Politechnika Gdańska Wydział Chemiczny Katedra Technologii Leków i Biochemii

Rozprawa doktorska

TERMODYNAMICZNE ASPEKTY ODDZIAŁYWANIA WYBRANYCH POCHODNYCH AKRYDYNY Z DNA

mgr inż. Karolina Maria Jagiełło

Promotor: prof. dr hab. inż. Jan Mazerski

Gdańsk 2010

SPIS TREŚCI

I. WPROWADZENIE	5
II. CZĘŚĆ TEORETYCZNA	7
II.1. SPOSOBY ODDZIAŁYWANIA MAŁOCZĄSTECZKOWYCH LIGANDÓW Z	Z DNA 7
II.1.1. Interkalacja	8
II.1.2. Oddziaływanie w małym rowku	12
II.1.3 Oddziaływania zależne od sekwencji	13
II.1.4 Oddziaływania mieszane	14
II.1.5. Selektywność sekwencyjna oddziaływań małocząsteczkowyh ligandów	15
II.2. TERMODYNAMIKA TWORZENIA KOMPLEKSÓW Z DNA	15
II.2.1. Modele oddziaływania ligand-DNA	15
II.2.2. Parametry termodynamiczne oddziaływań ligand-DNA	17
II.2.3. Metody wyznaczania parametrów termodynamicznych	19
II.3. PRZYKLADY ANALIZY TERMODYNAMICZNEJ KOMPLEKSÓW LIGAN	D/DNA
II.3.1.Ligandy wiażace się w małym rowku	
II.3.2. Interkalatory	
II.3.3. Ligandy wiążące się w małym rowku bądź interkalujące	
II.4. ODDZIAŁYWANIA POCHODNYCH AKRYDYNY Z DNA	23
II.4.1. Niekowalencyjne oddziaływania pochodnych akrydyny z DNA	
II.4.2. Kowalencyjne oddziaływanie pochodnych 1-nitroakrydyny z DNA	
III. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	
IV. MATERIAŁY I METODY	
IV.1. Materiały	
IV.2. Odczynniki chemiczne i biochemiczne	
IV.3. Roztwory wyjściowe	
IV.4. Aparatura	
IV.5. Stosowane metody	
IV.5.1. Pomiar stężenia kwasu nukleinowego	
IV.5.2. Spektrofotometryczne badania stanu pochodnych akrydyny w roztworach woo	dnych 39
IV.5.3. Analiza zestawów widm pochodnych akrydyny w roztworach wodnych	
IV.5.4.Miareczkowanie spektrofotometryczne	40
IV.5.5. Analiza zestawów widm miareczkowania pochodnych akrydyny roztworem c	tDNA 41
IV.5.6. Pomiary mikrokalorymetryczne procesu dimeryzacji	

IV.5.7. Analiza danych mikrokalorymetrycznych procesu dimeryzacji	42
IV.5.8. Pomiary mikrokalorymetryczne oddziaływania związku z DNA	44
IV.5.9. Analiza danych mikrokalorymetrycznych oddziaływania ligadów z kwasami	
nukleinowymi	44
V. WYNIKI BADAŃ	46
V.1. BADANIA SPEKTROSKOPOWE	46
V.1.1. Właściwości spektroskopowe wybranych pochodnych akrydyny w roztworach	
wodnych	46
V.1.2. Fizykochemiczne oddziaływanie wybranych pochodnych akrydyny z DNA	50
V.1.2.1. Oddziaływania Ledakrinu z ctDNA	50
V.1.2.2. Oddziaływania pochodnej C-857 z ctDNA	60
V.1.2.3. Oddziaływania pochodnej C-1311 z ctDNA	64
V.2. BADANIA MIKROKALORYMETRYCZNE	71
V.2.1. Analiza termodynamiczna oddziaływań ligandów z ctDNA	72
V.2.1.1. Analiza termodynamiczna oddziaływań bromku etydyny z ctDNA	72
V.2.1.2. Analiza termodynamiczna oddziaływań Ledakrinu z ctDNA	79
V.2.1.3. Analiza termodynamiczna oddziaływań pochodnej C-857 z ctDNA	84
V.2.1.4. Analiza termodynamiczna oddziaływań pochodnej C-1311 z ctDNA	85
V.2.1.5. Porównanie profili termodynamicznych oddziaływania bromku etydyny, Leda	akrinu
oraz pochodnej C-1311 z DNA	96
V.2.2. Analiza termodynamiczna oddziaływań małych ligandów z DNA o różnym skła	ıdzie
zasad	
V.2.2.1. Analiza termodynamiczna oddziaływań bromku etydyny z DNA o różnym skł	ładzie
	99
V.2.2.2. Analiza termodynamiczna oddziaływań Ledakrinu z DNA o różnym składzie	zasad
	100
V.2.2.3. Analiza termodynamiczna oddziaływań pochodnej C-1311 z DNA o różnym s	składzie
zasad	102
VI. DYSKUSJA WYNIKÓW	104
VII. LITERATURA	111

Wykaz skrótów stosowanych w pracy:

ε	współczynniki ekstynkcji molowej
ctDNA	calf thymus DNA, DNA z grasicy cielęcej
DSC	dyferencyjna kalorymetrii skaningowa
ITC	izotermiczna kalorymetrii miareczkująca
K	wewnętrzna stała wiązania
K _D	stała dimeryzacji
n	stała opisująca wielkość miejsca wiązania, w przypadku DNA jest to ilość zasad lub par zasad zajętych przez cząsteczkę liganda
pz	pary zasad
r	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

I. WPROWADZENIE

Coraz pełniejsze poznanie ludzkiego genomu stwarza unikalną możliwość wybiórczego blokowania wybranych genów, w tym genów odpowiedzialnych za transformacje nowotworowe i niekontrolowany wzrost komórek nowotworowych. Uważa się, że najskuteczniejszym sposobem wyciszenia aktywności niepożądanych genów jest uniemożliwienie ich ekspresji na jak najwcześniejszym etapie poprzez zablokowanie sekwencji promotorowych. Regulacja na dalszych etapach, np. poprzez blokowanie lub degradację mRNA, może być dużo mniej skuteczna. Wybiórcze zablokowanie genów zaangażowanych w podstawowe procesy podziału komórkowego przez specyficznie wiążące się z nimi ligandy spowoduje zatrzymanie podziałów komórkowych, co jest szczególnie ważne nie tylko w terapii przeciwnowotworowej, ale również przeciwwirusowej.

Nasuwającym się podejściem w tak zaprojektowanej terapii jest zastosowanie krótkich, syntetycznych fragmentów DNA o odpowiednio dobranej sekwencji. Oligonukleotydy po dotarciu do wnętrza komórki mogą bowiem tworzyć silne i trwałe kompleksy zarówno z dwuniciowym DNA jak i jednoniciowym RNA wpływając na ekspresję genów na różnych poziomach [1]. Informacje na temat prób zastosowania takich cząsteczek w terapii szeregu chorób pojawiły się w literaturze już w latach 70-dziesiątych ubiegłego stulecia [2]. Możliwe jest zaprojektowanie oligonukleotydów o takiej wielkości i sekwencji, że wiązać się będą silnie i selektywnie jedynie z sekwencjami promotorowymi zasad w podwójnej helisie DNA [1]. Nadzieje związane z oligonukleotydami antysensowymi okazały się jednak zbyt optymistyczne. Krótkie fragmenty jednoniciowego DNA wprowadzone do organizmu ulegają bowiem szybkiej degradacji przez nukleazy obecne w surowicy, średni okres półtrwania jest krótszy niż 15 min [3], co uniemożliwia dotarcie związku do jego celu molekularnego. Zastosowane modyfikacje chemiczne zabezpieczające przed działaniem enzymów wpływają niekorzystnie na i tak trudny transport leku przez błony komórkowe. Zdolność do wiązania się z określonymi sekwencjami DNA wykazują również niektóre

białka. Przy próbach wykorzystania białek jako potencjalnych leków przeciwnowotworowych występują również problemy z ich transportem i trwałością [4].

Małocząsteczkowe ligandy zdolne do wybiórczego wiązania się z wybranymi, krótkimi sekwencjami par zasad, są zatem obiecująca alternatywą zarówno dla klasycznych leków przeciwnowotworowych jak i dla oligonukleotydów lub białek. Ligandy takie ze względu na swoją małą masę cząsteczkową mają szansę na dotarcie do jądra komórkowego

na drodze dyfuzji, a ich wysoka selektywność w stosunku do odpowiednio dobranych sekwencji DNA powinna ograniczyć występowanie efektów niepożądanych.

Aktualny stan wiedzy na temat takich ligandów jest jednak niezadowalający i wymaga intensywnych badań eksperymentalnych w celu ustalenia elementów struktury odpowiedzialnych za selektywne wiązania się do wybranych sekwencji oraz określenia natury oddziaływań fizykochemicznych odpowiedzialnych za trwałość tych kompleksów.

Oddziaływanie różnorodnych małocząsteczkowym ligandów z DNA jest obecnie intensywnie badane w wielu laboratoriach na całym świecie [5]. Głównym celem jest uzyskanie informacji nie tylko na temat struktury kompleksów ligand/DNA i dynamiki tworzenia tych kompleksów, ale także wyznaczenie parametrów termodynamicznych procesu. Zastosowanie pomiarów termodynamicznych dla opisu oddziaływań małocząsteczkowych ligandów z DNA stwarza możliwość uzyskania informacji na temat udziału poszczególnych typów oddziaływań w całkowitej zmianie entalpii swobodnej towarzyszącej utworzeniu kompleksu związku z kwasem nukleinowym. Informacja na temat tego, jakie człony składają się na całkowitą zmianę entalpii swobodnej pozwala ocenić, który fragment struktury związku odpowiada za jego zdolność do selektywnego oddziaływania z wybraną sekwencją DNA.

II. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

II.1. SPOSOBY ODDZIAŁYWANIA MAŁOCZĄSTECZKOWYCH LIGANDÓW Z DNA

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

Rozróżniamy dwa podstawowe mechanizmy oddziaływania małocząsteczkowych substancji chemicznych z dwuniciowym DNA:

- tworzenie wiązań kowalencyjnych,
- tworzenie oddziaływań fizykochemicznych.

Związki posiadające odpowiednie reaktywne grupy funkcyjne (substancje bogate w elektrony, *nukleofile*, bądź substancje z niedoborem elektronów, *elektrofile*) mogą łączyć się z DNA poprzez utworzenie wiązania kowalencyjnego.

DNA posiada wiele miejsc zdolnych do tworzenia silnych oddziaływań fizykochemicznych. Możliwe jest więc powstawanie względnie trwałych kompleksów DNA z ligandami o odpowiednich właściwościach.

Związki wiążące się kowalencyjnie z DNA z dużą wydajnością, przed utworzeniem wiązania kowalencyjnego tworzą z nim najpierw kompleksy stabilizowane odwracalnymi oddziaływaniami fizykochemicznymi.

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

Najlepszym modelem struktury DNA w warunkach fizjologicznych jest model podwójnej helisy typu B. Jednakże w zależności od sekwencji par zasad możliwe są niewielkie, lokalne odstępstwa od tego modelu. Od sekwencji zasad zależy również dynamika samej helisy. Regiony bogate w pary zasad GC są bardziej "sztywne" niż regiony bogate w pary AT. Tak więc jednym ze sposobów rozpoznawania sekwencji DNA jest zdolność ligandów do wiązania się z regionami DNA o strukturach odbiegających od typowej helisy B. Od sekwencji zasad zależy również obecność określonych grup funkcyjnych w rowkach podwójnej helisy. Możliwe jest więc "odczytanie" sekwencji bez konieczności rozwijania podwójnej helisy i rozrywania wiązań wodorowych odpowiedzialnych za parowanie się zasad w dwuniciowym DNA.

Wyróżniamy dwa podstawowe sposoby niekowalencyjnego oddziaływania małocząsteczkowych związków chemicznych z dwuniciowym DNA [6]:

- interkalacja,
- wiązanie w małym rowku DNA.

Zaprezentowane są one schematycznie na Ryc. 1. Procesy te mogą być poprzedzone dalekozasięgowymi oddziaływaniami elektrostatycznymi, które ułatwiają dotarcie związków w pobliże podwójnej helisy DNA.



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

II.1.1. Interkalacja

Interkalacja została po raz pierwszy opisana przez Lermana [7] w roku 1961. Typowe interkalatory, to związki posiadające płaski, skondensowany układ pierścieni aromatycznych lub heteroaromatycznych, który może wnikać pomiędzy sąsiednie pary zasad w podwójnej helisie DNA. Powstający w ten sposób kompleks interkalacyjny jest stabilizowany przez oddziaływania typu π - π płaskich układów aromatycznych z układami aromatycznymi zasad. Struktury wybranych interkalatorów przedstawiono na Ryc. 2. Interkalacja powoduje zmiany w strukturze DNA, skutkujące rozwinięciem helisy, jej usztywnieniem oraz wydłużeniem [8]. Wielkość modyfikacji zależy od budowy interkalatora: zmiana kąta skręcenia DNA waha się od 10 do 26°, a odległość między sąsiednimi parami zasad wzrasta z 0,34 nm do około 0,7-0,8 nm [9]. Większość klasycznych interkalatorów tworzy najtrwalsze kompleksy pomiędzy parami zasad GC, chociaż znane są również interkalatory o innych preferencjach [10].



Rycina 2. Struktury chemiczne wybranych interkalatorów, A – bromek etydyny, B – sanguinaryna, C – benzo[a]piren

Oprócz klasycznych interkalatorów (Ryc. 2) znane są związki o bardziej skomplikowanych mechanizmach oddziaływania z DNA. Interkalacja odgrywa w tych mechanizmach kluczową rolę jednakże specyficzna budowa ligandu wymusza nietypową strukturę kompleksu (Ryc. 3).



Rycina 3. Schemat nieklasycznego oddziaływania interkalatorów z DNA, A – interkalatory przebijąjące, B – bisinterkalatory, C – multi-interkalatory

Wśród cząsteczek tego typu wyróżnić można:

1. interkalatory przebijające [11], (ang. *threading intercalators*) które mają duże podstawniki po przeciwnych stronach interkalującego układu aromatycznego, przedstawione schematycznie na Ryc. 3A. Płaski układ wnika pomiędzy pary zasad, a podstawniki lokują się w małym i dużym rowku helisy DNA. W celu utworzenia kompleksu jeden z podstawników musi "przejść" pomiędzy parami zasad, co wymaga większego odkształcenie struktury helisy. Proces przebiega wolniej niż w przypadku klasycznych interkalatorów, natomiast powstały kompleks jest bardziej stabilny. Przykładem tego typu cząsteczek jest bisantren (Ryc. 4).



Rycina 4. Struktura chemiczna bisantrenu

 bisinterkalatory, (Ryc. 3B), posiadające dwa połączone łącznikiem układy skondensowanych pierścieni aromatycznych. Najczęściej związki tego typu wykazują większe powinowactwo do podwójnej helisy DNA niż pojedyncze układy skondensowane wchodzące w ich skład. Przykłady bisinterkalatorów przedstawiono na Ryc. 5.



В



Rycina 5. Struktury chemiczne: A - diterkaliny, B – WP631

Diterkalina tworzy kompleks z d(CGCG)₂, w którym dwa układy aromatyczne interkalują do dwóch miejsc CpG, pominąwszy środkowy układ GpC w dupleksie, a sztywny łącznik wiąże się z dużym rowkiem [12,13,14]. Interkalacja do sąsiednich miejsc w dupleksie jest zdecydowanie niekorzystna, co prawdopodobnie wiąże się z sumarycznym wpływem efektów sterycznych, elektrostatycznych i czynników konformacyjnych szkieletu DNA.

Innym znanym bisinterkalatorem jest związek WP631, w którym dwa interkalujące pierścienie antracyklinowe (dwie cząsteczki daunorubicyny) połączono kowalencyjnie pksylenowym łańcuchem o długości około 7 Å, który układa się w małym rowku DNA. Związek ten wykazuje większe powinowactwo do DNA w porównaniu z pojedyńczą cząsteczką daunorubicyny wchodzącą w jego skład [15,16].

Bisinterkalatory mogą posiadać identyczne lub różne układy skondensowanych pierścieni zdolnych do interkalacji. Stwierdzono, że również budowa i długość łącznika ma istotny wpływ na selektywność sekwencyjną i zdolność do wiązania się z DNA. Ostatnio ukazała się monografia przedstawiająca szczegółowo aktualny stan wiedzy o bisinterkalatorach [17].

3. przebijające bisinterkalatory, w których strukturze występują dwa układy aromatyczne połączone kowalencyjnie łącznikami znajdującymi się po przeciwnych stronach pierścieni. Cząsteczki tego typu mają zwykle strukturę makrocykliczną [18]. Przykładem takich bisinterkalatorów może być związek przeciwnowotworowy o symbolu SDM (Ryc. 6).



Rycina 6. Struktura chemiczna związku przeciwnowotworowego o symbolu SDM

4. multi-interkalatory, posiadające kilka układów aromatycznych, z których jednak tylko trzy mogą równocześnie interkalować do DNA [19], schematycznie taki sposób interkalacji przedstawiono na Ryc. 3C Przykładem multi-interkalatorów może być trisaminoakrydyna zaprezentowana na Ryc 7.



Rycina 7. Struktura chemiczna trisaminoakrydyny

II.1.2. Oddziaływanie w małym rowku

W latach 50-tych odkryto nową grupę antybiotyków przeciwnowotworowych o bardzo nietypowej strukturze. Należały do tej grupy m.in. dystamycyna i netropsyna (Ryc. 8). Podczas badań nad ich mechanizmem działania stwierdzono, że oddziałują one z małym rowkiem podwójnej helisy w regionach DNA bogatych w pary AT.



Rycina 8. Struktury chemiczne antybiotyków wiążących się w małym rowku: A – dystamycyna A, B – netropsyna

Dla utworzenia stabilnego kompleksu dystamycyny z DNA wymagana jest obecność co najmniej 4 par AT [20]. W ostatnim czasie wykazano, że dystamycyna wiąże się z DNA w formie dimeru, wypełniając cały mały rowek helisy [21,22,23]. Znane są analogi tego związku charakteryzujące się odmienną selektywnością względem sekwencji DNA [24]. W związkach takich jeden lub więcej pierścieni N-metylopirolowych zastąpiony jest pierścieniem imidazolowym lub 3-hydroksypirolowym.

Związki oddziałujące z DNA w małym rowku posiadają najczęściej kilka pierścieni aromatycznych (np fenylowych, furanowych, pirolowych) połączonych w taki sposób, aby możliwa była rotacja pierścieni i dopasowanie związku do kształtu rowka. 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 z faktu, iż przy takiej sekwencji możliwe jest utworzenie wiązań wodorowych pomiędzy atomem tlenu związanym z węglem C2 tyminy lub atomem N3 adeniny oraz donorami tych wiązań występującymi w strukturze związku [25].

Struktury innych znanych ligandów oddziałującym z DNA w małym rowku przedstawiono na Ryc.9. Barwnik Hoechst 33258 jest prawdopodobnie jednym z najlepiej poznanych związków tej grupy. Stosowany jest do badania procesu apoptozy, etapów cyklu komórkowego i wybarwiania jąder komórkowych. Związek ten wykazuje preferencje w stosunku do sekwencji A3T3 [26]. Berenil również wykazuje specyficzność wiązania do miejsc DNA bogatych w pary AT, lecz znacznie mniejsze od dystamycyny. Związek ten wiąże się w małym rowku podwójnej helisy DNA, przy czym miejsce wiązania jest wielkości 4 par zasad [27,28].



Rycina 9. Struktury chemiczne syntetycznych barwników wiążących się w małym rowku: A – Hoechst 33258, B – berenil

W małym rowku wiążą się również poliaminy alifatyczne takie jak spermina i spermidyna [29]. Przyjmuje się, że siłą napędową kompleksów tworzonych przez poliaminy alifatyczne są przede wszystkim oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy sprotonowanymi w warunkach fizjologicznych grupami aminowymi i anionowymi resztami kwasu fosforowego. Przypuszcza się, że pewną rolę mogą odgrywać również oddziaływania hydrofobowe fragmentów alifatycznych. Związki te wiążąc się z DNA, stabilizują jego strukturę helikalną. Zachowują się więc analogicznie jak inne kationy wielowartościowe.

II.1.3 Oddziaływania zależne od sekwencji

Wśród związków oddziałujących z DNA znaleziono ponadto 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 DAPI (Ryc. 10). W przypadku fragmentów DNA bogatych w pary AT związek ten tworzy w małym rowku kompleks stabilizowany wiązaniami

wodorowymi tworzonymi z grupami funkcyjnymi zasad od strony małego rowka, natomiast w przypadku fragmentów bogatych w pary GC (brak co najmniej trzech kolejno ułożonych par AT) DAPI interkaluje pomiędzy pary zasad [30].



Rycina 10. Struktura chemiczna DAPI

II.1.4 Oddziaływania mieszane

Ligandy zawierające w swej strukturze zarówno wielopierścieniowe układy aromatyczne (heteroaromatyczne) jak i konformacyjnie labilne łańcuchy boczne tworzą z DNA kompleksy stabilizowane jednocześnie dzięki interkalacji jak i oddziaływaniom w rowkach DNA. Pierwszym odkrytym związkiem tego typu był antybiotyk przeciwnowotworowy aktynomycyna D (Ryc. 11 A). Pierścień fenoksazonowy tego związku interkaluje pomiędzy dwie pary zasad GC, a dwa cykliczne łańcuchy peptydowe układają się w dużym rowku: jeden powyżej a drugi poniżej miejsca interkalacji [31]. Inną grupą antybiotyków przeciwnowotworowych, które wykazują podobny, mieszany charkter oddziaływania z DNA są pochodne antracykliny, a wśród nich najszerzej opisana w literaturze daunorubicyna (Ryc. 11B). Układ aromatyczny cząsteczki, a dokładniej pierścienie B i C, intekalują pomiędzy pary zasad GC, układ aminocukrowy związany z pierścieniem A układa się w małym rowku DNA, natomiast pierścień D wysuwa się w kierunku rowka dużego [15,32].



Rycina 11. Struktury chemiczne: A – aktynomycyny D, B – daunorubicyny

Również szereg syntetycznych związków przeciwnowotworowych wykazuje podobny charakter oddziaływania z DNA. Do związków tego typu należą m.in. 9-aminoalkiloaminowe pochodne 1-nitroakrydyny (np. ledakrin Ryc. 12A) oraz antrachinony przeciwnowotworowe takie jak mitoksantron (Ryc. 12B). Układy aromatyczne tych związków interkalują pomiędzy

pary zasad, a łańcuch lub łańcuchy boczne oddziałują w małym rowku. Oddziaływanie to ma głównie charakter elektrostatyczny, chociaż istnieją przesłanki sugerujące udział w tym oddziaływaniu również wiązań wodorowych [33]



Rycina 12. Struktury chemiczne: A - ledakrin, B - mitoksantron

II.1.5. Selektywność sekwencyjna oddziaływań małocząsteczkowyh ligandów

Z punktu widzenia medycyny na szczególne zainteresowanie zasługują związki małocząsteczkowe wiążące się z określonymi sekwencjami DNA. Przez wiele lat, wydawało się, że mogą to być tylko związki wiążące się w małym rowku. Związki takie, tworząc wiązania wodorowe z odpowiednimi grupami wyściełającymi rowek, rozpoznają sekwencje obejmujące kilka par zasad. Interkalatory wchodzą pomiędzy sąsiadujące pary zasad, zatem generalnie charakteryzują się preferencją jedynie względem par AT bądź GC [34]. Ostatnio znaleziono jednak interkalatory zdolne do rozpoznawania bardziej skomplikowanych sekwencji DNA. 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 (p.II.1.4).

Wśród interkalujących ligandów największe nadzieje na uzyskanie związku wybiórczo rozpoznającego pożądaną sekwencje DNA wiąże się z bisinterkalatorami [35]. Zakłada się, że poprzez odpowiedni dobór układów interkalujących oraz długości i budowy chemicznej łącznika można będzie zaprojektować bisinterkalator zdolny do tworzenia trwałego kompleksu tylko z jedną dowolnie wybraną sekwencją obejmującą od 4 do 6 par zasad. Wymagać to będzie jednak dużo pełniejszej wiedzy o oddziaływaniach ligand/DNA niż obecnie posiadana.

II.2. TERMODYNAMIKA TWORZENIA KOMPLEKSÓW Z DNA

II.2.1. Modele oddziaływania ligand/DNA

Zaproponowano szereg modeli opisujących oddziaływania małocząsteczkowych ligandów z DNA. Najczęściej stosowanymi są modele z wykluczonym sąsiedztwem (ang.

neighbour exlusion models), w których podwójna helisa DNA traktowana jest jako nieskończenie długa, jednowymiarowa matryca. Ligand może oddziaływać z więcej niż jedną jednostką matrycy i nie ma on dostępu do miejsc wiązania tworzących ciągi krótsze niż liczba zajmowanych miejsc (Ryc.13). Liczba dostępnych miejsc maleje więc nieliniowo wraz ze wzrostem stopnia obsadzenia matrycy.



Rycina 13. Schemat oddziaływania liganda z matrycą w modelach z wykluczonym sąsiedztwem

Najszersze zastosowanie wśród modeli tego typu znalazł model zaproponowany w 1974 przez McGhee i von Hippel [36]. 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:

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

gdzie: L - molowe stężenie wolnego liganda,

v – gęstość wiązania, czyli średnia liczba cząsteczek liganda związana przez jednostkę matrycy (v=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 przypadku zastosowania tego modelu do opisu oddziaływania ligand/DNA jednostką matrycy jest para 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 parametru kooperatywności ma postać:

$$\frac{\nu}{L} = K(1 - n\nu) \left(\frac{(2\omega - 1)(1 - n\nu) + \nu - R}{2(\omega - 1)(1 - n\nu)} \right)^{n-1} \left(\frac{1 - (n+1)\nu + R}{2(1 - n\nu)} \right)^2$$
gdzie: $R = \sqrt{(1 - (n+1)\nu)^2 + 4\omega\nu(1 - n\nu)}$
(2)

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 (2) sprowadza się do równania (1).

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
- oddziaływanie ligandu nie tylko z najbliższymi sąsiadami więcej niż jedna wartość ω.

II.2.2. Parametry termodynamiczne oddziaływań ligand/DNA

Wyznaczenie parametrów termodynamicznych procesu tworzenia kompleksów ligand/DNA pozwala określić jakie czynniki decydują o powinowactwie partnerów i sile napędowej tego oddziaływania.

Do najczęściej wyznaczanych eksperymentalnie parametrów termodynamicznych należą wewnętrzna stała wiązanie, K, oraz zmiana entalpii procesu, ΔH^0 . Wartości te, wykorzystuje się do obliczenia zmiany standardowej entalpii swobodnej układu, ΔG^0 , oraz zmiany standardowej entropii układu, ΔS^0 , zgodnie ze wzorem:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K = \Delta H^0 - T \Delta S^0 \tag{3}$$

Dodatkowo, dzięki pomiarom zmiany entalpii w różnych temperaturach można wyznaczyć zmiany w pojemności cieplnej układu [37] zgodnie z równaniem:

$$\Delta C_{p} = \frac{d(\Delta H^{0})}{dT} = \frac{\Delta H^{0}_{T_{2}} - \Delta H^{0}_{T_{1}}}{(T_{2} - T_{1})}$$
(4)

Na zmianę entalpii swobodnej, ΔG^0 , składają się zmiany entalpii swobodnej poszczególnych oddziaływań. Zwykle w ogólnej zmianie entalpii swobodnej wyróżnia się część wynikającą z oddziaływań elektrostatycznych, ΔG_{pe} , oraz część wynikającą z oddziaływań nieelektrostatycznych (oddziaływania hydrofobowe, oddziaływania van der Waalsa, itd.), ΔG_t :

$$\Delta G_{obs} = \Delta G_{pe} + \Delta G_t \tag{5}$$

Wartość ΔG_{pe} jest dla ligandów będących jonami zależna od siły jonowej buforu, a logarytm naturalny ze stałej wiązania K jest zwykle liniową funkcją logarytmu naturalnego ze stężenia soli, [MX]. Nachylenie tej zależności, SK, jest dane wzorem:

$$SK = \frac{\delta \ln K}{\delta \ln[MX]} = -Z\Psi$$
(6)

gdzie: Z – ładunek liganda,

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

Zmiana entalpii swobodnej oddziaływań elektrostatycznych może być wówczas obliczona zgodnie z zależnością:

$$\Delta G_{pe} = -(SK)RT\ln[MX] \tag{7}$$

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

- zmiana entalpii swobodnej przemian konformacyjnych DNA i liganda, ΔG_{konf} ,
- zmiana entalpii swobodnej wynikająca z utraty swobody rotacji i translacji podczas kompleskowania, ΔG_{r+t} ,
- zmiana entalpii swobodnej oddziaływań hydrofobowych związana z przejściem ligandu z roztworu do DNA, ΔG_{hvd}, oraz
- zmiana entalpii swobodnej słabych oddziaływań niekowalencyjnych (oddziaływań van der Waalsa, interakcji dipol-dipol, itd.), ΔG_{mol} [38].

