

# REVERZIBILNÍ INTERAKCE DNA S MALÝMI MOLEKULAMI

tři základní typy interakcí:

## 1. nespecifická vnější vazba podél molekuly DNA -

elektrostatického původu ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ , polyaminy)

## 2. vazba do (malého nebo velkého) žlábku dvoušroubovice -

interakce přímo s okraji párů bází,  
elektrostatické plus vodíkové vazby;  
tvar a flexibilita molekuly



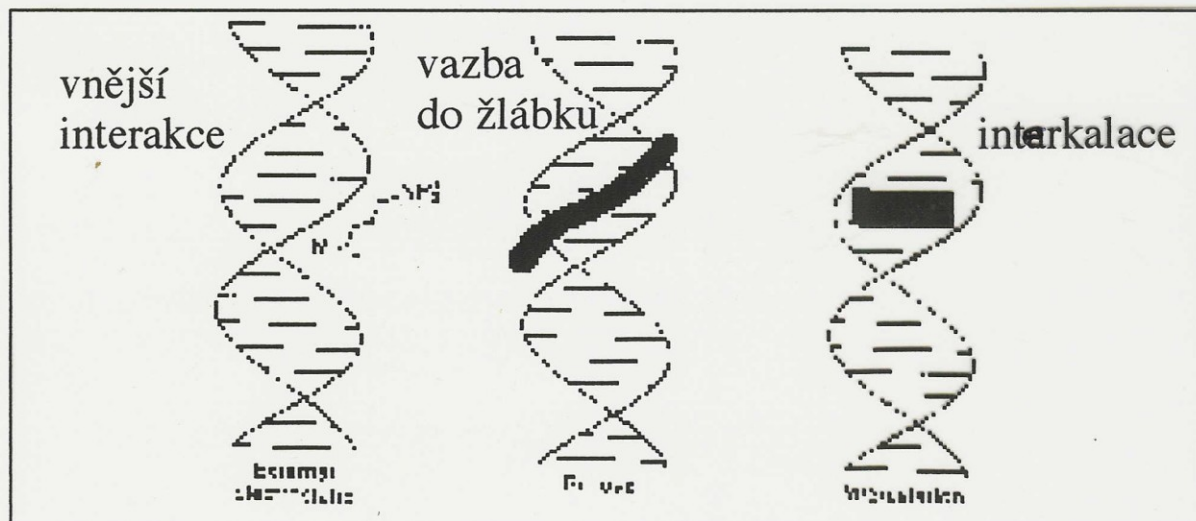
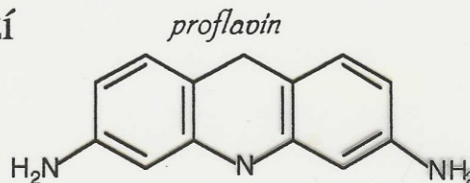
3. interkalace - planární aromatické (heterocyklické) molekuly  
mezi páry bází; elektrostatické plus vodíkové plus stacking  
interakce

vyžaduje změnu geometrie dvoušroubovice:

změna torzního úhlu, aby se páry bází

vzdálily

(0.34 nm)



## Vnější elektrostatické interakce

DNA: vysoce nabitý polyelektrolyt; náboj fosfátů ovlivňuje strukturu a interakce

Manning: teorie kondenzace protiiontů (counterion condensation)

v B-DNA připadá 1 náboj na každých 0.17 nm

(dva náboje na nukleotid a 10 bp na otáčku)

avšak: v nepřítomnosti „protiiontů“ by byla molekula nestabilní při větší hustotě nábojů než jeden na 0.7 nm

stabilitu při tak vysoké hustotě náboje zabezpečují kationty, které „kondenzují“ podél dvoušroubovice dokud hustota náboje neklesne pod jeden na 0.7 nm (což je sice entropicky nevýhodné, ale více než vyváženo výhodnými interakcemi v dvoušroubovici)

další ionty jsou vázány na zbývající záporné náboje ve smyslu Debye-Hückelovy teorie (iontová atmosféra)

Pro danou konformaci DNA je počet kondenzovaných iontů (hustota náboje) konstantní (v širokém rozmezí koncentrace iontů v roztoku)

ionty nejsou vázány na specifickém místě, rychle se vyměňují a migrují podél molekuly

pokud se odstraní náboje fosfátů (esterifikace, PNA), tvoří sice molekuly dvoušroubovici, ale nejeví obvyklé efekty v závislosti na iontové síle (závislost  $T_m$ , asociačních konstant kationických ligandů)

v B-DNA připadá na jeden fosfát 0.76 „kondenzovaného“ monovalentního kationtu a 0.88 celkem (kondens. plus Debye-Hück.)

