



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

KEMIJSKI ODSJEK

Sveučilišni poslijediplomski studij kemije

Organska kemija

SEMINARSKI RAD

KEMIJSKI SEMINAR I

METODE PROBIRA SPOJEVA PREMA AFINITETU VEZANJA NA VIŠELANČANE I HIBRIDNE
DNA/RNA STRUKTURE

(prema radu: U. Yildiz, B. Coban, *Appl Biochem Biotechnol.* **186** (2018) 547-562.)

Iva Zonjić

Zagreb, lipanj 2020.

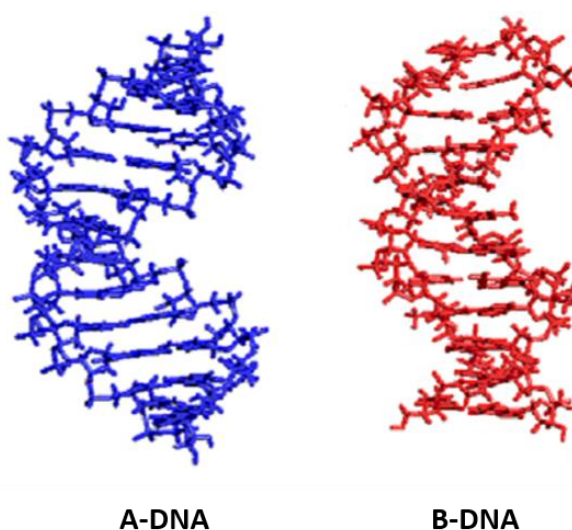
Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Molekula DNA.....	1
1.2. Višelančane i hibridne DNA strukture	3
1.3. Male molekule s preferencijalnim vezanjem na G-kvadrukse	4
2. RAZRADA	5
2.1. Metoda kompeticijske dijalize.....	5
2.2. Temperaturno mekšanje	10
2.3. Metoda izmještanja fluorescentnog interkalatora.....	12
3. ZAKLJUČAK.....	14
4. POPIS LITERATURE.....	15

1. UVOD

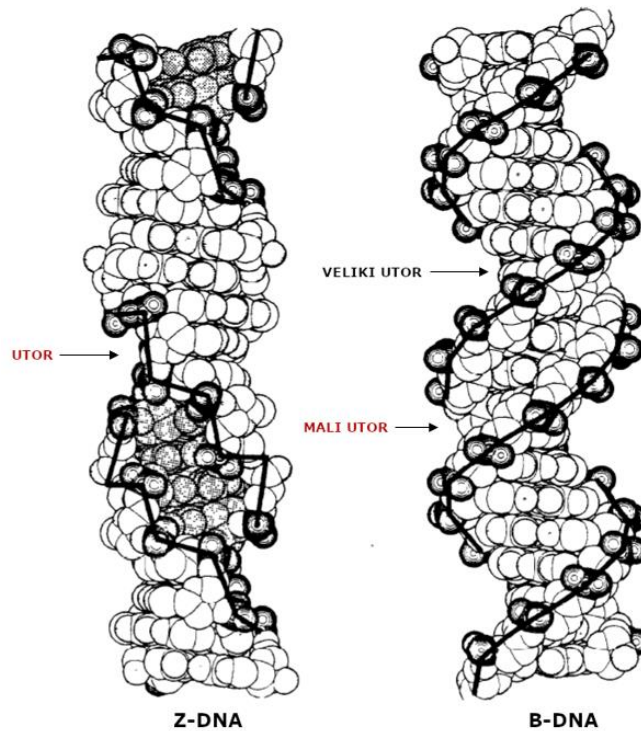
1.1. Molekula DNA

Watson i Crick 1953. opisali su strukturu DNA molekule koja sa samo četiri nukleotida kodira najbitnije informacije za život. Opisana je kao dvolančana uzvojnica koja se sastoji od aromatskih baza (purin i pirimidin), šećera i fosfatnih grupa. Purinske i pirimidinske baze nalaze se s unutrašnje strane uzvojnice, dok su fosfati i deoksiriboze smješteni s vanjske strane. Adenin se sparuje s timinom preko dvije vodikove veze, a gvanin i citozin s tri vodikove veze. U slučaju ribonukleinske kiseline, adenin se sparuje s uracilom dvjema vodikovim vezama.¹ Čak i prije otkrivanja njene trodimenzionalne strukture bilo je jasno da je molekula DNA polimorfna. Njen strukturni polimorfizam može varirati od manjih izbočenja do velikih odstupanja u strukturi čime može doći do krivog sparivanja baza, promjene broja lanaca u strukturi ili može utjecati na samu pokretljivost molekule.² Prvi dokaz polimorfnosti molekule DNA bilo je istraživanje Mauricea Wilkinsa i Rosalind Franklin u kojem je difrakcijom X-zraka napravljeno nekoliko kvalitetnih fotografija vlakna DNA. Naime, oni su uočili da kada imaju suho vlakno difrakcijom dobiju A-uzvojnica, a kada isti uzorak imaju u vlažnoj formi dobiju B-uzvojnica.³ A i B-DNA su obje desne dvolančane uzvojnice koju čine antiparalelni lanci povezani Watson-Crickovim sparivanjem baza. Na B-uzvojnici, koja je najčešća forma koja se može naći u fiziološkim uvjetima, jasno su definirani veliki i mali utor. Veliki je utor širok i plitak, a mali dubok i uzak dok je kod A-uzvojnice obrnuto. Uzvojnica tipa A šira je i kraća od B-uzvojnice, a njezini parovi baza nisu okomiti na os uzvojnice već nagnuti (Slika 1).⁴ Predstavnik A uzvojnice je molekula RNA koju možemo naći u stanici u obliku rRNA, mRNA i tRNA. Cirkularnim dikroizmom potvrđeno je (Fairall *et al.*, 1989.) da A-tip uzvojnice postoji i u DNA sekvenci [poly(dG) · poly(dC)] čime se pokazuje da u jednom dijelu molekule može postojati jedan tip uzvojnice dok u drugom može postojati drugi tip uzvojnice.³



Slika 1. Lijevo je na slici prikazana struktura A- uzvojnica koja je šira i kraća u odnosu na B-uzvojnica (desno na slici).⁵

