

Metode ispitivanja nekovalentnih interakcija malih organskih molekula s DNA i RNA. Detaljniji osvrt na ispitivanje interkalativnog načina vezanja.

KUI 29/2003
Received February 24, 2003
Accepted May 26, 2003

I. Piantanida

Institut Ruđer Bošković, Zavod za organsku kemiju i biokemiju,
P.O.Box 180, HR-10002 Zagreb, email: pianta@rudjer.irb.hr

Mnogo malih organskih spojeva priređeno je s idejom biološke ili biokemijske primjene (terapeutska primjena, markeri, molekularni alati,...). Biološka i/ili biokemijska ispitivanja vrlo su skupa i uzimaju dosta vremena, što ih čini nepogodnima za studiranje velike količine novih spojeva. Osim toga, spomenuta ispitivanja provode se u dosta kompliciranim sustavima unutar kojih je vrlo teško razlikovati utjecaje interakcija pojedinih sudionika na ukupni tok procesa. Stoga je nakon sinteze novih spojeva poželjno ispitati njihove nekovalentne interakcije s DNA i RNA u dobro definiranom i jednostavnom sustavu. Na raspolaganju za takva ispitivanja stoji cijeli niz jednostavnih i jeftinih eksperimentalnih metoda, koje omogućuju brzo utvrđivanje niza parametara nastalih kompleksa.

Sve u ovom radu predstavljene metode moguće je relativno lako upoznati i primijeniti. Dobiveni rezultati mogu poslužiti za određivanje selektivnosti/specifičnosti novih spojeva te usporedbu s već ranije ispitanim analozima. Pogotovo su takva brza i pregledna ispitivanja bitna za detaljno istraživanje interakcija velikih serija vrlo sličnih strukturnih analoga s DNA i RNA (npr. sustavno ispitivanje položaja određenog supstituenta na već poznatom DNA/RNA aktivnom spoju). Na osnovi dobivenih rezultata često je moguće iz velike serije analoga izdvojiti nekoliko najatraktivnijih za biološka ispitivanja te postići bitnu uštedu vremena i materijala.

Ključne riječi: DNA, nekovalentne interakcije, interkaliranje, konstante stabilnosti

Uvod

Fizikalna i kemijska svojstva nukleinskih kiselina te njihove interakcije s drugim kemijskim spojevima predmet su intenzivnih znanstvenih istraživanja današnjice. U zadnjih 50 godina od prvi put predložene strukture dvostruke uzvojnice deoksiribonukleinske kiseline postignut je znatan napredak u razumijevanju osnovnih principa selektivnog prepoznavanja odlomaka DNA pomoću peptida i bjelančevina,¹ "antisense" i "triplex" tehnologijama,² kompleksima oligonukleotida s tranzicijskim metalima³ i interakcijama s malim sintetskim organskim molekulama.⁴

Glavni razlozi intenzivnog istraživanja spomenutog područja usmjereni su na razjašnjenje osnove djelovanja prirodnih i sintetskih lijekova koji se vežu na DNA, određivanje prirode i uzroka promjena DNA pod utjecajem okoliša i kontrola osnovnih funkcija DNA *in vivo* i *in vitro* radi genske terapije te primjena u dijagnostici.

Interakcije malih organskih molekula s nukleinskim kiselinama mogu se podijeliti na dva osnovna tipa: nepovratne (npr. nastaju kovalentne veze male molekule s polinukleotidima ili dolazi do raznih tipova cijepanja polinukleotidnog lanca) te ravnotežne (nastaju nekovalentni kompleksi).

Budući da je tema ovog članka ograničena na područje ravnotežnih interakcija malih organskih molekula s prirodnim i sintetskim polinukleotidima DNA i RNA, literaturni pregled dosadašnjeg istraživanja biti će ograničen na spomenuto područje.

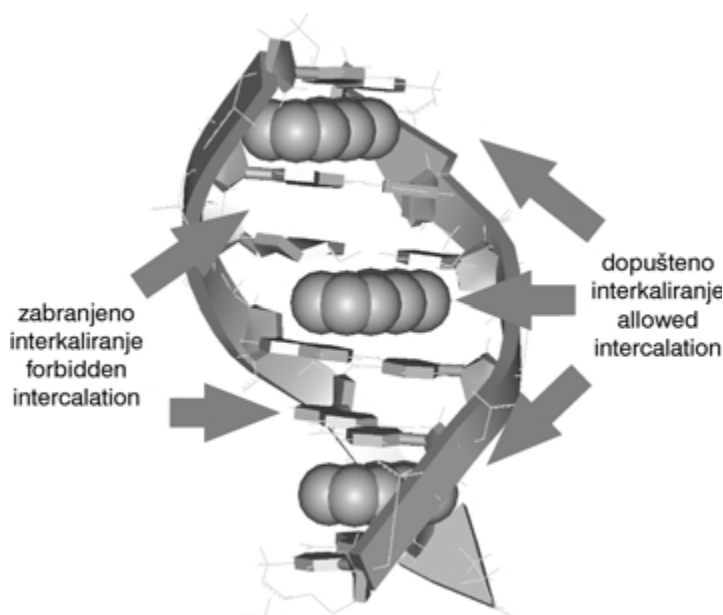
Ravnotežne interakcije najčešće se svode na nastajanje termodinamički najstabilnijeg kompleksa male molekule s polinukleotidom iako u nekim slučajevima i kinetički najpovoljniji kompleksi bitnu utječu na odvijanje procesa. Kod toga treba razlikovati tri osnovna tipa vezanja malih organskih molekula na DNA i/ili RNA.

TIP 1. Elektrostatske interakcije polikationskih spojeva, na primjer protoniranih poliamina⁵, s negativno nabijenim fosfatima polinukleotida karakterizira direktna ovisnost afiniteta o broju pozitivnih naboja male molekule. Takvi spojevi pokazuju malu ili nikakvu selektivnost vezanja s obzirom na slijed nukleotida u DNA ili RNA, no to ne znači da nisu biološki važni. Dobar primjer je niz alifatskih poliamina (tipični predstavnik je spermin), koji sudjeluju u biološkom procesima stanice.