**Vliv „kondenzovaných“ iontů na konformaci a naopak-** se změnou geometrie dvoušroubovice se mění lineární hustota náboje (např. interkalace => prodloužení molekuly => uvolnění protiiontů - platí i pro nenabitý interkalátor !)

**Kationty s více náboji** - silnější interakce, vytěsnění jednovazných (přechodné kovy - navíc koordinační vazby na báze, v tomto případě tvoří „pevné“ komplexy, tj. ion „drží“ na určitém místě. Pokud tento efekt převáží nad kondenzací, zvýšení koncentrace iontu vede ke snížení  $T_m$ : v ss DNA jsou báze přístupnější)

tří- a vícevazné kationty (hexaamminkobaltitý, polyaminy) indukují (v nepřítomnosti dvou- a jednomocných iontů) „kolaps“ molekul DNA (při její nízké koncentraci) do vysoce kondenzovaného stavu (silná neutralizace nábojů plus iontové můstky); při vyšší koncentraci DNA se tvoří agregáty a dochází k precipitaci

**Voda** silně vázaná: interaguje specificky s náboji fosfátů a polárními skupinami cukru a bází; vliv na stabilitu a interakce DNA  
další molekuly interagují méně pevně->postupný přechod do „volného“ stavu

### Nespecifické vnější „stacking“ interakce

interakce mezi planárními molekulami v roztoku (di- a „vícemery“) ve smyslu vertikálních interakcí ( $\pi$ - $\pi$ )

pokud jsou nabité (proflavin), odpuzují se;

pokud ovšem zároveň interagují

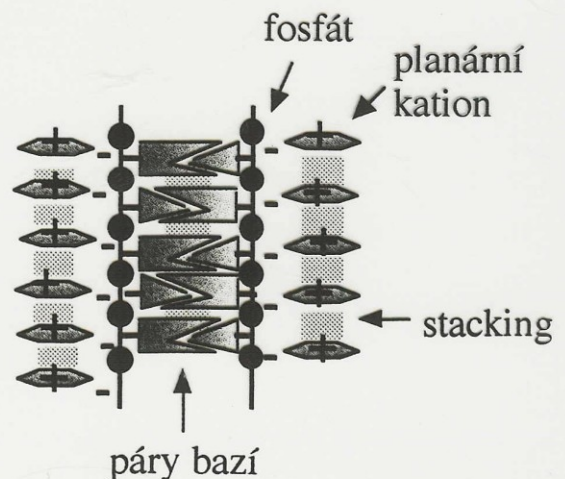
s opačně nabitým polyelektrolytem (DNA),

mohou vytvořit stacking komplexy

podél jeho molekul

(vnější stacking planárních kationtů);

efektivní jen při nízké iontové síle

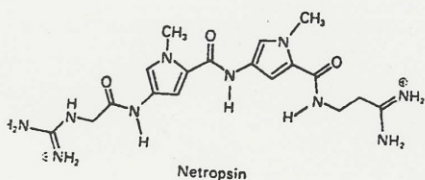


## Vazba do žlábků (groove binding => dále G.B. molekuly)

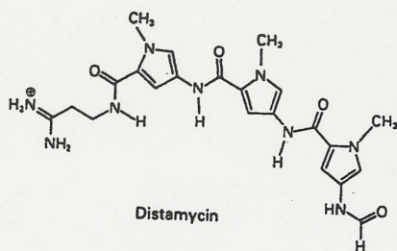
malé molekuly - většinou do malého žlábků

proteiny, oligonukleotidy - do velkého (oligos: Hoogstenovo párování)