Każdy z członów składających się na całkowitą zmianę entalpii swobodnej, zgodnie z równaniem (8), można wyznaczyć teoretycznie bądź eksperymentalnie.

$$\Delta G_{obs} = \Delta G_{pe} + \Delta G_{konf} + \Delta G_{r+t} + \Delta G_{hyd} + \Delta G_{mol}$$
(8)

Co najmniej dwa człony tego równania: zmiana entalpii swobodnej przemian konformacyjnych, ΔG_{konf} , oraz zmiana entalpii swobodnej związana z ograniczeniem rotacji i translacji, ΔG_{r+t} , przyjmują zawsze wartości dodatnie. Zatem, aby doszło do utworzenia kompleksu pozostałe człony muszą posiadać na tyle duże wartości ujemne, 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} [21]. Uzyskano ponadto empiryczną zależność pozwalającą oszacować wartość ΔG_{hyd} dysponując wartością pojemności cieplnej [39]:

$$\Delta G_{hvd} = (80 \pm 10) \Delta C_{p} \tag{9}$$

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 biologiczna. Taka informacja może być użyteczna dla racjonalnego projektowania nowych leków [40].

II.2.3. Metody wyznaczania parametrów termodynamicznych

Podstawowym parametrem termodynamicznym wyznaczanym dla kompleksów ligand/DNA jest wewnętrzna stała wiązania, K. Wyznaczana jest ona najczęściej metodami spektroskopowymi, poprzez pomiar zmian w widmie związku w trakcie dodawania kolejnych porcji DNA (bądź zmian w widmie DNA miareczkowanego roztworem ligandu) [41]. Uzyskane wyniki prezentuje się najczęściej w postaci wykresu zależności ułamka molowego formy skompleksowanej od logarytmu stosunku stężeń DNA/ligand. Zależność taką analizuje się poprzez numeryczne dopasowanie odpowiedniego modelu teoretycznego do danych eksperymentalnych. Metoda spektrofotometryczna pozwala, zatem określić również stechiometrię badanego procesu, czyli wyznaczyć liczbę par zasad biorących udział w wiązaniu jednej cząsteczki związku.

Inną coraz częściej stosowaną metodą jest technika rezonansu plazmonów powierzchniowych (ang. *Surface Plasmon Resonance, SPR*), która umożliwia badanie zjawisk zachodzących na powierzchni warstewki złota, na której immobilizowane są cząsteczki DNA. Tak skonstruowany chip oraz chip referencyjny (bez DNA) omywane są roztworem liganda o zadanym stężeniu. Jednocześnie rejestruje się zmiany wartości współczynnika załamania światła przy powierzchni chipu. Pozwala to z jednej strony ocenić dynamikę tworzenia kompleksu, a z drugiej dostarcza informacji o stopniu obsadzenia DNA cząsteczkami liganda. Uzyskane dane prezentuje się graficznie w postaci krzywej wiązania, do której dopasowuje się numerycznie odpowiedni model oddziaływań [42].

Obie te metody pozwalają ponadto wyznaczyć pośrednią zmianę entalpii oddziaływania związku z kwasem nukleinowym. Wymaga to jednak przeprowadzenia eksperymentu w co najmniej dwóch różnych temperaturach. Wartości tej funkcji termodynamicznej można wyznaczyć wykorzystując równanie van't Hoffa, opisujące zależność stałej wiązania od temperatury [43], zgodnie ze wzorem:

$$\frac{d(\ln K)}{dT} = \frac{\Delta H}{RT^2}$$
(10)

gdzie: K – stała wiązania,

 ΔH – zmiana entalpii reakcji,

R – stała gazowa,

T – temperatura wyrażana w stopniach Kalwina

Znajomość wartości zmiany entalpii pozwala z kolei oszacować zmianę entropii oraz zmianę pojemności cieplnej.

Wartości parametrów termodynamicznych wyznaczonych omówionymi powyżej metodami obarczone są jednak zwykle dużą niepewnością pomiarową. Wynika to z pośredniego sposobu ich wyznaczania. Dlatego dużym zainteresowaniem cieszą się metody bezpośredniego, kalorymetrycznego wyznaczanie zmian entalpii oddziaływania. Najczęściej stosowane są w tym celu: izotermiczna kalorymetria miareczkowa (ang. *Isothermal Titration Calorimetry*, ITC) oraz różnicowa kalorymetria skaningowa (ang. *Differential Skanning Calorimetry*, DSC).

W metodzie ITC następuje bezpośredni pomiar efektów cieplnych występujących w czasie dodawania związku do układu zawierającego kwas nukleinowy. Informacje na temat stechiometrii reakcji oraz stałej wiązania również można uzyskać tą techniką z wyników uzyskanych podczas jednego eksperymentu. Miareczkowanie z zastosowaniem metody ITC wykorzystano również do badania kinetyki oddziaływań makrocząsteczek [44,45]. Obecnie technika ITC znajduje coraz szersze zastosowanie, ze względu na prostotę jej wykonania oraz dokładność uzyskiwanych wyników [46,47].

Druga metoda, DSC, dostarcza użytecznych informacji o temperaturze przejść oraz zmianach pojemności cieplnej, które są wykrywane, kiedy próbka jest ogrzewana w szerokim zakresie temperatur. Na podstawie profili cieplnych może być badana ponadto odwracalność reakcji. Wszystko to umożliwia oszacowanie czynników stanowiących siłę napędową reakcji [48,49].

II.3. PRZYKLADY ANALIZY TERMODYNAMICZNEJ KOMPLEKSÓW LIGAND/DNA

Badania termodynamiki niekowalencyjnych oddziaływań małocząsteczkowych ligandów z DNA wykazały, iż zmiany entalpii są głównie wynikiem zmian w układzie wiązań wodorowych [50,51]. Dodatnia wartość zmian entropii jest wynikiem uwalniania cząsteczek wody z warstwy oddziaływań międzycząsteczkowych, natomiast ujemna wartość tej funkcji termodynamicznej jest związana ze zmianami konformacyjnymi reagentów [52,53]. Ujemna

(często duża) wartość ΔC_p połączona z dodatnią wartością zmian entropii układu jest traktowana jako wskaźnik oddziaływań hydrofobowych między molekułami [54].

Ze względu na polianionową strukturę DNA, w analizie termodynamicznej procesu tworzenia kompleksu ligand/DNA należy brać pod uwagę udział w tym procesie oddziaływań elektrostatycznych. Jeśli ligand posiada ładunek dodatni, to będzie przyciągany w pobliże ujemnie naładowanych grup fosforanowych łańcucha kwasu nukleinowego wchodząc w skład elektrycznej warstwy podwójnej otaczającej makrocząsteczkę. Udział kationowego ligandu w tworzeniu tej warstwy zależy silnie od stężenia innych kationów w roztworze. Skutkuje to zależnością stałej wiązania K od stężenia soli w mieszaninie reakcyjnej [55].

II.3.1.Ligandy wiążące się w małym rowku

Wszystkie dotychczas zbadane związki wiążące się z DNA w małym rowku posiadały podobne profile termodynamiczne, dla wszystkich uzyskano ujemną wartość ΔC_p . Tak więc główną siłą napędową oddziaływania małocząsteczkowego związku z DNA w małym rowku jest transfer cząsteczki z roztworu do wnętrza rowku. Stwierdzono, iż tworzeniu kompleksu towarzyszy wysoce energetyczny efekt hydrofobowy oraz silny wzrost entropii układu w wyniku uwalniania cząsteczek wody i podstawiania przeciwjonów warstwy podwójnej przez kationy ligandu. Dodatnia zmiana entalpii swobodnej wynikająca z utraty swobody rotacji i translacji w wyniku kompleksowania jest kompensowana przez ΔG_{hyd} oraz ΔG_{pe} . Dane uzyskane dla kilku związków przedstawione zostały w Tabeli 1 [21,56,57].

Tabela 1. Parametry termodynamiczne dla oddziaływań kilku związków z A3T3 w temperaturze 25 $^{\circ}$ C

Związek	ΔG_{obs} (kcal mol ⁻¹)	ΔH (kcal mol ⁻¹)	$T\Delta S$ (kcal mol ⁻¹)	K (*10 ⁶ M ⁻¹)	ΔC_p (cal mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG_{hyd} (kcal mol ⁻¹)
Hoechst 32258 [19]	-7,7	+4,4	+12,1	0,46	-330	-26,4
netropsyna [46]	-8,6	-5,8	+2,9	2,44	-213	-17,0
berenil [58]	-8,0	+0,6	+8,6	0,75	-146	-11,7

II.3.2. Interkalatory

W badaniach wykazano, iż podobnie jak dla związków, które wiążą się z podwójną helisą w jej małym rowku, tworzeniu kompleksu DNA/interkalator towarzyszy silny efekt hydrofobowy, związany z przeniesieniem cząsteczek interkalatora z roztworu do wnętrza helisy. W przypadku interkalatorów dodatnia zmiana entalpii swobodnej związanej z utratą swobody rotacji i translacji jest kompensowana nie tylko przez ΔG_{hyd} , ale również przez istotny wkład energetyczny wynikający z oddziaływań niekowalencyjnych. Wytłumaczyć to można faktem, iż w przypadku związków wiążących się z DNA w małym rowku, nie powstają żadne "nowe" oddziaływania: najczęściej cząsteczka wody zostaje podstawiona cząsteczką liganda. Natomiast w przypadku interkalatorów, związek wchodząc pomiędzy pary zasad "tworzy" nowe silne oddziaływania. Ponadto, interkalatory wchodząc pomiędzy pary zasad powodują częściowe rozwinięcie helisy i jej wydłużenie, natomiast brak jest doniesień o zmianach konformacyjnych w strukturze ligandów, czego wynikiem jest niezerowa wartość ΔG_{konf} [6,59]. Zatem proces tworzenia kompleksu DNA/interkalator może hipotetycznie przebiegać w dwóch etapach [60]:

1) $DNA \rightarrow DNA^*$

2) $DNA^* + Ligand \rightarrow DNA*Ligand$

W pierwszym etapie cząsteczka DNA ulega zmianom konformacyjnym (rozwinięciu) umożliwiając późniejszą interkalację. W drugim etapie związek wiąże się z rozwinięta cząsteczką DNA. Jednakże w praktyce obydwa procesy przebiegają jednocześnie i nie da się ich eksperymentalnie oddzielić.

Parametry termodynamiczne tworzenia kompleksu dla wybranych interkalatorów przedstawione zostały w Tabeli 2.

Związek	ΔG_{obs} (kcal mol ⁻¹)	ΔH (kcal mol ⁻¹)	TΔS (kcal mol ⁻¹)	K (*10 ⁵ M ⁻¹)	ΔC_p (cal mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔG_{hyd} (kcal mol ⁻¹)
sanguinarina	-8,15	-6,98	1,17	1,21	-140,80	-11,26
bromek etydyny	-8,41	-8,23	0,18	1,90	-159,77	-12,78

Tabela 2. Przykłady parametrów termodynamicznych oddziaływań ctDNA/interkalator w temperaturze 25 ℃, 10 mM NaCl [61]

II.3.3. Ligandy wiążące się w małym rowku bądź interkalujące

Zastosowanie różnych technik spektroskopowych i kalorymetrycznych do badań oddziaływań pomiędzy DNA i DAPI pozwoliło potwierdzić, iż związek ten może tworzyć dwa różne kompleksy z DNA charakteryzujące się różnym powinowactwem [62,63]. Wiązanie DAPI do poly[d(A-T)] jest silniejsze (stała wiązania jest około 1000 razy większa) i bardziej kooperatywne niż wiązanie tego liganda do poly[d(G-C)] [64].

Profil termodynamiczny uzyskany dla oddziaływań DAPI z cząsteczką DNA bogatą w pary AT okazał się analogiczny jak dla netropsyny. Procesowi tworzenia kompleksu towarzyszy silny wzrost entropii układu w wyniku uwalniania cząsteczek wody i podstawiania przeciwjonów warstwy podwójnej przez kationy ligandu. Uzyskane dane doświadczalne przedstawione zostały w Tabeli 3.

Niewielka jest natomiast ilość doniesień dotyczących termodynamiki interkalacji DAPI do podwójnej helisy DNA. Wykazano jedynie, iż zmiana entalpii tego oddziaływania wynosi -8 kcal/mol.

Mechanizm	ΔG (kcal mol ⁻¹)	ΔH (kcal mol ⁻¹)	TΔS (kcal mol ⁻¹)	K (M ⁻¹)
Interkalacja	-	-8,0 [56]	-	1,2*10 ⁵ [57]
Wiązanie w małym rowku -wiązanie z A2T2 w 25°C [56]	-10,6	-4,4	+6,2	5,5*10 ⁸

Tabela 3. Parametry termodynamiczne dla oddziaływań DAPI-DNA

II.4. ODDZIAŁYWANIA POCHODNYCH AKRYDYNY Z DNA

Odkąd wykazano przeciwbakteryjne i przeciwwirusowe właściwości pochodnych akrydyny [65,66] podjęto wiele prób modyfikacji chemicznej cząsteczki w celu znalezienia pochodnej charakteryzującej się wysoką aktywnością przeciwnowotworową [67,68]. Wybór pochodnych akrydyny jako potencjalnych leków przeciwnowotworowych nie był przypadkowy, podyktowany był przede wszystkim udowodnioną zdolnością tych związków do oddziaływania z DNA [69,70,71].

Wśród setek zsyntezowanych pochodnych akrydyny o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym znalazły się: i) proste pochodne, takie jak 9-aminoakrydyna i proflawina, ii) związki o bardziej rozbudowanych łańcuchach bocznych: amsakryna, ICR-191, chinakryna, nitroakrydyny, iii) związki posiadające więcej niż jedną strukturę akrydynową połączoną łańcuchem alifatycznym, tzw. bis-akrydyny [72] oraz iv) koniugaty akrydyny z innymi cząsteczkami, np. ASC (koniugat akrydyny ze spermidyną) [73] lub koniugaty akrydyny z zasadami purynowymi [74,75]. Wzory strukturalne wyżej wymienionych związków zostały przedstawione na Ryc. 14.



Rycina 14. Struktury chemiczne wybranych pochodnych akrydyny wiążących się z podwójną helisą DNA

II.4.1. Niekowalencyjne oddziaływania pochodnych akrydyny z DNA

Badania niekowalencyjnych oddziaływań pochodnych akrydyny z DNA prowadzono z użyciem różnych metod badawczych wykorzystujących zarówno zmiany w strukturze i otoczeniu związku, jak i w strukturze DNA. Wśród tych metod znalazły się pomiary spektroskopowe, wiskozymetryczne, pomiary temperatury "topnienia" DNA, pomiary stopnia nadskręcenia kolistego DNA oraz pomiary elektroforetyczne.

Jedną z pierwszych pochodnych akrydyny, której oddziaływania fizykochemiczne z DNA poddano szczegółowym badaniom była proflawina [76], Ryc. 14B. Badania te wskazały na występowanie dwóch typów oddziaływań:

- 1. Proces I, w którym proflawina silnie oddziałuje z DNA
- Proces II, w którym związek słabo oddziałuje z helisą DNA. Proces ten jest charakterystyczny dla wyższych stosowanych stężeń ligandu. Dominującą rolę w procesie II odgrywają oddziaływania elektrostatyczne [76].

Wykazano, że wiązanie proflawiny z dwuniciowym DNA powoduje wydłużenie helisy kwasu, nie wpływa natomiast na długość zdenaturowanego DNA. W kolejnych badaniach wykazano, iż proflawina zaburza strukturę kwasu nukleinowego obserwowaną metodami rentgenograficznymi, obniża współczynnik sedymentacji i zwiększa lepkość roztworu DNA [76]. Wyniki tych badań wskazywały, iż dochodzi do interkalacji związku pomiędzy pary zasad podwójnej helisy DNA. Powstający w ten sposób kompleks proflawiny z kwasem nukleinowym jest stabilizowany przez oddziaływania typu π - π płaskich układów aromatycznych z układami aromatycznymi zasad.

W latach 60-tych ubiegłego stulecia zespół profesora Zygmunta Ledóchowskiego w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej rozpoczął poszukiwania związków przeciwnowotworowych wśród nitrowych pochodnych 9-aminoakrydyny. W trakcie badań zsyntetyzowano wiele związków różniących się położeniem grupy nitrowej oraz strukturą łańcucha bocznego przyłączonego do grupy aminowej w pozycji 9. Pochodne te charakteryzowały się zróżnicowaną aktywnością biologiczną [77]. Najbardziej aktywne okazały się 1-nitro pochodne akrydyny z aminoalkilowym łańcuchem bocznym. Wynikiem prowadzonych wówczas badań było zarejestrowanie w 1974 roku pierwszego, polskiego leku przeciwnowotworowego 1-nitro-9-(3-dimetyloaminopropyloamino)-akrydyny. Związek ten otrzymał polską nazwę Ledakrin (symbol roboczy C-283, nazwa rekomendowana prze WHO to Nitracrine) [78,79,80]. Pochodna ta jest aktywna przeciwko nowotworom jajnika, płuc i skóry oraz nowotworom piersi [81,82,83]. Zaletą Ledakrinu jest fakt, iż nie wywołuje on efektu mielosupresyjnego [84,85], aczkolwiek powoduje inne niepożądane efekty, między innymi silne wymioty [86]. Struktura Ledakrinu została przedstawiona na Ryc.15.



Rycina 15. Struktura chemiczna Ledakrinu, C-283.

Podjęto szeroko zakrojone badania nad oddziaływaniami fizykochemicznymi pochodnych 9alkiloaminonitroakrydyn z dwuniciowym DNA. Zakładano, że jeśli etap tworzenia kompleksu Ledakrinu z DNA odpowiada za jego aktywność przeciwnowotworową, to związki o niskiej aktywności cytotoksycznej będą wykazywały mniejsze powinowactwo. Przeprowadzono badania dla wielu różnie podstawionych pochodnych, różnice te dotyczyły zarówno położenia grupy NO₂, jak i długości łańcucha bocznego na grupie aminowej [87]. Badania wykonano metodą miareczkowania spektrofotometrycznego oraz termicznej denaturacji kompleksów. W Tabeli 4 przedstawiono kodowe nazwy związków wraz z informacją o ich strukturze.

Położenie grupy	Długość łańcucha bocznego			
$-NO_2$	x = 2	x= 3	x = 4	
1	C – 337	C – 283	C - 205	
2	C – 338	C – 264	C – 176	
3	C – 309	C – 257	C – 175	
4	C – 308	C – 265	C – 232	

Tabela 4. Kodowe nazwy pochodnych akrydyny w zależności od położenia grupy nitrowej i długości łańcucha bocznego

Wszystkie powyższe związki oddziałują z DNA, powodując jego usztywnienie skutkujące podwyższeniem temperatury "topnienia" kompleksu w stosunku do niezwiązanego kwasu. Kompleks Ledakrin/DNA ulegał "topnieniu" przy temperatury o 11°C wyższej, a kompleksy z izomerami 2-, 3-, 4-nitro wykazywały podwyższenie temperatury "topnienia" od 14°C do 38°C, dla stosunku wagowego akrydyny do DNA równego 1:20 [82,88,89]. Kompleksy charakteryzowały się również znacznym poszerzeniem zakresu temperatur, w których zachodziła denaturacja DNA.

Badania spektrofotometryczne wykazały natomiast, że podczas tworzenia kompleksu występuje przesunięcie batochromowe i obniżenie intensywności najbardziej długofalowego pasma absorpcyjnego w widmie UV/VIS pochodnych akrydyny w miarę dodawania kolejnych porcji ctDNA [82]. Podobnie jak dla proflawiny wykazano istnienie dwóch mechanizmów oddziaływania związków z DNA [90]. Przez analogię z wcześniej publikowanymi pracami przyjęto, iż silne oddziaływanie następuje w wyniku interkalacji związku pomiędzy pary zasad kwasu nukleinowego, natomiast wiązanie słabe jest wynikiem oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy grupami fosforanowymi i zjonizowaną cząsteczką nitroakrydyny. Fakt interkalacji nitroakrydyn do DNA potwierdzają wyniki uzyskane metodą miareczkowania wiskozymetrycznego prowadzone z użyciem nadskręconego DNA [91]. W badaniach tych wykazano wzrost lepkości roztworu kwasu nukleinowego w wyniku indukowania przed Ledakrin obniżenia stopnia nadskręcenia. Interkalacja pojedynczej cząsteczki Ledakrinu indukowała rozwinięcie podwójnej helisy o ok. 16°. Podobną wartość, 15°, uzyskano dla 9-aminoakrydyny (wartość dla bromku etydyny [92] wynosi 26°). Wyznaczone stałe wiązania metoda miareczkowania spektrofotometrycznego dla wyżej wymieniowych pochodnych nitroakrydyny przedstawiono w Tabeli 5. Wyniki te opublikowane zostały w rozprawie doktorskiej pani Katarzyny Kołdej [87].

Tabela 5. Stałe wiązania pochodnych akrydyn	y z ctDNA wraz z liczbą cząsteczek związku
przypadająca na parę zasad podwójnej helisy	DNA w buforze tris-HCl 10 mM, 0,1 mM
EDTA, pH = 7,2, 150mM NaCl	

Zwiazek	Silne oddziaływanie		Słabe oddziaływanie	
LWIGLON	N ₁	$K_1 * 10^{-7} [M^{-1}]$	N ₂	$K_2 * 10^{-5} [M^{-1}]$
C – 337	0,18	3,3	0,27	10,0
C – 338	0,11	5,0	0,22	8,0
C – 309	0,16	2,7	0,24	9,0
C – 308	0,12	2,8	0,26	4,1
C – 283	0,06	2,8	0,12	4,9
C – 264	0,17	1,4	0,22	10,0
C – 257	0,15	3,1	0,20	10,0
C – 265	0,14	1,6	0,23	8,1
C – 205	0,12	4,0	0,25	2,2
C – 232	0,14	3,0	0,23	11,2

^{*}Dane opublikowane w rozprawie doktorskiej pani Katarzyny Kołdej

Uzyskane stałe wiązania zostały oszacowane przy zastosowaniu prostego modelu Scatcharda [93]. Dla silnych oddziaływań były one rzędu 10^7 M⁻¹, a więc zgodne z wcześniej opublikowanymi danymi [94]. Natomiast prace prowadzone równolegle w zespole naukowym z Uniwersytetu w Auckland (Nowa Zelandia) sugerowały, iż stała wiązania Ledakrinu jest o 2 rzędy wielkości mniejsza [95]. Różnice te wytłumaczyć można faktem, iż zespół z Uniwersytetu w Auckland do danych eksperymentalnych dopasowywał bardziej zaawansowany model z wykluczeniem najbliższego sąsiada (model McGhee i von Hippel, p. II.2.1). Wiadomo obecnie, że model Scatcharda, zastosowany przez naukowców z Politechniki Gdańskiej był zbyt uproszczony i nie wyjaśniał całej skomplikowanej natury oddziaływań małych ligandów z DNA.

Pomimo rozbieżności, co do wartości stałych wiązania dane przedstawione w Tabeli 5 pozwoliły stwierdzić, iż nie ma korelacji pomiędzy aktywnością biologiczną Ledakrinu i jego analogów a ich zdolnością do tworzenia kompleksów z DNA. W trakcie dalszych wieloletnich badań wykazano, iż Ledakrin ulega w komórce metabolicznej aktywacji. Powstające metabolity tworzą kowalencyjne wiązania z kwasem nukleinowym, są również zdolne do sieciowania DNA [96]. Dokładniejszy opis kowalencyjnych oddziaływań pochodnych akrydyny z DNA będzie tematem kolejnego podrozdziału niniejszej pracy doktorskiej.

W Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej pod kierownictwem profesora Jerzego Konopy zsyntezowano również analogi akrydyny: imidazoakrydony oraz triazoloakrydony. Wiodącymi związkami tych grup są odpowiednio pochodne oznaczone symbolami C-1311 oraz C-1305. Struktury chemiczne związków przedstawiono na Ryc. 16.



Rycina 16. Struktury chemiczne A - imidazoakrydonu C-1311, B - triazoloakrydonu C-1305

Wstępne badania mechanizmu działania imidazoakrydonów wykazały, iż związki te wiążą się niekowalencyjnie z dwuniciowym DNA [97,98]. Świadczą o tym zmiany w widmach absorpcyjnych (przesunięcie batochromowe i hypochromowe) i fluorescencyjnych, a także

wzrost stabilności termicznej dwuniciowego DNA (ΔT_m jest w granicach od 2,4 do 15,3°C dla różnie podstawionych pochodnych imidazoakrydounu, stosunek molowy ligandu do DNA równy 1:4). Wyznaczone stałe wiązania dla tych pochodnych są rzędu 10⁴ M⁻¹ (model McGhee i von Hippel, 150 mM NaCl). Większe powinowactwo (K=4,5*10⁵ M⁻¹) pochodnej C-1311 do DNA w buforze o niskiej sile jonowej, sugeruje, iż w tym procesie istotną rolę odgrywają oddziaływania elektrostatyczne [99,100]. Analogicznie jak dla Ledakrinu i jego analogów wielkość stałej wiązania, a także innych parametrów określających powinowactwo związku do kwasu nukleinowego, nie jest skorelowana z aktywnością biologiczną badanych imidazoakrydonów. Oznacza to, iż wiązanie fizykochemiczne do DNA nie wystarcza dla wystąpienia aktywności biologicznej tych związków [9].

Podobne wyniki uzyskano dla triazoloakrydonów: wykazano zdolność tych związków do fizykochemicznego oddziaływania z DNA, lecz utworzenie niekowalencyjnego kompleksu nie jest wystarczające dla wywołania efektu terapeutycznego [101].

Inną grupę pochodnych akrydyny o interesujących właściwościach biologicznych stanowią związki zsyntezowane na początku lat 70-tych ubiegłego stulecia na wspomnianym już Uniwersytecie w Auckland, w zespole kierowanym przez profesora Bruca Cain'a [102]. Związkiem wiodącym w tej grupie pochodnych była 9-anilinoakrydyna znana pod nazwą Amsakryna (m-AMSA), Ryc.14C. Lek ten jest stosowany w klinicznym leczeniu ostrych białaczek [103,104] oraz w leczeniu nowotworów, które nabyły oporność na antracykliny i inne leki przeciwnowotworowe [105].

Pochodne 9-anilinoakrydyny wiążą się niekowalencyjnie do DNA powodując zaburzenia struktury i funkcji materiału genetycznego [106]. Fizykochemiczne wiązanie m-AMSA do DNA jest stosunkowo słabe [107], stała wiązania w warunkach fizjologicznych jest rzędu 10^4 M^{-1} . Dla porównania stałe wiązania antybiotyków przeciwnowotworowych, takich jak adriamycyna, daunorubicyna i aktynomycyna D są rzędu 10^6 - 10^7 M^{-1} [108,109].

Fakt, iż oddziaływanie m-AMSA z DNA charakteryzuje mała zmiana entalpii $(\Delta H^0 = -5,2 \text{ kcal/mol})$ w porównaniu z innym znanymi interkalatorami, sugeruję, iż duży podstawnik przy grupie aminowej akrydyny utrudnia pełną interkalację związku pomiędzy pary zasad podwójnej helisy DNA. Wykazano również, że pochodna ta wykazuje większe powinowactwo w stosunku do fragmentów DNA bogatych w pary AT [107,110]. Na podstawie wszystkich przeprowadzonych badań zaproponowano model wiązania m-AMSA do DNA, w którym szkielet akrydynowy leży płasko pomiędzy parami zasad dwuniciowej helisy, a podstawnik anilinowy lokuje się w mniejszym rowku [104]. Schematycznie przedstawiono to na Ryc. 17. Grupa metanosulfonamidowa w przypadku m-AMSA jest

zdolna do tworzenia wiązań wodorowych z zasadami wyściełającymi mały rowek DNA. Dla porównania wiązań takich nie ma w przypadku orto podstawionej pochodnej 9-anilinoakrydyny, ponieważ grupa metoksylowa w pozycji 2' jest zawadą steryczną uniemożliwiającą dostatecznie bliski kontakt pomiędzy wnętrzem małego rowka a grupą –NHSO₂CH₃ [106]. Tworzenie dodatkowych wiązań wodorowych w przypadku m-AMSA wyjaśnia różnice w termodynamice oddziaływań analogów z DNA. Różnica ta limitowana jest głównie zmianą w entropii oddziaływań: dla m-AMSA wyznaczona zmiana entropii wynosi 2 calmol⁻¹K⁻¹, a dla o-AMSA 11,3 calmol⁻¹K⁻¹.



Rycina 17. Model wiązania m-AMSA do DNA [104]

Etap tworzenia fizykochemicznego kompleksu z DNA wydaje się być niezbędną cechą anilinokrydyn o wysokiej aktywności biologicznej. Stwierdzono, że obecność dużego podstawnika tert-butylowego w pozycji 3 lub 4 pierścienia akrydynowego, który uniemożliwia interkalację, znosi całkowicie aktywność przeciwnowotworową pochodnej m-AMSA [111].