TIP 2. Spojevi koji se vežu u manji utor dvolančanih uzvojnica DNA ili RNA (engl. minor groove binding, u daljnjem

tekstu UTOR – VEŽUĆI SPOJEVI) predmet su opsežnih istraživanja radi niza antibiotika (berenil⁶ i dr.) i antitumorskih lijekova (netropsin⁷, distamicin⁸ i dr.) čije se terapeutsko djelovanje temelji na spomenutom modelu vezanja. Konveksni oblik molekule karakterističan za spomenutu grupu spojeva odgovara konkavnom obliku utora dvostrukih uzvojnica DNA i RNA, dok raspored pozitivnih naboja u molekuli **utor-vežućeg spoja** omogućuje interakcije s negativno nabijenim fosfatima polinukleotida. Velika većina spojeva pokazuje izrazitu selektivnost prema manjem utoru dvostruke uzvojnice DNA u usporedbi s RNA, što se objašnjava oblikom dvostruke uzvojnice RNA, čiji manji utor je bitno širi i plići te ne odgovara veličini i obliku malih molekula, koje se vežu spomenutim načinom⁹. Također, prevladava afinitet prema dAdT bogatim slijedovima DNA zbog nepovoljnih steričkih utjecaja amino skupina gvanina u manjem utoru dGdC slijedova DNA te u slučaju nekih spojeva s mogućim vodikovim vezama između **utor-vežućeg spoja** i adeninskih baza polinukleotida. Selektivnost spomenute grupe spojeva te često i biološka aktivnost ovisi o kombiniranom utjecaju vodikovih veza, van der Waalsovih i hidrofobnih te elektrostatskih interakcija s veznim mjestom polinukleotida.¹⁰

TIP 3. Dvolančani i neki jednolančani polinukleotidi tvore u vodenim otopinama dobro organizirane helikalne strukture najvećim dijelom zahvaljujući aromatskim - interakcijama između baza.^{11,12} Iako su takve strukture vrlo stabilne, ipak su posljedica dinamičkog ravnotežnog procesa pri kojem se površina preklapanja aromatskih površina kontinuirano mijenja te se slijepljene baze povremeno razmiču. Ukoliko se u otopini nalaze planarne aromatske molekule, spomenuta ravnoteža unutar lanca polinukleotida omogućuje njihovo umetanje (interkaliranje) između parova baza.¹³ Nastajanje takvih interkalativnih kompleksa značajno stabilizira i ukružuje polinukleotidni lanac te dolazi do produljenja uzvojnice, njenog "odvijanja" i deformacije (slika 1).¹⁴



Slika 1 – Princip "isključenja susjeda" (engl. *neighbour exclusion principle*)

Fig. 1 – *Neighbour exclusion principle*

Interkalativni način vezanja ima ključnu ulogu u djelovanju mnogih klinički primijenjenih antitumorskih lijekova (amsakrin, elipticin, daunomicin, adriamicin) te nekih antibiotika (aktinomicin D, nogalamycin i derivati), blokirajući djelovanje topoizomerase II.¹⁵

Zanimljivost interkalatora nije ograničena samo na biološke učinke. Fluorescentna i fosforescentna svojstva nekih fenantridinijevih (etidijev bromid i analozi)¹⁶ i akridinijevih (proflavin, akridin orange i analozi)¹⁷ derivata drastično se mijenjaju interkaliranjem u polinukleotide te navedeni spojevi drže kao markeri za niz bioloških i biokemijskih tehnika.

Osnovni pojmovi interkalativnog načina vezanja malih molekula na DNA i RNA

Ispitivanje interkalativnih kompleksa karakterizira izrazit anti-kooperativni učinak u uvjetima bliskim zasićenju interkalativnih veznih mjesta polinukleotida. Naime, najveća eksperimentalno određena vrijednost omjera $r_{vs} = [\text{vezani interkalator}]/[\text{interkalativno vezno mjesto}]$ za neki interkalator više je nego upola manja od teorijski moguće. Na osnovi niza istraživanja zaključeno je da interkaliranje aromatske molekule između dva para baza onemogućuje istovrsno vezanje između susjednih parova baza (slika 1) te je ustanovljen princip "isključenja susjeda" (engl. *neighbour exclusion principle*).¹⁸

Iako na prvi pogled interkalativni kompleks planarne aromatske molekule umetnute između parova baza izgleda kao termodinamički jednostavan i dobro definiran sustav kontroliran poglavito p...p aromatskim interakcijama, u stvarnosti riječ je o kombinaciji niza različitih fizikalnih interakcija, koje su dijelom međusobno ovisne te dio njih nije u potpunosti poznat. Zbog toga do danas nije moguće sa sigurnošću predvidjeti svojstva kompleksa novopriređenog interkalatora s određenim slijedom baza dvolančanog odnosno jednolančanog polinukleotida. Sam proces nastanka interkalativnog kompleksa nije sa sigurnošću utvrđen, no na osnovi trenutačno najcitiranijih teorija^{17,19,18} interkaliranje je rezultat sljedećeg niza događaja:

- velika većina interkalatora pozitivno su nabijeni te prvi kontakt s polinukleotidom ostvaruju putem elektrostatskih interakcija s negativno nabijenim fosfatima,
- hidrofobne interakcije ispitivanih (aromatskih) molekula s DNA i RNA dodatno stabiliziraju nastali elektrostatski kompleks,
- tako postignuta visoka lokalna koncentracija molekula interkalatora uz polinukleotid dodatno pogoduje umetanju male planarne aromatske molekule između baza u momentu kada dođe do razdvajanja susjednih parova baza unutar polinukleotida,
- da bi do interkaliranja uopće došlo, moraju se uzeti u obzir Van der Waalsovi promjeri atoma polinukleotida i interkalatora (interkalator mora fizički stati između susjednih baza),
- nakon interkaliranja preklapanje aromatskih površina interkalatora i susjednih baza dodatno stabilizira kompleks $\pi\cdots\pi$ aromatskim interakcijama slaganja f) specifične inte-

rakcije supstituenata i heterocikličkih atoma interkalatora s određenim dijelom polinukleotida (vodikove veze, Londonova disperzijska međudjelovanja, elektrostatske interakcije...) mogu pridonijeti, ali i odmoći stabilizaciji nastalog kompleksa. Upravo te interakcije najčešće su uzrok selektivnosti (razlike afiniteta) pojedinog interkalatora prema određenom tipu polinukleotida. Također, posljedica spomenutih interakcija može biti i izrazita ovisnost spektroskopskog svojstva nastalog kompleksa o tipu polinukleotida.