Osim desno orijentiranih uzvojnica postoji i lijevo orijentirana DNA uzvojnica, a ona se zove Z-DNA. Može se formirati kada postoji sekvenca koja sadrži naizmjenično purin i pirimidin u određenim uvjetima poput visokog udjela soli, prisutnosti dvovalentnih kationa ili superzavijanja (engl. *supercoiling*) molekule DNA. Dvostruka uzvojnica i Watson-Crickovo sparivanje baza jedine su sličnosti B- i Z-DNA molekule. One se strukturno uvelike razlikuju u udaljenosti fosfat-baza, orijentaciji oko glikozidne veze i parova baza te u velikom i malom utoru koji su jasno vidljivi kod B-DNA dok je kod Z-DNA veliki utor gotovo nestao na ravnoj površini, a duboki i uski utor kojeg posjeduje analogan je malom utoru B-DNA (Slika 2).^{2,3,6}



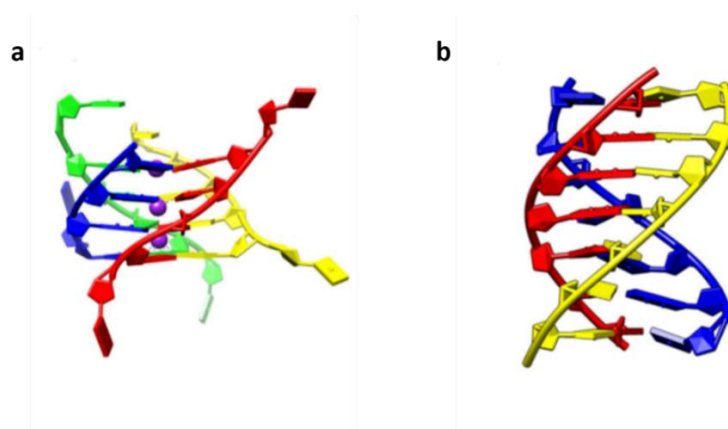
Slika 2. Usporedni prikaz strukturne različitosti između Z-DNA i B-DNA. Utor na molekuli Z-DNA analogan je malom utoru B-DNA dok je veliki utor na Z-DNA nestao.²

Međutim, neovisno o tome što je molekula DNA strukturno zanimljiva ona se tek zadnjih desetljeća u većem broju koristi kao meta za vezanje malih molekula. Do sada je razvoj bio orijentiran na druge biomakromolekule, poput proteina. Vezanjem malih molekula za DNA i RNA stvara se kompleks koji "napada" suštinu problema utječući tako na osnovne procese kao što su: ekspresija gena, stanični rast te translacijska i transkripcijska regulacije.⁷ Kako bi se takve male molekule uspješno dizajnirale i razvijale potrebno je razumijevanje njihova vezanja za molekulu DNA/RNA. Male molekule koje se koriste za njihovo prepoznavanje moraju imati određeni oblik i odgovarajuću sekvencu kako bi se mogle uspješno vezati u mali utor ili interkaliranjem.⁸ Od velike je važnosti nastavak istraživanja interakcija DNA/ligand jer je upravo DNA dobra unutarstanična meta za široki broj antibiotskih i antikancerogenih lijekova.⁹

1.2. Višelančane i hibridne DNA strukture

Molekula DNA zbog svoje polimorfnosti može se naći u obliku različitih dvostrukih i trostrukih struktura te kvadrupleksa koji su također zanimljivi za vezanje u kompleks s malim molekulama kao potencijalni terapeutici. Nekoliko godina nakon otkrivanja strukture DNA, 1960., prvi put je otkrivena struktura DNA-RNA hibrida. Međutim iako je odmah prepoznat njen potencijal kao mete za dizajn lijekova ova molekula je najmanje istražena od svih DNA struktura. DNA-RNA hibridi su važne strukture koje se formiraju tijekom različitih bioloških procesa uključujući: replikaciju DNA, replikaciju telomera uz pomoć telomeraze te reverznu transkripciju kod virusa HIV-a i drugih retrovirusa.¹⁰ Možemo ih naći u Okazakijevim fragmentima, koji se formiraju tijekom replikacije DNA, te se na taj način može utjecati i na inhibiranje transkripcije.¹¹ Dupleks nastao kombinacijom DNA i RNA značajno se razlikuje od čistog DNA-DNA i RNA-RNA dupleksa. Struktura hibridnih dupleksa u otopini je između A-uzvojnice (od RNA strukture) i B-uzvojnice (od strukture DNA). DNA-RNA hibridi strukturno se mogu razlikovati, ovisno o tome je li lanac DNA sastavljen od purina ili pirimidina pa prema tome imaju različite karakteristike za vezanje s malim molekulama čime predstavljaju veliki farmaceutski značaj. Tripleksi molekule DNA, čija se struktura sastoji od dvostruke uzvojnice na koju je dodan još jedan komplementarni lanac, otkriveni su već krajem 50-tih godina prošlog stoljeća kao potencijalni terapeutici (Slika 3a).¹² Vezanje trećeg lanca (Hoogsteenovim sparivanjem baza) je nestabilnije od Watson-Crickovog sparivanja dvaju lanaca pa su tripleksi nestabilnije strukture koje upravo male molekule interkaliranjem mogu stabilizirati.¹³

Gvaninom bogate regije u genomskoj DNA se sklapaju u višelančane strukture poznate kao G-kvadrupleksi (GQ). Oni se sastoje od dva ili tri složena kvarteta ili tetrade koji uključuju četiri gvanina u kvadratnom rasporedu koja su stabilizirana Hoogsteenovim vezama (Slika 3b).¹⁴ Smatra se da ljudski genom sadrži više od 370 000 nizova G-kvadrupleksa. Sudjeluju u ključnim biološkim procesima poput starenja i razvoja bolesti. U ljudskim telomerama sekvenca 5'-TTAGGG se često ponavlja pa su G-kvadrupleksi uključeni u aktivnost telomeraze koja ima regulatornu ulogu u 80-90 % tumorskih stanica. Osim telomernih krajeva kromosoma, promotorska područja DNA, poput gena za kontrolu rasta, *c-myc* također su bogata G-kvadrupleksima. *C-myc* onkogen ima važnu ulogu u proliferaciji, apoptozi, invaziji i metastazi stanica karcinoma čime ovakve strukture postaju zanimljiva meta za daljnja istraživanja antitumorskih lijekova.