Jednakże zdolność do tworzenia kompleksów interkalator/DNA, podobnie jak w przypadku wcześniej omawianej grupy akrydyn, nie jest wystarczająca dla wystąpienia aktywności biologicznej związku. Hipotezę tą potwierdza fakt, iż omawiany analog Amsakryny, o-AMSA, wykazuje około 2-krotnie większe powinowactwo do DNA [112], będąc jednocześnie nieaktywny biologicznie. Obecnie panujący pogląd na temat mechanizmu przeciwnowotworowego działania Amsakryny zakłada, że za efekt cytotoksyczny wywołany przez lek odpowiedzialna jest jego zdolność do blokowania kompleksu topoizomerazy II z DNA [113,114,115].

Kierując się hipotezą, iż etap interkalacji związku pomiędzy pary zasad DNA jest niezbędny dla aktywności biologicznej pochodnych akrydyn [107,116] podjęto badania nad bisakrydynami, Ryc 7G. Potencjalnie związki te powinny charakteryzować się większym powinowactwem do DNA [117,118] niż badane wcześniej monointerkalatory akrydynowe. Związki te powinny ponadto wykazywać większą selektywność sekwencyjną [119,120]. Układy akrydynowe są w bisakrydynach połączone łącznikiem zwykle o charakterze alifatycznym. Łącznik ten może, przy odpowiedniej budowie chemicznej, oddziaływać z krawędziami zasad eksponowanymi do małego rowka DNA oraz z grupami fosforanowymi helisy kwasu nukleinowego. Można zatem, zmieniając odpowiednio strukturę chemiczną łącznika, zmieniać ilość grup będących donorami/akceptorami wiązań wodorowych i w ten sposób modulować preferencje sekwencyjne związku [121,122,123]. Łącznik ten może być "elastyczny", możliwa jest wówczas rotacja układów akrydynowych, bądź sztywny, uniemożliwiający wewnątrzcząsteczkowe oddziaływania pomiędzy pierścieniami akrydynowymi [124].

Powinowactwo bisakrydyn do DNA, tak jak podejrzewano, znacznie wzrosło w stosunku do związków monomerycznych. Stała wiązania dla większości zbadanych bisakrydyn jest rzędu 10¹⁰ M⁻¹ [125]. Wynika to oczywiście z faktu, iż dochodzi tu do jednoczesnej interkalcji dwóch płaskich układów aromatycznych (p. II.1.1 Ryc.3B). Istotna zmiana stałej wiązania występująca w przypadku porównania mono- i bisakrydyn, nie występuje kiedy porównamy bis- i trisakrydyny [126].

Pomimo znacznego wzrostu powinowactwa bisakrydyn do DNA, nie zaobserwowano istotnej zmiany w aktywności biologicznej tych związków w porównaniu z monointerkalatorami [127]. Przede wszystkim nie uzyskano znaczącej poprawy ich selektywnej toksyczności w stosunku do komórek nowotworowych [128].

W ostatnich latach zaproponowano inne rozwiązanie problemu niskiej selektywnej toksyczności leków przeciwnowotworowych, w których mechanizmie działania występuje etap tworzenia kompleksu interkalator-DNA. Wykorzystano fakt, iż w przypadku komórek szybko proliferujących, czyli przede wszystkim komórek nowotworowych, występuje wysokie zapotrzebowanie na biogeniczne poliaminy [129,130,131]. Wysokie stężenie poliamin wykryto w wielu komórkach nowotworowych [132,133,134]. Poliaminy charakteryzują się wysokim powinowactwem do DNA [135,136,137,138]. Zaproponowano zatem połączenie akrydynowego układu interkalującego z poliaminami. Wykazano, iż uzyskane w ten sposób koniugaty zwiększają powinowactwo pochodnych akrydyn do kwasu nukleinowego, nie wpływają natomiast na ich aktywność jako inhibitora topoizomeraz

[139,140]. Jednocześnie cząsteczki te są łatwiej transportowane do komórek, wykorzystują bowiem układ transportujący poliaminy do wnętrza komórek [141,142,143]. Związkiem tego typu jest na przykład koniugat spermidyny z 9-aminoakrydyną o symbolu ASC [73], Ryc.14H. Wstępne badania mechanizmu działania tego związku wykazały, iż układ akrydynowy interkaluje pomiędzy pary zasad podwójnej helisy DNA. Stałe wiązania wyznaczone dla oddziaływań ASC z DNA są rzędu 10^6 M^{-1} [144], zatem powinowactwo pochodnej tej nie różni się od innych typowych interkalatorów o aktywności przeciwnowotworowej. Istotną zaletą tego związku jest fakt, iż poliaminowy łańcuch boczny oddziałuje z zasadami w rowkach DNA, blokując w ten sposób możliwość związania się z kwasem nukleinowym enzymów biorących udział w proliferacji DNA. Cząsteczka jest obecnie intensywnie badana po kątem możliwości jej użycia jako potencjalnego leku przeciwnowotworowego.

Podsumowując, akrydyna posiada płaski układ heteroaromatyczny, który umożliwia wnikanie związku pomiędzy pary zasad podwójnej helisy. Powstający kompleks DNAinterkalator stabilizowany głównie oddziaływaniami typu π - π , usztywnia strukturę kwasu, utrudniając jego rozplecenie. Dodatkowo uniemożliwia dotarcie w pobliże helisy enzymów bioracych udział w procesach proliferacji komórek, takich jak topoizomerazy i telomerazy [145,146]. Etap utworzenia fizykochemicznego kompleksu z DNA jest niezbędny, ale nie wystarczający dla wywołania odpowiedzi biologicznej. Podobnych obserwacji dokonano dla związków przeciwnowotworowych nie będących pochodnymi akrydyny [72,147,148,149]. odpowiedzialny Istnieje zatem jakiś inny mechanizm za występowanie przeciwnowotworowego działania pochodnych akrydyny.

II.4.2. Kowalencyjne oddziaływanie pochodnych 1-nitroakrydyny z DNA

Badania mechanizmu działania pochodnych 1-nitroakrydyny prowadzone w wielu ośrodkach naukowych wskazywały, iż etap utworzenia niekowalencyjnego kompleksu z DNA nie jest wystarczający dla wywołania odpowiedzi biologicznej. Uznano zatem, że warunkiem działania cytotoksycznego i przeciwnowotworowego tych związków jest ich kowalencyjne związanie się z DNA.

W trakcie badań działania Ledakrinu na DNA w mieszaninie reakcyjnej zawierającej tiole zaobserwowano istotny wzrost zdolności związku do inhibicji syntezy RNA. Sugerowało to, że dochodzi tu do silnego, prawdopodobnie kowalencyjnego, wiązania zaktywowanych produktów redukcji związku z kwasem nukleinowym [150,151]. Wykazano, iż w tych warunkach cząsteczki akrydyny wiążą się preferencyjnie z fragmentami DNA

bogatymi w puryny, głownie w guaninę [152]. Tworzenie adduktu jest hamowane dużym stężeniem bromku etydyny oraz wzrostem siły jonowej roztworu, co potwierdza, że etap silnego, kowalencyjnego wiązania poprzedzony musi być interkalacją związku pomiędzy pary zasad DNA [153].

Po żmudnych badaniach zaproponowano dwa możliwe szlaki przemian 1-nitroakrydyny: redukcja grupy nitrowej w pozycji 1 bądź utlenienie grupy aminowej łańcucha bocznego [154]. Istotna rola grupy nitrowej dla aktywności biologicznej 1-nitroakrydyn sugerowała, że w warunkach wewnątrzkomórkowych aktywacja związków dotyczy tej właśnie grupy [155]. Grupa nitrowa w związkach aromatycznych jest bardzo podatna na redukcję, w wyniku czego tworzą się bardziej reaktywne pochodne nitrozo i hydroksyloaminowe.



Rycina 18. Etapy redukcji grupy nitrowej w związkach aromatycznych

Zaproponowano schemat przemian metabolicznych Ledakrinu, przedstawiony na Ryc. 19. Wykazano, że pochodne -- NO (a) oraz -- NHOH (b) nie powstają w znaczących ilościach. Zidentyfikowano jedynie ślad ich jonów masowych w mieszaninie reakcyjnej, który szybko znikał [156]. Powstawały natomiast inne bardziej trwałe, chociaż również reaktywne pochodne, które z jednej strony były produktami podstawienia nukleofilowego w pierścieniu aromatycznym, z drugiej strony produktami świadczącymi o reaktywności redukowanej grupy nitrowej. Produkty te, Ryc. 19 (c-f), zawierały dodatkowe struktury cykliczne, które były efektem wewnątrzcząsteczkowych reakcji, w których biorą udział atomy azotu w pozycji 1 i 9. Zaktywowane produkty mogą wiązać się kowalencyjnie do DNA oraz do innych makromolekuł komórkowych [151,157]. Związki takie zdolne sa również do międzyłańcuchowego sieciowania DNA zarówno w komórkach bakteryjnych, jak i w komórkach ssaków [96,158]. Na podstawie badań korelacyjnych udowodniono, że zdolność do tworzenia wiązań sieciujących jest odpowiedzialna za aktywność biologiczna 1nitroakrydyn [159].



Rycina 19. Produkty metabolizmu Ledakrinu, a,b – nietrwałe intermediaty, c-f – wyizolowane związki [148]

Metaboliczna aktywacja niezbędna jest również dla aktywności przeciwnowotworowej imidazo- [160,161] i triazoloakrydonów [101,162]. Jednakże w przypadku tych pochodnych aktywacja przebiega poprzez utlenianie związku a nie jego redukcję. Podobnie jak w przypadku pochodnych 9-amino-1-nitroakrydyny zaktywowane produkty wiążą się kowalencyjnie do DNA, są również zdolne do międzyłańcuchowego sieciowania kwasów nukleinowych [163].

Zupełnie inne podejście do terapii przeciwnowotworowej z wykorzystaniem zdolności pochodnych akrydyny do kowalencyjnego wiązania się do DNA zaproponowali naukowcy z Uniwersytetu Josepha Fouriera w Grenoble we Francji. Wykorzystali oni strategię degradacji DNA na skutek specyficznego cięcia nici w miejscach bezzasadowych powstających między innymi w procesach naprawy DNA. W każdej żywej komórce dochodzi bowiem do uszkodzeń DNA. Szacuje się, że liczba tych uszkodzeń mieści się w przedziale od 10⁴ do 10⁶ na dzień [164]. Dlatego w komórce konieczne są precyzyjne i efektywne systemy ich naprawy. U ssaków można wyróżnić kilka podstawowych mechanizmów naprawy uszkodzeń DNA. Jednym z nich jest wieloetapowy mechanizm naprawy uszkodzeń DNA poprzez wycinanie zasad - BER (ang. Base Excision Repair), w którym etapem pośrednim jest powstawanie miejsc bez zasad [165,166]. Schematycznie przebieg naprawy typu BER został przedstawiony na Ryc. 20. Miejsce bezzasadowe może powstawać również samorzutnie [167] jako jeden z rodzajów uszkodzeń DNA.



Rycina 20. Naprawa uszkodzonego DNA przez wycięcie nukleotydu zawierającego zmodyfikowaną zasadę azotową – BER [168]

W zespole prof. Pascala Dumy w Uniwersytecie w Grenoble zsyntetyzowano szereg związków katalizujących reakcję β -eliminacji w miejscach bezzasadowych nici DNA. Wiodącym związkiem tej grupy pochodnych jest purynowa pochodna akrydyny, Rys. 14I. Wykazano, że zawarty w związku łańcuch triaminoalkilowy odpowiedzialny jest za aktywność typu syntetycznej nukleazy. Obecny w cząsteczce fragment purynowy ułatwia wiązanie fizykochemiczne w miejscu bezzasadowym.

W założeniu połączenie zdolności do kowalencyjnej modyfikacji kwasu nukleinowego przez 1-nitroakrydyny zsyntetyzowane w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej oraz zdolności syntetycznych nukleaz do degradacji i cięcia DNA w miejscach bezzasadowych, potencjalnie mogłyby się przyczynić do uzyskania efektywniejszych związków przeciwnowotworowych. Wzrost komórki nowotworowej, w której zainicjowano uszkodzenie DNA i równocześnie zahamowano mechanizmy naprawcze byłby niemożliwy lub co najmniej znacząco utrudniony. Badania nad związkami tego typu są obecnie w toku.

Mimo intensywnych badań w zakresie mechanizmu działania pochodnych akrydyny, wciąż jesteśmy daleko od jednoznacznego stwierdzenia jakie właściwości związków z tej grupy odpowiadają za ich aktywność biologiczną. Wydaje się, że etap wiązania fizykochemicznego z DNA jest wstępnym, ale niezbędnym etapem w mechanizmie działania tych chemoterapeutyków, umożliwiającym dostarczenie wystarczającej ilości aktywnego czynnika w pobliże kwasu nukleinowego. Dlatego możliwie szczegółowe poznanie natury i rodzaju oddziaływań odpowiedzialnych za powstawanie, trwałość i strukturę kompleksów pochodnych akrydyny z DNA jest kluczowe dla racjonalnego projektowania leków przeciwnowotworowych na bazie układu akrydynowego.

III. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

W Katedrze Technologii Leków i Biochemii Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej od wielu lat prowadzone są badania, które koncentrują się na poszukiwaniu nowych leków przeciwnowotworowych o korzystnych właściwościach farmakologicznych. W kręgu zainteresowań Katedry znajdują się między innymi pochodne nitroakrydyny. Mechanizm działania nitroakrydyn nie został dotychczas dokładnie określony. Wykazano, że związki te, dzięki obecności heterocyklicznego układu akrydynowego interkalują do DNA. Istnieją poważne przesłanki, że etap tworzenia fizykochemicznych kompleksów z DNA jest niezbedny dla aktywności biologicznej badanych pochodnych, umożliwia bowiem dostatecznie bliski kontakt tych związków z DNA. Z drugiej strony wykazano, że etap ten nie jest wystarczający: najaktywniejsze biologicznie pochodne 1-nitroakrydyny wcale nie maja największego powinowactwa do DNA.

Celem niniejszej pracy jest poznanie na poziomie molekularnym mechanizmu niekowalencyjnego oddziaływania wybranych pochodnych akrydyny z DNA o różnych sekwencjach zasad. Cel ten zamierzałam osiągnąć stosując techniki spektroskopowe oraz mikrokalorymetryczne. Szczególnie wartościowe wyniki spodziewałam się uzyskać z bezpośrednich pomiarów wielkości termodynamicznych. Informacja na temat tego, jakie człony składają się na całkowitą zmianę entalpii swobodnej związanej z tworzeniem kompleksów powinna pozwoliłć na ustalenie, które fragmenty struktury badanych związków odpowiadają za ich zdolność do oddziaływania z DNA.

Realizacja tak postawionego celu pracy wymagała zbadania szeregu niewyjaśnionych dotychczas właściwości badanych związków, takich jak:

- zachowanie się wybranych pochodnych akrydyny w roztworach wodnych o różnej sile jonowej,
- występowanie ewentualnych różnic w mechanizmie niekowalencyjnego oddziaływania badanych związków z DNA w buforach o różnej sile jonowej,
- przyczyny występowanie różnic w powinowactwie wybranych pochodnych w stosunku do DNA o różnym składzie zasad.
IV. MATERIAŁY I METODY

IV.1. Materiały

W badaniach wykorzystałam 3 nitrowe pochodne akrydyny oraz bromek etydyny, jako związek referencyjny. Struktury chemiczne związków przedstawiłam w Tabeli 6. *Tabela 6. Nazwy i struktury chemiczne badanych związków.*

Związek	Nazwa systematyczna	Wzór strukturalny		
C-283 (Ledakrin)	1-nitro-9-[3'-(dimetyloamino)- propyloamino]-akrydyna	H ₃ C _N CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ NH NO ₂		
C-857	1-nitro-9-(2'-hydroksyloetyloamino)- akrydyna	OH CH ₂ CH ₂ NH NO ₂		
C-1311	8-hydroksy-5- [(dietyloaminoetylo)amino]imidazo[4,5,1- de]akrydyn-6-on	HO $HN^{-(CH_2)_2N(CH_2CH_3)_2}$		
Br.Et.	Bromek etydyny	H ₂ N H ₂ N H ₂ N H ₂ N H ₂ CH ₃		

IV.2. Odczynniki chemiczne i biochemiczne

Kwas dezoksyrybonukleinowy, DNA z grasicy cielęcej (calf thymus, ct DNA) – Sigma Chemical Company, St.Louis, MO, USA, polinukleotydy poly(dA-dT)*poly(dA-dT), poly (dG-dC)*poly (dG-dC), poly (dl-dC)·poly (dl-dC) - Sigma Chemical Company, St.Louis, MO, USA

- NaCl Chempur, Piekary Śląskie, Polska
- EDTA Sigma Chemical Company, St.Loius, MO, USA

IV.3. Roztwory wyjściowe

Roztwór DNA przygotowywano w buforze i przechowywano w temperaturze -4°C

Roztwory badanych pochodnych przygotowywano bezpośrednio przed analizą poprzez rozpuszczenie odpowiedniej ilości związku w buforze

10 mM bufor TrisHCl zawierający 0,1 mM EDTA i różne stężenie NaCl, odpowiednio:
 5, 50 i 150 mM NaCl

➢ 10 mM bufor fosforanowy zawierający 0,1 mM EDTA i różne stężenie NaCl, odpowiednio: 5, 50, 100 i 150 mM NaCl, pH=7,4

IV.4. Aparatura

Pomiary absorpcji światła zostały wykonane przy użyciu Spektrofotometru UV-Vis Perkin Elmer, λ 45. Pomiary mikrokalorymetryczne zostały wykonane przy użyciu Izotermicznego Mikrokalorymetru Miareczkującego firmy Calorimetry Science Corp., model Nano – ITC III CSC 5300. Ponadto w trakcie analizy korzystano z wagi, vortexu oraz pHmetru.

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:

$$A_{\lambda} = \mathcal{E}_{\lambda} c l \tag{11}$$

gdzie: A_{λ} – absorbancja przy danej długości fali λ wyrażonej w nanometrach \mathcal{E}_{λ} – współczynnik ekstynkcji molowej przy danej długości fali λ

c – stężenie molowe

l – długość drogi optycznej wyrażonej w centymetrach.

Kwas nukleinowy	Długość fali, λ [nm]	Współczynnik ekstynkcji molowej [*] , ε _λ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	
p(dA-dT)⋅p(dA-dT)	260	6800 [169]	
p(dG-dC)⋅p(dG-dC)	255	8400 [166]	
ctDNA	260	6600 [170]	
p(dI-dC)⋅p(dI-dC)	251	6900 [171]	

Tabela 7. Współczynniki ekstynkcji molowych badanych kwasów nukleinowych

^{*} 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

Przebieg procesu agregacji pochodnych akrydyny i bromku etydyny badano w buforach fosforanowych o różnej sile jonowej, odpowiednio: 5 i 150 mM NaCl. Widma absorpcyjne testowanych związków wykonałam przy użyciu spektrofotometru UV-VIS, Lambda 45, Perkin Elmer w zakresie długości fali 600 – 350 nm. 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

Zarejestrowane widma pochodnych akrydyny były, zgodnie z prawem Lamberta-Beera, przeliczane na wartości molowych współczynników ekstynkcji. Utworzona w ten sposób macierz **Z**, złożona z n wierszy (długości fal) i m kolumn (ilość widm – widma uzyskane dla kolejnych stężeń związku) była poddawana analizie przy użyciu technik chemometrycznych. Zastosowałam metodę głównych składowych [172].

Celem metody głównych składowych, w skrócie PCA (ang. *Principal Spektrum Analysis*), jest redukcja wymiarowości danych wyjściowych. Cel ten można osiągnąć zakładając występowanie korelacji pomiędzy każdą parą analizowanych widm. Wartość każdego z widm poddano standaryzacji (autoskalowaniu) zgodnie z poniższym wzorem:

$$w_{ij} = \frac{s_{ij} - \mu_j}{\sigma_j} \tag{12}$$

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 Z. Macierz korelacji C konstruowano w oparciu o zależność:

$$C = \frac{1}{n-1} Z^T Z \tag{13}$$

W wyniku rozkładu macierzy **C** metodą głównych składowych uzyskano n wzajemnie ortogonalnych wektorów własnych. Z każdym wektorem własnym związana jest jednoznacznie liczba zwana wartością własną. Minimalna liczba pierwszych wektorów własnych (tych o największych wartościach własnych) niezbędna do odtworzenia zmienności systematycznej zawartej w danych wyznacza ilość niezależnych tworów spektralnych – k. Ze względu na występowanie błędu pomiaru pierwsze k wektorów własnych nie zawiera 100 % zmienności występującej w zarejestrowanym zbiorze widm. Po zastosowaniu rotacji VARIMAX oraz renormalizacji wektory własne mogą być traktowane jako pierwsze przybliżenie widm składników.

Macierz widm Z, jeśli spełnia prawo Lamberta-Beera, można zaprezentować w postaci iloczynu dwóch innych macierzy: macierzy składników **B**, w której kolumny przedstawiają widma czystych niezależnych składników oraz macierzy **X**, której kolumny zawierają ułamki molowe poszczególnych składników.

W=BX (14)

Uzyskane tą metodą ułamki molowe poszczególnych składników wykorzystałam do oceny stopnia agregacji związku. Wykorzystałam wzór na stałą agregacji K_D, wartość stałej zoptymalizowano metodę simpleksów [173,174,175].

$$K_{D} = \frac{1 - x_{m}}{2C_{t} x_{m}^{2}}$$
(15)

gdzie: Ct - stężenie całkowite związku,

x_m - ułamka molowego monomeru.

IV.5.4.Miareczkowanie spektrofotometryczne

Przebieg procesu tworzenia kompleksów badanych związków z DNA badano z zastosowaniem metody miareczkowania spektrofotometrycznego. Reakcję prowadziłam w kuwetach o drodze optycznej 2 cm w temperaturze 25°C. Do roztworu związku o odpowiednio dobranym stężeniu dodawano niewielkie ilości roztworu ctDNA otrzymując wcześniej założone wartości R, czyli wartości stosunków stężenia DNA (wyrażonego w parach zasad) do stężenia badanego związku. Widma rejestrowano w przedziale 385-540 nm

w postaci cyfrowej. Reakcje prowadzono w roztworach zawierających różne stężenia soli, odpowiednio 5 mM NaCl, 50 mM NaCl i 150 mM NaCl.

IV.5.5. Analiza zestawów widm miareczkowania pochodnych akrydyny roztworem ctDNA

Podobnie jak w przypadku badania stopnia agregacji pochodnych akrydyny, zarejestrowane widma były przeliczane na wartości molowych współczynników ekstynkcji i poddawana analizie przy użyciu technik chemometrycznych. Zastosowano metodę głównych składowych [167] oraz numeryczną dekompozycję widm [176].

Zastosowana analiza głównych składowych umożliwiła oszacowanie ilości niezależnych tworów spektralnych oraz pierwszego przybliżenia ich widm. Niemniej jednak wektory własne uzyskano przy założeniu ich idealnej ortogonalności, co w przypadku widm tworów spektralnych nie jest prawdziwe. Dlatego, w celu rozwiązania równania (13) wymagane jest zastosowanie techniki określanej mianem iteracyjnej procedury samouzgadniania, w skrócie NSD (ang. *Numerical Spektrum Decomposition*):

- Do uzyskania pierwszego przybliżenia kolumn macierzy B wykorzystano liniową kombinację obróconych i zrenormalizowanych wektorów własnych. Wektory te ręcznie modyfikowano tak, aby spełniały dwa następujące założenia: i) molowe współczynniki ekstynkcji nie mogą przejmować wartości mniejszych od zera, ii) ilość, pozycja oraz intensywność pasm absorpcyjnych w widmach składników powinna być zbliżona do tych samych wartości obserwowanych w zarejestrowanych widmach
- Przybliżenie macierzy B zastosowano do wyznaczenia macierzy ułamków molowych X według wzoru:

-

$$X = \left[B^T B\right]^{-1} B^T W \tag{16}$$

- Macierz X korygowano według dwóch reguł: i) ułamki molowe nie powinny być ujemne,
 ii) suma ułamków molowych poszczególnych tworów spektralnych w każdej próbce powinna wynosić 1. Wartości ujemne w macierzy X sprowadzano do 0, a kolumny macierzy przeskalowano formując macierz Y
- Macierz Y wykorzystano do wyznaczenia kolejnego przybliżenia macierzy składników B według wzoru:

$$B = WY^{T} [YY^{T}]^{-1}$$
(17)

5. Macierz Y z kroku (3) i macierz B z kroku (4) zastosowano następnie do obliczenia macierzy składników V:

$$V = BY \tag{18}$$

41

 Powtarzając etapy od (2) do (4) po kilku cyklach iteracyjnych uzyskiwano zadowalające samouzgadniania wyników.

Uzyskane w ten sposób uzgodnione ułamki molowe wykorzystałam do wyznaczenia stałej wiązania z zastosowaniem modelu McGhee-von Hippel [33].

IV.5.6. Pomiary mikrokalorymetryczne procesu dimeryzacji

Pomiary mikrokalorymetryczne prowadzone były z wykorzystaniem 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 bufor (ok.1,3 ml). Wszystkie próbki przed pomiarem były odgazowywane pod próżnią. Za pomocą strzykawki hamiltonowskiej sterowanej programem komputerowym do komory pomiarowej wprowadzane były małe (10 µl) objętości związku w założonych odstępach czasu (300 s). Po każdej dodanej porcji związku następował pomiar mocy wymaganej do utrzymania stałej temperatury między komorami. Moc ta była następnie przeliczana na ciepło reakcji. Dane miareczkowania kalorymetrycznego przedstawione są na termogramie zależności mocy od czasu, t = f(dH/dt). Wykres przedstawia serię pików, które odpowiadają kolejnym seriom miareczkowania. Dane zbierane były za pomocą odpowiedniego oprogramowania, który umożliwia obliczanie (metodą całkową) pola piku i zapisywanie wyników na dysku komputera. Powierzchnia piku jest proporcjonalna do efektu cieplnego przemiany. Ciepło reakcji dimeryzacji zostało oszacowane na podstawie cyklu następujących doświadczeń [177]:

- 1. miareczkowanie buforu ligandem,
- miareczkowanie buforu buforem (poprawka wynikająca z różnicy temperatur pomiędzy titrantem i próbki w komorze).

Po odjęciu drugiego efektu cieplnego od pierwszego uzyskuje się ciepło reakcji.

IV.5.7. Analiza danych mikrokalorymetrycznych procesu dimeryzacji

Do uzyskanych metodą ITC danych eksperymentalnych procesu dimeryzacji dopasowałam matematyczny model dimeryzacji, pomijając pierwszy pomiar, który obarczony jest błędem wynikającym z możliwości dyfuzji związku ze strzykawki do roztworu. Model matematyczny opracowano zakładając, że najprostszym modelem agregacji jest zjawisko dimeryzacji, gdzie:

$$2M \leftrightarrow D$$
 (19)

Stan równowagi tego procesu opisuje stała dimeryzacji, K_D wyrażona wzorem :

$$K_D = D/M^2 \rightarrow D = K_D * M^2$$
 (20)

Następnie przekształcając równanie bilansu cząsteczkowego, oraz podstawiając w miejsce stężenia dimeru równanie (20) otrzymujemy równanie kwadratowe postaci:

$$2KM^2 + M - c = 0 (21)$$

Rozwiązując powyższe równianie otrzymujemy wzór opisujący stężenie monomeru, który po przekształceniach daje zależność opisującą stężenie dimeru:

$$2D = \frac{4K_D c + 1 - \sqrt{1 + 8K_D c}}{4K_D}$$
(22)

Liczbę moli związku ulegającej rozpadowi w każdym kolejnym nastrzyku (n_i) można opisać następująco:

$$n_i = n_{it} - (n_{Di} - n_{Di-1}) \tag{23}$$

$$\mathbf{n}_{\mathrm{it}} = \mathbf{v}_{\mathrm{i}} 2 \mathbf{D}_{\mathrm{0}},\tag{24}$$

$$n_{\rm Di} = V2D_{\rm i},\tag{25}$$

$$n_{Di-1} = V2D_{i-1},$$
 (26)

gdzie: n_{it} – liczba moli dimeru dodawana w każdym nastrzyku,

n_D-liczba moli dimeru znajdująca się w celce podczas i-tego nastrzyku,

n_{Di-1} – liczba moli dimeru znajdująca się w celce podczas poprzedniego nastrzyku,

v_i – objętość nastrzykiwanego dimeru,

V – objętość celki, D0 – stężenie dimeru dodawanego w każdym nastrzyku,

D_i - stężenie dimeru w celce podczas i-tego nastrzyku,

D_{i-1} - stężenie dimeru w celce podczas poprzedniego nastrzyku.

Podstawiając równanie (23) do (24) oraz stosując odpowiednie przekształcenia otrzymujemy równanie:

$$n_i = \frac{v_i}{4K_D} - v_i \sqrt{\frac{c_0}{2K_D}} + \sqrt{\frac{Vv_i}{2\sqrt{i}}} \cdot \sqrt{\frac{c_0}{2K_D}}$$
(27)

Ciepło molowe reakcji można obliczyć ze wzoru:

 $\mathbf{q}_{i} = \mathbf{n}_{i} \Delta \mathbf{H} \tag{28}$

gdzie: ΔH - zmiana entalpii

Ciepło molowe kolejnego nastrzyku przedstawia zależność:

$$\Delta H_i = q_i / \Delta n_i \tag{29}$$

gdzie: Δn_i – przyrost moli związku podczas kolejnego nastrzyku.