Iz gore navedenih točaka **a – f** vidljivo je da kod interkalativnih kompleksa uvijek imamo ravnotežu elektrostatski vezane molekule na vanjsku površinu polinukleotida (**a**) s interkaliranom (**e**) aromatskom molekulom. Udjel takvog vanjskog vezanja u ukupnoj stabilnosti kompleksa ovisi o cijelom nizu čimbenika, vanjskih (ionska jakost vodene otopine, tip kationa u otopini, ...) i unutarnjih (broj induciranih i stalnih pozitivnih naboja u maloj molekuli, moguće vodikove veze, sterički čimbenici,...).

Zbog svega navedenog nije jednostavno sa sigurnošću utvrditi interkalativni način vezanja na DNA i RNA za do tada nepoznati spoj. Kako bi se moglo s prihvatljivom sigurnošću ustvrditi tvori li nepoznati spoj s DNA / RNA interkalativni tip kompleksa nužno je upotreba više međusobno neovisnih metoda.²⁰

Polinukleotidni supstrati

Za preliminarna ispitivanja interakcija spomenutih spojeva primjenjuje se neka od prirodnih izoliranih dvolančanih DNA, npr. iz timusa teleta (*calf thymus*) (ct DNA), čiji redoslijed parova baza nije detaljno poznat. Za detaljnija ispitivanja upotrebljava se velik broj sintetskih polinukleotidnih supstrata koji su komercijalno dostupni, a pomoću uređaja za automatsku sintezu moguće je pripremiti oligonukleotide željenog redoslijeda baza. Uglavnom se nastoji ustanoviti ovisnost afiniteta i modela vezanja ispitivanog spoja o tipu baza, vrsti šećernog dijela (ribo- odnosno deoksiriboderivati) te strukturnim karakteristikama polinukleotidnog supstrata. Za takva istraživanja najčešće se rabe sljedeći, komercijalno dostupni polinukleotidi:

Jednolančani polinukleotidi: poli A, poli G, poli C, poli U te odgovarajući analozi DNA jednostavni su supstrati pogodni za ispitivanje osnovnih interakcija spojeva s određenim tipom baze uz manje steričke, elektrostatske te hidrofobne utjecaje od onih koji su dostupni kod dvolančanih analoga. Većina jednolančanih polinukleotida (izuzevši poli U i poli T) tvori u vodenom mediju kod standardnih uvjeta (pH 6 – 7,5; $I \approx 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$) relativno stabilne jednolančane uzvojnice zahvaljujući aromatskim π - π interakcijama između baza.²¹ Također, u kiselim uvjetima (pH < 5) dio jednolančanih polinukleotida (poli A, poli C) zbog protoniranja tvori dvostruke uzvojnice,²¹ što omogućuje ispitivanje selektivnosti vezanja između dvolančanih i jednolančanih analoga.

Dvolančani polinukleotidi: a) homopolinukleotidi osnovne strukture poli X-poli Y (A-U, G-C, dA-dT, dG-dC); b) alternirajući polinukleotidi osnovne strukture poli XY-poli XY (dAdT-dAdT, dGdC-dGdC)

RNA polinukleotidi uglavnom su dostupni u obliku homopolimera te se za usporedbu s njima rabe odgovarajući analozi DNA. No homopolinukleotidi pri određenim eksperimentalnim uvjetima te pri vezanju nekih malih molekula lako tvore trostruke uzvojnice,^{12,21} odnosno kompliciranije strukture. Za pouzdanu usporedbu afiniteta ispitivanog spoja prema određenim parovima baza služe se stabilniji alternirajući polinukleotidi. Dvolančane uzvojnice G-C parova baza stabilnije su od A-U(T) analoga zahvaljujući većem broju vodikovih veza.

Također, treba uzeti u obzir da svaki od spomenutih dvolančanih analoga ima karakterističnu sekundarnu strukturu, što može utjecati na vezanje sterički zahtjevnih malih molekula.

Najbolji primjer su izrazito različita svojstva poli dA – dT homopolinukleotida u usporedbi sa svim ostalim dvolančanim analogima te time uzrokovane različitosti vezanja malih molekula.^{22,23} Kompleksi spomenutih spojeva s RNA analognom (poli A – U) bitno se razlikuju u stabilnosti upravo zbog spomenutih strukturnih razlika.²⁴ Strukture dvolančanih polinukleotida nakon otapanja po uputama proizvođača treba provjeriti određivanjem temperature mekšanja T_m .

Metode ispitivanja nekovalentnih interakcija malih molekula s DNA i RNA; kako utvrditi interkalativni način vezanja

Kristalne strukture interkalativnih kompleksa

Kristalne strukture kompleksa interkalatora s oligonukleotidima²⁵ smatraju se jednim od najpouzdanijih dokaza interkaliranja. Ipak, treba uzeti u obzir da su svojstva i strukture kratkih dvolančanih oligonukleotida, koji se koriste kod dobivanja kristala s interkalatorima, često bitno različita od svojstava polinukleotida. Osim toga opće je poznato da situacija u kristalu ne ukazuje nužno na stanje u otopini, koje je rezultat niza ravnotežnih procesa uzrokovanih hidrofobnim, elektrostatskim i π - π aromatskim interakcijama.

Također, priređivanje kristala kompleksa malih molekula s oligonukleotidima dugotrajan je i neizvestan postupak, k tome i dosta skup zbog cijene kratkih oligonukleotida te skupih uređaja za dobivanje dovoljno kvalitetnog skupa repleksa kristala.

Najčešće primjenjivane eksperimentalne metode

Najčešće primjenjivane eksperimentalne metode za ispitivanje nekovalentnih kompleksa malih molekula s DNA/RNA mogu se podijeliti u nekoliko osnovnih grupa.

a) Eksperimenti koji prate promjene strukture i stabilnosti polinukleotida uzrokovane vezanjem ispitivanog spoja:

- promjena viskoziteta otopine DNA/RNA
- promjena sedimentacijskog koeficijenta ili elektroforetske pokretljivosti cirkularne DNA

– pomaci u niže magnetsko polje signala fosfatnog dijela polinukleotida u ^{31}P NMR spektru polinukleotida