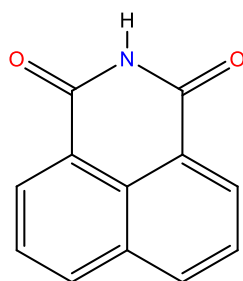


Slika 3. Shematski prikazi DNA struktura (a) TG4T-kvadrupleks (b) DNA tripleks (poli(dA)-2poli(dT)).¹⁵

1.3. Male molekule s preferencijalnim vezanjem na G-kvadruplekse

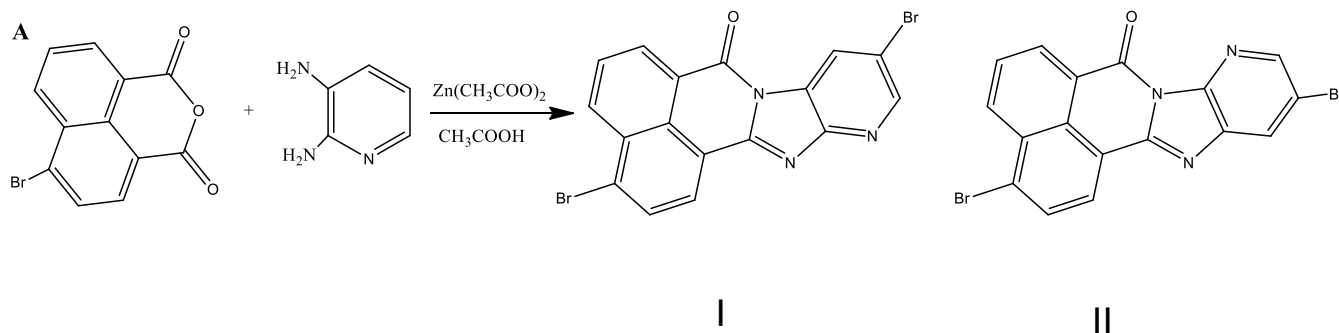
Značajka malih molekula koje imaju preferenciju vezanja na G-kvadruplekse je da imaju veliku, ravnu, aromatsku površinu s prisutnošću protoniranih bočnih lanaca kako bi elektrostatski privlačile G-kvadruplekse. Najpoznatije male molekule koje se vežu na G-kvadruplekse su policiklički planarni aromatski spojevi s barem jednim kationskim supstituentom, poput: BRACO-19, RHSP4 i telomestatina. Također se i mnogi metalni kompleksi poput platina (II) kompleksa koriste za ciljano vezanje s G-kvadrupleksima zbog njihovih kationskih metalnih središta kojima privlače G-kvadruplekse i time predstavljaju veliki antikancerogeni potencijal.¹⁴

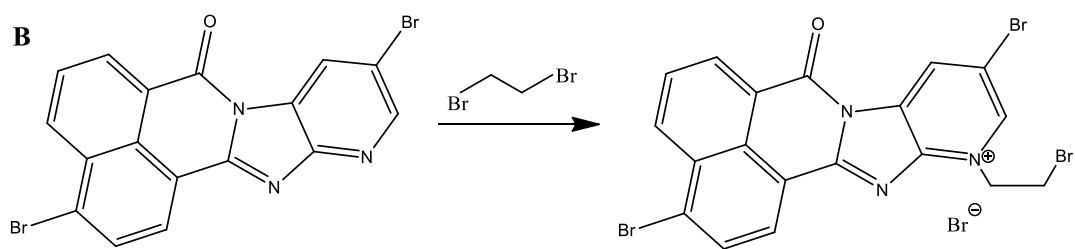
Jedna od malih molekula koja se pokazala kao efektivna za vezanje s DNA je 1,8-naftalimid (Slika 4). Njegovi derivati ulaze u utor molekule DNA ili interkaliraju te su neki već (*monafide*, *mitonafide*, *elinafide*, *bisnafide* i *UNBS5162*) u zadnjim stadijima kliničkih istraživanjima kao potencijalni kemoterapeutici.



Slika 4. Prikaz strukture 1,8-naftalamida.

U radu (Yildiz & Coban, 2018.) je sintetiziran novi heterociklički derivat 3,10-dibrom-7H-benzo[de]pirido[2',3':4,5]imidazo[2,1-a]izokinolin-7-on (**derivat 1**) reakcijom 4-brom-1,8-naftalan anhidrida s 2,3-diamino-5-bromopiridinom. **Derivat 1** ima dva izomera (I i II) (Slika 5a). Dizajniran je da ima veliku, ravnu, aromatsku površinu kako bi se selektivno vezao za G-kvadruplekse. Osim **derivata 1**, autori su sintetizirali i **derivat 2**. To je derivat s kvarternim aromatskim dušikom koji je dobiven reakcijom **prvog derivata** i dibrometana (Slika 5b). Kako bi usporedili sintetizirane derivate provedena su ispitivanja o afinitetu vezanja oba derivata na G-kvadruplekse i dvolančanu molekulu DNA koristeći se različitim metodama.





Slika 5. A) Skraćeni shematski prikaz sinteze **derivata 1** s oba njegova izomera (I i II). B) Shematski prikaz sinteze **derivata 2**.

2. RAZRADA

Razlozi neuspješnih istraživanja o vezanju hibridnih struktura i kvadrupleksa s malim molekulama leži vjerojatno u nesigurnostima i nesporazumima o preciznoj prirodi tih struktura te nedostatkom mogućih prirodnih i sintetskih liganada. Još jedna od velikih mana u takvim istraživanjima je upravo korištenje metoda kojim bi se procijenilo strukturno-selektivno vezivanje liganada za hibride i kvadruplekse. Za istraživanje vezanja malih molekula na DNA/RNA koriste se razne analitičke metode poput UV/Vis- i fluorescentna spektroskopija, CD/LD spektrometrija, viskozimetrija, DSC, ITC mikrokolorimetrija, ali one ne daju brzu procjenu veznog potencijala spojeva sa više različitih struktura DNA i RNA istodobno, posebno za velike knjižice spojeva. Nedostatak probira velikih i nasumičnih kombinatorijalnih knjižnica je dobivanje pozitivnih odgovora za vodeće (engl. *hit*) strukture, prilikom čega se zanemaruje većina drugih spojeva iz biblioteke te su na taj način mnogi podaci izgubljeni. Kompeticijska dijaliza učinkovita je metoda probira spojeva koji se vežu za DNA·RNA hibride, kvadruplekse, triplekse i ostale DNA/RNA strukture. Njene prednosti su: jednostavnost, pouzdanost, nije potreban čvrsti nosač, mogućnost brze procjene preferencijalnog vezanja liganada na različite DNA i RNA strukture istodobno.¹⁰ Uz kompeticijsku dijalizu eksperiment temperaturnog mekšanja se provodi kako bi se nadopunili i potvrdili dobiveni rezultati. Osim ove dvije metode postoji i metoda probira na čvrstom nosaču za detekciju vezanja. To je brza i jednostavna metoda izmještanja fluorescentnog interkalatora kojom se može procijeniti afinitet male molekule prema određenoj DNA strukturi.