Wstawiając do równania (28) kolejno równanie (27) oraz (29) otrzymujemy końcową zależność ciepła molego na każdy nastrzyk. Tworząc wykres liniowej zależności molowej entalpii na nastrzyk w funkcji kolejnych nastrzyków, z równiania (28) można wyznaczyć stałą dimeryzacji K_D oraz przyrost entalpii ΔH towarzyszący temu procesowi:

$$K_{D} = \frac{2v_{i}a^{2}Vb^{2}}{(4v_{i}a^{2} - Vb^{2})c_{0}}$$
(30)

$$\Delta H = \frac{4v_i a^2 b}{4v_i a^2 - V b^2} \tag{31}$$

gdzie: a,b – współczynniki liniowe prostej zależności molowej entalpii na nastrzyk w funkcji kolejnych nastrzyków.

IV.5.8. Pomiary mikrokalorymetryczne oddziaływania związku z DNA

Pomiary mikrokalorymetryczne wykonane zostały przy pomocy mikrokalorymetru N-ITC III, firmy CSC. W komorze porównawczej znajdowała się woda, w pomiarowej bufor bądź roztwór DNA w tym buforze (ok. 1.3 ml). Do komory pomiarowej wprowadzane były, za pomocą strzykawki hamiltonowskiej sterowanej programem komputerowym, małe (10 µl) objętości drugiego odczynnika w założonych odstępach czasu (300 s). Wszystkie próbki przed pomiarem były odgazowywane pod próżnią.

Ciepło reakcji oddziaływania liganda z DNA oszacowano na podstawie cyklu następujących doświadczeń [174]:

- 1. miareczkowanie buforu ligandem (poprawka na efekt rozcieńczenia),
- 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 ligandem.

Po odjęciu sumy efektów cieplnych z trzech pierwszych doświadczeń od efektu cieplnego czwartego doświadczenia uzyskuje się ciepło reakcji.

IV.5.9. Analiza danych mikrokalorymetrycznych oddziaływania ligadów z kwasami nukleinowymi

Do uzyskanych metodą ITC danych eksperymentalnych oddziaływania ligandów z DNA dopasowano model oddziaływań, pomijając pierwszy pomiar, który obarczony jest błędem wynikającym z możliwości dyfuzji związku ze strzykawki do roztworu. Wybrano model oddziaływań zaproponowany przez N. Buurma i J. Haq [178]. Uzyskane ciepło oddziaływania związku z DNA (skorygowane o ciepło rozcieńczania związku i kwasu) wprowadzono do programu IC-ITC, który umożliwia uzyskanie podstawowych parametrów termodynamicznych (ΔH, K oraz n).

Wyznaczone parametry termodynamiczne wykorzystano do obliczenia zmiany entalpii swobodnej (Δ G) i entropii procesów (Δ S), zgodnie z równaniem (3). Reakcje prowadzono w dwóch temperaturach, po pozwoliło na wyznaczenia pojemności cieplnej (Δ C_p), zgodnie z równaniem (4).

V. WYNIKI BADAŃ

V.1. BADANIA SPEKTROSKOPOWE

V.1.1. Właściwości spektroskopowe wybranych pochodnych akrydyny w roztworach wodnych

Mając na względzie dane literaturowe, które wskazują, że niektóre pochodne akrydyny agregują w roztworach wodnych [76,179,180] przed przystąpieniem do spektroskopowych badań oddziaływań fizykochemicznych tych związków z DNA, należało ustalić, czy proces ten zachodzi również w przypadku wybranych do badań pochodnych.

Badanie przebiegu procesu agregacji badanych związków przeprowadziłam w oparciu o spektroskopię absorpcyjną UV-VIS. Widma związków w buforze fosforanowym rejestrowano w zakresie długości fal charakterystycznych dla chromoforu akrydynowego (300÷600 nm dla Ledkainu i 350-600 nm dla pochodnych C-857 i C-1311). Pomiary były wykonywane w kuwetach kwarcowych o długości drogi optycznej 2; 1; 0,5 i 0,1 cm, dobranej odpowiednio w zależności od badanych stężeń związku w temperaturze pokojowej, przy użyciu spektrofotometru UV-VIS Lambda 45, Perkin-Elmer. Metodyka pomiarów została szczegółowo opisana w punkcie IV.5.2.

Zestawy widma badanych pochodnych przedstawiłam na Ryc.21. Wszystkie związki wykazują silne pasma absorpcji w widzialnym zakresie widma. Dla Ledakrinu najbardziej długofalowe pasmo znajduje się w zakresie 390÷450 nm, a dla związków C-1311 i C-857 jest ono lekko przesunięte w kierunku fal dłuższych i przypada na obszar 420÷460 nm.





Rycina 21. Zestawy widma absorpcyjnych pochodnych akrydyny w buforze fosforanowym, 5 mM NaCl, pH=7, temperatura pokojowa. Stężenia badanych związków w zakresie 20÷1000 µM

W badanym zakresie stężeń kształt widm Ledakrinu oraz pochodnej C-857 wydaje się nie ulegać zmianie wraz ze wzrostem stężenia, Ryc. 21. Niewielkie różnice w intensywności widm mogą być wynikiem niedokładności przy sporządzaniu roztworów. W celu sprawdzenia, czy zachodzi zmiana kształtu widm przeprowadziłam ich standaryzację (p.IV.5.3, równanie (12)). Zestawy widm standaryzowanych, przedstawione na Ryc. 22, wskazują na brak zmian kształtu widma ze wzrostem stężenia związku. Można zatem założyć, że w badanym zakresie stężeń nie dochodzi do agregacji Ledakrinu i pochodnej C-857.



Rycina 22. Zestawy widm Ledakrinu oraz pochodnej C-857 z Ryc. 21 po standaryzacji

Odmienny charakter ma zestaw widm uzyskany dla imidazoakrydonu C-1311. Wraz ze wzrostem stężenia związku dochodzi tu do przesunięcia najbardziej długofalowego pasma absorpcji w kierunku fal dłuższych. Analogiczne pomiary przeprowadziłam dla tej pochodnej w buforze o dużej sile jonowej (150 mM NaCl), w celu sprawdzenie wpływu składu roztworu na proces dimeryzacji. Porównanie obu zestawów widm przedstawiłam na Ryc. 23. W obydwu buforach widoczny jest wyraźnie efekt batochromowy (przesunięcie maksimum widma w kierunku fal dłuższych). W obydwu przypadkach wyraźne są również punkty izosbestyczne przy długości fali 395 nm i 423 nm. Podobne właściwości spektralne wykazują wcześniej opisane związki, używane w terapii przeciwnowotworowej, takie jak daunomycyna [181], doksorubicyna [182] i mitoksantron [147].

Zastosowanie analizy chemometrycznej, zgodnie z procedurą opisaną w p.IV.5.3 pozwoliło na wyznaczenie ułamków molowych poszczególnych form spektralnych oraz oszacowanie stałej dimeryzacji według równania (15). Zastosowanie procedury samouzgodniania widm, NSD (p.IV.5.5) pozwoliło mi również na uzyskanie widm monomeru i dimeru, których charakterystyki spektralne przedstawiłam w Tabeli 8. Wyznaczone stałe dimeryzacji wynoszą odpowiednio: dla 5 Mm NaCl 4,08(±0,09)*10⁴ M⁻¹, dla 150 mM NaCl 3,38(±0,15)*10⁴ M⁻¹. Wzrost siły jonowej buforu jedynie nieznacznie obniża stałą dimeryzacji pochodnej C-1311. Wartości stałych dimeryzacji nie odbiegają znacznie od wartości uzyskanych dla innych związków. Dla przykładu dla daunomycyny, doksorubicyny i mitoksantronu wynoszą one odpowiednio 1,5·10³ M⁻¹, 1,3·10⁴ M⁻¹ i 3,0(±0,4)·10⁴ M⁻¹ w zbliżonych warunkach pomiarowych [181,182].



Rycina 23. Zestawy widma absorpcyjnych pochodnych C-1311 w buforze Tris-HC, 5 mM NaCl i 150 mM NaCl, pH=7

Tabela 8. Właściwości spektralne pochodnej C-1311w buforze fosforanowym o 5 mM stężeniu NaCl

C-1311	$\lambda_{max}[nm]$	$\epsilon_{max}[M^{-1}cm^{-1}]$	
Monomer	420	5161	
Dimer	432	5170	

V.1.2. Fizykochemiczne oddziaływanie wybranych pochodnych akrydyny z DNA

Ze względu na polianionową strukturę DNA, w analizie procesu tworzenia kompleksu ligand/DNA należy brać pod uwagę udział w tym procesie oddziaływań elektrostatycznych. Jeśli ligand posiada ładunek dodatni, to będzie przyciągany w pobliże ujemnie naładowanych grup fosforanowych łańcucha kwasu dezoksyrybonukleinowego wchodząc w skład elektrycznej warstwy podwójnej otaczającej makrocząsteczkę. Udział kationowego ligandu w tworzeniu tej warstwy zależy silnie od stężenia innych kationów w roztworze (jego siły jonowej).

Niektóre z badanych przeze mnie związków, Ledakrin oraz pochodna C-1311, mogą występować w fizjologicznym pH w formie sprotonowanej. Mogłam się zatem spodziewać, że między helisą a tymi związkami dochodzi do oddziaływań elektrostatycznych. Do badań wybrałam również pochodna C-857, która w tych warunkach jest cząsteczką obojętną. Spodziewałam się, że taki dobór związków oraz zastosowanie buforów o różnej sile jonowej pozwoli mi na ocenę udziału oddziaływań elektrostatycznych w niekowalencyjnym wiązaniu się wybranych pochodnych z ctDNA. Badania wykonałam z zastosowaniem miareczkowania spektrofotometrycznego, natomiast analizę uzyskanych wyników przeprowadziłam przy użyciu technik chemometrycznych.

V.1.2.1. Oddziaływania Ledakrinu z ctDNA

Na Ryc. 24 przedstawiłam zestaw widm uzyskany podczas miareczkowania 40 µM roztworu Ledakrinu roztworem ctDNA w buforze zawierającym 5 mM stężenie NaCl. W miarę dodawania kolejnych porcji DNA zaobserwowałam charakterystyczne zmiany widm. Początkowo osłabieniu ulega pasmo absorpcji z maksimum przy 400 nm bez wyraźnych zmian w zakresie 430÷500 nm. Dopiero, gdy wartość R, czyli stosunek stężenia DNA do stężenia związku, przekracza 2, występuje wyraźny wzrost absorpcji w obszarze długofalowym.

Na zestawie widm zdaje się występować punkt izosbestyczny przy ok. 420 nm. Nie jest on jednak dostatecznie wyraźny, aby na jego podstawie wnioskować o obecności tylko dwóch form spektralnych w badanych roztworach. Dlatego przeprowadziłam chemometryczną analizę uzyskanego zestawu widm.



Rycina 24. Zestaw widm dla Ledakrinu w roztworze zawierającym 5 mM NaCl

W celu oceny zmian intensywności widm wykonałam wykres zależności odchylenia standardowego widm w zakresie 385-540 nm, traktowanego jako uogólniony wskaźnik intensywności widma, od logarytmu R, Ryc. 25. Na wykresie przerywaną linią zaznaczyłam również odchylenie standardowe widma wolnego Ledakrinu. Kształt uzyskanego wykresu wykazuje, że:

- wyraźna zmiana intensywności widma wskazująca na tworzenie się w roztworze nowej formy spektralnej występuje już dla wartości R=1,
- nawet dla R>10 intensywność widm ulega zmianie wraz ze zmianą R, co świadczy o tym, że ligand nie został jeszcze całkowicie skompleksowany.

Ten ostatni wniosek sugeruje, że nawet dla R=20 znacząca ilość liganda występuje w formie wolnej. Kształt uzyskanej zależności nie pozwala jednoznacznie ustalić liczby form spektralnych występujących w roztworze Ladakrinu podczas miareczkowania.



Rycina 25. Zależność odchylenia standardowego widm od logarytmu ze stosunku stężeń DNA do Ledakrinu w buforze o niskiej sile jonowej. Linią przerywaną oznaczono odchylenie uzyskane dla niezwiązanego liganda

W celu zidentyfikowania liczby tworów spektralnych obecnych w roztworze zastosowałam metodę PCA, opisaną w p.IV.5.4. Klasyczna analiza wartości własnych, przedstawiona w Tabeli 9 oraz na Ryc.26, silnie sugeruje, iż w roztworze obecne są dwie formy spektralne: wolny ligand i kompleks z DNA. Analiza widm resztowych potwierdziła, że w wyniku oddziaływania Ledakrinu z ctDNA w roztworze o niskiej sile jonowej powstaje tylko jeden typ kompleksów, Ryc. 27.

Tabela 9. Charakterystyka głównych składowych zestawu widm Ledakrinu miareczkowanego ctDNA w buforze o niskiej sile jonowej

	Główne składowe				
	1	2	3	4	5
wartości własne	7,3565	0,6426	0,0008	0,0001	0,0000
% zmienności	91,96	8,03	0,01	0,00	0,00
sum.% zmienności	91,96	99,99	100,00	100,00	100,00



Rycina 26. Wykres osypiska dla danych z Tabeli 9





Rycina 27. Zestaw widm standaryzowanych oraz kolejne widma resztowe uzyskane w oparciu o metodę PCA dla oddziaływań Ledakrinu z ctDNA w roztworze zawierającyn 5 mM NaCl

Zastosowanie do uzyskanego zestawu widm iteracyjnej procedury samouzgodnienia, NSD, p.IV.5.5, pozwoliło wyznaczyć widma form spektralnych oraz oszacować wartości ułamków molowych tych form w badanych roztworach.

Widma uzyskanych form spektralnych przedstawiłam na Ryc. 28. Odtworzone widmo wolnej formy liganda, L, pokrywa się z widmem Ledakrinu w roztworze bez dodatku DNA. Widmo kompleksu, oznaczone symbolem X, posiada maksimum absorpcji przy 450 nm. Obserwowane przesuniecie batochromowe jest charakterystyczne dla procesu interkalacji.



Rycina 28. Widma form spektralnych uzyskane metodą NSD dla oddziaływań Ledakrinu z ctDNA w roztworze zawierającym 5 mM NaCl

Wykres zależności wartości ułamków molowych od stosunku stężeń DNA do stężenia związku przedstawiłam na Ryc. 29. Początkowo zawartość monomeru pozostaje stała, dopiero gdy wartość R przekracza 1 następuje wyraźnych spadek zawartości ligandu w roztworze. Powyżej tego stosunku obserwuje się również szybki przyrost udziału kompleksu X. Nawet dla R = 20 obserwuje się obecność w roztworze jeszcze ok. 20% wolnego ligandu.



Rycina 29. Zależność ułamka molowego od logarytmu ze stosunku stężenia ctDNA do stężenia Ledakrinu dla poszczególnych form spektralnych w roztworze o 5 mM stężeniu NaCl

Numeryczne dopasowanie uzyskanych danych do modelu McGhee-von Hippel, przedstawione na Ryc.30, pozwoliło mi na wyznaczenie stałej wiązania związku do ctDNA oraz oszacowanie jego stechiometrii.



Rycina 30. Dopasowanie modelu McGhee-von Hippel (linia ciagła) do danych doświadczalnych (punkty) dla oddziaływań Ledakrinu z ctDNA w roztworze o 5 mM stężeniu NaCl

Analogiczna analiza miareczkowania Ledakrinu roztworem DNA w buforze zawierającym 50mM NaCl pozwoliła mi stwierdzić nieco odmienny charakter zmian widm, Ryc. 31. W miarę dodawania kolejnych porcji ctDNA widma ulegają przesunięciu w kierunku fal dłuższych. W tym przypadku nie obserwowałam jednak widma o długofalowym maksimum absorpcji (przy λ =450nm). Dla R=20 w widmie roztworu obserwuje się maksimum przy ok. 440 nm oraz pozostałości pasma charakterystycznego dla wolnego ligandu, co sugeruje, iż 20-krotny nadmiar DNA nie jest wystarczający do całkowitego przereagowania związku.



Rycina 31. Zestaw widm dla Ledakrinu w roztworze zawierającym 50mM NaCl

W przeciwieństwie do układu analizowanego powyżej, na zestawie widm przedstawionym na Ryc. 31 można zaobserwować występowanie wyraźnego punktu izozbestycznego przy długości fali 437 nm, co sugeruje, że w roztworze współistnieją w stosunku równowagowym dwie formy spektralne: wolny ligand oraz kompleks. Fakt ten został potwierdzony analizą wartości własnych i widm resztowych (dane niezałączone).

Zastosowanie iteracyjnej procedury samouzgodnienia pozwoliło mi wyznaczyć widma form spektralnych oraz oszacować ich ułamki molowe. Widma obu form spektralnych uzyskane w oparciu o metodę NSD dla oddziaływań Ledakrinu z ctDNA w roztworze zawierającym 50mM NaCl przedstawiłam na Ryc. 32. Obserwowane przesunięcie się pasma absorpcji kompleksu X w kierunku fal dłuższych, czyli efekt batochromowy jest charakterystyczny dla procesu interkalacji. Kształt uzyskanego widma kompleksu oraz położenie punktu izosbestycznego jest w przypadku buforu o 50 mM stężeniu NaCl odmienne niż dla buforu niskosolnego. Sugeruje to, że wzrost stężenia soli powodować może zmianę struktury kompleksu.



Rycina 32. Widma form spektralnych uzyskane metodą NSD dla oddziaływań Ledkarinu z ctDNA w roztworze zawierającym 50mM NaCl

Dla 50 mM stężenia NaCl obserwuje się około 90 % przereagowanie ligania przy R=20, Ryc. 33.



Rycina 33. Zależność ułamka molowego od logarytmu ze stosunku stężenia ctDNA do stężenia Ledakrinu dla poszczególnych form spektralnych w roztworze zawierającym 50 mM NaCl

Numeryczne dopasowanie modelu pozwoliło mi wyznaczyć parametry oddziaływania Ledakrinu z ctDNA w roztworze zawierającym 50mM NaCl (Ryc.34). Wzrost siły jonowej skutkuje około 10-krotnym obniżeniem stałej wiązania i zmianą stechiometrii kompleksu.



Rycina 34. Dopasowanie modeluMcGhee-von Hippel (linia ciągła) do danych doświadczalnych (punkty) dla oddziaływań Ledakrinu z ctDNA w roztworze zawierającym 50 mM NaCl

Na Ryc. 35 zaprezentowałam wynik miareczkowania Ledakrinu ctDNA w roztworze o dużej sile jonowej (150mM NaCl). Widma absorpcji związku w obecności wzrastającej ilości DNA zmieniają się stopniowo, wykazując jednak tylko spadek intensywności. Porównując widmo czystego związku i widmo zarejestrowane przy 20-krotnym nadmiarze molowym DNA odnotowuje się 17% spadek maksimum absorpcji.



Rycina 35. Zestaw widm dla Ledakrinu w roztworze zawierającym 150mM NaCl

Aby stwierdzić, czy podczas miareczkowania zachodzi również zmiana kształtu widm przeprowadziłam ich standaryzację (p.IV.5.2, równanie 12). Zestaw widm standaryzowanych, przedstawionych na Ryc. 36, wskazuje na niewielką zmianę kształtu widma, które ulega przesunięcie w kierunku fal dłuższych. Przesunięcie to jest wyraźne dopiero dla stosunku stężeń R=20.



Rycina 36. Zestaw widm standaryzowanych dla oddziaływania Ledakrinu z ctDNA w roztworze zawierającym 150mM NaCl

W celu oceny stopnia przereagowania wykonałam wykres zależności odchylenia standardowego od stosunku stężenia DNA do stężenia związku, Ryc. 37. Na wykresie linią

przerywaną zaznaczyłam odchylenie standardowe uzyskane dla widma związku przed dodaniem DNA. Niewielki spadek odchylenia standardowego, jako uogólnionej miary intensywności widm, jest obserwowalny dla R > 2. Brak sigmoidalnego przebiegu wykresu pokazuje wyraźnie, że proces oddziaływania Ledakrinu z DNA nawet dla R = 20 daleki jest od zakończenie. W tych warunkach zastosowanie procedury NSD nie rokuje uzyskania wiarygodnych wyników.



Rycina 37. Zależność odchylenia standardowego widm od logarytmu R dla Ledakrinu miareczkowanego ctDNA w buforze o dużej sile jonowej. Linią przerywaną oznaczono odchylenie uzyskane dla niezwiązanego liganda

Podsumowując stężenie soli w roztworze ma bardzo istotny wpływ na oddziaływania Ledakrinu z ctDNA. Wzrost siły jonowej hamuje badany proces.

V.1.2.2. Oddziaływania pochodnej C-857 z ctDNA

Na Ryc.38 przedstawiłam zestaw widm uzyskany dla miareczkowania pochodnej C-857 roztworem ctDNA. Widma absorpcji związku w obecności wzrastającej ilości DNA zmieniają się stopniowo, wykazując spadek intensywności i nieznaczne batochromowe przesunięcie położenia maksimum absorpcji. Porównując widmo czystego związku i widmo zarejestrowane przy 20-krotnym nadmiarze molowym DNA odnotowuje się aż 50% spadek maksimum absorpcji.



Rycina 38. Zestawy widm dla C-857 w roztworze zawierającym 5 mM NaCl

Analogicznie jak dla Ledakrinu wykonałam wykres widm standaryzowanych w celu oceny zmiany kształtu widm w miarę dodawania kolejnych porcji DNA. Wynik uzyskanej standaryzacji zaprezentowałam na Ryc. 39. Niewielkie przesunięcie widma w kierunku fal dłuższych zaobserwowałam dla R > 5.



Rycina 39. Zestaw widm standaryzowanych dla oddziaływań C-857 z ctDNA w roztworze zawierającym 5 mM NaCl

Wykonałam również wykres zależności odchylenia standardowego od stosunku stężenia DNA do stężenia związku, Ryc. 40. Podobnie jak dla Ledakrinu, linią przerywaną zaznaczyłam odchylenie standardowe uzyskane dla niezwiązanego ligandu. Widoczny spadek intensywności zaobserwowałam dla R \geq 5. Przebieg zależności wskazuje ponadto, że nawet dla R=20 znaczna część liganda występuje w formie niezwiązanej z DNA



Rycina 40. Zależność odchylenia standardowego widm od logarytmu ze stosunku stężeń DNA do C-857 w roztworze zawierającym 5 Mm NaCl. Linią przerywaną oznaczono odchylenie uzyskane dla niezwiązanego ligania.

Przy tak niewielkich zmianach w kształcie widm ani analiza głównych składowych ani dekompozycja numeryczna nie rokują uzyskania wiarygodnych wyników.

Podczas miareczkowania spektrofotometrycznego pochodnej C-857 w roztworze o dużej sile jonowej (150mM) nie obserwowałam znaczących zmian widma, Ryc.41.



Rycina 41. Zestawy widm dla C-857 w roztworze zawierającym 150 mM NaCl

Analiza widm standaryzowanych, Ryc. 42, potwierdziła, iż widma mają zasadniczo jednakowy kształt. Brak zmian w odchyleniach standardowych widm w trakcie dodawania kolejnych porcji DNA, Ryc. 43, wskazuje z kolei na zbliżoną intensywność widm. Zatem z wykorzystaniem techniki miareczkowania spektrofotometrycznego nie można wyciągnąć żadnych wniosków dotyczących ewentualnego wiązania się i oddziaływania C-857 z DNA w roztworze o wysokiej sile jonowej.



Rycina 42. Zestaw widm standaryzowanych dla oddziaływań C-857 z ctDNA w roztworze zawierającym 150 mM NaCl



Rycina 43. Zależność odchylenia widm od logarytmu ze stosunku stężeń DNA do C-857 w roztworze zawierającym 150mM NaCl. Linią przerywaną oznaczono odchylenie uzyskane dla niezwiązanego liganda.

Podsumowując zatem miareczkowanie spektrofotometryczne nie jest odpowiednią metodą badania oddziaływania pochodnej C-857 z ctDNA w roztworze o dużej sile jonowej. Jeżeli w tych warunkach badana pochodna tworzy niekowalencyjne kompleksy z DNA, to fakt ten nie znajduje odbicia w jej widmie absorpcyjnych w obszarze widzialnym. Tym samym raczej nie są to kompleksy interkalacyjne.

V.1.2.3. Oddziaływania pochodnej C-1311 z ctDNA

Na Ryc.44 przedstawiłam zestaw widm uzyskany dla miareczkowania pochodnej C-1311 roztworem ctDNA. Wyjściowe stężenia pochodnej było równe 40 μM, maksimum absorpcji dla tego widma położone było przy 420 nm (p.V.1.1. Tabela 8), co świadczy o tym, że w roztworze występuje głównie forma monomeryczna związku.

Widma absorpcji związku w obecności wzrastającej ilości DNA zmieniają się stopniowo, wykazując spadek intensywności i batochromowe przesunięcie maksimum absorpcji. Porównując widmo czystego związku i widmo zarejestrowane przy 10-krotnym nadmiarze molowym DNA odnotowuje się około 18% spadek maksimum absorpcji.



Rycina 44. Zestawy widm dla C-1311 w roztworze zawierającym 5 mM NaCl

Analogicznie jak dla wyżej badanych pochodnych wykonałam wykres widm standaryzowanych w celu oceny zmiany kształtu widma w miarę dodawania kolejnych porcji DNA. Wynik uzyskanej standaryzacji zaprezentowałam na Ryc. 45. Niewielkie przesunięcie widma w kierunku fal dłuższych zaobserwowałam dla R > 1.



Rycina 45. Zestaw widm standaryzowanych dla oddziaływań C-1311 z ctDNA w roztworze zawierającym 5 mM NaCl



Rycina 46. Zależność odchylenia standardowego widm od logarytmu ze stosunku stężeń DNA do C-1311 w roztworze zawierającym 5 mM NaCl. Linią przerywaną oznaczono odchylenie uzyskane dla niezwiązanego liganda.

Wykonałam wykres zależności odchylenia standardowego od stosunku stężenia DNA do stężenia związku, Ryc. 46. Widoczny spadek odchylenia zaobserwowałam dla R >0,5. W odróżnieniu od zależności przedstawionych na Ryc.25, Ryc.37 i Ryc.40 w tym przypadku intensywność widm dla dużych wartości R ustala się. Oznacza to, że dla R>4 praktycznie cały ligand związany jest z DNA.

W celu określenia liczby tworów spektralnych obecnych w roztworze zastosowałam metodę PCA, p.IV.5.4. Na podstawie klasycznej analizy wartości własnych oraz widm resztowych (dane niezałączone) stwierdziłam, iż w roztworze obecne są dwie formy spektralne: wolny ligand i kompleks z DNA.



Rycina 47. Widma form spektralnych uzyskane metodA NSD dla oddziaływań C-1311 z ctDNA w roztworze zawierającym 5 mM NaCl

Do uzyskanego zestawu widm zastosowałam iteracyjną procedurę samouzgodnienia, p.IV.5.5, co pozwoliło wyznaczyć widma form spektralnych oraz oszacować wartości ułamków molowych tych form w badanych roztworach. Należy jednak zwróci uwagę, że w przypadku oddziaływania pochodnej C-1311 z DNA zmiany widm dotyczą głównie intensywności, zmiany kształtu są niewielkie. Zatem zastosowana tutaj procedura samouzgodnienia może dawać przybliżone wyniki, zwłaszcza ułamków molowych.

Widma uzyskanych form spektralnych przedstawiłam na Ryc. 47. Odtworzone widmo wolnej formy liganda, L, pokrywa się z widmem pochodnej C-1311 w roztworze bez dodatku DNA. Widmo kompleksu, oznaczone symbolem X, posiada maksimum absorpcji przy 430 nm. Obserwowane niewielkie przesuniecie batochromowe jest charakterystyczne dla procesu interkalacji.



Rycina 48. Zależność ułamka molowego od logarytmu ze stosunku stężenia ctDNA do stężenia C-1311 dla poszczególnych form spektralnych w roztworze o 5 mM stężeniu NaCl

Wykres zależności wartości ułamków molowych od stosunku stężenia DNA do stężenia związku przedstawiłam na Ryc. 48. Zawartość monomeru stopniowo maleje, wyraźny spadek obserwowany jest dla R>0,5. Dla R = 10 w roztworze występuje jedynie kompleks C-1311/DNA.

Numeryczne dopasowanie uzyskanych danych do modelu McGhee-von Hippel, przedstawione na Ryc.49, pozwoliło na wyznaczenie stałej wiązania związku do ctDNA oraz oszacowanie stechiometrii kompleksu.

Warto zauważyć, że otrzymałam dla C-1311 bardzo dużą wartość stałej wiązania rzędu 10⁷. Wartość ta obarczona jest jednak dużą niepewnością ze względu na małe różnice w kształcie widm wolnego C-1311 i jego kompleksu z DNA. Na uwagę zasługuje również duża gęstość wiązania ligandu: ponad dwukrotnie większa niż dla Ledakrinu.