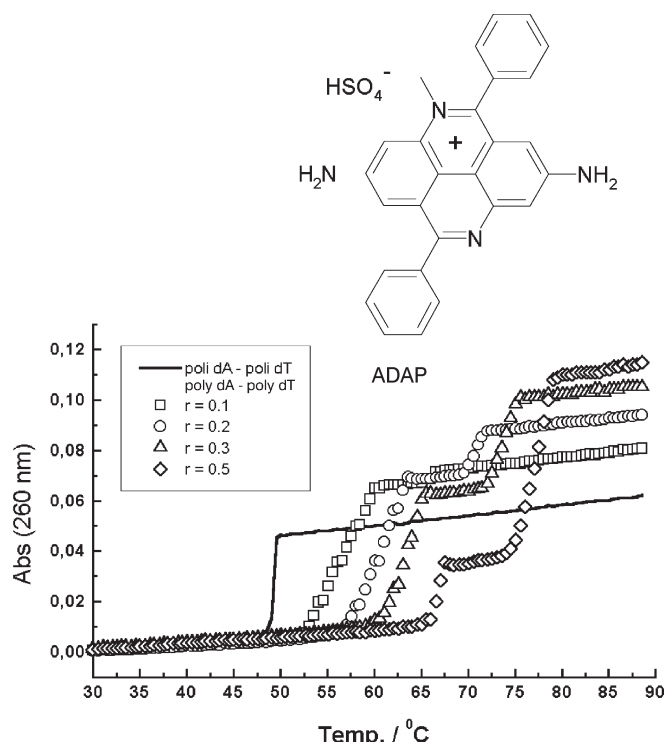
– promjena temperature “mekšanja” dvostruke uzvojnice po vezanju ispitivanog spoja

b) Metode temeljene na promjeni spektroskopskih svojstva ispitivanog spoja (UV/VIS, fluorescencijska i ^1H NMR spektroskopija).

c) Metode koje upućuju na pravilnost orijentacije molekula ispitivanog spoja te dinamiku i homogenost načina vezanja na polinukleotid – CD i LD spektroskopija, polarizacija fluorescencije, anizotropija fluorescencije.

Promjena točke “mekšanja” dvolančanih polinukleotida

Dvostruke uzvojnice dvolančanih polinukleotida termički su nestabilne. Grijanjem njihovih vodenih otopina dolazi do pucanja vodikovih veza između baza te prelaska jednog dvolančanog u dva jednolančana polinukleotida (Slika 2). Slijedovi A-T(U) stabilizirani samo dvjema vodikovim vezama odvajaju se pri nižim temperaturama od slijedova G-C stabiliziranih trima vodikovim vezama.¹² Svaki od dvolančanih polinukleotida karakterizira temperatura “mekšanja” (T_m), to jest temperatura pri kojoj je približno pola dvolančane uzvojnice prešlo u dvije jednolančane.²¹



Slika 2 – Primjer dvofazne temperaturne denuracijske krivulje poli dA - dT pri raznim molarnim omjerima r_s ([ADAP] / [polinukleotid]), pH 7, $I = 0,02 \text{ mol dm}^{-3}$.

Fig. 2 – Example of the byphasic thermal denaturation curves of poly dA - dT at different molar ratios r_s ([ADAP] / [polinukleotid]), pH 7, $I = 0.02 \text{ mol dm}^{-3}$.

Proces mekšanja može se pratiti nizom spektroskopskih metoda (CD, NMR, kalorimetrija), no najčešće se rabi UV spektroskopija. Naime, “mekšanje” je praćeno izrazitim hiperkromnim učinkom UV spektra.

Utjecaj različitih načina vezanja malih molekula na promjenu T_m dvolančanih polinukleotida detaljnije je opisan u nekim preglednim radovima.²⁴ Općenito se može zaključiti da interkalativni način vezanja stabilizira dvostruku uzvojnica te daje pozitivne ΔT_m vrijednosti, dok spojevi koji se vežu u utore DNA/RNA mogu uzrokovati pozitivne, ali i negativne (destabilizacija dvostruke uzvojnice) ΔT_m vrijednosti.

Prednosti su ove metode jednostavnost i brza izvedba, jeftini uređaji, male količine spoja i polinukleotida potrebne za mjerenje. Nedostatci su prijeko potrebna termička stabilnost ispitivanih spojeva, temperature bitno više od standardne (25 °C) i fiziološke (37 °C) te nemogućnost međusobnog uspoređivanja rezultata za spojeve koji se vežu na polinukleotid različitim načinima (npr. interkalativni, neinterkalativni model).

Ovom metodom moguće je pri istim eksperimentalnim uvjetima uspoređivati utjecaj niza spojeva koji se vežu istim načinom na stabilizaciju dvostruke uzvojnice određenog polinukleotida, odnosno uspoređivati utjecaj vezanja jednog spoja na stabilizaciju dvostruke uzvojnice više različitih polinukleotida.

Pomoću ove metode moguće je i prosuditi maksimalnu zasićenost polinukleotida s ispitivanim interkalatorom, tj. vrijednost omjera t_{vs} [vezani interkalator] / [polinukleotid]. Naime, kod velikog suviška polinukleotida (r_{vs} [vezani interkalator] / [polinukleotid] < 0,1) stabilizacija dvostruke uzvojnice (ΔT_m vrijednost) proporcionalna je povećanju koncentracije interkalatora. Kod omjera r_{vs} [vezani interkalator] / [polinukleotid] bliskih zasićenju interkalativnih veznih mjesta (princip “isključenja susjeda”, slika 1, poglavlje 2), promjena vrijednosti ΔT_m za ista povećanja koncentracije interkalatora smanjuje se. Ekstrapoliranjem vrijednosti ΔT_m u područje platoa moguće je prosuditi vrijednost omjera r_{vs} [vezani interkalator] / [polinukleotid].

Ukoliko ispitivani spoj tvori s polinukleotidom više bitno različitih tipova kompleksa dobivaju se višefazne denuracijske krivulje (slika 2).

Na slici 4 donji temperaturni fazni prijelaz, koji je pri nižim omjerima r_s bitno jače izražen odgovara utjecaju interkalativnog vezanja, dok gornji fazni prijelaz dominantan pri uvjetima suviška ADAP s obzirom na vezna mjesta odgovara neinterkalativnom načinu vezanja.²⁶

Viskozimetrija

Utjecaj ispitivanog spoja na duljinu polinukleotidne uzvojnice uglavnom se prati mjerenjem viskoziteta otopine sonificiranih, štapičastih fragmenata DNA polinukleotida (molekulska masa oko $2,5 \times 10^5$) kao funkcije različitih omjera $r_s = C_{\text{ispitivani spoj}} / C_{\text{polinukleotid}}$. Pokazalo se da pri spomenutim uvjetima viskoznost otopine ovisi o produljenju uzvojnice uzrokovanom vezanjem spoja po jednadžbi (I)²⁷:

$$L / L_0 = 1 + m r_s, \quad (1)$$

gdje je L/L_0 relativno produljenje, omjer $r_s = ([\text{spoj}] / [\text{polinukleotid}])$, a m nagib pravca ovisnosti L/L_0 o r_s .