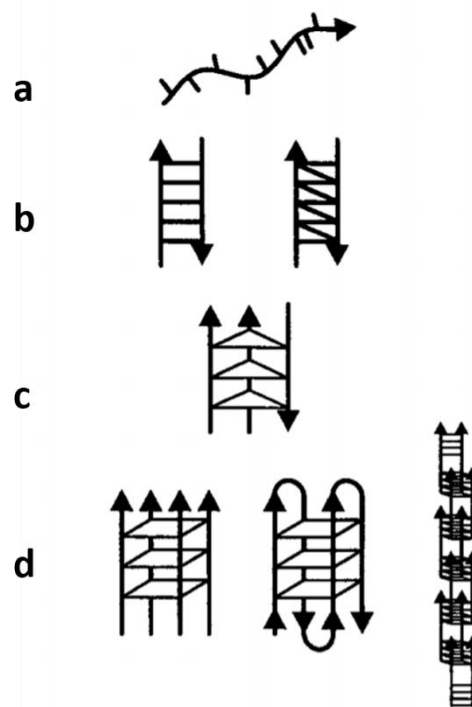
2.1. Metoda kompeticijske dijalize

Kompeticijska dijaliza (engl. *Competition Dialysis*) je pogodan alat za ispitivanje većeg broja spojeva, poput knjižice koji imaju afinitet vezanja za polinukleotide. Ona se temelji na osnovnom termodinamičkom principu ravnotežne dijalize i daje detaljnu termodinamičku informaciju o sklonosti i selektivnosti ispitivanog liganda na vezanje sa širokim spektrom polinukleotida. U eksperimentu se može koristiti do 48 različitih nukleinskih kiselina i to uključuje obe hibridne DNA·RNA forme poput poly(dA)·poly(U) i poly(A)·poly(dT) hibrida zajedno s čistim DNA i RNA dupleksima te raznim jednolančanim polinukleotidima, tripleksima i kvadrupleksima (Slika 6). Osnovno načelo kompeticijske dijalize je difuzni protok jednog ili više otapala kroz polupropusnu

membranu. One molekule koje su veličinom manje od pora membrane slobodno mogu prolaziti dok veće molekule zaostaju. U kompeticijskoj dijalizi nekoliko je različitih nukleinskih kiselina iste, točno određene, koncentracije smješteno je u zasebne komorice koje se nalaze unutar posude u koju je smještena otopina s ligandom, također određene koncentracije. Ligand prolazi kroz polupropusnu membranu iz posude u komorice i obratno. Difundirajući dio liganda se veže za određenu strukturu polinukleotida u komorici, a dio ostaje u slobodan u otopini. Ukoliko je afinitet vezanja liganda za određenu sekvencu polinukleotida viši tada će ga veći dio i ostati vezanog u komorici. Postizanjem ravnoteže svaki polinukleotid unutar komorice je vezao određenu količinu liganda sukladnom svom afinitetu vezanja što se utvrđuje spektroskopijom.^{10,16}

Kompeticijska dijaliza prvi je put napravljena već 1975. godine kada su Muller i Crothers dizajnirali jednostavniju inačicu ovog eksperimenta kako bi ispitali afinitet njihovog liganda prema različitim sekvencama DNA. U jednu su komoricu stavili AT bogatu sekvencu DNA, a u drugu GC, te su ih uronili u otopinu s ligandom i nakon uravnoteženja dobili su rezultat kojim je pokazao koju sekvencu ligand više preferira.^{16,17}

Današnji eksperiment je samo proširenje onog što su Muller i Crothers napravili. S vremenom je eksperiment napredovao pa su se uvodile različite strukture poput tripleksa, kvadrupleksa i hibrida, čije se interakcije s ligandima danas istražuju.



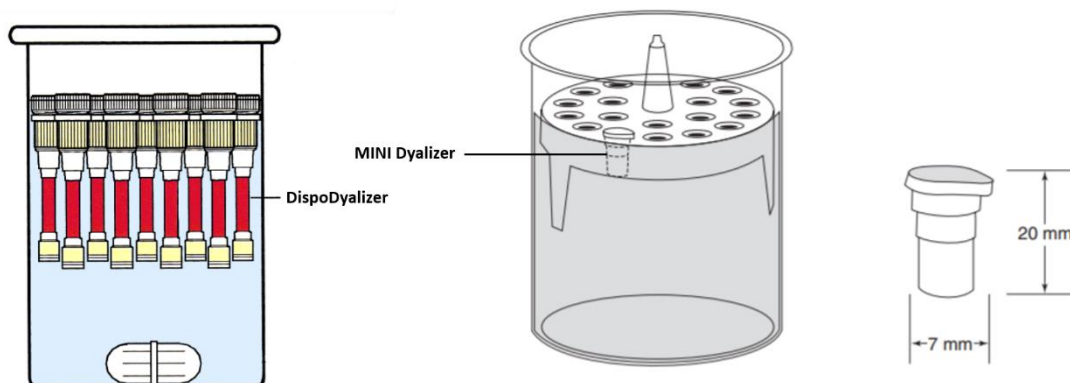
Slika 6. Prikaz svih struktura koje se koriste u kompeticijskoj dijalizi danas: a) jednolančane strukture, b) razne dvolančane strukture (A, B i Z uzvojnice) c) tripleksi d) kvadrupleksi.¹⁸

Njihovim uvođenjem rastao je i broj mjesta koja su potrebna za provođenje takvih eksperimenata pa je tako prva generacija eksperimenta mogla proučavati interakciju s 13 različitih polinukleotida, već druga generacija s 19, a treća generacija koristi tehnologiju s 96 jažica na mikrodijalizatoru u koje se mogu staviti uzorci.¹⁶ Čime se kompeticijska dijaliza pokazala kao poboljšanje u istraživanju strukturno-selektivnih interakcija liganda s hibridnim i višelančanim molekulama DNA.

Materijali

Za uspješnu provedbu eksperimenta potrebne su:

1. Jedinice za dijalizu-najprije su se koristile DispoDialyzer (Spectrum Medical Industries Inc.) u prvoj generaciji eksperimenata, a sada se koriste Pierce Slide-A-Lyzer MINI dijalizacijske jedinice s membranom koja ima granicu za molekularnu težinu od 3500 Da (Pierce Chemical Company). Obje jedinice prikazane su na slici 7.
2. Nukleinske kiseline-najduži korak kompeticijske dijalize je upravo priprema nukleinskih kiselina. Sintetski polinukleotidi (jednolančani i dvolančani) dostupni su za kupnju i pripremaju se na način da se otope u određenoj količini pufera po izboru i ostave se preko noći na 4 °C. DNA-RNA hibridni duplexi napravljeni su miješanjem jednog jednolančanog polinukleotida RNA i jednog jednolančanog DNA polinukleotida u molarnom omjeru 1:1. Nakon čega se puferna otopina s polinukleotidima zagrijavanja na 90 °C i postupno hladi kako se dobio hibridni polinukleotid.¹⁰ Tripleksi se pripremaju na isti način kao i hibridi, ali umjesto dva jednolančana polinukleotida miješaju se jedan dvolančani s jednim jednolančanim polinukleotidom, nakon čega se smjesa zagrijava i postepeno hladi. Dok se kvadrupleksi pripremaju zagrijavanjem oligonukleotida na 90 °C pet minuta te se lagano hlade do sobne temperature nakon čega se inkubiraju na 4 °C preko noći.¹⁹ Jako je važno odrediti koncentraciju svih polinukleotida koji se koriste u eksperimentu UV/Vis spektroskopijom prije samog početka. Stock otopine svih nukleinskih kiselina moraju biti pripremljene u točno određenoj koncentraciji koristeći monomerne jedinice kao standard. To znači da se koncentracija ne mjeri u fosfatima već u bazama za jednolančane polinukleotide, u parovima baza za dvolančane, tripletima za triplekse i na koncu kvartetima za kvadruplekse.



Slika 7. Prikaz jedinica za dijalizu. Lijevo na slici su prikazane jedinice za dijalizu prve generacije dok su desno prikazane mini jedinice koje se koriste danas. Krajnje desno su prikazane dimenzije MINI Dializera.^{17,18}

3. Ligandi- važno je da su ligandi koji se žele ispitati topljivi i stabilni u puferu koji se koristi za dijalizu. Također, važno je da se kod otapanja ne koristi više od 1 % DMSO-a zbog osjetljivosti

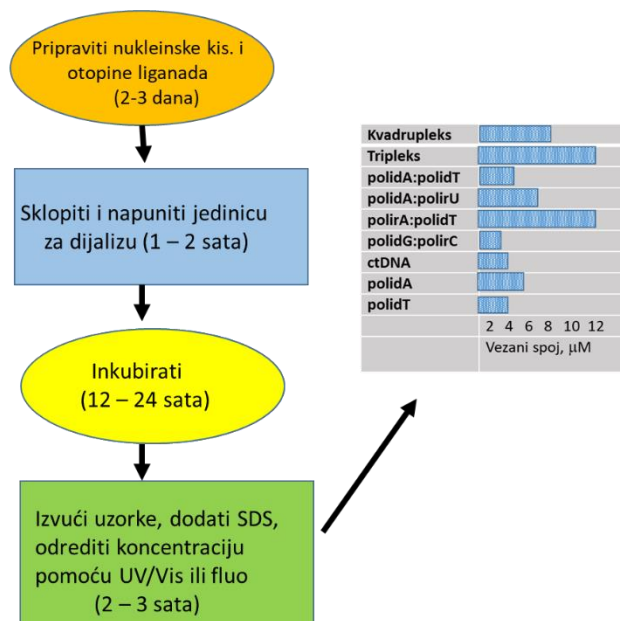
jedinica za dijalizu. Prilikom provođenja eksperimenta važno je da ligandi koji se koriste imaju spektroskopska svojstva kako bi se mogli determinirati, budući da se nakon postizanja ravnoteže rezultati mjere UV/Vis ili fluorescencijskom spektroskopijom. Za čije je određivanje potrebno također dobro otopiti spoj, paziti da nema agregiranja i paziti na odabir kivete.^{10,16}

Autori su u radu izvaganu količinu **derivata 1** otopili u 0,5 mL DMSO-a (zbog slabe topljivosti) te zatim razrijedili s puferom (100 mM KCl, 10 mM Tris; pH 7,0) 150 puta kako bi dobili željenu koncentraciju. Za otapanje **derivata 2** nije se koristio DMSO, zbog njegove bolje topljivosti, nego samo pufer isti kao i za **derivat 1**. Dvolančana molekula DNA i G-kvadrupleks pripremljeni su kao što je gore opisano, a naravno u jednakom puferu kao i oba spoja.

Metoda

Kompeticijska dijaliza je kratak eksperiment u kojem se u samo nekoliko koraka za 24 sata dolazi do rezultata.

1. Prvi korak je u čašu staviti otopinu spoja željene koncentracije (autori su u radu koristili 5 μ M koncentraciju) te se na nju stavi plastični držač za MINI jedinice za dijalizu. Kako bi se dobila željena koncentracija spoj se razrijedi s radnim puferom (u radu je korišten 20 mM Tris-HCl; pH 7,2; + 20 mM NaCl) koji mora biti jednak onom puferu u kojem su priređeni polinukleotide.
2. U svaku, zasebnu MINI jedinicu za dijalizu odpipetira se pripremljena otopina polinukleotida (način pripreme naveden u poglavlju materijali). Izabrane jedinice za dijalizu postavse u MINI plastični držač koji pluta (Pierce Chemical Company) i sve se to stavi u čašu kako bi plutalo na otopini spoja koja je priređena u prethodnom koraku.
3. Čaša s otopinom spoja i MINI jedinicama za dijalizu prekrije se parafilmom, zamota u foliju i ostavi da stoji na sobnoj temperaturi (20 - 22 °C) uz kontinuirano miješanje 24 sata.
4. Nakon uravnoteženja, pažljivo se odpipetira svaki DNA uzorak iz MINI jedinica za dijalizu u jažice na mikrodijalizatoru koji se sastoji od 96 jažica. U svaku se jažicu nakon pipetiranja doda 10 %-tnog natrijevog dodecil sulfata (SDS) kako bi konačna koncentracija u jažici bila 1 % (w/v).¹⁰
5. Ukupna koncentracija spoja (c_t) određuje se u svakoj jažici spektroskopski koristeći valne duljine i ekstincijske koeficijente za svaki od korištenih spojeva. Koncentracija slobodnog liganda (c_f) također se odredi spektroskopski tako da se alikvot iz čaše prenese u jednu od jažica na mikrodijalizatoru. Koncentracija se ne bi trebala razlikovati od početne koncentracije otopine u čaši.



Slika 8. Shematski prikaz potrebnih koraka i vremena u metodi kompeticijske dijalize.

6. Obrada rezultata-ukoliko se radi o većem broju spojeva poput knjižice onda se rezultati nakon spektroskopskog mjerenja obrađuju u obliku dijagrama u Origin softveru ili nekom drugom programu za obradu i analizu podataka. U takvom se stupičastom dijagramu prikazuje afinitet i selektivnost ispitivanog liganda s određenim nukleinskim kiselinama. Međutim, ako se radi o manjem broju spojeva onda se rezultati mogu prikazati tablicom. Konstanta vezanja, K_{app} , može se dobiti jednostavno iz sljedeće jednačbe:

$$K_{app} = C_b / \{ C_f \times ([DNA]_{total} - C_b) \}^*$$

*Gdje C_b predstavlja koncentracija vezanog spoja (engl. *bound*) i računa se prema: $C_b = C_t - C_f$ (C_t - ukupna koncentracija spoja; C_f - koncentracija slobodnog liganda). Dok $[DNA]_{total}$ označava ukupnu koncentraciju DNA.