Rycina 49. Dopasowanie modelu McGhee-von Hippel (linia ciągła) do danych doświadczalnych (punkty) dla oddziaływań C-1311 z ctDNA w roztworze o 5 mM stężeniu NaCl

Na Ryc. 50 zaprezentowałam wynik miareczkowania C-1311 roztworem DNA w buforze o dużej sile jonowej (150mM NaCl). Widma absorpcji związku w obecności wzrastającej ilości DNA zmieniają się stopniowo, wykazując spadek intensywności i niewielkie przesunięcie batochromowe. Porównując widmo czystego związku i widmo zarejestrowane przy 10-krotnym nadmiarze molowym DNA odnotowuje się, podobnie jak w przypadku niskosolnego roztworu, około 25% spadek maksimum absorpcji.



Rycina 50. Zestawy widm dla C-1311 w roztworze zawierającym 150 mM NaCl

Analiza widm standaryzowanych, Ryc. 51, pozwoliła stwierdzić, iż zmiana w kształcie widm następuję, gdy R>1. Wniosek ten potwierdza analiza zależności odchyleń standardowych od stosunku stężenia DNA do stężenia ligandu (Ryc.49).



Rycina 51. Zestaw widm standaryzowanych dla oddziaływań C-1311 z ctDNA w roztworze zawierającym 150 mM NaCl



Rycina 52. Zależność odchylenia standardowego widm od logarytmu ze stosunku stężeń DNA do C-1311 w roztworze zawierającym 150 mM NaCl. Linią przerywaną oznaczono odchylenie uzyskane dla niezwiązanego liganda.

Analogicznie jak dla roztworu niskosolnego, analizę uzyskanego zestawu widm przeprowadziłam z zastosowaniem technik chemometrycznych. Zastosowanie techniki PCA, p.IV.5.5, pozwoliło mi na zidentyfikowanie w roztworze obecności 2 form spektralnych. Procedura samouzgodnienia NSD (p.IV.5.5.) natomiast pozwoliła mi na odtworzenie ich widma oraz oszacowanie wartości ułamków molowych tych form w badanych roztworach.



Rycina 53. Widma form spektralnych uzyskane metodą NSD dla oddziaływań C-1311 z ctDNA w roztworze zawierającym 150 mM NaCl

Widma uzyskanych form spektralnych przedstawiłam na Ryc. 53. Odtworzone widmo wolnej formy liganda, L, pokrywa się z widmem pochodnej C-1311 w roztworze bez dodatku DNA. Widmo kompleksu, oznaczone symbolem X, analogicznie jak dla wyżej analizowanego roztworu zawierającego 5 mM stężenie NaCl, posiada maksimum absorpcji przy 430 nm. Wykres zależności wartości ułamków molowych od stosunku stężenia DNA do stężenia związku przedstawiłam na Ryc. 54. Przebieg krzywych wskazuje, że nawet dla R = 10 w roztworze jest jeszcze ok. 10% wolnego ligandu. Numeryczne dopasowanie uzyskanych danych do modelu McGhee-von Hippel, przedstawione na Ryc.49, pozwoliło mi na wyznaczenie stałej wiązania związku do ctDNA oraz oszacowanie stechiometrii kompleksu.



Rycina 54. Zależność ułamka molowego od logarytmu ze stosunku stężenia ctDNA do stężenia C-1311 dla poszczególnych form spektralnych w roztworze o 150 mM stężeniu NaCl



Rycina 55. Dopasowanie modelu McGhee-von Hippel (linia ciągła) do danych doświadczalnych (punkty) dla oddziaływań C-1311 z ctDNA w roztworze o 150 mM stężeniu NaCl

Zmiany w widmie pochodnej C-1311 w miarę dodawania kolejnych porcji DNA sugerują, iż dochodzi to do interkalacji liganda pomiędzy pary zasad podwójnej helisy. 30krotny wzrost stężenia soli w roztworze skutkuje około 10-krotnym obniżeniem stałej wiązania i zmianą stechiometrii kompleksu. Zatem oddziaływanie pochodnej C-1311 z ctDNA jest zależne od siły jonowej buforu, ale nie w takim samym stopniu jak dla wyżej badanego Ledakrinu, gdzie 10-krotne obniżenie stałej wiązania obserwowane jest już dla 10krotnego wzrostu stężenia soli.

V.2. BADANIA MIKROKALORYMETRYCZNE

Na podstawie pomiarów spektrofotometrycznych została dokonana wstępna charakterystyka właściwości fizykochemicznych wybranych pochodnych akrydyny w roztworach wodnych oraz określony zakres stężeń do pomiarów mikrokalorymetrycznych. Wykonanie pomiarów mikrokalorymetrycznych umożliwi dokładniejsze poznanie natury tych oddziaływań. W badaniach tych oprócz pochodnych akrydyny wykorzystałam bromek etydyny jako związek referencyjny. Badania wykonałam z wykorzystaniem izotermicznej kalorymetrii miareczkowej, w skrócie ITC (*ang. Isothermal Titration Calorimetry*). Analiza termodynamiczna stanowi uzupełnienie wieloletnich badań prowadzonych w Katedrze

Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej nad naturą niekowalencyjnych oddziaływań pochodnych akrydyny z DNA.

V.2.1. Analiza termodynamiczna oddziaływań ligandów z ctDNA

Analizę termodynamiczną oddziaływań małych ligandów z ctDNA rozpoczęłam od zbadania procesu tworzenia komplesku bromek etydyny/DNA. Do badań wybrałam właśnie bromek etydyny jako związek referencyjny, ponieważ jest on szeroko opisany w literaturze w aspekcie oddziaływań z kwasami nukleinowymi.

V.2.1.1. Analiza termodynamiczna oddziaływań bromku etydyny z ctDNA

Zbadałam wpływ stężenia NaCl oraz temperatury na proces tworzenia kompleksu związku z ctDNA. Dla każdego badanego układu przeprowadziłam trzy odrębne doświadczenia. Całkowite efekty cieplne miareczkowania DNA związkiem składają się bowiem z efektów cieplnych kilku zachodzących jednocześnie procesów: efekt cieplny rozcieńczania związku, efekt cieplny rozcieńczania kwasu dezoksyrybonukleinowego oraz efekt cieplny oddziaływania związku z ctDNA. Wyniki uzyskane dla niskosolnego buforu fosforanowego (5 mM NaCl) w temperaturze 25°C przedstawiłam na Ryc. 56 A.




Rycina 56. A. Cykl pomiarów mikrokalorymetrycznych oddziaływania bromku etydyny z ctDNA w 25 °C, kolor czarny – miareczkowanie ctDNA roztworem bromku etydyny, kolor czerwony – miareczkowanie buforu roztworem bromku etydyny, kolor zielony – miareczkowanie ctDNA buforem. Stężenie wyjściowego roztworu bromku etydyny 601 μM, ctDNA 303 μM pz, bufor fosforanowy o 5 mM stężeniu NaCl. Miareczkowanie nastrzykami po 10 μl roztworu bromku etydyny B. Izoterma oddziaływania bromku etydyny z ctDNA w 25 °C

W tych warunkach oddziaływanie bromku etydyny z ctDNA ma charakter egzotermiczny, efekt cieplny towarzyszący kilku pierwszym nastrzykom liganda (w porcjach po 10 µl) jest rzędu 4 µJ/s. Efekt ten stopniowa maleje w wyniku wysycania miejsc wiązania związku z helisa kwasu nukleinowego. W celu wyznaczenia ciepła oddziaływania liganda z ctDNA, od efektu cieplnego zarejestrowanego podczas miareczkowania DNA związkiem, odjęłam efekty cieplne uzyskane w pozostałych doświadczeniach. Bardzo niewielkie efekty cieplne obserwowane są podczas miareczkowania buforu buforem, dlatego ten efekt pominęłam w obliczeniach. Ciepło rozcieńczania bromku etydyny jest stałe, dlatego od powierzchni pików oddziaływania związku z kwasem dezoksyrybonukleinowym odjęłam uśrednioną powierzchnię pików rozcieńczania liganda. Stałe jest także ciepło rozcieńczania DNA, dlatego w tym przypadku również odjęłam uśrednioną powierzchnię pików. Do uzyskanych w ten sposób danych dopasowałam model oddziaływania opracowany przez Buurma i Haq [178], procedura została opisana w p.IV.5.9. W wyniku dopasowania modelu uzyskano stałą wiązania bromku etydyny z ctDNA, K = $1.75(\pm 0.21) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, zmianę entalpii procesu, $\Delta H =$ -44,23 \pm 1,53 kJmol⁻¹ oraz wielkość miejsc wiązania, n=2,34 \pm 0,05. Dane te pozwoliły na wyznaczenie zmian entropii i entalpii swobodnej procesu: $\Delta G = -29,91\pm0,28$ kJmol⁻¹, T $\Delta S =$ $-14,36\pm1,27$ Jmol⁻¹K⁻¹, zgodnie z równaniem (3).

Pomiary mikrokalorymetryczne oddziaływania bromku etydyny z ctDNA wykonałam w czterech buforach, różniących się stężeniem NaCl. W celu wyznaczenia pojemności cieplnej układu, dla jednego z buforów, wykonałam miareczkowanie mikrokalorymetryczne ctDNA roztworem bromku etydyny w temperaturze 35°C (temperatura "topnienia" ctDNA w buforze fosforanowym wynosi 64,8±0,72°C [163], w stosowanej temperaturze występuje zatem wyłącznie dwuniciowe DNA). Wynik uzyskany przedstawiłam na Ryc.57 A.



Rycina 57. A. Cykl pomiarów mikrokalorymetrycznych oddziaływania bromku etydyny z ctDNA w 35 °C, kolor czarny – miareczkowanie ctDNA roztworem bromku etydyny, kolor czerwony – miareczkowanie buforu roztworem bromku etydyny, kolor zielony – miareczkowanie ctDNA buforem. Stężenie wyjściowego roztworu bromku etydyny 601 μM, ctDNA 303 μM pz, bufor fosforanowy o 50 mM stężeniu NaCl. Miareczkowanie nastrzykami po 10 μl roztworu bromku etydyny B. Izoterma oddziaływania bromku etydyny z ctDNA w 35°C

Na Ryc.58 przedstawiłam wyniki miareczkowania ctDNA bromkiem etydyny w buforze fosforanowym o 150 mM stężeniu NaCl. Stwierdziłam, że wyższe stężenie soli nie wpływa na efekt cieplny rozcieńczania bromku etydyny. Zarówno wzrost temperatury (w proponowanym zakresie) jak i wzrost siły jonowej roztworu nie wpływają również na efekty cieplne rozcieńczania DNA.

Parametry termodynamiczne oddziaływania bromku etydyny z ctDNA w roztworze o dużej sile jonowej uzyskane w wyniku dopasowania modelu do danych eksperymentalnych przedstawiłam na Ryc. 58B oraz w Tabeli 10.



Rycina 58. A. Cykl pomiarów mikrokalorymetrycznych oddziaływania bromku etydyny z ctDNA w 25°C, kolor czarny – miareczkowanie ctDNA roztworem bromku etydyny, kolor czerwony – miareczkowanie buforu roztworem bromku etydyny, kolor zielony – miareczkowanie ctDNA buforem. Stężenie wyjściowego roztworu bromku etydyny 596 μM, ctDNA 251 μM pz, bufor fosforanowy o 150 mM stężeniu NaCl. Miareczkowanie nastrzykami po 10 μl roztworu bromku etydyny B. Izoterma oddziaływania bromku etydyny z ctDNA w 25°C

Parametry	Warunki reakcji:					
termodynamiczne	5 mM NaCl 25 °C	50 mM NaCl 25 °C	100 mM NaCl 25 °C	150 mM NaCl 25 °C	50 mM NaCl 35 °C	
K [M ⁻¹]	1,75(±0,21)*10 ⁵	1,53(±0,40)*10 ⁵	8,33(±0,33)*10 ⁴	6,71(±0,42)*10 ⁴	2,65(±0,35)**10 ⁵	
n	2,34±0,05	2,38±0,07	2,70±0,06	2,86±0,05	2,33±0,12	
$\Delta H [kJmol^{-1}]$	-44,23±1,55	-44,36±1,0	-45,68±1,27	-45,43±1,17	-47,38±0,80	
$\Delta G_{obs} [kJmol^{-1}]$	-29,91±0,28	-29,58±0,07	-28,07±0,10	-27,53±0,16	-30,92±0,33	
$T\Delta S [kJmol^{-1}]$	-14,36±1,27	14,36±1,27 -14,77±1,0		-17,90±1,21	-16,46±0,66	
$\Delta G_{pe} [kJmol^{-1}]$	nw	-5,69±0,55	-4,37±0,42	-3,60±0,35	-	
$\Delta G_t [kJmol^{-1}]$	nw	-23,89±0,47	-23,69±0,32	-23,93±0,50	-	
$\Delta C_p[Jmol^{-1}K^{-1}]$	-315,0±13,9					
$\Delta G_{hyd} [kJmol^{-1}]$	-25,2(±10)					

Tabela 10. Parametry termodynamiczne oddziaływania bromku etydyny z ctDNA w buforach o różnym stężeniu NaCl i w różnej temperaturze

Parametry termodynamiczne uzyskane dla buforów o różnym stężeniu NaCl pozwoliły mi wyznaczyć udział zmian entalpii swobodnej oddziaływań elektrostatycznych w całkowitej zmianie entalpii swobodnej, korzystając z liniowej zależności logarytmu naturalnego ze stałej wiązania K od logarytmu naturalnego ze stężenia soli, [NaCl]. Entalpia swobodna oddziaływań elektrostatycznych może być obliczona zgodnie z zależnością:

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

Wyznaczona wartość nachylenia zależności logarytmu naturalnego ze stałej wiązania K od logarytmu naturalnego ze stężenia NaCl (SK) wynosi -0,77(±0,07), i jest zbliżona do tej wartości uzyskanej dla innych monokationów wiążących się do DNA, która mieści się w zakresie od -0,80 do -1,24 [61,183,184]. Podczas wyznaczania SK nie brałam pod uwagę stałej wiązania uzyskanej w buforze niskosolnym, ponieważ wartość ta znacznie odbiegała od liniowości pozostałych punktów (Ryc. 59A). Wyznaczona w ten sposób wartość SK pozwoliła na oszacowanie zmian entalpii swobodnej oddziaływań elektrostatycznych w całkowitej, obserwowanej zmianie entalpii swobodnej dla buforów o 50, 100 i 150 mM

stężeniu NaCl. Wyznaczona wartość zmian entalpii swobodnej oddziaływań elektrostatycznych maleje wraz ze wzrostem stężenia soli, natomiast zmiany entalpii swobodnej oddziaływań nieelektrostatycznych pozostają zbliżone we wszystkich badanych buforach i stanowią od 80% do 87% całkowitej zmiany entalpii swobodnej, Ryc. 59B



Rycina 59. A. Liniowa zależność logarytmu naturalnego ze stałej wiązania bromku etydyny K od logarytmu naturalnego ze stężenia soli, [NaCl] B. Udział zmian entalpii swobodnej oddziaływań elektrostatycznych (obszar zakratkowany) oraz oddziaływań nieelektrostatycznych (obszar czarny) w całkowitej zmianie entalpii swobodnej dla poszczególnych buforów

Obserwowana zależność zmian entalpii oddziaływania bromku etydyny z ctDNA od temperatury pozwoliła mi na wyznaczenia zmian pojemności cieplnej układu, ΔC_p , co z kolei pozwoliło określić udział oddziaływań hydrofobowych w procesie [39], zgodnie z równaniem:

 $\Delta G_{hyd} = 80(\pm 10) * \Delta C_p = -25,20(\pm 10) \text{ kJmol}^{-1}$

Nie ma, jak dotąd wskazówek sugerujących, iż w wyniku interkalacji bromku etydyny pomiędzy pary zasad podwójnej helisy DNA dochodzi do zmian konformacyjnych w strukturze liganda. Zatem zmiana entalpii swobodnej konformacyjnych przekształceń reagentów, ΔG_{konf} , jest generowana przez zmiany w strukturze DNA. Lokalne rozplecenie helisy i jej częściowe rozwinięcie jest procesem wymagającym dostarczenia energii do układu, ilość energii jest zależna między innymi od struktury kwasu, sekwencji zasad oraz rodzaju interkalatora [50]. Dla klasycznych iterkalatorów ΔG_{konf} , wyznaczone na podstawie równowagowej stałej konformacyjnych zmian ctDNA wynosi 16,72 kJmol⁻¹ (równowagowa stała konformacyjnych zmian DNA wynosi 10⁻³) [59,185].

W literaturze koszt energetyczny utworzenia kompleksu z dwóch reagentów, ΔG_{r+t} , [26,49] definiowany jest wzorem:

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

Jest wiele kontrowersji, co do rzeczywistej wartość ΔS_{r+t} [186,187,188]. W ostatnim latach najczęściej stosowana jest wartość ΔS_{r+t} równa 209(±10) Jmol⁻¹K⁻¹ [185], wówczas obliczona wartość ΔG_{r+t} dla temperatury 298 K wynosi 62,28 kJmol⁻¹ (wartość ta jest porównywalna z wartością założoną przez Chaires i jego współpracowników [59], która wynosi 62,70 kJmol⁻¹) Zatem wstawiając wyżej wymienione zmiany entalpii swobodnych do równania

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

otrzymujemy:

 $\Delta G_{obs} = -5,69 + (-25,20) + 62,28 + 16,72 + \Delta G_{mol} = -29,58$ $\Delta G_{mol} = -77,77 \text{ kJmol}^{-1}$



Rycina 60. Wkład poszczególnych zmian entalpii swobodnej w całkowitej, obserwowanej zmianie entalpii swobodnej dla oddziaływania bromku etydyny z ctDNA w buforze fosforanowym o 50 mM stężeniu NaCl w temperaturze 25°C

Analiza diagramu przedstawionego na Ryc. 60 pozwala stwierdzić, że tworzenie kompleksu bromku etydyny z ctDNA w temperaturze 25°C w buforze fosforanowym następuje z uwolnienia energii głównie w wyniku przeniesienia aromatycznej cząsteczki z roztworu wodnego do hydrofobowego wnętrza podwójnej helisy DNA, ΔG_{hyd} , oraz powstawania nowych oddziaływań niekowalencyjnych, ΔG_{mol} , przede wszystkim oddziaływań van der Waalsa oraz oddziaływania typu п-п.

V.2.1.2. Analiza termodynamiczna oddziaływań Ledakrinu z ctDNA

Analogicznie jak dla bromku etydyny, wykonałam badania mikrokalorymetryczne dla oddziaływań Ledakrinu z ctDNA. Miareczkowanie wykonałam w czterech buforach różniących się stężeniem NaCl. Zbadałam również wpływ temperatury na proces tworzenia kompleksu Ledakrin-ctDNA.

Na Ryc. 61 przedstawiłam cykl miareczkowania ctDNA roztworem Ledakrinu w buforze o niskiej sile jonowej i w temperaturze 25 °C.





Rycina 61. A. Cykl pomiarów mikrokalorymetrycznych oddziaływania Ledakrinu z ctDNA w 25°C, kolor czarny – miareczkowanie ctDNA roztworem Ledakrinu, kolor czerwony – miareczkowanie buforu roztworem Ledakrinu, kolor zielony – miareczkowanie ctDNA buforem. Stężenie wyjściowego roztworu Ledakrinu 1,5 mM, ctDNA 1,5 mM pz, bufor fosforanowy o 5 mM stężeniu NaCl. Miareczkowanie nastrzykami po 10 µl roztworu Ledakrinu B. Izoterma oddziaływania Ledakrinu z ctDNA w 25°C

Uzyskany termogram wskazuje, iż oddziaływanie Ledakrinu z ctDNA ma charakter egzotermiczny. W przypadku tej pochodnej dodatek kolejnych porcji liganda skutkuje pojawieniem się dodatkowych, mniejszych pików. Niestety, jak dotąd, nie udało się znaleźć odpowiedzi na pytanie wynikiem, jakich oddziaływań są dodatkowe piki na termogramie.

Miareczkowania ctDNA roztworem Ledakrinu w buforze o dużej sile jonowej przedstawiłam na Rys. 62A. W przypadku Ledakrinu wzrost stężenia NaCl istotnie wpłynął na przebieg procesu. Efekt termiczny towarzyszący nastrzykowi 10 µl roztworu liganda do celki pomiarowej jest w tym przypadku rzędu około 1,5 µJ/s. Wartość ta w porównaniu z analogiczną reakcją prowadzoną w buforze o 5 mM stężeniu chlorku sodu spadła ponad 3,5 razy. Znajduje to swoje odbicie w wartości stałej tworzenia K (Ryc. 62B). Jest ona około 4-krotnie mniejsza niż w buforze o niskiej sile jonowej. Silna zależność oddziaływania Ledakrinu od stężenia soli potwierdza wniosek uzyskany w badaniach oddziaływań Ledakrinu z ctDNA wykonanych metodą miareczkowania spektrofotometrycznego. Niekowalencyjne oddziaływania Ledakrinu z ctDNA zależą od temperatury i siły jonowej buforu.



Rycina 62.A. Cykl pomiarów mikrokalorymetrycznych oddziaływania Ledakrinu z ctDNA w 25°C, kolor czarny – miareczkowanie ctDNA roztworem Ledakrinu, kolor czerwony – miareczkowanie buforu roztworem Ledakrinu, kolor zielony – miareczkowanie ctDNA buforem. Stężenie wyjściowego roztworu Ledakrinu 1,6 mM, ctDNA 1,62 mM pz, bufor fosforanowy o 150 mM stężeniu NaCl. Miareczkowanie nastrzykami po 10 µl roztworu Ledakrinu B. Izoterma oddziaływania Ledakrinu z ctDNA w 25°C

Parametry	Warunki reakcji:					
termodynamiczne	5 mM NaCl 25 °C	50 mM NaCl 25 °C	100 mM NaCl 25 °C	150 mM NaCl 25 °C	50 mM NaCl 35 °C	
K [M ⁻¹]	1,67(±0,15)*10 ⁴	1,75(±0,25)*10 ⁴	5,61(±0,15)*10 ³	3,69(±0,15)*10 ³	$1,31(\pm 0,29)*10^3$	
n	7,75±0,08	5,35±0,04	5,30±0,06	4,60±0,10	5,40±0,20	
∆H [kJmol ⁻¹]	-35,74±1,16	-40,95±3,96	-43,73±6,90	nw	nw	
$\Delta G_{obs} [kJmol^{-1}]$	-24,08±0,23	-24,18±0,37	-21,39±0,07	-20,35±0,10	-23,47±0,41	
$T\Delta S [kJmol^{-1}]$	-11,66±1,13	-16,77±3,70	-22,34±6,95	nw	nw	
$\Delta G_{pe} [kJmol^{-1}]$	nw	-10,63±1,31	-8,17±1,01	-6,73±0,83	-	
$\Delta G_t \ [kJmol^{-1}]$	nw	-13,56±0,95	-13,22±1,07	-13,62±0,92	-	

Tabela 11. Parametry termodynamiczne oddziaływania Ledakrinu z ctDNA w buforach o różnym stężeniu NaCl i w różnej temperaturze

nw - nie wyznaczona



Rycina 63. A. Liniowa zależność logarytmu naturalnego ze stałej wiązania Ledakrinu K od logarytmu naturalnego ze stężenia soli, [NaCl] B. Udział zmian entalpii swobodnej oddziaływań elektrostatycznych (obszar zakratkowany) oraz oddziaływań pozaelektrostatycznych (obszar czarny) w całkowitej zmianie entalpii swobodnej dla poszczególnych buforów

Dla oszacowania udziału oddziaływań elektrostatycznych wyznaczyłam nachylenie prostej, opisującej zależność logarytmu naturalnego z K od logarytmu naturalnego ze stężenia

soli w buforze. W tych obliczeniach pominęłam wynik uzyskany w roztworze o niskiej sile jonowej (5 mM), ponieważ znacznie odbiegał od pozostałych punktów na wykresie, Ryc. 63A. Dla trzech pozostałych punktów uzyskano SK równe -1,43(±0,18). Dla badanej pochodnej akrydyny również uzyskałam spadek udziału oddziaływań elektrostatycznych wraz ze wzrostem stężenia soli. Udział oddziaływań nieelektrostatycznych pozostaje na zbliżonym poziomie, stanowi od 55% do 65% całkowitej zmiany entalpii swobodnej dla tego oddziaływania,Ryc.63B.

Zmiany entalpii oraz zmiany entropii dla reakcji prowadzonych w buforze o najwyższym stężeniu soli oraz w podwyższonej temperaturze wyznaczone w wyniku dopasowania modelu oddziaływań obarczone były dużym błędem statystycznym i nie uwzględniłam ich w dalszych rozważaniach, dlatego wartości tych nie umieściłam w Tabeli 11.

Analogicznie z wyżej analizowanym oddziaływaniem bromku etydyny z ctDNA można założyć, iż w trakcie wiązania Ledakrinu z DNA nie dochodzi do zmian konformacyjnych w strukturze liganda, wówczas wartość ΔG_{konf} jest generowana przez zmiany w strukturze podwójnej helisy. Brak jest danych dotyczących wartości tej funkcji termodynamicznej dla iterkalatorów posiadających dodatkowe łańcuchy boczne, dlatego w niniejszej pracy przyjęłam, iż wartość ta jest taka sama jak dla klasycznych interkalatorów i wynosi 16,72 kJmol⁻¹ [59,191] (założenie to prawdopodobnie obarczone jest błędem).

Zatem wstawiając wyżej wymienione zmiany entalpii swobodnych do równania

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

otrzymujemy:

$$\begin{split} \Delta G_{obs} &= -10,63 + 62,28 + 16,72 + \Delta G_{mol} + \Delta G_{hyd} = -24,18 \\ (\Delta G_{mol} + \Delta G_{hyd}) &= -92,55 \text{ kJmol}^{-1} \end{split}$$



Rycina 64. Wkład poszczególnych zmian entalpii swobodnej w całkowitej, obserwowanej zmianie entalpii swobodnej dla oddziaływania Ledakrinu z ctDNA w buforze fosforanowym o 50 mM stężeniu NaCl w temperaturze 25°C

Analogicznie jak dla bromku etydyny, oddziaływanie Ledakrinu z ctDNA następuje w wyniku wysoce energetycznego przeniesienia aromatycznej cząsteczki z roztworu wodnegodo wnętrza podwójnej helisy DNA oraz tworzenia nowych wiązań niekowalencyjnych, ($\Delta G_{mol} + \Delta G_{hyd}$).

V.2.1.3. Analiza termodynamiczna oddziaływań pochodnej C-857 z ctDNA

Badania spektroskopowe oddziaływań pochodnej C-857 z ctDNA wykazały brak zmian w widmie związku w miarę dodawania kolejnych porcji DNA. Postawiłam wówczas hipotezę, iż miareczkowanie spektroskopowe nie jest odpowiednią metodą badania oddziaływania tej pochodnej z DNA. W celu sprawdzenia czy dochodzi do niekowalencyjnego wiązania C-857 do podwójnej helisy DNA w sposób nie znajdujący odbicia w widmach elektronowych przeprowadziłam miareczkowanie mikrokalorymetryczne pochodnej roztworem ctDNA, Ryc. 65. Efekt cieplny obserwowany podczas tego miareczkowania, przy zastosowaniu nawet bardzo wysokich stężeń związku, wynika przede wszystkim z rozcieńczania rozwtoru pochodnej. Nie dochodzi tu do tworzenia kompleksu liganda z DNA.



Rycina 65. Cykl pomiarów mikrokalorymetrycznych oddziaływania pochodnej C-857 z ctDNA w 25°C, kolor czarny – miareczkowanie ctDNA roztworem pochodnej C-857, kolor czerwony – miareczkowanie buforu roztworem pochodnej C-857. Stężenie wyjściowego roztworu C-857 4 mM, ctDNA 0,4 mM pz, bufor fosforanowy o 5 mM stężeniu NaCl. Miareczkowanie nastrzykami po 10 μl roztworu pochodnej C-857

V.2.1.4. Analiza termodynamiczna oddziaływań pochodnej C-1311 z ctDNA

Do badań, oprócz 1-nitro pochodnych akrydyny, wybrano pochodną imidazoakrydonu o symbolu C-1311. Na Ryc. 66 przedstawiłam cykl pomiarów mikrokalorymetrycznych oddziaływania pochodnej C-1311 z ctDNA w buforze o niskim stężeniu NaCl.



