos F, Kapuscinski J, Gong J, Ardelt B, Darzynkiewicz RJ, Darzynkiewicz Z, (1993) Caffeine Prevents Apoptosis and Cell Cycle Effects Induced by Camptothecin or Topotecan in HL-60 Cells. *Cancer Res.* 53: 4613-18
- 156** Blade A, Peacocke AR, (1968) The interaction of aminoacridines with nucleic acids. *Biopolymers*, 6: 1225-1253
- 157** Bradley DF, Wolf MK, (1959) Aggregation of dyes bound to polyanions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 45: 944-952
- 158** Bradley DF, Felsenfeld G, (1959) Aggregation of an acridine dye on native and denatured deoxyribonucleates. *Nature* 184: 1920-1922
- 159** Buurma NJ, Haq I, (2008) Calorimetric and spectroscopic studies of Hoechst 33258: self-association and binding to non-cognate DNA. *J Mol Biol* 5:607-621
- 160** Hossain M, Kumar GS (2009) DNA binding of benzophenanthridine compounds sanguinarine versus ethidium: Comparative binding and thermodynamic profile of intercalation. *J Chem Thermodynamics*, 41: 764-774
- 161** Wilson WD, Lopp IG (1979) Analysis of cooperativity and ion effects in the interaction of quinacrine with DNA. *Biopolymers* 18: 3025-3041
- 162** Friedman RA, Manning GS (1984) Polyelectrolyte effects on site-binding equilibria with application to the intercalation of drugs into DNA. *Biopolymers* 23: 2671-2714
- 163** Williams MC, Wenner JR, Rouzina I, Bloomfield VA (2001) Entropy and heat capacity of DNA melting from temperature dependence of single molecule stretching, *Biophysical Journal* 80: 1932–1939
- 164** MacGregor RB Jr, Clegg RM, Jovin TM (1987) Viscosity dependence of ethidium-DNA intercalation kinetics. *Biochemistry*, 26: 4008-4016
- 165** Finkelstein AV, Janin J (1989) The price of lost freedom: entropy of bimolecular complex formation. *Protein eng*, 3:1-3
- 166** Searle MS, Williams DH (1992) The cost of conformational order: entropy changes in molecular association. *J Am Chem Soc* 114: 10690-10697
- 167** Spolar RS, Record MT (1994) Coupling of local folding to site-specific binding of proteins to DNA. *Science* 263: 777-783
- 168** Ladbury JE (2002) Isothermal titration calorimetry: application to structure-based drug design. *Thermochimica acta* 380: 209-215
- 169** Ward WHJ, Holdgate GA (2001) Isothermal titration calorimetry in drug discovery. *Prog Med Chem* 38: 309-376
- 170** Michael A.A. O'Neill a, Simon Gaisford, (2011) Application and use of isothermal calorimetry in pharmaceutical development. *International Journal of Pharmaceutics* 417: 83–93
- 171** Ghai R, Falconer RJ, Collins BM (2012) Applications of isothermal titration calorimetry in pure and applied research--survey of the literature from 2010, *J Mol Recognit.* 25: 32-52
- 172** Jagiełło K (2010), Termodynamiczne aspekty oddziaływania wybranych pochodnych akrydyny z DNA, *Praca doktorska, Politechnika Gdańska*
- 173** Brown DG, Sanderson MR, Garman E, Neidle S (1992) Crystal structure of a berenil-d(CGCAAATTTGCG) complex. An example of drug-DNA recognition based on sequence-dependent structural features. *J Mol Biol* 20: 481-490