U radu se ispituju samo dva spoja sa samo dvije DNA strukture (G-kvadrupleksom i dvolančanom molekulom DNA), a ne knjižica zbog čega su se i rezultati prikazali tablicom. Osim toga **derivat 1** nije bilo moguće obraditi ovom metodom upravo zbog problema sa topljivošću spoja (način otapanja opisan pod materijali) u kojem ima viši postotak DMSO-a od dozvoljenog i došlo bi do uništavanja jedinica za dijalizu. Metodom kompeticijske dijalize tako je određena konstanta vezanja i koncentracija vezanog liganda, a rezultati pokazuju da **derivat 2** ima bolji afinitet za G-kvadrupleks nego za dvolančanu DNA (Tablica 1).

Tablica 1. Konstante vezanja i koncentracija vezanog liganda (**derivat 2**) dobivene iz kompeticijske dijalize.

spoj	K_{app} (M^{-1})		C_b (μM)	
	G-kvadrupleks	ds-DNA	G-kvadrupleks	ds-DNA

derivat 2	$1,82 \times 10^4$	$0,23 \times 10^4$	4,64	1,08
-----------	--------------------	--------------------	------	------

*dsDNA - dvolančana molekula DNA

2.2. Temperaturno mekšanje

Temperaturno mekšanje (engl. *UV Melting Studies*) je eksperiment u kojem se određuje stabilnost sekundarne strukture DNA i RNA. Ovaj eksperiment prvi put napravljen je 50-tih godina prošlog stoljeća (Thomas, 1951.). Temelji se na zagrijavanju uzorka što dovodi do apsorpcijskih promjena i odražava se na konformacijsku promjenu molekule u otopini. Najčešće se eksperiment provodi pomoću UV/Vis spektroskopa snimanjem apsorpcije na 260 nm u ovisnosti o temperaturi. Prilikom eksperimenta dolazi do povećanja temperature što ukazuje da se ligand veže i stabilizira dvolančanu molekulu DNA. Osim molekule DNA eksperimentom se mogu utvrditi i stabilizacije druge molekula, kao što su kvadrupleksi i tripleksi. U slučaju eksperimenta s DNA·RNA hibridima ne koristi se klasični eksperiment temperaturnog mekšanja već njegova proširena inačica. Povećanje vrijednosti temperature mekšanja (T_m) u eksperimentu potvrđuje interakciju male molekule s dvolančanom DNA uzvojnicom, kao i s kvadrupleksom kada dolazi do interakcije kvadrupleks-mala molekula. Samo se eksperimenti razlikuju u tome što se za dvolančanu DNA snima na 260 nm, dok se za kvadrupleks snima na 295 nm također u ovisnosti o temperaturi. U eksperimentu temperaturnog mekšanja uvijek je potrebno staviti određenu strukturu (dvolančanu DNA/RNA, kvadrupleks, DNA·RNA hibrid ili tripleks) bez dodanog liganda kako bi smo mogli pratiti razvoj krivulje u odnosu na uzorak u kojem imamo ligand i nukleinsku kiselinu. Temperatura taljenja nukleinskih kiselina ima određenu vrijednost koja se nakon dodatka liganda mijenja. Kolika će promjena biti ovisi o ligandu i njegovu afinitetu vezanja. Za hibridne DNA·RNA strukture koristi se proširenje ovog eksperimenta u kojem se pripremi smjesa različitih struktura nukleinskih kiselina (dvolančane DNA i RNA strukture kao i dvije hibridne DNA·RNA forme) čije se temperature mekšanja razlikuju. Sve se strukture dodaju u jednu kivetu, a ne svaka pojedinačno s ligandom, a ostale karakteristike eksperimenta su jednake kao u klasičnom eksperimentu. Dodatkom liganda nukleinskim kiselinama mijenja se izgled krivulje čime se na brz i jednostavan način može napraviti brza strukturalna procjena liganda.¹⁰

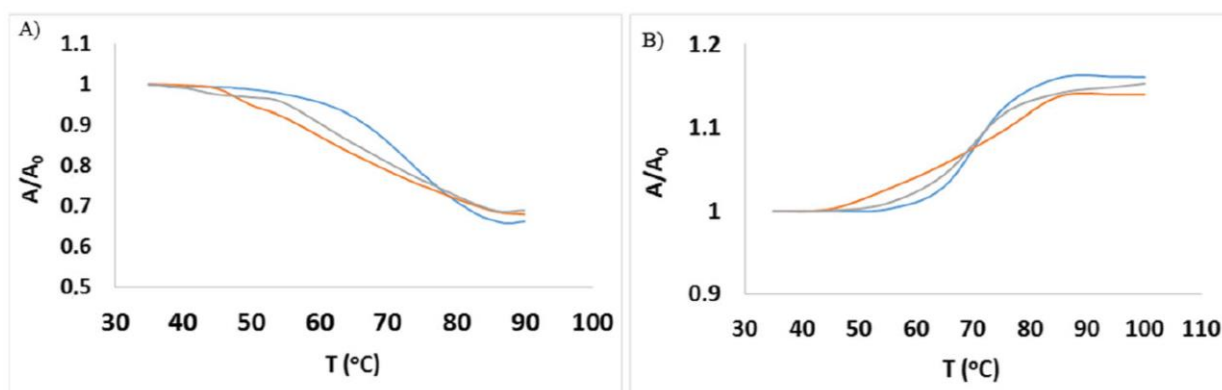
Materijali

Za provedbu ovog eksperimenta nužni su spojevi koji imaju afinitet vezanja s određenim strukturama DNA, a odabiru se prema rezultatima kompeticijske dijalize kao metode probira. Potreban je i radni pufer, kiveta te UV/Vis spektrofotometar.

Metoda

1. Pripreme se otopine nukleinskih kiselina s radnim puferom i spektroskopski im se odredi koncentracija. Na isti način se naprave otopine spojeva.