Rycina 66. Cykl pomiarów mikrokalorymetrycznych oddziaływania pochodnej C-1311 z ctDNA w 25°C, kolor czarny – miareczkowanie ctDNA roztworem pochodnej C-1311, kolor czerwony – miareczkowanie buforu roztworem pochodnej C-1311, kolor zielony – miareczkowanie ctDNA buforem. Stężenie wyjściowego roztworu C-1311 2 mM, ctDNA 0,1 mM pz, bufor fosforanowy o 5 mM stężeniu NaCl. Miareczkowanie nastrzykami po 10 µl roztworu pochodnej C-1311

W przypadku tej pochodnej zaobserwowałam istotny endotermiczny efekt rozcieńczania związku buforem. Z badań spektroskopowych tej pochodnej wiadomo, iż związek w wyższych stężeniach ma tendencję do tworzenia agregatów. Widmo agregatu posiada maksimum absorpcji przy długości fali 432 nm (λ_{max} dla monomeru występuje przy 420 nm, p.V.1.1. Tabela 8). W celu potwierdzenia, iż stosowany 2 mM roztwór pochodnej zawiera formę zagregowaną wykonałam jego widmo absorpcyjne, przedstawione na Ryc. 67. Maksimum absorpcji występuje dla długości fali równej 432 nm, co potwierdza, iż w roztworze występuje kompleks złożony z większej liczby cząsteczki. Informacja ta może tłumaczyć znaczący efekt termiczny towarzyszący około 100-krotnemu rozcieńczaniu związku, który jest związany z rozpadem agregatów na pojedyncze cząsteczki, efekt ten stopniowo zanika, tworzy się bowiem równowaga pomiędzy formą monomeryczną i zagregowaną. Jednocześnie informacja ta jest istotna z punktu widzenia badanych oddziaływań niekowalencyjnych. Przestrzeń jaka jest możliwa do utworzenia pomiędzy parami zasad w dwuniciowym DNA pozwala na interkalację tam co najwyżej jednej płaskiej cząsteczki interkalatora, a nie jego dimeru.



Rycina 67. Widmo absorpcyjne pochodnej C-1311 o stężeniu 2 mM

Termogram oddziaływania pochodnej C-1311 z ctDNA, Ryc. 66, sugeruje, iż dochodzi tu do dwóch typów odziaływania związku z DNA. Pierwszy etap to prawdopodobnie oddziaływanie elektrostatyczne, które stopniowo zanika (po 4 nastrzyku). Nie jest jasne , czy oddziaływanie to dotyczy formy monomerycznej czy zagregowanej. Już we wczesnych badaniach nad oddziaływaniem pochodnych akrydyny z DNA wskazano, iż związki te występując w formie zagregowanej są przyciągane przez ujemnie naładowane grupy fosforanowe łańcucha DNA [76]. W miarę wzrostu stężenia monomeru dochodzi prawdopodobnie do interkalacji cząsteczek pomiędzy pary zasad helisy DNA. Po wysyceniu wszystkich możliwych miejsc wiązania (po 14 nastrzyku) na termogramie przejawia się jedynie efekt cieplny rozpadu agregatów.

W celu sprawdzenia czy badana pochodna akrydyny w formie zagregowanej oddziałuje z ctDNA wykonałam miareczkowanie odwrotne. W eksperymencie tym w celce pomiarowej umieściłam roztwor związku C-1311 w stężeniu 1 mM (forma zagregowana), który miareczkowałam roztworem DNA. Wynik tego miareczkowania przedstawiłam na Ryc. 68. Z termogramu tego jasno wynika, iż dochodzi tu do oddziaływań pochodnej C-1311 z ctDNA, jednak tak duży nadmiar związku w stosunku do kwasu dezoksyrybonukleinowego powoduje wytrącenie DNA, dlatego wynik ten nie będzie analizowany bardziej szczegółowo.



Rycina 68. Cykl pomiarów mikrokalorymetrycznych oddziaływania pochodnej C-1311 z ctDNA w 25°C, kolor czarny – miareczkowanie C-1311 roztworem ctDNA, kolor czerwony – miareczkowanie roztworu pochodnej C-1311buforem, kolor zielony – miareczkowanie buforu roztworem ctDNA. Stężenie wyjściowego roztworu C-1311 2 mM, ctDNA 0,1 mM pz, bufor fosforanowy o 5 mM stężeniu NaCl. Miareczkowanie nastrzykami po 10 µl roztworu ctDNA

Miareczkowania mikrokalorymeteryczne pochodnej C-1311 kwasem dezoksyrybonukleinowym z grasicy cielęcej w buforze o dużej sile jonowej wskazało, Ryc.69, że wzrost stężenia soli w mieszaninie reakcyjnej nie wpływa na endotermiczny proces rozpadu agregatów. 150 mM stężenie NaCl wpływa natomiast na zdolność związku do oddziaływania z DNA. Tak istotnego wpływu soli na wiązanie związku do DNA nie obserwowałam w badaniach spektroskopwych (p.V.1.2.3). W analizie UV-Vis zastosowałam niskie stężenie pochodnej, 40 µM, zatem obserwowane zmiany w widmie związne są z oddziaływaniem formy monomerycznej z podwójną helisą DNA. Zmiany te przypisałam interkalacji cząsteczki pomiędzy pary zasad DNA. Istotny wpływ siły jonowej roztworu na obserwowane metodą ITC oddziaływanie C-1311 z ctDNA, w której zastosowano wysokie stężenie pochodnej (2 mM, forma zagregowana) może być zatem dowodem, iż obecność soli w tym przypadku zahamowała oddziaływania elektrostatyczne, które są wstępnym etapem niekowalencyjnego oddziaływania imidazo pochodnej akrydyny z DNA [189].



Rycina 69. Cykl pomiarów mikrokalorymetrycznych oddziaływania pochodnej C-1311 z ctDNA w 25°C, kolor czarny – miareczkowanie ctDNA roztworem pochodnej C-1311, kolor czerwony – miareczkowanie buforu roztworem pochodnej C-1311, kolor zielony – miareczkowanie ctDNA buforem. Stężenie wyjściowego roztworu C-1311 2 mM, ctDNA 0,1 mM pz, bufor fosforanowy o 150 mM stężeniu NaCl. Miareczkowanie nastrzykami po 10 µl roztworu pochodnej C-1311

Ze względu na fakt, iż rozcieńczaniu pochodnej C-1311 towarzyszy silny efekt termiczny podjęłam próbę znalezienia warunków reakcji, w których proces ten będzie słabszy. Jak już wspomniałam powyżej wzrost stężenia soli nie ma wpływu na to zjawisko. Zbadałam zatem jak na rozpad agregatów wpłynie wzrost temperatury. Wykonałam miareczkowanie mikrokalorymetryczne pochodnej C-1311 buforem o 5 mM stężeniu NaCl w dwóch dodatkowych temperaturach, 35 °C i 45 °C. Wyniki przedstawiłam na Ryc.70. Na podstawie termogramów i przedstawionej na Ryc. 71 zależności ciepeł od logarytmu z całkowitego stężenia związku, stwierdziłam, iż proces rozpadu zagregowanej fromy C-1311 jest niezeleżny od temperatury. Tym samym nie udało mi się znaleźć warunków w technice ITC, w których możliwe byłoby użycie roztworu C-1311 w formie monomerycznej. Zatem proces deagregacji należy uwzględnić w opisie oddziaływania ligandu z DNA.



Rycina 70. Miareczkowanie mikrokalorymetrycznych pochodnej C-1311 buforem:

а.	w 25°C
b.	w 35°C

c. w 45°C



Rycina 71. Zależność ciepła rozcieńczania pochodnej C-1311 od logarytmu z całkowitego stężenia związku w celce pomiarowej

Na podstawie uzyskanych ciepeł oraz wykorzystując opracowany przeze mnie model dimeryzacji (p.IV.5.7.) wyznaczyłam stałą dimeryzacji K_D oraz molową entalpię ΔH towarzyszącą procesowi dimerycacji związku C-1311 w każdym z wyżej zaprezentowanych miareczkowań. Wyniki przestawiłam w Tabeli 12.

Związek	Parametry reakcji	$K_{D}[M^{-1}]$	ΔH [kJ/mol]
	25°C, 5mM NaCl, pH 7,4	(5,8±1,6)*10 ³	-20,7 ± 4,03
	35°C, 5mM NaCl, pH 7,4	(2,6±1,3)*10 ³	-15,6±6,60
311	45°C, 5mM NaCl, pH 7,4	(1,0±0,1)*10 ³	-8,8±0,66
C-13	25°C, 75mM NaCl, pH 7,4	(4,8±1,8)*10 ³	-12,7±3,70
	25°C,150mM NaCl, pH 7,4	(1,8±0,5)*10 ³	-9,5 ± 1,70
	25°C, 5mM NaCl, pH 6,0	nw	-23,3±1,50

Tabela 12. Parametry termodynamiczne reakcji dimeryzacjii pochodnej C-1311 w buforach o różnym składzie

nw - nie wyznaczone

Wyznaczone stałe dimeryzacji są o rząd wielkości mniejsze niż analogiczne stałe wyznaczone metodami spektroskopowymi. Wytłumaczyć to można faktem, że podczas badań mikrokalorymetrycznych mierzony efekt cieplny jest sumą wielu zachodzących jednocześnie oddziaływań międzycząsteczkowych [26]. Niebagatelny udział mają w nich oddziaływania

hydratacyjne i elektrostatyczne. Zmiany w widmach obserwowane podczas pomiarów spektroskopowych są zaś jedynie wynikiem zmian w orientacji chromoforów w wyniku procesu dimeryzacji.

Jak wynika z danych przedstawionych w Tabeli 12 stała dimeryzacji zależy zarówno od stężenia soli w buforze, jak i od temperatury. Wraz ze wzrostem siły jonowej roztworu spada stała dimeryzacji, pododnie spadek stałej jest obserwowany przy wzroście temperatury. Proces dimeryzacji jest egzotermiczny we wszystkich badanych warunkach.

Do danych eksperymentalnych miareczkowania DNA pochodną C-1311 został dopasowany model opracowany przez Buurma i Haq [178]. Dane eksperymentalne uzyskane podczas miareczkowania ctDNA roztworem pochodnej C-1311 w buforach różniących się stężeniem NaCl zostały wprowadzone do programu IC-ITC, uzyskano w ten sposób podstawowe parametry termodynamiczne procesu. W analizie tej pominęłam efekt termiczny obserwowany dla początkowych nastrzyków liganda do celki pomiarowej, nie udało mi się bowiem uzyskać termogramu (tak dobrać stężenia reagentów), w którym efekt ten "dałby się opisać termodynamiczne". Wyniki uzyskane podczas poszczególnych miareczkowań podsumowałam w Tabeli 13.

czas [s]



92



Rycina 72. A. Cykl pomiarów mikrokalorymetrycznych oddziaływania pochodnej C-1311 z ctDNA w 25°C, kolor czarny – miareczkowanie ctDNA roztworem pochodnej C-1311, kolor czerwony – miareczkowanie buforu roztworem pochodnej C-1311, kolor zielony – miareczkowanie ctDNA buforem. Stężenie wyjściowego roztworu C-1311 2 mM, ctDNA 0,1 mM pz, bufor fosforanowy o 5 mM stężeniu NaCl. Miareczkowanie nastrzykami po 10 µl roztworu pochodnej C-1311B. Izoterma oddziaływania C-1311 z ctDNA w 25 °C





Rycina 73. A.Cykl pomiarów mikrokalorymetrycznych oddziaływania pochodnej C-1311 z ctDNA w 25°C, kolor czarny – miareczkowanie ctDNA roztworem pochodnej C-1311, kolor czerwony – miareczkowanie buforu roztworem pochodnej C-1311, kolor zielony – miareczkowanie ctDNA buforem. Stężenie wyjściowego roztworu C-1311 2 mM, ctDNA 0,1 mM pz, bufor fosforanowy o 150 mM stężeniu NaCl. Miareczkowanie nastrzykami po 10 µl roztworu pochodnej C-1311 B. Izoterma oddziaływania C-1311 z ctDNA w 25 °C

Parametry	Warunki reakcji:					
termodynamiczne	5 mM NaCl 25 °C	50 mM NaCl 25 °C	100 mM NaCl 25 °C	150 mM NaCl 25 °C	50 mM NaCl 35 °C	
K [M ⁻¹]	3,81(±0,13)*10 ⁶	1,24(±0,12)*10 ⁶	9,76(±0,24) *10 ⁵	4,54(±0,23) *10 ⁵	9,5(±0,30)*10 ⁵	
n	3,32±0,02	3,20±0,02	3,13±0,10	2,87±0,03	3,93±0,03	
$\Delta H [kJmol^{-1}]$	-21,22±0,51	-18,73±0,57	-14,73±2,19	-11,90±1,45	-25,93±1,35	
$\Delta G_{obs} [kJmol^{-1}]$	-31,84±0,08	-34,76±0,24	-34,18±0,06	-32,23±0,15	-30,29±3,36	
T∆S [kJmol ⁻¹]	+10,62±0,43	+16,03±0,68	+19,44±2,13	+20,37±1,31	+4,36±2,28	
$\Delta G_{pe} [kJmol^{-1}]$	-10,01±4,87	-5,66±2,73	-4,35±2,12	-3,59±1,75	-	
$\Delta G_t [kJmol^{-1}]$	-21,82±4,81	-26,17±2,69	-29,81±2,07	-28,68±1,89	-	
$\Delta C_p[Jmol^{-1}K^{-1}]$	-471,0±102,6					
$\Delta G_{hyd} [kJmol^{-1}]$	-37,68(±10)					

Tabela 13. Parametry termodynamiczne oddziaływania C-1311 z ctDNA w buforach o różnym stężeniu NaCl i w różnej temperaturze

Wyniki wskazują, że oddziaływanie pochodnej C-1311 z ctDNA zależy od temperatury i siły jonowej buforu.

Dla oszacowania udziału oddziaływań elektrostatycznych w procesie wyznaczyłam nachylenie prostej, opisującej zależność logarytmu naturalnego z K od logarytmu naturalnego ze stężenia soli w mieszaninie reakcyjnej, Ryc. 74A. Uzyskałam SK równe -0,76(±0,37). Dla pochodnej C-1311 również uzyskałam spadek udziału oddziaływań elektrostatycznych wraz ze wzrostem stężenia soli, udział oddziaływań nieelektrostatycznych pozostawał na zbliżonym poziomie, stanowił od 80 do 90% całkowitej zmiany entalpii swobodnej dla tego oddziaływania.



Rycina74. A. Liniowa zależność logarytmu naturalnego ze stałej wiązania C-1311 K od logarytmu naturalnego ze stężenia soli, [NaCl] B. Udział zmian entalpii swobodnej oddziaływań elektrostatycznych (obszar zakratkowany) oraz oddziaływań nieelektrostatycznych (obszar czarny) w całkowitej zmianie entalpii swobodnej dla poszczególnych buforów

Analogicznie jak dla bromku etydyny i Ledkarinu założyłam, że w trakcie wiązania pochodnej C-1311 z DNA nie dochodzi do zmian konformacyjnych w strukturze liganda, wówczas wartość ΔG_{konf} wynosi 16,72 kJmol⁻¹ [59,191].

Zatem wstawiając wyżej wyznaczone zmiany entalpii swobodnych do równania

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

otrzymujemy:

$$\label{eq:Gobs} \begin{split} \Delta G_{obs} &= \text{-}5,66\text{+}(\text{-}37,68)\text{+}16,72\text{+}62,28\text{+}\ \Delta G_{mol} = \text{-}34,76\\ \Delta G_{mol} &= \text{-}70,42\ \text{kJmol}^{-1} \end{split}$$



Rycina 75. Wkład poszczególnych zmian entalpii swobodnej w całkowitej, obserwowanej zmianie entalpii swobodnej dla oddziaływania C-1311 z ctDNA w buforze fosforanowym (5 mM NaCl) w temperaturze 25°C

Oddziaływanie pochodnej C-1311 z ctDNA następuje w wyniku wysoce energetycznego przeniesienia aromatycznej cząsteczki do wewnątrz podwójnej helisy DNA oraz tworzenia nowych wiązań niekowalencyjnych.

V.2.1.5. Porównanie profili termodynamicznych oddziaływania bromku etydyny, Ledakrinu oraz pochodnej C-1311 z DNA

Oddziaływanie wszystkich badanych związków z ctDNA jest procesem egzotermicznym. Uzyskane profile termodynamiczne (ujemna zmiana entalpii, stechiometria) sugerują, że cząsteczki te interkalują pomiędzy pary zasad podwójnej helisy DNA. Wniosek ten, dla wybranych pochodnych akrydyny, potwierdzają badania spektroskopowe, w których zaobserwowałam przesunięcia widm w kierunku fal dłuższych, co jest charakterystyczne dla procesu interkalacji.

Wartości parametrów termodynamicznych uzyskanych dla oddziaływania bromku etydyny z ctDNA są zbliżone dla wszystkich buforów różniących się stężeniem NaCl. Ujemna wartość ΔG_{obs} wskazuje, że kompleks ctDNA-Br.Et ma niższą energię niż suma energii makrocząsteczki i ligandu. Równowaga jest zatem przesunięta w kierunku tworzenia kompleksu. Uzyskane dane są porównywalne z wcześniej publikowanymi wartościami dotyczącymi oddziaływań bromku etydyny z ctDNA [59,61, 190,191,192,193].

Podobne profile termodynamiczne uzyskano dla oddziaływania Ledakrinu z ctDNA. Niekowalencyjnemu wiązaniu związku z podwójną helisą kwasu dezoksyrybonukleinowego towarzyszy spadek entalpii oraz entropii, Ryc.70. Jednak w przypadku tego związku należy zauważyć, iż skład buforu wpływa na uzyskane wartości parametrów termodynamicznych. Wzrost stężenia soli zmienia udział zmian entalpii i entropii w zmianach entalpii swobodnej oddziaływania, co może sugerować, że stężenia soli wpływa na strukturę powstającego kompleksu. Hipoteza taka jest zgodna z wnioskami wyciągniętymi z analizy spektroskopowej. Kształt uzyskanego widma kompleksu oraz położenia punktu izosbestycznego w przypadku buforu o 50 mM stężeniu NaCl było odmienne niż dla buforu niskosolnego.

Profil termodynamiczny oddziaływania C-1311 z ctDNA jest odmienny w porównaniu z Ledakrinem i bromkiem etydyny, Ryc. 76. Wiązaniu cząsteczki do podwójnej helisy towarzyszy silny, dodatni przyrost entropii, z jednoczesnym spadkiem entalpii. Dodatnia zmiana entropii jest charakterystyczna dla oddziaływania związków wiążących się z DNA w małym rowku, co może sugerować, iż łańcuch boczny pochodnej C-1311 lokuje się w rowku podwójnej helisy.



Rycina 76. Porównanie wartości wybranych funkcji termodynamicznych dla oddziaływania bromku etydyny, Ledakrinu i C-1311 z ctDNA w buforze fosforanowym w temperaturze 25°C

V.2.2. Analiza termodynamiczna oddziaływań małych ligandów z DNA o różnym składzie zasad

W ramach prezentowanej pracy doktorskiej wykonałam również badania oddziaływań wybranych związków z DNA o zróżnicowanym składzie zasad, co pozwoli mi określić preferencje cząsteczek w stosunku do konkretnych par nukleotydów. Badania te wykonałam w niskosolnym buforze (w badaniach pominięto pochodną C-857, która jak się okazało nie oddziałuje niekowalencyjnie z DNA). Doświadczenia wykonałam dla trzech różnych polinukleotydów. Oprócz klasycznych polinukleotydów o naprzemiennych sekwencjach p(AT) oraz p(GC) wybrałam polinukleotyd p(IC) [194,195,193]

V.2.2.1. Analiza termodynamiczna oddziaływań bromku etydyny z DNA o różnym składzie

Badania zmierzające do określenia preferencji badanych ligandów do określonych par zasad DNA rozpoczęłam od zbadania oddziaływań bromku etydyny z trzema rodzajami polinukleotydów, poly(dA-dT)₂, poly(dG-dC)₂ oraz poly(dI-dC)₂. Miareczkowanie mikrokalorymetryczne przeprowadziłam dla niskosolnego buforu w temperaturze 25°C. Uzyskany profil termodynamiczny dla wszystkich badanych reakcji przedstawiłam w Tabeli 14.

Parametry	Makrocząsteczka:				
termodynamiczne	ctDNA	Poly(dA-dT) ₂	Poly(dG-dC) ₂	Poly(dI-dC) ₂	
K [M ⁻¹]	1,75(±0,21)*10 ⁵	5,45(±0,32)*10 ⁵	3,67(±0,13)*10 ⁶	1,29(±0,16)*10 ⁶	
n	2,34±0,05	1,55±0,05	1,85±0,05	1,54±0,06	
$\Delta H [kJmol^{-1}]$	-44,23±1,55	-37,68±0,60	-37,89±0,28	-34,76±0,08	
$\Delta G [kJmol^{-1}]$	-29,91±0,28	-32,72±0,15	-37,45±0,09	-34,85±0,32	
$T\Delta S [kJmol^{-1}]$	-14,36±1,27	-4,96±0,66	-0,44±0,34	nw	

Tabela 14. Parametry termodynamiczne oddziaływania bromku etydyny z DNA o różnym składzie zasad w buforze fosforanowym o 5 mM NaCl

Z danych przedstawionych w Tabeli 14 wynika, iż bromek etydyny wiąże się zarówno do DNA bogatego w sekwencję AT, GC jak i IC, podobną informację uzyskano dla oddziaływań innych znanych interkalatorów [10]. Najwyższa stała wiązania, rzędu 10⁶ M⁻¹ (pz), występuje dla oddziaływań związku z poly(dG-dC)₂ oraz poly(dI-dC)₂. W zależności od rodzaju nukleotydów w DNA zmienia się ilość par zasad zajętych przez jedną cząsteczkę liganda. Oddziaływanie bromku etydyny ze wszystkimi badanymi polinukleotydami ma charakter egzotermiczny. Ryc. 77.



Rycina 77. Porównanie wartości wybranych funkcji termodynamicznych dla oddziaływania bromku etydyny z DNA o różnym składzie zasad w buforze fosforanowym o 5 mM stężeniu NaCl w temperaturze 25°C

V.2.2.2. Analiza termodynamiczna oddziaływań Ledakrinu z DNA o różnym składzie zasad

Analogicznie jak dla bromku etydyny wykonałam miareczkowanie trzech rodzajów nukleotydów roztworem Ladakrinu. Reakcje przeprowadziłam w buforze o niskim stężeniu soli w temperaturze 25°C. Uzyskany profil termodynamiczny przedstawiłam w Tabeli 15.

Tabela 15. Parametry termodynamiczne oddziaływania Ledakrinu z DNA o różnym składzie zasad z w buforze fosforanowym o 5 mM NaCl

Parametry	Makrocząsteczka:				
termodynamiczne	ctDNA	Poly(dA-dT) ₂	Poly(dG-dC) ₂	Poly(dI-dC) ₂	
K [M ⁻¹]	1,67(±0,15)*10 ⁴	5,51(±0,35)*10 ⁴	1,80(±0,12)*10 ⁴	6,40 (±0,23)*10 ⁴	
n	7,75±0,08	7,93±0,30	6,90±0,22	5,93±0,07	
$\Delta H [kJmol^{-1}]$	-35,74±1,16	-32,97±0,20	-41,85±1,05	nw	

$\Delta G \ [kJmol^{-1}]$	-24,08±0,23	-21,04±0,16	-24,27±0,16	-27,42±0,12
$T\Delta S [kJmol^{-1}]$	-11,66±1,13	-5,92±0,05	-17,58±0,93	nw

nw - nie wyznaczone

Analiza danych przedstawionych w Tabeli 15 pozwala stwierdzić, iż Ledakrin wiąże się zarówno do DNA bogatego w sekwencję AT jak i GC przy czym siła wiązania i stechiometria kompleksu zależy od składu zasad. Najwyższa stała wiązania, rzędu 10^4 M⁻¹ (pz), występuje dla oddziaływań związku z poly(dG-dC)₂ oraz poly(dI-dG)₂. Wykazane preferencje pochodnej akrydyny w stosunku do sekwencji GC oraz IC są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi [196]. Oddziaływanie ze wszystkimi badanymi polinukleotydami ma charakter egzotermiczny, Ryc.78. Zmiana entalpii oddziaływania Ledakrinu z poly(dI-dG)₂ uzyskana w wyniku dopasowania modelu Burmma oraz Haq [178] obarczona jest dużym błędem statystycznym, dlatego dana ta została pominięta w Tabeli 15 oraz na Ryc. 78 (brak możliwości wyznaczenia Δ H skutkuje brakiem możliwości wyznaczenia T Δ S).



Rycina 78. Porównanie wartości wybranych funkcji termodynamicznych dla oddziaływania Ledakrinu z DNA o różnym składzie zasad w buforze fosforanowym o 5 mM stężeniu NaCl w temperaturze 25°C

V.2.2.3. Analiza termodynamiczna oddziaływań pochodnej C-1311 z DNA o różnym składzie zasad

W Tabeli 16 zebrałam parametry termodynamiczne uzyskane dla oddziaływania imidazoakrydonu, związku C-1311, z DNA o różnym składzie zasad. Pomiary przeprowadziłam w buforze fosforanowym o niskim stężeniu NaCl w temperaturze 25°C.

Tabela 16. Parametry termodynamiczne oddziaływania pochodnej C-1311 z DNA o różnym składzie zasad w buforze fosforanowym o 5 mM NaCl

Parametry	Makrocząsteczka:					
termodynamiczne	ctDNA	Poly(dA-dT) ₂	Poly(dG-dC) ₂	Poly(dI-dC) ₂		
K [M ⁻¹]	3,81(±0,13)*10 ⁶	4,84(±0,13)*10 ⁴	2,75(±0,12)*10 ⁵	$3,16(\pm 0,08)^*10^5$		
n	3,32±0,02	3,32±0,02	2,81±0,04	3,33 ±0,05		
$\Delta H [kJmol^{-1}]$	-21,22±0,51	-18,49 ± 0, 3 9	-29,42±0,45	-20,95±0,16		
$\Delta G [kJmol^{-1}]$	-31,84±0,08	-26,72 ±0,07	-31,03 ±0 ,11	-31,38±0,06		
$T\Delta S [kJmol^{-1}]$	+10,62±0,43	+8,23 ± 0,44	+1,62 ±0,40	+10,43 ±0,20		

Pochodna C-1311, podobnie do wyżej analizowanych związków, wiąże się zarówno do DNA bogatego w pary GC, jak i AT, IC. Oddziaływanie to jest jednak najsilniejsze w przypadku poly(dI-dC)₂, stała wiązania dla poly(dI-dC)₂ oraz poly(dG-dC)₂ jest rzędu 10⁵. Zdecydowanie najsłabsze oddziaływanie zaobserwowano dla poly(dA-dT)₂ ze stałą rzedu 10⁴. Podobne wyniki uzyskano dla tej pochodnej akrydyny we wcześniejszych badaniach [9]. Dla tego polinukleotydu zaobserwowano również zdecydowanie niższą zmianę entalpii swobodnej. Charakterystyczna jest również zależność zmiany entropii w zależności od rodzaju DNA, Ryc. 79.



Rycina 79. Porównanie wartości wybranych funkcji termodynamicznych dla oddziaływania C-1311 z DNA o różnym składzie zasad w buforze fosforanowym o 5 mM stężeniu NaCl w temperaturze 25°C

VI. DYSKUSJA WYNIKÓW

W ramach mojej pracy doktorskiej podjęłam się zbadania procesu tworzenia niekowalencyjnych kompleksów wybranych pochodnych akrydyny z DNA metodą spektroskopii absorpcyjnej UV/VIS oraz izotermicznej kalorymetrii miareczkującej. Do badań wybrałam kilka różnie podstawionych pochodnych akrydyny oraz bromek etydyny, jako związek referencyjny. Badania te przeprowadziłam w buforach o różnym stężeniu NaCl, w celu oceny udziału oddziaływań elektrostatycznych w niekowalencyjnym wiązaniu się wybranych pochodnych z DNA.

Podczas miareczkowania Ledakrinu roztworem ctDNA w buforze o niskiej sile jonowej stwierdziłam, że widmo tego związku w zakresie najbardziej długofalowego pasma absorpcji ulega charakterystycznym zmianom. Charakter i zakres tych zmian zależy przy tym od siły jonowej roztworu (Ryc. 24, Ryc. 31 oraz Ryc. 35). Największe zmiany widm podczas miareczkowania uzyskałam w buforze o niskiej sile jonowej (5 mM NaCl). W buforze zawierającym 50 mM NaCl zmiany te miały odmienny charakter i mniejsze nasilenie, a w buforze o fizjologicznym stężeniu soli zaobserwowałam jedynie nieznaczne zmiany widma. Zastosowanie zaawansowanych technik chemometrycznych do zestawów widm uzyskanych podczas miareczkowania w buforach zawierających 5 i 50 mM stężenie soli umożliwiło mi wyznaczenie widm kompleksów. Widma te różnią się zdecydowanie od siebie położeniem i intensywnością najbardziej długofalowego pasma absorpcji. Inne jest również położenie punktu izosbestycznego. Na zestawie widm uzyskanych w buforze o dużej sile jonowej można dopatrzyć się występowania punktu izosbestycznego przy podobnej długości fali jak w zestawie uzyskanym w buforze o 50 mM stężeniu soli. Wyniki te sugerują, że kompleks powstający w buforze o niskiej sile jonowej może mieć inną strukturę niż kompleks powstający przy 50 i 150 mM stężeniu soli. Potwierdzeniem tej sugestii może być również obserwowana różnica W stechiometrii obu kompleksów: $n_{5NaCl} = 9,29(\pm 0,36),$ $n_{50NaCl} = 6,01(\pm 1,74).$

Ewentualne różnice w strukturze kompleksu mogą być wynikiem postulowanych w literaturze zmian w strukturze DNA w zależności od siły jonowej buforu. Wykazano np., że widmo dichroizmu kołowego DNA zależy od stężenia soli w roztworze. Wzrost stężenia soli prowadzi do zmniejszenia dodatniego pasma z maksimum przy 275 nm oraz małej zmiany w ujemnym paśmie z minimum przy 245 nm. Zmiany te przypisuje się niewielkim zmianom konformacyjnym w strukturze DNA, np. zmianon kąta zwinięcia podwójnej helisy [197]. Przy bardzo dużym stężeniu NaCl (2 M) dochodzi nawet do przejścia DNA z formy B-DNA

do Z-DNA [198]. Podobne przesłanki wynikają również z pomiarów mikrokalorymetrycznych nad wpływem stężenia soli na termodynamikę "topnienia" dwuniciowej struktury DNA [195,199].