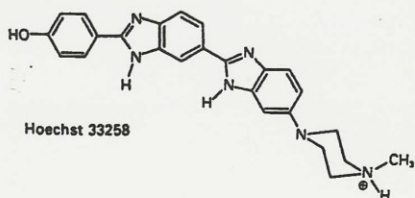
Typická molekula vázající se do m.ž.: několik aromatických kruhů (benzen, furan, pyrol) spojených vazbami s torzní volností



-molekuly mohou „zapadnout“ do žlábků, mohou **opsat jeho helikální zakřivení**  
-vytěsní molekuly vody



-obecně preferují **A:T oblasti** - kde je malý žlábek užší a lépe tam příslušné aromatické molekuly „pasují“ a vytvářejí ve srovnání s G:C oblastmi silnější INTERAKCE:



-**van der Waalovy** vazby na řetězec, který tvoří stěny žlábků: v A:T těsnější

**-vodíkové vazby** s bázemi: na O<sup>2</sup>-T a N<sup>3</sup>-A

v GC párech je sterické bránění aminoskupinou G (tvoří vodíkovou vazbu O<sup>2</sup>-C, která sama leží v malém žlábků)

-negativní **elektrostatický potenciál** je větší v A:T úsecích než v GC (G.B. molekuly jsou zpravidla kationty)

Obecně existuje u G.B. látek možnost **rozpoznání specifické sekvence** (na rozdíl od interkalátorů): G.B. molekuly mohou obsáhnout několik pár bází nodél řetězce (kromě látek vázajících se do malého žlábků též např.

## Netropsin:

známa krystalová struktura s oligonukleotidem

CGCGAATTCGCG

váže se na sekvenci **AATT**

tvorí amidové skupiny vodíkové

vazby s N3-A a O2-T

pyrolové kruhy jsou vzájemně zkříženy o asi 33 °

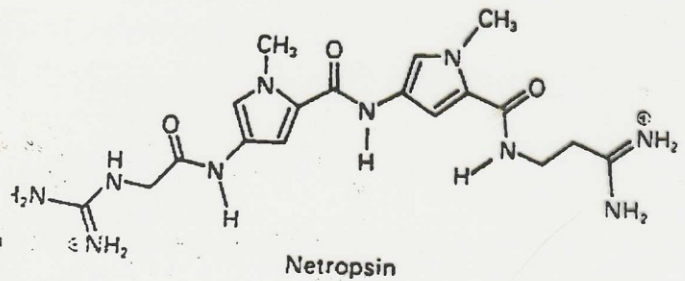
vazba netropsinu způsobuje ohyb osy dvoušrobovice a mírné

**zavinutí** v A:T oblastech (=> příprava pozitivně superhelikální DNA)

v GC - mnohem slabší vazba; při náhradě pyrolových kruhů

imidazolem (=> **lexitropsiny**), který je akceptorem vodíkové vazby

z aminoskupiny G => zvýšená vazba v G:C oblastech

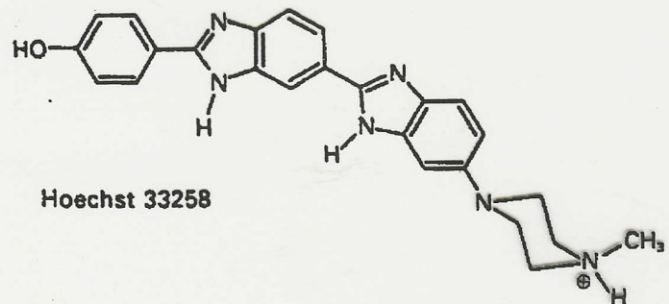


**Hoechst 33258** - antibiotikum, barvení chromozómů, stranovení

DNA (fluorescenční komplex)