- U kivetu se doda spoj i DNA struktura u željenoj koncentraciji nakon čega se nježno promiješa i krene s mjerenjem. Kod proširenog eksperimenta sve DNA/RNA strukture pomiješaju se sa spojem u određenoj koncentraciji i tako se ekvilibriraju 12 sati na 4 °C prije početka mjerenja.
- Podaci se skupljaju na 260 nm koristeći se „Thermal“ modulom na Cary WinUV softveru kako bi se dobile krivulje temperaturnog mekšanja (Slika 9). Eksperiment se izvodi u temperaturnom rasponu od 15/20 °C do 95 °C tako da temperatura raste jedan stupanj u minuti.
- Dobiveni se podaci analiziraju u Origin softveru.



Vrijednost temperature taljenja za dvolančanu DNA iznosi oko 65 °C ± 0,20 (u uvjetima Tris/KCl pufera; 100 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5), dok je dodatkom **derivata 2** porasla na 68,5 °C ± 0,12 (tablica 2). Za kvadruplekse je karakteristično smanjenje apsorbancije nakon porasta temperature (Slika 9.). Temperatura taljenja za kvadrupleks bez dodatka ijednog derivata iznosi 64,5 °C ± 0,40 (isti uvjeti kao za dsDNA) dok se nakon dodatka **derivata 1** temperatura taljenja povećala na 69 °C ± 0,44; a nakon dodatka **derivata 2** na 74 °C ± 0,35. Čime je pokazano da se oba derivata vežu jače na G-kvadrupleks nego na dvolančanu DNA, ali i da **derivat 2** više stabilizira G-kvadrupleks (Tablica 2) čime se potvrđuju literaturni navodi.

Tablica 2. Eksperimentalni podaci dobiveni metodom temperaturnog miješanja G-kvadrupleksa i dvolančane DNA sa sintetiziranim **derivatima 1 i 2**.

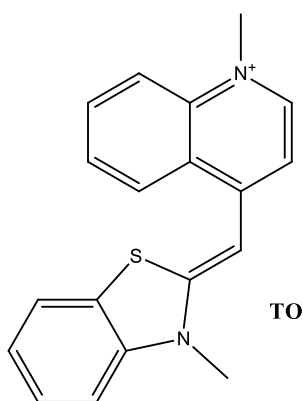
spojevi	T _m za dsDNA (°C)	Δ T _m (°C)	T _m za G-kvadrupleks (°C)	Δ T _m (°C)
-	65	-	64,5	-
1	67	2	69	4,5
2	68,5	3,5	74	9,5

2.3. Metoda izmještanja fluorescentnog interkalatora

Metoda izmještanja fluorescentnog interkalatora (engl. *Fluorescent intercalator displacement assay*, FID) je jednostavan način za vrednovanje relativnih afiniteta vezanja spojeva na nukleinske kiseline. Zasniva se na principu kojim se fluorescentna komponenta veže za nukleinsku kiselinu od interesa nakon čega se izmiče ligandom te dolazi do smanjenja intenziteta fluorescencije. Fluorescentne komponente koje se koriste u metodi kao interkalatori su: tiazol-narančasto (engl. *thiazole orange*, TO) i etidij bromid, a kao molekula koja se veže u mali utor Hoechst 33258. Metodom se lako mogu ispitivati velike knjižice spojeva koje imaju afinitet vezanja za različite DNA strukture zbog čega je ovo vrlo popularna metoda.¹⁹

Dosadašnja istraživanja su pokazala kako se TO veže s visokim afinitetom za strukturu G-kvadrupleksa zbog čega se i koristi umjesto etidij bromida koji ima veći afinitet vezanja za DNA molekulu nego za G-kvadrupleks. Osim toga kada TO interkalira s G-kvadrupleksom dolazi do jakog fluoresciranja (Slika 10).²⁰

Stoga istiskivanje interkalatora s malom molekulom od interesa daje približnu vrijednost afiniteta vezanja spoja za odgovarajuću DNA strukturu. To se mjeri vrijednosti DC_{50} koja odgovara potrebnoj koncentraciji kompleksa za smanjenje fluorescencije za 50 %.



Slika 10. Struktura interkalatora tiazol-narančasto koji se koristi u metodi izmještanja fluorescentnog interkalatora.

Materijali

Za provedbu eksperimenta potreban je interkalator, u ovom slučaju radi se o TO interkalatoru, ligand od interesa te nukleinska kiselina. Autori u radu ispituju vezanje dvaju sintetiziranih derivata samo na dvije strukture, dvolančanu DNA i G-kvadrupleks, koje su pripremljene kako je već opisano u poglavlju 2.1. kompeticijska dijaliza (podnaslov – materijali). Inače se eksperiment može koristiti, kako je opisano u uvodu, za ispitivanje knjižica spojeva pa je tada potreban mikrodijalizator s većim brojem jažica kako bi se sve strukture zajedno mogle analizirati.

Također, potreban je i radni pufer, kiveta te fluorimetar kako bi se mogao pratiti pad fluorescencije.

Metoda

1. Prvi korak je da se u kiveti s radnim puferom titrira željena DNA struktura s određenim interkalatorom kako bi se stvorio kompleks interkalator/DNA. U radu su dvolančana DNA i G-

kvadrupleks titrirani s interkalatorom TO u omjeru koncentracije TO/DNA 2:1 tijekom 30 minuta na 27 °C kako bi se dobio početni kompleks.

2. Nakon čega se kompleksu interkalator/DNA dodaje postupno određena količina liganda dok ne dođe do zasićenja, a svaka se promjena prati snimanjem spektara na fluorimetru. Autori su pobudili TO na 504 nm i na toj apsorpciji pratili promjene koje se događaju tijekom eksperimenta.
3. Analiza i obrada dobivenih podataka u Origin softwareu, a udio izmještanja TO interkalatora računa se prema formuli (1).¹⁹

$$\%FID = 100 - \left(100 \times \frac{F}{F_0}\right)$$

$$F = F_{(ligand+DNA+TO)} - F_{(pufer+TO)} - F_{(DNA+ligand)}$$

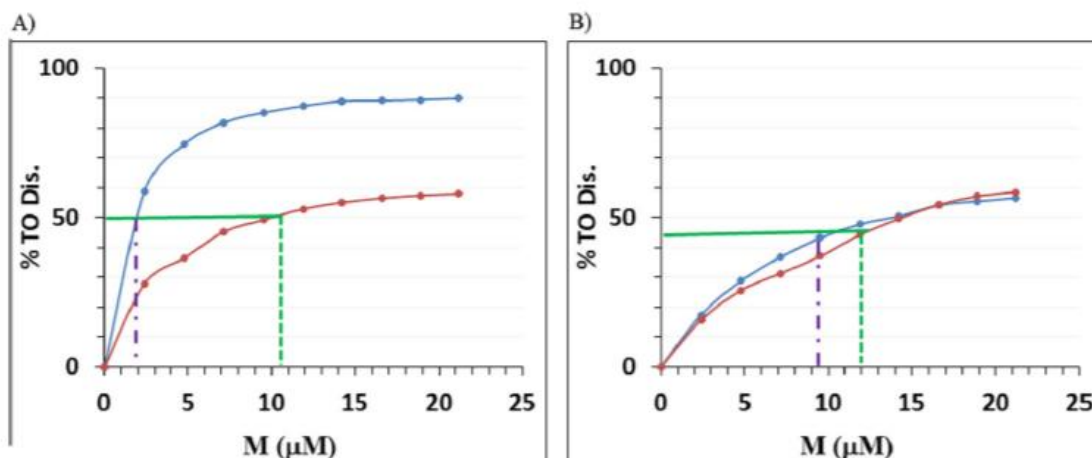
$$F_0 = F_{(DNA+TO)} - F_{(pufer+TO)} \quad (1)$$