Podobny efekt wpływu siły jonowej zaobserwowałam również w przypadku drugiej badanej przeze mnie pochodnej 1-nitroakrydyny, związku C-857. W buforze o niskiej sile jonowej zaobserwowałam wyraźny spadek intensywności pasma długofalowego oraz niewielką zmianę jego kształtu (Ryc. 38), a w obecności 150 mM NaCl zmiany widm są trudne do wykrycia (Ryc. 41).

Tak dramatycznego wpływu siły jonowej przebieg miareczkowania na spektrofotometrycznego nie zaobserwowałam jednak przypadku pochodnej W imidazoakrydonu, związek C-1311. Zestawy widm uzyskane w buforach zawierających 5 i 150 mM steżenie NaCl maja bardzo podobny charakter. Również wyznaczone widma kompleksów są do siebie bardzo podobne (Ryc. 47 i Ryc. 53).

Uzyskane przeze mnie wyniki miareczkowania spektrofotometrycznego wskazują, że technika ta posiada wyraźne ograniczenia i niedogodności przy wyznaczaniu stałej wiązania ligand/DNA. Nawet wykorzystując zaawansowane techniki chemometrycznej analizy widm może być ona z powodzeniem zastosowana jedynie w przypadkach, gdy widmo wolnego ligandu i jego kompleksu różni się istotnie kształtem. Sytuacja taka nie zawsze ma jednak miejsce nawet w przypadku kompleksów interkalacyjnych. Ponadto, przy niewielkich różnicach kształtu widm trudno jest ustalić, czy kompleks ligand/DNA w ogóle powstaje.

Alternatywą dla metod spektrofotometrycznych obecnie szeroko jest wykorzystywana do badań oddziaływań małych ligandów z DNA technika mikrokalorymetryczna [37,38,40,52]. Zastosowana przeze mnie izotermiczna kalorymetria miareczkująca (ITC) pozwoliła mi wyznaczyć podstawowe parametry termodynamiczne dla oddziaływań bromku etydyny, Ledakrinu oraz pochodnej C-1311.

W przypadku pochodnej C-857 obserwowany podczas miareczkowania DNA niewielki efekt cieplny związany jest przede wszystkim z rozcieńczaniem pochodnej. Nie udało mi się wykazać, że w przypadku tego związku dochodzi do tworzenia kompleksu ligand/DNA. Można zatem przypuszczać, iż dla efektywnego powstawania niekowalencyjnych kompleksów 1-nitro-9-aminoakrydyn z DNA ważny jest efekt "zagęszczenia elektrostatycznego" - cząsteczki o charakterze kationowym są przyciągane przez polianionową makrocząsteczkę i ich lokalnie wyższe stężenie ułatwia interkalację pomiędzy pary zasad.

105

Oddziaływanie pochodnej C-1311 w buforze o niskim stężeniu soli jest najsilniejsze: wyznaczona na drodze pomiarów mikrokalorymetrycznych stała wiązania dla tego procesu jest rzędu 10⁶ [M⁻¹], dla bromku etydyny jest rzędu 10⁵, natomiast dla Ledakrinu 10⁴, Tabela 10, Tabela 11 oraz Tabela 13. Prawdopodobnie wyższa stała wiązania uzyskana dla imidazoakrydonu w porównaniu z bromkiem etydyny jest wynikiem obecności w C-1311 łańcucha bocznego, który może tworzyć dodatkowe wiązania w rowkach DNA. Łańcuch taki obecny jest również w przypadku Ledakrinu, pochodna ta jednak posiada grupę nitrową w pozycji 1, która zmienia geometrię cząsteczki. Wykazano, że w pochodnych 1-nitroakrydyny hetroaromatyczny fragment cząsteczki nie jest zupełnie płaski. Tym samym utrudniona jest wówczas interkalacja związku pomiędzy pary zasad DNA [200].

Wielkość miejsc wiązania, n, dla oddziaływania związków z makromolekułą jest różna dla poszczególnych ligandów. Dla bromku etydyny wynosi około 2,5 par zasad na jedną cząsteczkę liganda i jest jedynie nieznacznie zależna od siły jonowej roztworu, Tabela 10. Uzyskana wartość n w zakresie 2,0-6,5 jest zgodna z tym, czego należałoby oczekiwać dla modelu oddziaływań z wykluczeniem najbliższego sąsiada i jest porównywalna z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi dotyczącymi oddziaływania interkalatorów z DNA [201].

W przypadku Ledakrinu gęstość wiązania jest zdecydowanie zależna od stężenia soli, w niskosolnym buforze wynosi 7,75 (\pm 0,21), a dla 150 mM stężenia NaCl spada do 4,60 (\pm 0,10), Tabela 11. Podobną zależność wielkości miejsc wiązania od siły jonowej buforu obserwowałam w przypadku badań spektrofotometrycznych, wówczas 10-krotny wzrost stężenia soli skutkował około 1,5-krotnym spadkiem n, Ryc. 30 i Ryc. 34.

Dla pochodnej C-1311 wielkość miejsc wiązania jest równa około 3,3 par zasad na cząsteczkę związku, i jest jedynie nieznacznie zależna od stężenia soli, Tabela 13.

Na podstawie profili termodynamicznych przedstawionych na Ryc. 76, mogę stwierdzić, że oddziaływanie bromku etydyny, Ledakrinu oraz pochodnej C-1311 z ctDNA jest egzotermiczne we wszystkich badanych warunkach.

Profil termodynamiczny oddziaływania C-1311 z ctDNA jest jednak odmienny w porównaniu z Ledakrinem i bromkiem etydyny, Ryc. 76. Wiązaniu cząsteczki C-1311 do podwójnej helisy towarzyszy silny przyrost entropii, podczas gdy tworzenie kompleksów z bromkiem etydyny lub Ledakrinem związane jest ze spadkiem entropii. Dodatnia zmiana entropii jest charakterystyczna dla oddziaływania związków wiążących się z DNA w małym rowku, co może sugerować, iż łańcuch boczny pochodnej C-1311 lokuje się w rowku podwójnej helisy.

Analiza uzyskanych profili termodynamicznych dla trzech badanych związków w zależności od stężenia NaCl wskazuje, Ryc. 76, że siła jonowa buforu wpływa znacząco zarówno na efekt entropowy, T Δ S, jak i na zmianę entalpii swobodnej, Δ G. Dla wszystkich badanych związków ze wzrostem stężenia soli zaobserwowałam zmniejszenie wartości zmian entalpii swobodnej o 10 do 15%

Stężenie soli ma najsilniejszy wpływ na efekt entropowy oddziaływania Ledakrinu z ctDNA. Wzrost stężenia soli od 5 mM do 100 mM związany jest w przypadku tego związku z podwojeniem spadku entropii podczas tworzenia kompleksu. Prowadzi to do wyraźnej zmiany wzajemnych relacji członów ΔG i T ΔS . O ile w buforze niskosolnym człon entropowy stanowi ok. ½ zmiany entalpii swobodnej o tyle w buforze zawierającym 100 mM NaCl nieznacznie przewyższa on zmianę entalpii swobodnej (Ryc. 76 i Tabela 11). Podobne zmiany profilu termodynamicznego uzyskałam również dla bromku etydyny, jednakże zakres zmian członu entropowego jest w tym przypadku zdecydowanie mniejszy, Tabela 10.

Wzrost siły jonowej ma również bardzo istotny wpływ na efekt entropowy związany z oddziaływaniem C-1311 z DNA, Tabela 13. Wzrost stężenia NaCl od 5 mM do 150 mM wywołuje ok. dwukrotny wzrost dodatniej wartości T Δ S.

Przyjmuje się powszechnie, że w przypadku małocząsteczkowych ligandów oddziałujących z DNA występowanie dużego członu entropowego związane jest ze zmianą składu otoczki hydratacyjnej i elektrycznej warstwy podwójnej partnerów oddziaływania [52]. Nie można, więc wykluczyć, że bardzo silny wpływ stężenia soli na efekt entropowy w przypadku Ledakrinu i C-1311 związany jest z obecnością w cząsteczce tych związków łańcucha aminoalkilowego. Alifatyczna grupa aminowa jest w pH = 7 sprotonowana i jej oddziaływanie z DNA może silnie zależeć od stężenia przeciwjonów w roztworze. W cząsteczce bromku etydyny brak jest łańcucha aminoalkilowego, a dodatni ładunek cząsteczki zdelokalizowany jest w układzie aromatycznym. Należy więc spodziewać się słabszego wpływu stężenia soli na zmiany otoczki hydratacyjnej i elektrycznej warstwy podwójnej.

Zależność stałej wiązania od stężenia NaCl w buforze obserwowana dla wszystkich badanych związków pozwoliła mi wyznaczyć udział oddziaływań elektrostatycznych, ΔG_{pe} , w ogólnej zmianie entalpii swobodnej, ΔG_{obs} , obserwowanej w procesie niekowalencyjnego wiązania badanych ligandów z ctDNA. Dla wszystkich związków wzrost siły jonowej buforu skutkował spadkiem stałej wiązania ligandu. Jednakże tylko w przypadku imidazoakrydonu C-1311 zależność ta miała przebieg zgodny z teorią w całym badanym zakresie stężeń NaCl, Ryc. 74 A. Dla bromku etydyny i Ledakrinu stałe wiązania uzyskane dla buforów o najniższym stężeniu soli zdecydowanie odbiegały od zależności obserwowanej dla wyższych stężeń soli, Ryc. 59 A i Ryc. 63 A. Dla Ledakrinu jest to zgodne z wynikami jakie uzyskałam z miareczkowania spektrofotometrycznego sugerującymi, że w buforze o niskiej sile jonowej powstaje kompleks o innej budowie niż w buforach o wyższym stężeniu soli. Liniowa zależność logarytmu stałej tworzenia kompleksu od logarytmu ze stężenia soli przewidywana na podstawie rozważań teoretycznych zakłada, że w całym badanym zakresie stężeń soli nie zmienia się budowa i charakter kompleksu. W tej sytuacji, dla bromku etydyny i Ledakrinu analizowałam wpływ soli na wartość stałej wiązania tylko w zakresie stężeń soli od 50 do 150 mM.

Dla wszystkich związków wartości ΔG_{pe} maleją ze wzrostem siły jonowej, a wartość zmian entalpii swobodnej oddziaływań nieelektrostatycznych pozostaje na zbliżonym poziomie, i stanowi 80-87% dla bromku etydyny, 55-65% dla Ledakrinu oraz 80-90% dla C-1311 całkowitej zmiany entalpii swobodnej dla tego oddziaływania, Ryc. 59, Ryc. 63, Ryc. 74. Wyższe stężenie soli w buforze powoduje, że jony Na⁺ wchodząc w skład elektrycznej warstwy podwójnej otaczającej makrocząsteczkę utrudniają przyciąganie kationowego liganda w pobliże ujemnie naładowanych grup fosforanowych łańcucha DNA [58]. Przyciąganie to jest najbardziej znaczące (około 40%) dla Ledakrinu, który w warunkach fizjologicznych posiada ładunek dodatni w łańcuchu bocznym. Naładowany atom azotu w łańcuchu bocznym w przypadku pochodnej C-1311 jest związany z dwiema grupami etylowymi, co utrudnia kontakt z grupami fosforanowymi łańcucha DNA. Kation w pierścieniu w przypadku bromku etydyny również jest znacznie trudniej przyciągany w pobliże DNA.

Dzięki wyznaczeniu dla bromku etydyny i imidazoakrydonu C-1311 zmiany pojemności cieplnej, ΔC_p , związanej z utworzeniem kompleksu byłam w stanie oszacować udział poszczególnych rodzajów oddziaływań w ogólnej zmianie entalpii swobodnej, Ryc. 60 i Ryc. 75. W przypadku Ledakrinu, wobec niemożliwości oszacowania zmian pojemności cieplnej, nie byłam w stanie oddzielnie oszacować wpływu oddziaływań hydrofobowych i słabych oddziaływań międzycząsteczkowych, a jedynie ich łączny efekt, Ryc. 64.

Uzyskana dla bromku etydyny i pochodnej C-1311 duża ujemna wartość ΔC_p jest najprawdopodobniej związana z uwalnianiem cząsteczek wody z otoczki hydratacyjnej oraz przeniesieniem niepolarnych części związków ze środowiska wodnego do wnętrza podwójnej helisy DNA [58]. Wyznaczenie wartości ΔC_p dla tych związków umożliwiło wyznaczenie udziału oddziaływań hydrofobowych w procesie, dla bromku etydyny ΔG_{hyd} wynosi
$-25,20(\pm 10)$ kJmol⁻¹, a dla C-1311 $-37,68(\pm 10)$ kJmol⁻¹. Wartości te wskazują na istotny udział tych oddziaływań w procesie tworzenia kompleksu ligand/DNA.

Wyznaczenie pozostałych członów składających się na obserwowaną zmianę entalpii swobodnej umożliwiło oszacowanie czynników stanowiacych siłę napędową reakcji, Ryc. 60, Ryc.64 i Ryc. 74. Dla wszystkich badanych związków dodatnia zmiana entalpii swobodnej wynikająca z utraty swobody rotacji i translacji w wyniku kompleksowania oraz zmian konformacyjnych DNA jest kompensowana przez łączny efekt ΔG_{pe} , ΔG_{hvd} oraz ΔG_{mol} . Duża wartość ΔG_{mol} przypuszczalnie wynika głównie z tworzących się, podczas powstawania kompleksu ligand/ctDNA, nowych słabych oddziaływań międzycząsteczkowych, głównie oddziaływań van der Waalsa i oddziaływań π - π [59]. Oszacowano, iż oddziaływania tego typu występujące pomiędzy aromatycznymi fragmentami cząsteczek prowadzą do uwolnienia energii o wartości -175,56 Jmol⁻¹Å⁻² [202]. Zatem, dla uzyskanej zmiany entalpii $\Delta G_{mol} =$ -70,42 kJmol⁻¹ dla bromku etydyny oraz $\Delta G_{mol} = -77,77$ kJmol⁻¹ dla C-1311 można oszacować, że ok. 400 Å² bromku etydyny i ok. 440 Å² C-1311 uczestniczy w tworzeniu oddziaływań z DNA. Całkowita powierzchnia płaskiego, aromatycznego fragmentu bromku etydyny wynosi 503 Å² [59], zatem około 80% tej części cząsteczki odpowiedzialne jest za tego typu oddziaływania z DNA. Zatem oddziaływanie badanych związków z ctDNA następuje z uwolnienia energii głównie w wyniku przeniesienia aromatycznej cząsteczki z roztworu wodnego do hydrofobowego wnętrza podwójnej helisy DNA oraz powstawania nowych oddziaływań niekowalencyjnych, przede wszystkim oddziaływań van der Waalsa oraz oddziaływań typu π - π .

Wykonałam również badania oddziaływań wybranych związków z DNA o zróżnicowanym składzie zasad, co pozwoliło mi określić preferencje cząsteczek badanych ligandów w stosunku do różnych par nukleotydów. Wszystkie badane związki wykazują zdecydowaną preferencję w stosunku do polinukleotydów zawierających pary GC lub IC, aczkolwiek wiążą się one również do DNA zbudowanego z par AT. Podobną specyficzność sekwencyjną wiązania wykryto również dla oddziaływań innych znanych interkalatorów [10].

Stwierdziłam, że skład DNA wpływa również na profil termodynamiczny oddziaływania, a w szczególności na jego składnik entropowy. Wpływ ten zależy przy tym w charakterystyczny sposób od użytego liganda. W przypadku bromku etydyny, Ryc. 77, podczas oddziaływania z ctDNA o bardzo zróżnicowanej sekwencji par zasad obserwuje się silny ujemny efekt entropowy. Efekt ten ulega znacznemu osłabieniu w przypadku DNA o naprzemiennej sekwencji zasad, a w przypadku sekwencji p(dG-dC)₂ i p(dI-dC)₂ praktycznie zanika. Dla kompleksów z Ledakrinem, Ryc. 78, najsilniejszy spadek entropii stwierdziłam w

przypadku sekwencji $p(dG-dC)_2$, a najsłabszy dla sekwencji $p(dA-dT)_2$. Naturalny DNA o mieszanej sekwencji wykazuje pośrednią wartość efektu entropowego. W przypadku imidazoakrydonu C-1311 porównywalny wzrost entropii stwierdziłam w przypadku ctDNA, $p(dA-dT)_2$ i $p(dI-dC)_2$, Ryc. 79. Wzrost ten jest jednak zdecydowanie słabszy dla sekwencji $p(dG-dC)_2$.

Tak zróżnicowany obraz profili termodynamicznych sugeruje wyraźnie, że na końcowy efekt termiczny oddziaływania, wartości Δ H, ma wpływ nie tylko nasilenie i rodzaj oddziaływań pomiędzy partnerami (wartości Δ G), ale także efekty entropowe związane ze zmianami uporządkowania cząsteczek rozpuszczalnika i jonów soli zawartych w buforze.

Reasumując, zastosowanie przeze mnie techniki mikrokalorymetrycznej pozwoliło na głębsze wniknięcie w naturę badanych oddziaływań niż jest to możliwe przy użyciu miareczkowania spektrofotometrycznego. Wyznaczone parametry termodynamiczne umożliwiły określenie czynników stanowiących siłę napędową badanych oddziaływań. Wyniki stanowią uzupełnienie badań prowadzonych dotychczas w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej a dotyczących mechanizmu przeciwnowotworowego działania pochodnych akrydyny.

Uzyskane opisy termodynamiczne nie tylko dostarczają nowych danych, ale również skłaniają do sformułowania nowych pytań związanych z pełną interpretacją uzyskanych wyników. Dotyczy to w szczególności pełnego wyjaśnienia przyczyn zmienności efektów entropowych oddziaływania w zależności od: i) składu buforu, ii) budowy liganda oraz iii) sekwencji par zasad DNA.

VII. LITERATURA

1 Wraight CJ, White PJ (2001) Antisense oligonucleotides in cutaneous therapy. Pharmacol Ther 90: 89-104

2 Zamecnik PC, Stephenson ML (1978) Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. Proc Natl Acad Sci U S A 75:280-284.

3 Heidenreich O, Kang S-H, Xu X, Nerenberg M (1995) Application of antisense technology to therapeutics. Mol Med Today 1: 128-133

4 Torchilin VP, Lukyanov AN (2003) Peptide and protein drug delivery to and into tumors: challenges and solutions. Drug Discov Today 8: 259-266

5 Chaires JB (1998) Drug-DNA interactions. Curr Opin Struct Biol.8: 314-320

6 Haq I (2002) Part II: The thermodynamics of drug-bipolymer interaction. Thermodynamics of drug-DNA interactions. Arch Bioch Biophys 403: 1-15

7 Luzzati V, Masson F, Lerman LS (1961) Interaction of DNA and proflavine: a small-angle x-ray scattering study. J Mol Biol 3: 634-639

8 Suh D, Chaires JB (1995) Criteria for the mode of binding of DNA binding agents. Bioorg Med Chem 3: 723-728

9 Dzięgielewski J (1998) Badanie mechanizmu działania przeciwnowotworowego imidazoadrydonów. Rozprawa doktorska, Politechnika Gdańska

10 Ren J, Chaires JB (1999) Sequence and structural selectivity of nucleic acid binding ligands. Biochemistry 38: 16067-16075

11 Tanious FA, Yen SF, Wilson WD (1991) Kinetic and equilibrium analysis of a threading intercalation mode:DNA sequence and ion effects. Biochemistry 30: 1813-1819

12 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: 2422-2426

13 Williams LD, Gao Q (1992) DNA-ditercalinium interactions: implications for recognition of damaged DNA. Biochemistry 31: 431543-24

14 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: 2155-2159

15 Tayeb-bel Haj H, Salerno M, Priebe W, Kozłowski H, Garnier-Suillerot A (2003) New Finding in the study on the intercalation bisdaunorubicin and its monomeric analogues with naked and nucleus DNA. Chem Biol Interact 145: 349-358

16 Portugal J, Cashman DJ, Trent JO, Ferrer-Miralles N, Przewloka T, Fokt Izabela, Priebe W, Chaires JB (2005) A new bisintercalating anthracycline with picomolar DNA binding affinity. J Med. Chem, 48: 8209-8519

17 Stańczak A, Szumilak M (2009) Bisinterkalatory jako potencjalne leki przeciwnowotworowe. Wiadomości Chemicznych, 63: 847-875

18 Veal JM, Li Y, Zimmerman SC, Lamberson CR, Cory M, Zon G, Wilson WD (1990) Interaction of a macrocyclic bisacridine with DNA. Biochemistry 29: 10918-10927

19 Wirth M, Buchardt O, Koch T, Nielsen PE, Norden B (1998) Interactions between DNA and monobis-, tris-, tetrakis-, and hexakis(aminoacridines). A linear and circular dichroism, electric orientation relaxation, viscometry, and equilibrium study. J Am Chem Soc 110: 932-939

20 Wang AHJ, Teng M (1990) Crystallographic and modeling methods in molecular desing. Springer-Verlag New York str.123-150

21 Wemmer DE (2000) Designed sequence-specific minor groove ligands. Annu Rev Biophys Biomol Struct 29: 439-461

22 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

23 Wang L, Kumar A, Boykin DW, Bailly C, Wilson WD (2002) Comparative thermodynamics for monomer and dimer sequence-dependent binding of a heterocycic dication in the DNA minor groove. J Mol Biol 317: 361-374

24 Woods CR, Faucher N, Eschgfaller B, Bair KW, Boger DL (2002) Synthesis and DNA binding properties of saturated distamycin analogues. Bioorg Med Chem Lett 12: 2647-2650

25 Wemmer DE, Dervan PB (1997) Targeting the minor groove of DNA. Cur. Opin Struct Biol 7: 355-61

26 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. J Mol Biol 271: 244-257

27 Braithwaite AW, Baguley BC (1980) Existence of an Extended Series of Antitumor Compounds Which Bind to Deoxyribonucleic Acid by Nonintercalative Means. Biochemistry 19: 1101-1106

28 Barcelo F, Ortiz-Lombardia M, Portugal J (2001) Heterogeneous DNA binding modes of berenil. Biochim Biophys Acta 1519: 175-184

29 Wemmer DE, Dervan PB (1997) Targeting the minor groove of DNA. Curr Opin Struct Biol 7: 355-361

30 Wilson WD, Tanious FA, Barton HJ, Jones RJ, Fox K, Wydra RL, Strekowski L (1990) DNA sequence dependent binding modes of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Biochemistry 29: 8452-8461.

31 Goldberg IH (1971) The interaction of actinomycin with DNA. Antibiot Chemother 17: 67-86

32 Wang J, Oysoy M, Cai X, Rias G, Shiraishi H, Grant DH, CHicharro M, Fernandes J, Palecek E (1998) Interations of antitumor drug daunomycin with DNA in solution and at the surface. Bioelectrochem Bioenergetics 45: 33-40

33 Li N, Ma Y, Yang C, Guo L, Yang X (2005) Interaction of anticancer drug mitoxantrone with DNA analyzed by electrochemical and spectroscopic methods. Biophys Chem 116: 199–205

34 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: 267-277

35 Chaires JB, Leng F, Przewloka T, Fokt I, Ling YH, Perez-Soler R, Priebe W (1997) Structurebased desing of a new bisintercalating anthracycline antibiotic. J Med Chem 40: 261-266

36 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

37 Holdgate GA, Ward WHJ (2005) Measurements of binding thermodynamics in drug discovery. Drug discovery today 22: 1543-1550

38 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: 321-337

39 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: 801-816

40 Ladbury JE (2002) Isothermal titration calorimetry: application to structure-based drug design. Thermochimica acta 380: 209-215

41 Seeman NC, Rosenberg JM, Rich A (1976) Sequence-specific recognition of double helical nucleic acids by proteins. Proc Nat Acad Sci USA 73: 804-808

42 Davis TM, Wilson WD (2001) Surface plasmon resonance biosensor analysis of RNA-small molecule interactions. Methods Enzymol 340: 22-51

43 Tellinghuisen J (2004) Van't Hoff analysis of K (T): How good ...or bad? Biophys Chem 326: 125-127

44 Todd MJ, Gomez J (2001) Enzyme kinetics determined using calorimetry: a general assay for enzyme activity? Analytic Biochem 296: 19-23

45 Spencer SD, Raffa RB (2004) Isothermal titration calorimetric study of Rnase-A kinetics (cCMP \rightarrow 3'-CMP) involving end-poduct inhibition. Pharmceutic Reas 21: 1642-1647

46 Naghibi H (1995) Significanst discrepancies between van't Hoff and calorimetry enthalpies. Proc Natl Acad 92: 5597-5599

47 Liu Y, Sturevant JM (1995) Significanst discrepancies between van't Hoff and calorimetry enthalpies. II. Protein science 4: 2559-2561

48 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

49 Chaires JB (1998) Energetics of Drug-DNA Interactions. Biopolymers 44: 201-215

50 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

51 Holdgate GA (2001) Making cool drugs hot: isothermal titration as a tool to study binding energetics. Biotechniques 31: 164-184

52 Ward WHJ, Holdgate GA (2001) Isothermal titration calorimetry in drug discovery. Prog Med Chem 38: 309-376

53 Kwong P (2002) HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites. Nature 420: 678-682

54 Lin Z (1995) The hydrophobic nature of GroEL-substrate binding. J Biol Chem 270: 1011-1014

55 Record MT, 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. Quart Rev Biophys 11: 103-178

56 Jain S, Zon G, Sundaralingam M (1989) Base only binding of spermine in the deep groove of the A-DNA octamer d(GTGTACAC). Biochemistry 28: 2360–2364

57 Tabernero L, Verdaguer N, Coll M, Fita I, van der Marel GA, van Boom JH, Rich A, Aymamí J (1993) Molecular structure of the A-tract DNA dodecamer d(CGCAAATTTGCG) complexed with the minor groove binding drug netropsin. Biochemistry 32: 8403-8410

58 Brown DG, Sanderson MR, Garman E, Neidle S (1992) Crystal structure of a berenild(CGCAAATTTGCG) complex. An example of drug-DNA recognition based on sequence-dependent structural features. J Mol Biol 20: 481-490

59 Ren J, Jenkins TC, Chaires JB (2000) Energetics of DNA intercalation reactions. Biochemistry 39: 8439-8447

60 Baginski M, Polucci P, Antonini I, Martelli S (2002) Binding free energy of selected anticancer compaunds to DNA-theoretical calculations. J Mol Model 32: 25-32

61 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

62 Manzini G, Xodo L, Barcellonal ML, Quadrifoglio F (1985) Interaction of DAPI with doublestranded ribonucleic acids. Nucleic Acids Res 13: 8955-8967

63 Freyer M, Buscaglia R, Nguyen B,Wilson WD, Lewis EA (2006) Binding of netropsin and 4,6diamidino-2-phenylindole to an A2T2 DNA hairpin: A comparison of biophysical techniques. Anal Biochem 355: 259-266

64 Wilson WD, Tanious FA, Barton HJ, Jones RJ, Fox K, Wydra RL, Strekowski L (1990) DNA sequence dependent binding modes of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Biochemistry 29: 8452-8461

65 Acheson RM (1956) Acridines, Intersience, New York

66 Wolfe AD (1975) Quinacrine and other acridines in: J.W. Corocoran and F.E. Hahn, Antibiotics, Vol.III, Mechanism of Action of Antimicrobial and Antitumor Agents, Spinger Varlag, Berlin-Heidelbrger

67 Cain BF, Atwell GJ (1976) Potential antitumor agents. 20, Structure-activity-site relationships for the 4'-(9-acridinylamino)alkane sulonanilides, J Med Chem 19: 1409-1416

68 Chen TK, Fico R, Canllakis ES (1978) Diacridines, bifunctional intercalators. Chemistry and antitumor activity. J Med Chem 21: 868-874

69 Bradley DF,Wolf MK (1959) Aggregation of dyes bound to polyanions. Proc Natl Acad Sci USA 45:944-952

70 Demeunynck M, Charmantray F, Martelli M (2001) Interest of acridine derivatives in the anticancer chemotherapy. Curr Pharm Des 7:1703-1724

71 Terzaghi E, Okada Y, Streisinger G, Erich J, Innouye M, Tsugita A (1966) Change of a sequence of amino acids in phage T4 lysozyme by acridine-induced mutations Proc Natl Acad Sci USA 56: 500-507

72 Ferguson LR, Denny WA (2007) Genotoxicity of non-covalent interactions:DNA intercalators. Mutat Res 623:14-23

73 Sanchez-Carrasco S, Delcros JG, Moya-Garcia AA, Sanchez-Jimenez F, Ramirez FJ (2008) Study by optical spectroscopy and molecular dynamics of the interaction of acridine-spermine conjugate with DNA. Bioph Chem 133: 54-65

74 Fkyerat A, Demeunyck M, Constant J-F, Michon P, Lhomme J (1993) A new class of artificial nucleases that recognize and cleave apurine sites in DNA with great selectivity and afficiency. J Am Chem Soc 115:9952-9959

75 Belmont P, Jourdan M, Demeunynck M, Constant J-F, Garcia J, Lhomme J (1999) Abasic site recognition in DNA as a new strategy to potentiate the action of anticancer alkylating drugs? J Med Chem 42:5153-5159

76 Blade A, Peacocke AR (1968) The interaction of aminoacridines with nucleic acids. Biopolymers, 6: 1225-1253

77 Konopa J, Ledóchowski A, Matuszkiewicz A, Jereczek-Morawska E (1969) In vitro studies on the cytotoxic properties of 9-amino-nitroacridine derivatives. Neoplasma 16: 171-179

78 Ledóchowski A, Ledóchowski Z, Stefańska B, Radzikowski C Patent polski Nr P. 104655

79 Ledóchowski A (1976) Ledakrin-anticancerous medicine 1-nitro-9(3dimethyloaminopropylamino)acridine -2HCl-H2O. Materia Medica Polona 8: 237-251

80 Radzikowski C (1976) Ledakrin – a new polish antitumor drug. Materia Medica Polona 8: 56-57

81 Krzyzowska-Gruca S, Gruca S, Kwaśniewska-Rokicińska C, Vorbrodt A (1973) Nuclear and nucleolar ultrastructural lesions induced by 1-nitro-9-aminoacridine (C-283) in human ovarian carcinoma cells. Eur J Cancer 9: 785-788.