Klasični interkalatori poput etidijevog bromida i akridinijevih derivata daju vrijednosti $m \approx 0,8 - 0,9$. Interkaliranje mora uzrokovati produljenje dvolančane uzvojnice te se bitno manja vrijednost m od gore spomenute smatra potvrdom neinterkalativnog načina vezanja. Obrnuti zaključak ne vrijedi budući da neki spojevi, koji se vežu u manji utor DNA i RNA, uzrokuju produljenja slična vrijednostima interkalatora. Na osnovi rezultata viskozimetrije često je moguće razlikovati mono-interkalatore od bis-interkalatora (molekula koje sadrže dvije aromatske jedinice koje interkaliraju u DNA/RNA) jer potonji uzrokuju približno dvostruko produljenje DNA lanca kod istog omjera r .

Nedostatci metode su relativno visoke koncentracije spoja i DNA potrebne za mjerenje ($c \approx 10^{-5} - 10^{-4}$ mol dm⁻³) te nepouzdanost rezultata u slučaju ispitivanih spojeva koji vezanjem uzrokuju savijanje štapičaste dvostruke uzvojnice time prividno smanjujući produljenje uzrokovano interkaliranjem. Također, ova metoda ne razlikuje doprinos neinterkalativnog načina vezanja prisutnog kod većine interkalatora pri uvjetima bliskim zasićenju interkalativnih veznih mjesta DNA ($r_s \approx 0,25$).

Spektroskopske titracije

Vezanje malih molekula na polinukleotide često uzrokuje bitne promjene u njihovim spektroskopskim svojstvima (UV/VIS, fluorescencija, ¹H NMR), koje mogu pružiti niz korisnih informacija. Tako na primjer izosbestične točke u UV/VIS titracijama ispitivanog spoja s polinukleotidima upućuju na nastajanje samo jednog tipa kompleksa, dok smjer pomaka signala u ¹H NMR spektrima te NOE interakcije mogu pružiti niz podataka o strukturi kompleksa u vodenj otopini.²⁸ Karakteristične promjene fluorescencijskih spektara nekih interkalatora (etidijev bromid, proflavin, akridin orange) po vezanju na nukleinske kiseline učinile su ih nezaobilaznim markerima pri radu s genetskim materijalom. Osim toga visoka osjetljivost fluorescencijskih metoda omogućila je eksperimente pri mikromolarnim i nižim koncentracijama ispitivanog spoja, tj. u uvjetima sličnim onima u biološkim sustavima.

Ukoliko se radi o ravnotežnom procesu te su spektroskopske promjene dovoljno velike i proporcionalne udjelu nastalog kompleksa, moguće je izračunati ili prosuditi afinitet ispitivanog spoja prema polinukleotidu. Budući da interkalativni model vezanja jedini pruža mogućnost jasne definicije veznih mjesta na polinukleotidu (poglavlje 2., slika 1), razvijen je niz jednadžbi za izračun konstante stabilnosti (K_s) nastalih kompleksa na osnovi podataka titracije ispitivanog spoja s polinukleotidom. Osnova svih jednadžbi je Scatchardova inačica²⁹ Langmuirove izoterme, jednadžba (I):

$$r_s / c_v = K_s (r_{vs} - r_s), \quad (2)$$

gdje je c_v koncentracija interkaliranog spoja, K_{vs} je omjer [vezani spoj]/[polinukleotid], omjer $r = [\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]$ i K_s konstanta stabilnosti kompleksa. Treba napomenuti da se u literaturi mogu naći razne varijante omjera r_{vs} ovisno o tome da li je koncentracija polinukleotida [polinukleotid] definirana kao koncentracija baza, parova baza odnosno najčešće koncentracija fosfata (također i u ovom radu).

Pri povoljnim eksperimentalnim uvjetima interkaliranje daje linearnu ovisnost r_s/c_v o r_s te je iz dobivenog pravca moguće izračunati konstantu stabilnosti K_s i vrijednost omjera r_{vs} . Spomenuta jednadžba stavlja puno veću signifikantnost na prvu (0 % nastalog kompleksa) i zadnju točku (100 % nastalog kompleksa) te je iz tog razloga pouzdanija analiza podataka titracije pomoću Scatchardove jednadžbe nelinearnom regresijskom metodom.^{17,30}

Model opisan Scatchardovom jednadžbom (I) ne uzima u obzir mogućnost kooperativnog odnosno anti-kooperativnog utjecaja molekule interkalatora na interkaliranje sljedeće molekule u susjedna vezna mjesta. Koliko su spomenuti utjecaji bitni, najbolje će predočiti primjer principa "isključenja susjeda" opisan u poglavlju 2, slika 1.

Teorijski modeli, koje su izveli McGhee i von Hippel³¹ uveli su u Scatchardovu jednadžbu parametar kooperativnosti ω . Osnovni problem pri uporabi spomenutih jednadžbi bila je nemogućnost razlikovanja kooperativnog utjecaja interkaliranja od doprinosa neinterkalativnih načina vezanja^{19,32,33} pri uvjetima bliskim zasićenju veznih mjesta polinukleotida. Osim toga, kod većine spektroskopskih titracija nije moguće doseći uvjete od 100 % nastalog kompleksa, te je bila nužna obrada podataka temeljem spomenutih jednadžbi pomoću metoda nelinearne regresije. Pri tome zbog izravne međusobne ovisnosti tri varijable (K_s , r_{vs} i ω) te vrlo često dodatne varijable koja opisuje spektroskopska svojstva nastalog kompleksa (npr. Abs_{lim} , Int_{lim}) računski su dobivene krivulje vrlo širokih i plitkih minimuma kod kojih je moguće varirati vrijednosti K_s , r_{vs} i ω u širokom rasponu^{34,35} bez znatnog utjecaja na koeficijente korelacije eksperimentalnih i računskih podataka.

U literaturi je taj problem širokog raspona vrijednosti rezultata rješavan na razne načine, na primjer fiksiranjem omjera $r_{vs} = 0,17 - 0,2$ prema vrijednostima standardnih interkalatora (etidijev bromid³³, akridinijevi derivati³⁶) te bis-interkalatora ($r_{vs} = 0,075$)³⁷, određivanjem vrijednosti r_{vs} neovisnim metodama (ovisnost ΔT_m o omjeru r , poglavlje 4.2.1.)³⁸.