krystaly se stejným oligonukleotidem jako netropsin: vazebné místo

je spíše **ATTC**



## Interkalace

zač. 60 let, Lerman: interakce DNA s planárními organickými kationty

interkalace - vmezeření planární molekuly mezi sousední páry bází

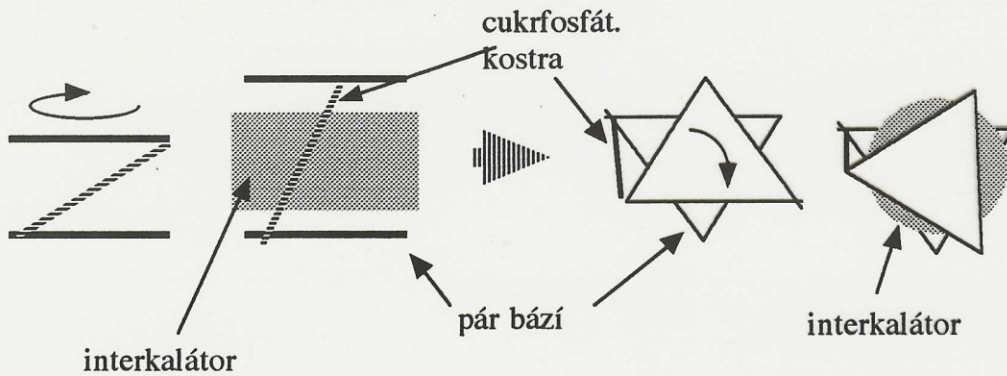
-to vede k prodloužení molekuly DNA (o efektivní tloušťku

interkalátoru, asi 0.34 nm podle klasického modelu)=>změna

hydrodynamických vlastností

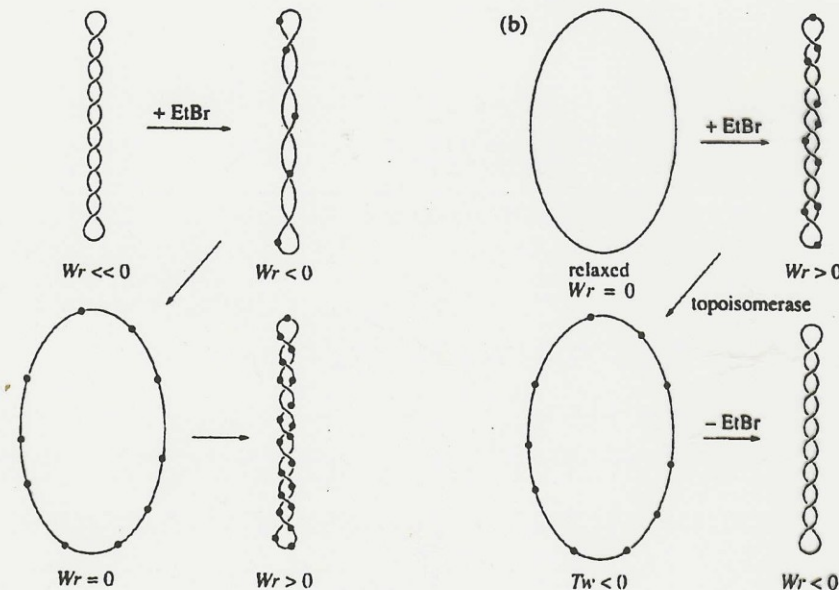
-to je spojeno s vzájemnou torzní rotací párů bází, zmenší se twist (z

obvyklých 36 °) a zvětší počet bp na otáčku



v kovalentně uzavřené kružnicové DNA se v důsledku toho zvětší počet nadšroubovicových závitů (tj. negativně scDNA se relaxuje, relaxovaná přechází na pozitivně sc)

=>**příprava topoizomerů**



změna torzního úhlu (odvinutí dvoušroubovice)- ethidium a propidium 26 °, akridiny (proflavin) 17 °, daunomycin, adriamycin - 11 °

G.B. molekuly DNA neodvíjejí (neropsin: zavinutí)

dichroismus - planární cyklické systémy poskytují podobné chiroptické parametry jako páry bází

anizotropie polarizace fluorescence (např. ethidium):

studium konformace DNA

(G.B. molekuly mívají dichroismus opačný)

interkalace vede ke zploštění „vrtulového zkrutu“ párů bází, interkalátor a přilehlé bp mají navíc „tilt“ 20-25° (zesílení stacking interakcí s interkalátorem)