82 Rogalski E, Domagala J, Kolodziej J (1976) Results of combined treatment withlung tissue resection and simultaneous administration of Ledakrin in bronchial carcinoma. Mater Med Pol 3: 311-315

83 Piotrowska-Sowińska J (1976) Clinical observations of the Ledakrin effects in treatment of patients with malignant neoplasms. Mater Med Pol. 8: 266-272

84 Bratkowska-Seniów B, Dziedzic J, Fengler I, Steuden W, Szymaniec S, Wysocka M (1976) Morphologic blood pattern in patients treated with Ledakrin. Mater Med Pol 8: 295-301

85 Glazman-Kuśnierczyk H, Radzikowski C, Budzyński W, Paprocka M (1982) Studies on antitumor and myelotoxic effect of Ledakrin and its selected analogues. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 30: 385-393.

86 Gieldanowski J, Patkowski J, Szaga B, Teodorczyk J (1972) Preclinical pharmacologic investigations on 1-nitro-9-(dimethylaminopropylamino)-acridine and its N-oxide. I. Acute and subchronic activity. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 20: 399-417.

87 Kołdej K (1976) O oddziaływaniach Ledakrinu z kwasem dezoksyrybonukleinowym. Rozprawa doktorska, Politechnika Gdańska

88 Konopa J, Chotkowska E, Kołdej K, Pawlak JW, Wojnarowski JM (1976) Studies on the mechanizm of antitumor activity of Ledakrin. Materia Medica Pol 3: 258-265

89 Filipski J, Marczyński B, Chorąży M (1975) Complexes of derivatives of 1-nitro-9-aminoacridine with DNA. Acta Biochim Polon 2: 119-129

90 Pawlak K, Matuszkiewicz A, Pawlak JW, Konopa J (1983) The mode of action of cytotoxic and antitumor 1-nitroacridenes. I. the 1-nitroacridines do not exert their cytotoxic effects by physicochemical binding with DNA. Chem-Biol Interact 43: 131-149

91 Wilson WR, Denny WA, Twigden SJ, Baguley BC, Probert JC (1984) Selective toxicity of nitracrine to hypoxic mammalian cells. Br J Cancer 49: 215-223

92 Wang JC (1974) The degree of unwinding of the DNA helix by ethidium. I. Titration of twisted PM2 DNA molecules in alkaline cesium chloride density gradients. J Mol Biol 89: 783-801

93 Scatchard G (1949) Tha attraction of proteins for small molecules and ions. Ann NY Acad Sci 51: 660

94 Wolfe AD, Cook TM, Hahn FE (1971) Antibacterial nitroacridine, nitraocridin 3582: binding to nucleic acids in vitro and effects on selected cell-free model systems of macromolecular biosynthesis. J Bacteriol 108: 1026-1033

95 Wilson WR, Baguley BC, Wazelin LPG, Wargin MJ (1981) Interaction of the antitumor drug 4'- (9-acridinyl-amino)methanesulfon-m-aniside and related acridines with nucleic acids. Mol Pharmacol 20: 404-406

96 Konopa J, Pawlak JW, Pawlak K (1983) The mode of action of cytotoxic and antitumor 1nitroacridines.III. In vivo interstand cross-linking of DNA of mammalian or bacterial cells by 1nitroakridines. Chem-Biol Interact 43: 175-197

97 Dzięgielewski J, Ślusarski B, Konitz A, Skałdanowski A, Konopa J(2002) Intercalation of imidazoacridinones to DNA and its relevance to cytotoxic and antitumor activity. Biochem Pharmacol 63: 1653-1662

98 Dzięgielewski J, Składanowski A, Konopa J (1996) Noncovalent binding of potent imidazoacridinones to DNA. Ann Oncol 7 (Suppl1)

99 Burger AM, Jenkins TC, Double JA, Biddy MC (1999) Cellular uptake cytotoxicity and DNA dinding studies of the novel imidazoacridinone antineoplastic agent C-1311. Br J Cancer 81: 367-375

100 Berger B, Marquardt H, Westendorf J (1996) Pharmacological and toxicological aspects of new imidazoacridinone antitumor agents. Cancer Res 56: 2094-2104

101 Koba M, Konopa J (2007) Interactions of antitumor triazoloacridinones with DNA. Acta Biochim Pol 54:297-9306

102 Cain B, Atwell G, Denny W (1975) Potential antitumor agents. 16.4'-(Acridin-9-ylamino)methanesulfonanilides. J Med Chem 18: 1110-1117

103 Marsoni S, Wittes R (1984) Clinical development of anticancer agents. National Cancer Institute perspective. Cancer Treat Rep 68: 77-85

104 Winton EF, Hearn EB, Vogler WR, Johnson L,Logan T, Raney M (1983) Amsacrine in refractory adult acute leukemia: a pilot study of the Southeastern Cancer Study Group. Cancer Treat Rep 67: 977-980

105 Legha S, Kearing MJ, McCredie KB, Bodey GP, Freireich E (1982) Evaluation of AMSA in previously treated patients acute leukemia: results of terapy in 109 adults. Blood 60: 484-490

106 Cassileth PA, Gale RP (1986) Amsacrine: a review. Leuk Res 10: 1257-1265

107 Wadkins RM, Graves DE (1989) Thermodynamics of the interactions of m-AMSA and o-AMSA with nucleic acids: influence of ionic strength and DNA base composition. Nucleic Acids Res 17: 9933-9946

108 Cirilli M, Bachechi F, Ughetto G, Colonna FP, Capobianco ML (1993) Interactions between morpholinyl anthracyclines and DNA. The crystal structure of a morpholino doxorubicin bound to d(CGTACG). J Mol Biol 230: 878-889

109 Quigley GJ, Wang AH, Ughetto G, van der Marel G, van Boom JH, Rich A (1980) Molecular structure of an anticancer dru-DNA complex: daunomycin plus d)CpGpTpApCpG). Proc Natl Acad Sci USA 77: 7204-7208

110 Chen K-X, Gresh N, Pullman B (1988) Energetics and stereochemistry of DNA complexation with the antitumor AT specific intercalators tirone and m-AMSA. Nucleic Acids Res 16: 3061-3073

111 Denny W, Twigden SJ. Baguley BC (1986) Streic constraints for DNA binding and biological activity in the amsacrine series. Anticancer Drug Des 1: 125-132

112 Wadkins RM, Graves DE (1991) Interactions of anilinoscridines with nucleic acids: effects of substituent modifications on DNAbinding properties. Biochemistry 30: 4277-4283

113 Robinson MJ, Osheroff N (1990) Stabilization of the topoisomerase II-DNA cleavage complex by antineoplastic drugs: inhibition of enzyme-mediated DNA relegation by 4'-(9-acridinylamino)methanesulfon-m-anisidide. Biochemistry 29: 2511-2514

114 Sorensen BS, Sinding J, Andersen AH, Alsner J, Jensen PB, Westergaard O (1992) Mode of action of topoisomerease II-targeting agents at a specific DNA sequence. Uncoupling the DNA binding, cleavage and relegation events. J Biol Chem 228: 778-786

115 Marsh KL, Willmore E, Tinelli S, Cornarotti M, Meczes EL, Capranico G, Fisher LM, Austin CA (1996) Amsacrine-promoted DNA cleavage site determinants for the two human DNA topoisomerase II isoforms alpha and beta. Biochem Pharmacol 52: 1675-1685

116 Hartley JA, Reszka K, Zuo ET, Wilson WD, Morgan AR, Lown JW (1998) Characteristics of the interaction of anthrapyrazole anticancer agents with deoxyribonucleic acids: structural requirements for DNA binding, intercalation, and photosensitization. Mol Pharmacol 33: 265-271

117 Esnault C, Roques BP, Jacquemin-Sablon A, Le Pecq JB (1984) Effects of new antitumor bifunctional intercalators derived from 7H-pyridocarbazole on sensitive and resistant L 1210 cells. Cancer Res 44: 4355-4360

118 Garg R, Denny WA, Hansch C (2000) Comparative QSAR studiem on substitued Bis-(acridimes) and Bis-(phenazines)-Carboxamides: a new class of anticancer agents., Bioorg Med Chem 8: 1835-1839

119 Lorente A, Vazquez YG, Fernandez M-J, Fernandez A (2004) Bisacridines with aromatic linking chains. Synthesis, DNA interation, and antitumor activity. Bioorg Med Chem 13: 4307-4312

120 Andrew H, Wang J, Neidle S, Waring M (1993) Molecular aspects of anticancer dA interactions. CRC Press, Boca Raton, Florida (rozdział 2)

121 Reinhardt CG, Krugh TR (1978) A comparative study of ethidium bromide complexes with dinucleotides and DNA: direct evidence for intercalation and nucleic acid sequence preferences. Biochemistry 17: 4845-4854

122 Seeman NC, Rosenberg JM, Rich A (1976) Sequence-specific recognition of double helical nucleic acids by proteins. Proc. Natl.Acad. Sci. USA 73:, 804-808

123 Gaugain B, Markovits J, Le Pecq J-B, Roques BP (1981) Hydrogen bonding in deoxyribonucleic acid base recognition. 1. Proton nuclear magnetic resonance studies of dinucleotide-acridine alkylamide complexes. Biochemistry 20:3035-3042

124 Delbarre A, Delepierre M, Garbay C, Igolen J, Le Pacq J-B, Roques BP (1987) Geometry of antitumor drug Ditercalinium bisintercalated into d(CpGpCpG)2 by 1H NMR. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84; 2155-2159

125 Markovits J, Garbay-Jaureguiberry C, Proques BP, Le Pecq J-B. (1989) Acridine dimmers: influence of the intercalating ring and of the linking-chain nature on the equilibrium and kinetic DNA-binding parameters. Eur J Biochem 180: 359-366

126 Gaugain B, Markovits J, Le Pecq J-B, Roques BP (1984) DNA polyintercalation: comparison of DNA binding properties of an acridine doimer I trimer. Eur J Biochem. 169: 123-126

127 Wakelin LP (1986) Polyfunctional DNA intercalating agents. Med Res Rev 6: 275-340.

128 Acheson RM, Taylor GN, Waring MJ, Haylock S, Abel G (1985) The intercalative DNA binding and antitumor activity of some bis-acridines related to nitracrine., Chem Biol Interact 53: 371-375

129 Cohen SS (1998) Molecural effects on internal cellular polymers: transfer RNA and DNA. A guide for the polyamines. Oxford Univ Press, New York

130 Thomas T, Thomas TJ (2001) Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanism and theraputic application. Cell Mol Life Sci 58: 244-258

131 Bachrach U (2004) Polyamines and cancer: minireview article. Amino Acids 26: 307-309

132 Bachrach U, Bekierkunst A, Abzug S (1967) The occurerence of putrescine, spermidine and spermie in Ehrlich ascites cells. Isr J Med. Sci 3: 474-477

133 Williams-Ashman HG, Coppope GL, Weber G (1972) Imbalance in ornithine metabolism in formation of putrescine, spermidine and spermine. Cancer Res 32: 1924-1932

134 Russell DH, Durie BGM (1978) Polyamines as biochemical markers of normal and malignant growth. Raven Press New York

135 Raspaud E, Olvera de la Cruz M, Sikorav JL, Livolant F (1998) Precipitation of DNA by polyamines: a polyelectrolyte behavior. Biophys J 74: 381-393

136 Pelta J, Livolant F, Sikorav JL (1996) DNA aggregation induced by polyamines and cobalthexamine. J Biol Chem 271: 5656-5662

137 Esposito D, Del Vecchio P, Barone G (1997) Interations with natural polyamines and thermal stability of DNA: a DSC study and a theoretical reconsideration. J Am Chem Soc 119: 2606-2613

138 Ruiz –Chica J, Medina MA, Sanchez-Jimenez F, Ramirez FJ (2001) Fourier transform Raman study of the structural specificities on the interaction between DNA and biogenic polyamines. Biophys J 80: 443-454

139 Blagbrough LS, Taylor S, Carpenter ML, Novoselkiy V, Shamma T, Haworth LS (1998) Asymetric intercalation of N1-(acridin-9-ylcarbyl)spermine at homopurine sites of duplex DNA. Chem Commun 929-930

140 Wang L, Price HL, Juusola J, Kline M, Phanstiel IV O (2001) The influence of polyamine architecture on the transport and topoisomerase II inhibitory properties of polyamine DNA-itercalator conjugates. J Med Chem 44: 3682-3691

141 Seiler N, Dezeure F (1990) Polyamine transport in mammalian cells. Int J Biochem Cell Biol 22: 211-218

142 Khan NA, Fardel O, Havouis R, Fauchet R, Moulinoux JP (1994) Transport and metabolism of polyamines in wild and multidrug resistant human leukemia (K 562) cells. Leuk Res 18: 283-291

143 Seiler N, Delcros JG, Moulinoux J-P (1996) Polyamine transport in mammalian cells. An update. Int J Biochem Cell Biol 28: 843-861

144 Perez-Florez L, Ruiz –Chica J, Delcros JG, Sanchez-Jimenez F, Ramirez FJ (2008) Effect of spermine conjugation on the interaction of acridine with alternating purine-pyrimidine oligodeoxyribonucleotides studied by CD, fluorescence and absorption spectroscopies. Spetrochimica Acta part A 69: 1089-1096

145 Larsen AK, Escargueil AE, Skladanowski A (2003) Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. Pharmacol Ther, 99: 167–181.

146 Marco E, Laine W, Tardy C, Lansiaux A, Iwao M, Ishibashi F, Bailly C, Gago FJ (2005) Molecular determinants of topoisomerase I poisoning byLamellarins: comparison with camptothecin and structure–activityrelationships. Med Chem 48: 3796–3807.

147 Kapuściński J., Darzynkiewicz Z.: "Interactions of antitumor agents ametantrone and mitoxantrone (Novatrone) with double-stranded DNA", Biochem Pharmacol., 34, 1985, 4203-4213

148 Pizzo V, Sacchi N, Menozzi M (1969) Kinetic studies of anthracycline-DNA interaction by fluorescencje Stoppel flow confirm a complex association mechanizm. Biochemistry 28: 461-477

149 Johnson RK, Zee-Cheng RK, Lee WW, Acton EM, Henry DW, Cheng CC (1979) Experimental antitumor activity of aminoanthraquinones. Cancer Treat Rep 63: 425-439

150 Gniazdowski M, Szmigiero L (1981) Coplexes of nitracrine with DNA. Arzneim-Forsch/Drug Res 31: 1875-1877

151 Gniazdowski M, Szmigiero L (1995) Nictracrine and its congeners-an overview. Gen Pharmac 26: 473-481

152 Wilmańska D, Małagocka E, Szmigiero L, Gniazdowski M (1984) Effect of intercalating and groove-binding ligands on formation of covalent complexes between nitracrine (Ledakrin, C-283) or 8-methoxypsoralen and DNA. Biochim Biophys Acta. 18: 285-294.

153 Wilmańska D, Szmigiero L, Gniazdowski M (1989) In vitro binding of nitracrine to DNA in chromatin. Z Naturforsch [C]. 44: 307-311.

154 Pawlak JW, Konopa J (1979) In vitro binding of metabolically activated [14C]-Ledakrin, or 1nitro-9-14C-(3'-dimethylamino-N-propylamino)acridine, a new antitumor and DNA cross-linking agent, to macromolecules of subcellular fractions isolated from rat liver and HeLa cells. Biochem Pharmac 28: 3391-3402

155 Konopa J, Koldej K, Pawlak JW. (1976) Covalent binding of 1-nitro-9-(3-dimethyl-n-propylamino) acridine, a new antitumor drug, to DNA of Ehrlich ascites tumor cells in vivo, Chem Biol Interact, 13, 99-103

156 Gorlewska K, Mazerska Z, Sowiński P, Konopa J (2001) Products of metabolic activation of antitumor drug Ledakrin (Nitracrine) in vitro. Chem Res Toxicol 14: 1-10

157 Pawlak JW, Pawlak K, Konopa J (1983) The mode of action of cytotoxic and antitumor 1nitroacridines. II. In vitro enzyme mediated covalent binding of a 1-nitroacridine derivative mammalian or bacterial cells. Chem Biol Interact 43: 151-173

158 Bartoszek A, Dackiewicz P, Składanowski A, Konopa J (1997) In Vitro DNA crosslinking by Ledakrin, an antitumor derivative of 2-nitro-9-aminoacridine. Chemico –Biological Inter 103: 141-151

159 Pawlak K, Pawlak JW, Konopa J (1984) Cytotoxic and antitumor activity of 1-nitroacridines as an aftereffect of their interstrand DNA cross-linking. Cancer Res 44: 4289-4296

160 Mazerska Z, Dziegielewski J, Konopa J (2001) Enzymatic activation of a New antitumor drug, 5diethylaminoethylamino-8-hydroxyimidazoacridinone, C-1311, observed after its intercalation into DNA. Biochem Pharmacol 61: 685-694

161 Mazerska Z, Zapomni S, Marassi R, Sowiński P, Konopa J (2002) The products of electro- and photochemical oxidation of 2-hydroxyacridinone, the reference compound of antitumor imidazoacridinene derivatives. J Electroanalytical Chem 521: 144-154

162 Augustin E, Moś-Rompa A, Skwarska A, Konopa J (2006) Induction of G2/M phase arrest and apoptosis of human leukemia cells by potent antitumor triazoloacridinone C-1305. Biochem Pharmacol 72: 1668-1679

163 Koba M (2003) Wiązanie sie z DNA oraz jego międzyłańcuhcowe sieciowanie przez triazoloakrydony i aktynomycynę D. Rozprawa doktorska, Politechnika Gdańska

164 Friedberg EC, Walker GC, Siede W (1995) DNA repair and mutagenesis. American Society for Microbiology, Washington

165 Matthews H R, Freedland RA, Miesfeld RL (1999) Biochemia i biologia molekularna w zarysie. Prószyński i S-ka

166 Lindahl T (2001) Keynote: past, present, and future aspects of base excision repair. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 68.

167 Wilson SH (1998) Mammalian base excision repair and DNA polymerase beta. Mutat Res 407: 203-215

168 Kwaśniewska A (2005) Badanie własności fizykochemicznych, biochemicznych i biologicznych nowych pochodnych nitroakrydyny z 2,6-diamino-9-(10-amino-3,7-diazadecylo)-9H-puryną o aktywności syntetycznej nukleazy w łańcuchu bocznym. Praca dyplomowa, Wydział Chemiczny PG,

169 Bhadra K, Maiti M, Kumar GS (2007) Molecular regognition of DNA by small malecules: AT base pair specific intercalative binding of cytotoxic plant alkaloid palmatine. Biochem Biophys Acta 1770:1071-1080

170 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

171 Barcelo F, Scotta C, Ortiz-Lambardia M, Mendez C, Salas JA, Portugal J (2007) Entropicallydriven binding of mithramycin in the minor groove of C/G-rich DNA sequence. Nucleic Acids Res 35:: 2215-2226

172 Sharaf MA, Ullman DL, Kowalski BR (1998) Chemometrics. Wiley, New York

173 Findeisen W, Szymanowski J, Wierzbicki A (1980) Teoria i metody obliczeniowe optymalizacji. W-wa: PWN

174 Brandt S (1998) Analiza danych W-wa: PWN

175 Mazerski J (2004) Podstawy chemometrii. Wydawnicwto Politechniki Gdańskiej

176 Kramer R (1998) Chemometric Techniques for Quantitative Analysis. Marcel Dekker, New York

177 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: 4613-4618.

178 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

179 Bradley DF, Wolf MK (1959) Aggregation of dyes bound to polyanions. Proc Natl Acad Sci U S A 45: 944-952

Bradley DF, Felsenfeled G (1959) Aggregation of an acridine dye on native and denatured deoxyribonucleates. Nature 184: 1920-1922

181 Chaires JB, Dattagupta N, Crothers DM (1982) Self-Association of Daunomycin. Biochemistry 21: 3927-3932.

Menozzi M, Valentini L, Vannini E, Arcamone F (1984) Self-Association of Doxorubicin and Related Compounds in Aqueous Solution. J Pharm Sci 73: 766-770

Wilson WD, Lopp IG (1979) Analysis of cooperativity and ion effects in the interaction of quinacrine with DNA. Biopolymers 18: 3025-3041

184 Friedman RA, Manning GS (1984) Polyelectrolyte effects on site-binding equilibria with application to the intercalation of drugs into DNA. Biopolymers 23: 2671-2714

MacGregor RB Jr, Clegg RM, Jovin TM (1987) Viscosity dependence of ethidium-DNA intercalation kinetics. Biochemistry, 26: 4008-4016

Finkelstein AV, Janin J (1989) The price of lost freedom: entropy of bimolecular complex formation. Protein eng, 3:1-3

Searle MS, Williams DH (1992) The cost of conformational order: entropy changes in molecular association. J Am Chem Soc 114: 10690-10697

Spolar RS, Record MT (1994) Couplong of local folding to site-specific binding of proteins to DNA. Science 263: 777-783

189 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

190 Chaires JB (2008) Calorimetry and thermodynamics in drug design. Annu Rev Biophys 37: 135-151

191 Chaires JB (2006) A thermodynamic signature for drug-DNA binding mode. Arch Biochem Biophys 453: 26-31

Ward WH, Holdgate GA (2001) Isothermal titration calorimetry in drug discovery. Prog Med Chem 38: 309-376.

Guthrie KM, Parenty ADC, Smith LV, Cronin L, Cooper A (2007) Microcalorimetry of interaction of dihydro-imidazo-phenanthridinium (DIP)-based compounds with duplex DNA. Biophys Chem 129: 117-123

Kapuscinski J, Darzynynkiewicz Z (1985) Interactions of antitumor agents ametantrone and mitoxantrone (Novatrone) with double –stranded DNA. Biochem Pharmacol 34: 4203-4213

195 Chalikian TV, Volker J, Plum GE, Breslauer KJ (1999) A more unified picture for the thermodynamics of nucleic acid duplex melting: a characterization by calorimetry and volumetric techniques. Proc Natl Acad Sci USA 96: 7853-7858

196 Kapuscinski J, Darzynkiewicz Z (1987) Interactions of acridine orange with double stranded nucleic acids spectral and affinity studiem. J Biomol Struct Dyn 5: 127-143

197 Hanlon S, Brudno S, Wu TT, Wolf B (1975) Structural transitions of deoxyribonucleic amid In aqueous elektrolyte solution. I. Reference spectra of conformational limits. Biochemistry 14: 1648-1660

Chan A, Kilkuskie R, Hanlon S(1979) Correlations between the duplex winding angle and the circular dichroism of calf thymus DNA. Biochemistry 18: 84-91

Rouzina I, Bloonfield VA (1999) Heat capacity effects on the melting of DNA. 1. General aspects. Biophys J 77: 3242-3251

Stallings WC, Glusker JP, Carrell HL, Bogucka-Ledóchowska M, Ledóchowski A, Stezowski JJ (1984) Intercalation model for DNA-cross linking in a 1-nitro-9-aminoacridine derivative, an analog of the antitumor agent "Ledakrin" (Nitracrine). J Biomol Struct Dyn 2: 511-524

201 Ren J, Chaires JB (2001) Rapid screening of structurally selective ligand binding to nucleic acids. Methods Enzymo 340: 99-108

Makhatadze GI, Privalov PL (1995) Energetics of protein structure. Adv Protein Chem 47: 307-425

Dorobek naukowy:

Publikacje:

1. Sawicka (Jagiełło) Karolina, Chrapkowska Agnieszka, Klimkowska Anita, Kot-Wasik Agata, Bartoszek-Paczkowska Agnieszka, Paine Mark, Wolf Roland, Konopa Jerzy, Mazerska Zofia: "*NADPH-Cytochrome P-450 reductase in strongly involved in activating metabolic transformatios of 9-amino-1-nitroacridine antitumor agents*" Acta Biochemica Polonica, vol. 52, 2005, s. 141

2. Chrapkowska Agnieszka, **Sawicka (Jagiełło) Karolina**, Klimkowska Anita, Kot-Wasik Agata, Konopa Jerzy, Mazerska Zofia: *"Human CYP2 family of cytochrome P-450 takes part in metabolism of two acridine antitumor agents, C-1311 and C-1748, selected for I phase of clinical trials"* Acta Biochemica Polonica, vol. 52, 2005, s. 129

3. Wiśniewska Anita, **Jagiełło Karolina**, Mazerska Zofia: *"Reduktaza NADPH:cyt.P450, nie tylko partner cytochromu P450"*, Postępy Biochemii, vol. 55, 2009, s. 272

4. Jagiełło Karolina, Dopierała Anita, Mazerski Jan: "*Termodynamiczne aspekty oddziaływania małocząsteczkowych ligandów z DNA*", Postępy Biochemii, 2010, przyjęty do druku

Doniesienia konferencyjne:

1. Sawicka (Jagiełło) Karolina, Chrapkowska Agnieszka, Klimkowska Anita, Kot-Wasik Agata, Bartoszek-Paczkowska Agnieskza., Paine Mark, Wolf Roland, Konopa Jerzy, Mazerska Zofia: "*NADPH-Cytochrome P-450 reductase in strongly involved in activating metabolic transformatios of 9-amino-1-nitroacridine antitumor agents*" 40th Meeting of the Polish Biochemical Society, 19.09-23.09.2005, Lublin

2. Chrapkowska Agnieszka, **Sawicka (Jagiełło) Karolina**, Klimkowska Anita, Kot-Wasik Agata, Konopa Jerzy, Mazerska Zofia: *"Human CYP2 family of cytochrome P-450 takes part in metabolism of two acridine antitumor agents, C-1311 and C-1748, selected for I phase of clinical trials"* 40th Meeting of the Polish Biochemical Society, 19.09-23.09.2005, Lublin

3. Jagiełło Karolina, Mazerski Jan: "Spectrophotometric titration of dsDNA by nitroacridines-chemometrics approach" III Konferencja "Chemometria – metody i zastosowania", 19.10.-22.10.2006, Zakopane

4. Jagiełło Karolina, Dopierała Anita, Mazerski Jan: "*Studies on DNA-ligand interactions by ITC microcalorimetry*", 10th Conference on Calorimetry and Thermal Analysis joint with 2nd Czech-Hungarian-Polish-Slovakian Thermoanalytical Conference, 30.08.-03.09.2009, Zakopane

5. Jagiełło Karolina, Dopierała Anita, Mazerski Jan: *"ITC microcalorimetry for aggregated DNA ligands*", 10th Conference on Calorimetry and Thermal Analysis joint with 2nd Czech-Hungarian-Polish-Slovakian Thermoanalytical Conference, 30.08.-03.09.2009, Zakopane

Rozdział w książce:

1. Jagiełło Karolina, Mazerski Jan: "Spectrophotometric titration of dsDNA by nitroacridines-chemometrics approach". W "Chemometrics - methods and applications"; Red. D. Zuba, A. Parczewski; Wydawnictwo Instytutu Espertyz Sądowych; Kraków, 2006

2. Jagiełło Karolina, Dopierała Anita, Mazerski Jan: *"Thermodynamic aspects of interactions between acridine derivative and DNA"*. W "13th International Symposium of Students and Young Mechanical Engineers. Advances in Chemical and Mechanical Engineering"; Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej, Gdańsk, 2010, przyjęty do druku

3. Dopierała Anita, **Jagiełło Karolina**, Mazerski Jan: "The influence of reactions conditions on aggregation of dyes used in biochemistry". W "13th International Symposium of Students

and Young Mechanical Engineers. Advances in Chemical and Mechanical Engineering"; Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej, Gdańsk, 2010, przyjęty do druku