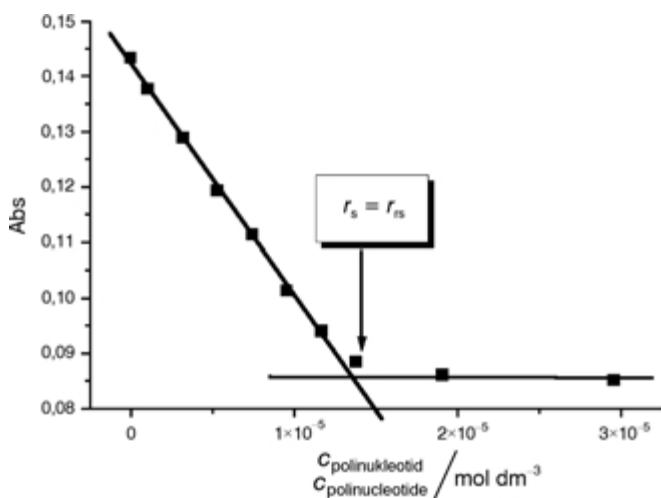
Najpouzdaniji rezultati K_s i r_{vs} mogu se dobiti temeljem titracija provedenih pri većem suvišku veznih mjesta polinukleotida (omjer $r_s < 0,1$) kod kojeg se može smatrati da se molekule interkalatora vežu na izolirana, međusobno neovisna vezna mjesta. Ukoliko je moguće, omjer r_{vs} treba odrediti s barem dvije neovisne metode (npr. UV/VIS ili fluorimetrijska titracija, ovisnost vrijednosti ΔT_m o omjeru r_s).

U slučaju titracija ispitivanog spoja s dvolančanim polinukleotidom kod uvjeta gdje je konstanta stabilnosti interkalativnog kompleksa (K_s) $\gg 1 / c_{\text{ispitivani spoj}}$ rezultati obrade podataka nisu pouzdani zbog "prezasićenosti" polinukleotida u većem dijelu titracije. Naprimjer, kad je $c_{\text{spoj}} \approx 10^{-5}$ mol dm⁻³, a $K_s \gg 10^5$ dm³ mol⁻¹ prve promjene u spektrima javljaju se pri $c_{\text{polinukleotid}} < 10^{-5}$ mol dm⁻³, tako da je spoj većim dijelom titracije u velikom suvišku s obzirom na vezna mjesta polinukleotida, kao što je opisano nejednadžbom (3):

$$r_s([\text{spoj}]/[\text{polinukleotid}]) > r_{vs}([\text{vezani spoj}]/[\text{polinukleotid}]) \quad (3)$$

U takvim uvjetima u ukupnoj konstanti stabilnosti kompleksa često pridonose i neinterkalativni načini vezanja²⁹⁻³¹

na vanjsku površinu ili u utoke polinukleotida te se kao rezultat obrade titracije Scatchardovom jednačkom dobivaju vrijednosti r_{vs} veće od teorijski mogućih te bitno veće K_s . Vrlo često vidljiva su i odstupanja od izosbestičke točke, što također ukazuje na više vrsta nastalih kompleksa. Za omjer koncentracije ispitivanog spoja i polinukleotida na kraju titracije (plato, slika 3) može se pretpostaviti da je $r_s = r_{vs}$, što je vrlo korisna informacija za obradu podataka fluorimetrijskih mjerenja.



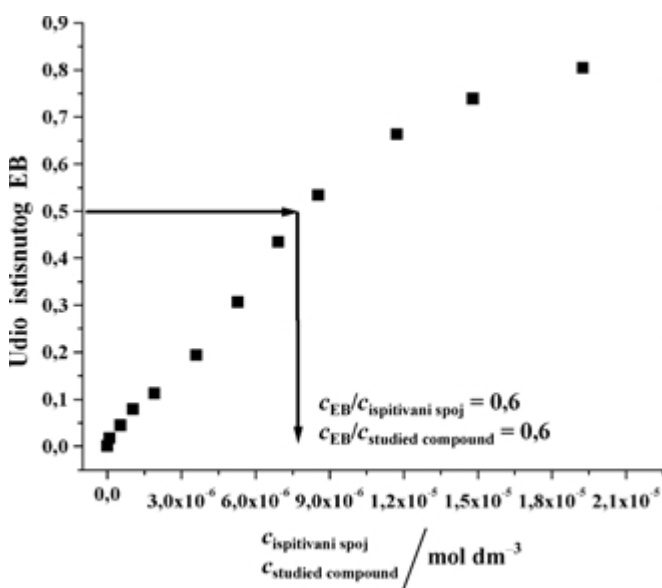
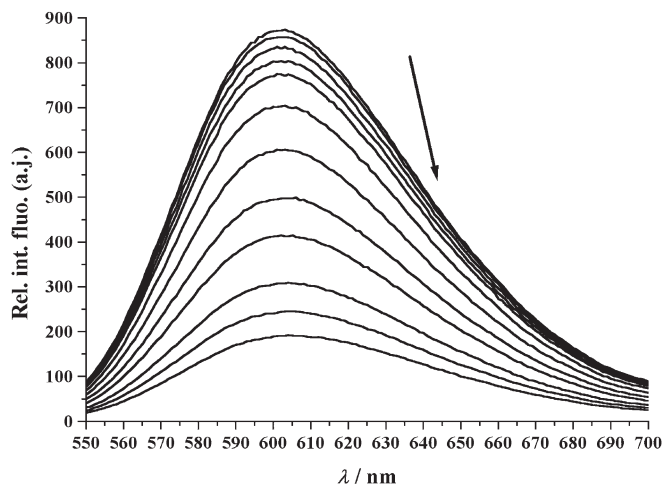
Slika 3 – Primjer UV/VIS titracije za slučaj kad je $c_{\text{spoj}} \approx 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, a konstanta stabilnosti $K_s \gg 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$

Fig. 3 – Example of the UV/VIS titration for $c(\text{studied compound}) \approx 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ and stability constant $K_s \gg 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1}$

Posredno određivanje afiniteta spoja prema DNA/RNA

Nisu rijetki slučajevi kada interakcije ispitivanog spoja s polinukleotidima nije moguće pratiti kroz promjenu spektroskopskog svojstva spoja. U takvom slučaju afinitet ispitivanog spoja prema polinukleotidu može odrediti i posredno kompeticijskim eksperimentima sa standardnim spojem za pretpostavljeni model vezanja. Najčešće se rabi "IC50" metoda,¹⁶ temeljena na količini ispitivanog spoja koji je potrebno dodati da bi se 50 % etidijevog bromida (EB) prethodno interkaliranog u polinukleotid istisnulo iz kompleksa. Metoda se temelji na izuzetno velikoj razlici fluorescencije EB (8 – 40 puta) u slobodnom (slaba fluorescencija) i interkaliranom stanju (jaka fluorescencija). Prvo se polinukleotid zasiti s etidijevim bromidom kako bi sva interkalativna mjesta bila popunjena. Postupnim dodavanjem otopine ispitivanog spoja EB biva istisnut iz kompleksa s polinukleotidom, što uzrokuje gašenje fluorescencije EB (slika 4, A). Kad se u eksperimentu postigne fluorescencija slična onoj nevezanog EB, iz grafa B (slika 4) jednostavno je odrediti kod kojeg je omjera $c_{EB}/c_{\text{ispitivani spoj}}$ (IC50) je istisnuto 50 % EB.