Cilj ove metode je usporedba afiniteta vezanja sintetiziranih **derivata 1 i 2** na dvolančanu DNA i G-kvadrupleks. Rezultati iz rada dobiveni ovom metodom su prikazani u tablici 3 iz koje se može vidjeti kako dolazi do znatnog smanjenja fluorescencije nakon dodatka **derivata 2** DNA/TO kompleksu.

Tablica 3. Vrijednosti DC₅₀ za derivate 1 i 2 s dvolančanom DNA i G-kvadrupleksom.

spoj	DC ₅₀ (μM)		selektivnost (dsDNA/G-kvadrupleks)
	dsDNA	G-kvadrupleks	
1	11,9	10,51	1,13
2	9,51	1.91	4,98

Derivat 2 ima veću selektivnost prema G-kvadrupleksu u usporedbi s **derivatom 1** zbog čega mu je i vrijednost DC₅₀ dosta veća što se može vidjeti i na grafičkom prikazu (Slika 11a). Čime se zaključuje da je **derivat 2** (kvarterni aromatski dušik) bolje izmješta interkalator TO iz G-kvadrupleksa. Dok je na slici 11b vidljivo kako je slabo izmještanje interkalatora TO i jednim i drugim derivatom iz kompleksa TO/dsDNA.



Slika 11. Grafički prikaz izmještanja interkalatora TO **derivatima 1 i 2** iz: A) G-kvadrupleksa i B) dvolančane DNA.

3. ZAKLJUČAK

Metode korištene za određivanje afiniteta vezanja za višelančane i DNA/RNA hibridne strukture su vrlo jednostavne i kratke. Ni jedna od metoda ne traje duže od 24 sata, čime se omogućava brzo i efikasno dobivanje rezultata. Metode su korisne u probiru knjižice spojeva, ali i kada se radi o samo nekoliko spojeva kako bi se na brz način odredio afinitet vezanja. Tako je u ovom radu pokazano kako se metode mogu koristiti na samo dva derivata kako bi se brzo i jednostavno došlo do zaključka koji ima veći afinitet vezanja. Sintetizirana su dva nova heterociklička derivata: **1** - 3,10-dibrom-7H benzo[de]pirido[2',3':4,5]imidazo[2,1-a]izokinolin-7-on i **2** - analog koji ima kvaterni aromatski dušik kojima su određeni afiniteti vezanja za DNA strukture različitim metodama. Svim je eksperimentalnim metodama pokazano kako **derivat 2** bolje stabilizira i ima veću selektivnost prema G-kvadrupleksu. Dok se eksperimentom izmještanja fluorescentnog interkalatora pokazalo kako je derivat 2 može istisnuti TO pri nižim koncentracijama. **Derivat 2** ima bolju topljivost u vodi jer se radi o soli s kvarternim aromatskim dušikom čime se može ispitivati u kompeticijskoj dijalizi dok se derivat 1 otapao samo u DMSO-u što je bio manjak za ispitivanje ovom metodom. **Derivat 2** je kationski derivat pa, kao što literatura i navodi, ima poboljšani afinitet vezanja za G-kvadruplekse što se metodama također potvrdilo.

4. POPIS LITERATURE

1. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger: Principles of Biochemistry*, SPRINGER NATURE, Switzerland, 2005, str. 273–305.
2. A. Rich, *Gene*. **135** (1993) 99-109.
3. R.R. Sinden, *DNA Structure and Function*, Academic Press, San Diego, 1994, str. 1-31.
4. M. Badovinac, *Spektroskopska karakterizacija dipeptida pirena i cijanina i njihove interakcije s dvolančanim polinukleotidima*, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2019, str. 18-20.
5. N. N. Shaw, D. P. Arya, *Biochimie*. **90** (2008) 1026-1039.
6. A. H. Wang, G. J. Quigley, F. J. Kolpak, J. L. Crawford, J. H. van Boom, G. van der Marel, A. Rich, *Nature*. **282** (1979) 680-686.
7. P. A. Holt, R. Buscaglia, J. O. Trent, J. B. Chaires, *Drug Dev Res*. **72** (2011) 178–186.
8. S. Kumar, M. Newby Spano, D. P. Arya, *Biopolymers*. **101** (2014) 720–732.
9. I. Haq, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **403** (2002) 1–15.
10. R. T. Wheelhouse, J. B. Chaires, *Methods Mol Biol*. **613** (2010) 55–70.
11. N. N. Shaw, H. Xi, D. P. Arya, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **18** (2008) 4142–4145.
12. L. Petraccone, C. Spink, J. O. Trent, N. C. Garbett, C. S. Mekmaysy, C. Giancola, J. B. Chaires, *J. Am. Chem. Soc.* **133** (2011).
13. D. P. Arya, *Acc Chem Res*. **44** (2011) 134–146.
14. Q. Li, J. Zhang, L. Yang, Q. Yu, Q. Chen, X. Qin, F. Le, Q. Zhang, J. Liu, *Journal of Inorganic Biochemistry* **130** (2014) 122-129.
15. S. Yasar, J. B. Schimelman, M. A. Aksoyoglu, N. F. Steinmetz, R. H. French, V. A. Parsegian, R. Podgornik, *Scientific Reports* **6** (2016) 270-279.
16. P. A. Ragazzon, N. C. Garbett, J. B. Chaires, *Methods* **42** (2007) 173–182.
17. J. B. Chaires, *Top Curr Chem* **253** (2005) 33–53.
18. J. Ren, J. B. Chaires, *Methods in enzymology* **340** (2001) 99-108.
19. R. del Villar-Guerra, R. D. Gray, J. O. Trent, J. B. Chaires, *Nucleic Acid Res*. **46** (2018) 1-10.
20. D. Monchaud, C. Allain, M. P. Teulade-Fichou, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **16** (2006) 4842–4845.