Tilt



Roll



Twist



Propellor Twist

avšak: interkalace nezpůsobí celkový ohyb DNA (lokální změny parametrů se zprůměrují)

### INTERAKCE:

**elektrostatické** - kationické interkalátory vs. fosfáty

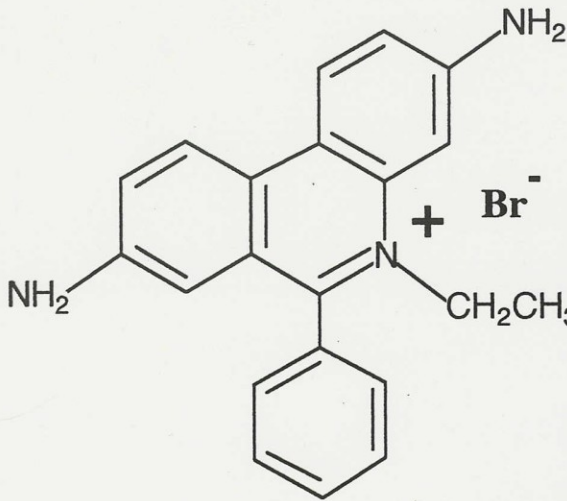
**stacking** - s páry bází

**vodíkové vazby** (obvykle exocyklických aminoskupin - např. ethidia, proflavinu - na kyslíky v fosfodiesterových vazbách)

STRUKTURA: klasické interkalátory obsahují 2 - 3

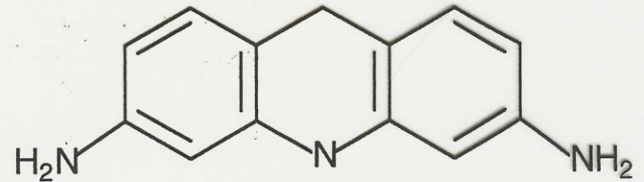
kondenzované aromatické (heterocyklické) kruhy a kladně nabitě skupiny (často amino-, kvartérní dusík...)

(G.B. molekuly: cykly nejsou kondenzované, mohou vzájemně rotovat - ale též „neklasické“ interkalátory)



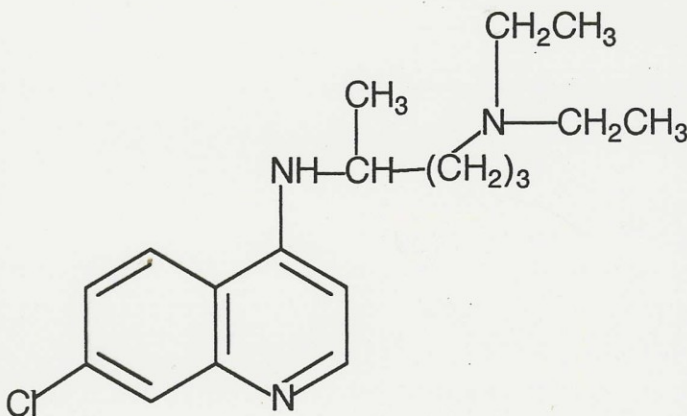
**ethidium** (bromid)

**propidium:** místo ethylové skupiny  $-(\text{CH}_2)_3\text{N}^+(\text{CH}_3)(\text{C}_2\text{H}_5)_2$  (bývá jako iodid)  
fenylová skupina brání dokonalé interkalaci=> určitý „kink“ v místě vazby  
tyto postranní skupiny v malém žlábk



proflavin

barvení gelů, jader, stanovení DNA (fluorescenční komplex)  
příprava topoizomerů, izolace scDNA v CsCl-gradientu



**Chloroquin**

slabší interkalátor  
-stanovení superhelikální hustoty gelovou elektroforézou  
-2D-elektroforéza: sledování strukturních přechodů v scDNA