Ovako dobivene vrijednosti omjera gruba su prosudba usporedbe afiniteta EB i ispitivanog spoja te se u slučaju ispitivanja novih interkalatora tek razlike u IC50 vrijednostima od reda veličine mogu smatrati bitnima. Zbog spomenutih ograničenja metode preporučljivo je za nepoznati spoj, ukoliko je ikako moguće, odrediti konstantu stabilno-



Slika 4 – Primjer kompetitivnog eksperimenta istiskivanja etidijevog bromida iz interkalativnog kompleksa s DNA pomoću ispitivanog spoja

Fig. 4 – Example of competitive ethidium bromide displacement from the intercalative complex with DNA by studied compound

sti i omjer r_{vs} nekom od direktnih metoda (poglavlje Spektroskopske titracije).

Zaključak

Zbog izuzetne atraktivnosti znanstvenog područja interakcija malih molekula s DNA/RNA velik broj organskih sintetičkih grupa u Hrvatskoj bavi se pripremom potencijalnih DNA/RNA liganada. S druge strane, niz istraživačkih grupa ispituje utjecaj malih organskih molekula na biološkim i biokemijskim sustavima, koristeći skupe i dugotrajne metode. Osnovni cilj ovog rada bio je ukazati na jednostavnost i upotrebljivost danas u Hrvatskoj lako dostupnih fizikalno-kemijskih metoda za brzo i pregledno ispitivanje nekovalentnih interakcija malih molekula s DNA i RNA te korisnosti rezultata takvog pristupa u izboru najatraktivnijih kandidata za biološka ispitivanja, odnosno upotrebljivosti dobivenih rezultata u dizajnu novih analoga.

Literatura

References

1. A. Travers, DNA-Protein interactions, Chapman & Hall, London, (1993).
2. P. E. Nielsen, *Nature* **365** (1993) 566.; P. A. Beal, P. B. Der-
van, *Science* **251** (1991) 1360.; B. C. Froehler, *Science* **260**
(1993) 1510.
3. W. I. Sundquist, S. J. Lippard, *Coord. Chem. Rev.* **100** (1990)
293.; J. K. Barton, *Science* **233** (1986) 727.
4. T. R. Krugh, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4** (1994) 351.; S. Neidle,
M. Waring, Molecular Aspects of Anticancer Drug-DNA
Interactions, CRC, Ann Arbor, MI, (1993) vol.1 and Boca
Raton, FL, (1994) vol.2.
5. N. Schmid, J.-P. Behr, *Biochemistry* **30** (1990) 4357.
6. R. Gambari, C. Nastrozzi, *Biochem. Pharm.* **47** (1994) 599.
7. A. C. Finlay, F. A. Hochstein, B. Moore, *Definitive Overview of Intercalative Mode of Binding*,
Chem. Soc. **73** (1951) 341.
8. F. Arcamone, S. Penco, P. Orezzi, V. Nicoletta, A. Pirelli, *Natu-
re* **203** (1964) 108.
9. H. M. Berman, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4** (1994) 289.
10. M. L. Kopka, C. Yoon, D. Goodsell, P. Flura, R. F. Dickerson,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82** (1985) 1376.
11. E. Kool, *Chem. Rev.* **97** (1997) 1473.
12. W. Saenger, Principles of Nucleic Acid Structure, Springer,
New York, (1984).
13. L. S. Lerman, *Mol. Biol.* **3** (1969) 10.
14. B. C. Baguley, *Anticancer Drug Des.* **6** (1991) 1.; W. A. Deny,
Anticancer Drug Des. **4** (1988) 441.
15. G. Capranico, *J. Mol. Biol.* **238** (1994) 2055.; P.
D'Arpa, L. Absorbance versus temperature.
16. B. C. Baguley, M. LeBret, *Biochemistry* **23** (1984) 937.; A. R.
Morgan, J. The Lee, *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* **33** (1995) 108.
17. H. W. Zimmermann, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **25** (1986)
115.
18. D. M. Crothers, *Biopolymers* **6** (1968) 575.; J. L. Botour, E.
Delain, *D. Scoulez, Ch. LePecq, L. Barbet, B. Riquen, Bio-
polymers* **12** (1973) 108.
19. J. Kapuscinski, Z. Dzizy, *Howitzer, J. Significant Studies Dyn. F.*
(1987) 1271..000 fold more sensitive than absorbance spectroscopy. By measuring the spectral changes of the ligand
as a function of nucleic acid concentration, binding isotherms can be generated and used to calculate af-
finity constants. Analysis of direct binding data must take into account the concentration of the observable species
relative to the affinity of the small molecule – DNA/RNA interaction being studied. For most titrations, the
concentration of the observable species is kept constant, while the non-observable species is titrated in. If
the concentration of the observable species is much lower than the K_d of the interaction, then the bind-
ing isotherm is sensitive only to the highest affinity binding site.
20. E. C. Long, J. K. Barton, *Acc. Chem. Res.* **23** (1990) 273.; D.
Suh, J. B. Chiles, *Anal. Med. Direct Binding Data*, pp.
San Francisco, (1980).
21. C. R. Cantor, and P. R. Schimmel, *Biophysical Chemistry, Part
III: The Behavior of Biological Macromolecules*, Freeman
(1980), pp.
San Francisco, (1980).
22. H. C. M. Nelson, J. I. Finch, B. F. Luisi, A. Klug, *Nature*, **330**
(1987) 221-226.
23. W. D. Wilson, *Scatchard Plot*, *Ch. Trans. Biochem. Soc.* **109A**
(1985) 109A.
24. W. D. Wilson, *Scatchard Plot*, *Ch. Trans. Biochem. Soc.* **109A**
(1985) 109A.
25. Do danas koriste knjižicu s linkom na web adresi
http://ndbserver.rutgers.edu/NDB/NDBATLAS/
26. I. Piantanida, B. S. Pal, A. M. Žižić, H. J. Schneider, *J. Chem.
Soc., Perkin Trans. 2* (2001) 1808.
27. G. Cohen, *Non-linear Analysis of Binding Data*, pp.
San Francisco, (1980).
28. D. B. Davies, A. N. Veselkov, J. Chem. Soc., Faraday Trans.
92 (1996) 3545.
29. G. Scatchard, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **51** (1949) 660.
30. I. R. Klotz, *Ligand-Receptor Energetics*, John Wiley & Sons
Inc. New York, 1997.
31. J. D. McGhee, P. H. von Hippel, *J. Mol. Biol.* **86** (1974) 469.
i **103** (1976) 679.
32. M. K. Pal, J. K. Ghosh, *Spectrochimica Acta* (1995), 489.
33. J. B. LePecq, C. Paoletti, *J. Mol. Biol.* **27** (1967) 87.
34. H.-C. Becker, B. Norden, *J. Am. Chem. Soc.* **119** (1997)
5798.
35. A. M. Brun, A. Harriman, *J. Am. Chem. Soc.* **113** (1991)
8153.
36. J. L. Bresloff, D. M. Crothers, *J. Mol. Biol.* **95** (1975) 103.
37. M. Wirth, O. Buchardt, T. Koch, P. E. Nielsen, B. Norden, *J.
Am. Chem. Soc.* **110** (1988) 932.
38. D. M. Crothers, *Biopolymers* **10** (1971) 2147.; H. S. Basu, L.
J. Marton, *Biochem. J.* **244** (1987) 243.

SUMMARY

Methods for Study of Noncovalent Interactions of Small Organic Molecules with DNA and RNA.

More Detailed Overview of Intercalative Mode of Binding.

I Piantanida

Extended Abstract: A number of compounds are designed and prepared with the aim of biological and/or biochemical implementation (therapeutic usage, markers, molecular devices,...). Study of noncovalent interactions of small organic molecules with natural and synthetic polynucleotides in aqueous media is a logical choice for fast screening after preparation of novel DNA and RNA active substances. Today, a number of rather simple and handy experimental methods is available for the study and characterization of the complexes between the polynucleotide and a small molecule of interest.

Thermal Denaturation: The bases of RNA and DNA are active chromophores. The thermal denaturation of nucleic acid can be monitored by measuring the change in UV absorbance of a nucleic acid solution as a function of temperature. A significant hyperchromicity (a higher molar extinction coefficient) of the nucleic acid at 260nm is observed upon the melting of duplex regions into single stands. The temperature of melting (T_m) is defined as the temperature where 1/2 of the DNA or RNA becomes denatured; for duplexes, T_m is a function of the salt concentration and appears as an inflection point in the plot of D' Arpa, L. absorbance versus temperature.

UV-vis Absorbance and Fluorescence Emission Spectroscopy: UV-vis absorbance and/or fluorescence emission spectroscopy are routinely used to probe RNA or DNA binding of small molecules. The sensitivity of each technique is different. However, fluorescence measurements are often 100 – 1000 fold more sensitive than absorbance spectroscopy. By measuring the spectral changes of the ligand as a function of nucleic acid concentration, binding isotherms can be generated and used to calculate affinity constants. Analysis of direct binding data must take into account the concentration of the observable species relative to the affinity of the small molecule – DNA/RNA interaction being studied. For most titrations, the concentration of the observable species is kept constant, while the non-observable species is titrated in. If the concentration of the observable species is much lower than the K_d of the interaction, then the binding isotherm is sensitive only to the highest affinity binding site.

Spectroscopic titrations and analysis of binding data: UV-vis absorbance and/or fluorescence emission spectroscopy are routinely used to probe RNA or DNA binding of small molecules. The sensitivity of each technique is different. However, fluorescence measurements are often 100 – 1000 fold more sensitive than absorbance spectroscopy. By measuring the spectral changes of the ligand as a function of nucleic acid concentration, binding isotherms can be generated and used to calculate affinity constants. Analysis of direct binding data must take into account the concentration of the observable species relative to the affinity of the small molecule – DNA/RNA interaction being studied. For most titrations, the concentration of the observable species is kept constant, while the non-observable species is titrated in. If the concentration of the observable species is much lower than the K_d of the interaction, then the binding isotherm is sensitive only to the highest affinity binding site.

Linear Analysis: If the binding interaction is non-cooperative, direct binding data can be analyzed using Scatchard plot. Both binding stoichiometry and the average affinity can be determined. Scatchard plot is made by plotting r_s versus r/C_f . The slope of this plot will equal K_{eq}, and the X-intercept will equal the number of binding sites. Large errors with Scatchard analysis are often encountered if the data points for the 100% free and the 100% bound states are "weighed" much more heavily than the points in the middle of the titration. Non-linear analysis of binding data can help reduce the errors associated with quantifying the spectral properties of these "extreme" (and often inaccurate) data points.

Non-Linear Analysis: Line shape analysis can eliminate much of the error associated with quantifying the spectral properties of the 100% "free" versus the 100% "bound" states of the observable species. Non-linear analysis of binding data can help reduce the errors associated with quantifying the spectral properties of these "extreme" (and often inaccurate) data points.

Ethidium Bromide Displacement: The fluorescence intensity of ethidium bromide typically increases upon the binding of nucleic acids. Subsequent displacement of ethidium is apparent by a decrease in emission intensity upon addition of a competitive inhibitor. Since it binds to most DNAs and RNAs, ethidium displacement experiments can be conducted using a wide range of nucleic acids. The concentration of competitive inhibitor needed to displace 1/2 of the ethidium bromide is marked as IC₅₀.

However, direct binding isotherms are more thermodynamically meaningful than activity measures (IC50 values).

Conclusions: Methods mentioned in this text are simple to learn and unexpensive to handle. Results obtained from these methods allow the determination of eventual selectivity or specificity of studied compounds and comparison with the previously studied analogues. This methodological approach is especially suitable for the systematic study of the large series of structurally close analogues. Results obtained for the large series of analogues often allow the choice of the most attractive substances for the biological studies, in this way saving time and material.

*Ruder Bošković Institute, Division of Organic Chemistry and Biochemistry,
P.O.Box 180, HR-10002 Zagreb, email: pianta@rudjer.irb.hr*

*Received June 12, 2003
Accepted September 16, 2003*