řada antibiotik: adriamycin, daunomycin, doxorubicin

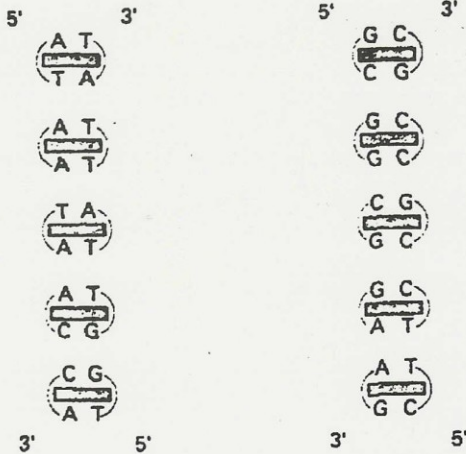


## Vazebná specificita

jednoduché interkalátory interagují jen s dvěma bp

(G.B. molekuly s více)

=> deset možností vazebných míst:



(postranní řetězce mohou ovlivňovat i další bp)

většina interkalátorů poněkud preferuje G:C páry

(G.B. molekuly A:T)

důvod - obecně větší vnitřní dipólmoment v G:C páru, který indukuje polarizaci v molekule interkalátoru

interkal. s preferencí k A:T byly syntetizovány

obecně je selektivita G.B. molekul větší než interkalátorů (protože

„dutiny“ mezi A:T a G:C páry se málo liší co do elektrostatických, van der Waalových, hydrofobních atd. interakcí; na druhé straně žlábků v A:T a G:C oblastech jsou velmi rozdílné)

„**vyloučení sousedního místa**“ (neighbour exclusion):

obecně by mohl interkalátor obsadit všechna místa mezi bp (tj.

stejný počet molekul jako bp), ale v praxi je saturovaná DNA

interkalátorem obsazena jen asi z 1/2 - střídavě, jen každé druhé místo:

jestliže je jedno místo obsazeno, na sousední se nenaváže

-z konformačních důvodů (změna indukovaná interkalací další interkalaci v sousedství znemožní)

-z elektrostatických důvodů (první interkalátor neutralizuje negativní náboj DNA, vazba druhého cv sousedství je méně výhodná)

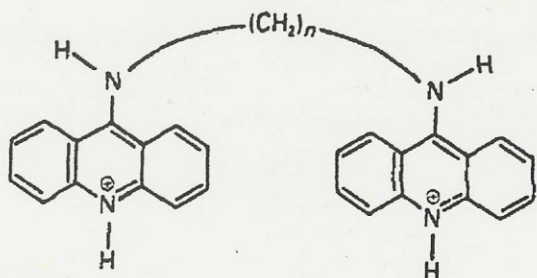
- některé bisinterkalátory >> toto pravidlo porušují

## Bisinterkalátory

syntetické: dva planární interkalující cyklické systémy spojené řetězcem, který může mít varabilní délku (např. methylenové skupiny)

-zvýšení vazebné konstanty (význam např. u léků)

-pokud je spojovací řetězec příliš krátký, molekula může porušit

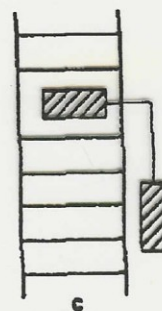
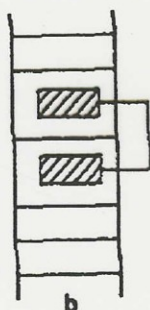
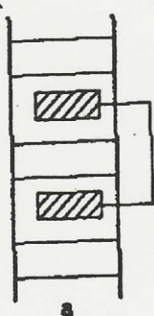


např. bisakridin s oligomethylenovým linkerem

pro  $n < 4$  se váže jen jako monointerkalátor, druhá akridinová skupina je vně

$n = 6$  - bisinterkalace s porušením pravidla vyloučení

$n > 8$  - bisinterkalace bez porušení



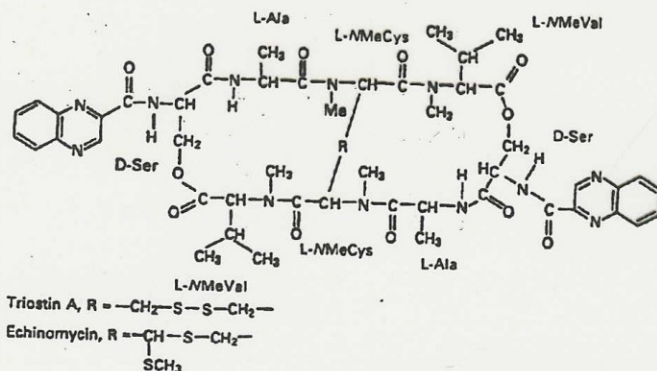
(modelový systém, který tak ve skutečnosti možná nefunguje; existují však rigidní molekuly, které se prokazatelně bisinterkalují s porušením pravidla)

# echinomycin a triostin A

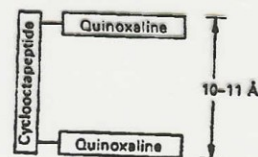
přírodní antitumorová antibiotika

cyklické peptidy tvořící relativně rigidní rovinu se dvěma chinoxalinovými kruhy kolmými k této rovině

ideální konfigurace pro bisinterkalaci (neporušuje pravidlo vyloučení: mezi se vejdou dva bp)



preferují G:C páry mezi interkalujícími skupinami



## krystalová struktura

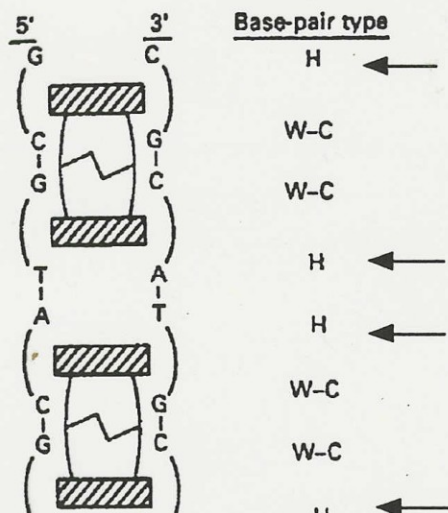
triostinu s GCGTACGC

cyklický peptid je v malém žlábkku

NH skupiny alaninových zbytků tvoří vodíkové vazby s N3 obou G, jejich karbonylové skupiny s aminoskupinami G => důvod specificity

v krystalu mají adeniny v A:T párech opačnou konfiguraci (syn-) a tvoří Hoogstenovo párování, stejně jako koncové G:C (tam je to přakvapující, protože C v Hoogstenově páru by měl být protonizován)

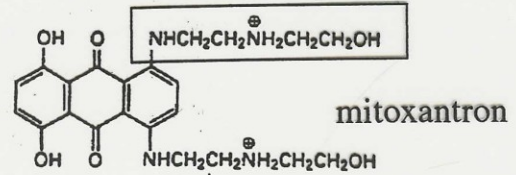
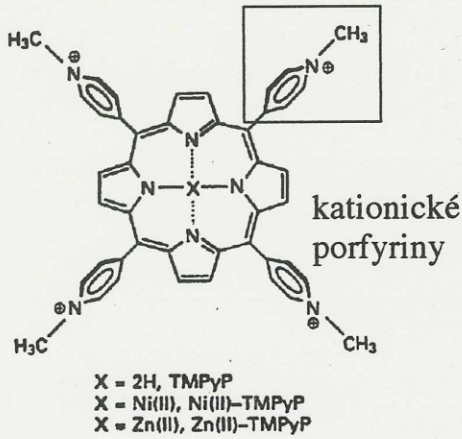
(to neplatí pro „dlouhou“) DNA v roztoku



tyto krajně neobvyklé konformační změny DNA jsou energeticky kryty tvorbou komplexu - to je obecný jev u konformačních změn indukovaných vazbou jakékoli molekuly

## Neklasické interkalátory

Interkalátory s více objemnými skupinami - pokud jsou na opačných stranách molekuly, musí se jedna z nich při tvorbě komplexu „protlačit“ skrz dvoušroubovici mezi bp => pomalý krok, kinetický blok pro tvorbu komplexu (zejména pokud jsou postranní řetězce nabitě nebo polární)

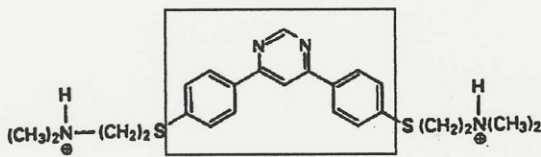


vazba jednoduchého klasického interkalátoru (proflavin) je dvoustupňová:

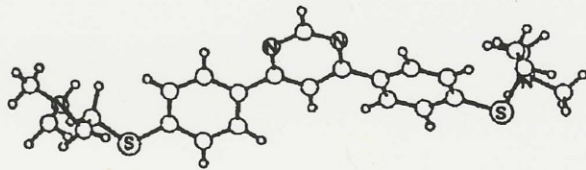
1. nespecifická iontová interakce s DNA a lineární difuze k místu, kde 2. vstoupí do interkalačního komplexu u molekul s objemnými skupinami vyžaduje druhý krok významnou distorzi struktury DNA nebo i přerušení vodíkových vazeb v bp => pomalu

boční řetězce tvoří výhodné interakce např. ve žlábkách, nebo elektrostatické s fosfáty => vysoké vazebné konstanty (navíc je kineticky blokována i disociace interkalačního komplexu)

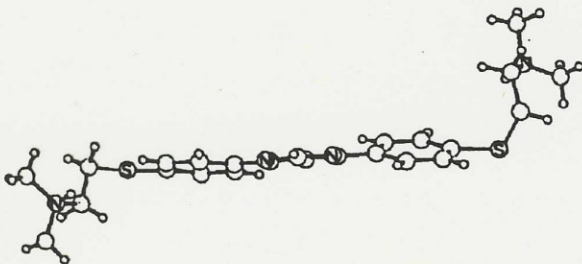
Interkalátory s „vrtulovým zkrutem“ - nekondenzované cyklické systémy (jako G.B. molekuly) - mají torzní volnost



struktura odpovídající G.B., ale jde o silný interkalátor (odvíjí scDNA, prodlužuje molekuly DNA)



twist v molekule může kopírovat propeller-twist párů bází

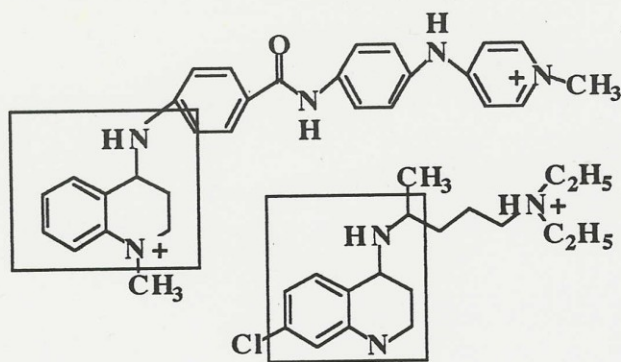


## Interkalace vs. vazba do žlábků

řada molekul má podobnou strukturu, ale váže se odlišným způsobem

o tom, jestli se bude molekula interkalovat, nebo G.B., rozhoduje termodynamika tvorby toho kterého komplexu (tj jak výhodné interakce mohou vzniknout při tom kterém způsobu)

G.B. molekula SN6999 vs. interkalátor chloroquin:



obsahují stejnou část molekuly

-SN6999 může vytvořit řadu výhodných interakcí ve žlábků (vodíkové vazby, van der Waals, elektrostatické)

-chloroquin nemá pro tyto interakce výhodnou strukturu a jeho cyklický systém se (poměrně slabě - má jen dva cykly) interkaluje

G.B. vs. „vrtulové“ (nekondenzované) interkalátory:

difenylpyrimidin nemá skupiny, které by byly donory vodíkových vazeb => vazba do žlábků není výhodná

DAPI (4',6-diamidino-2-fenylinol): (barvení jader)

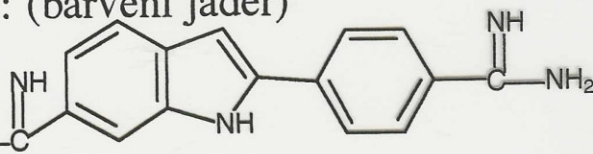
způsob vazby odráží vlastnosti

DNA v závislosti na sekvenci:

v **A:T** oblastech se váže do žlábků

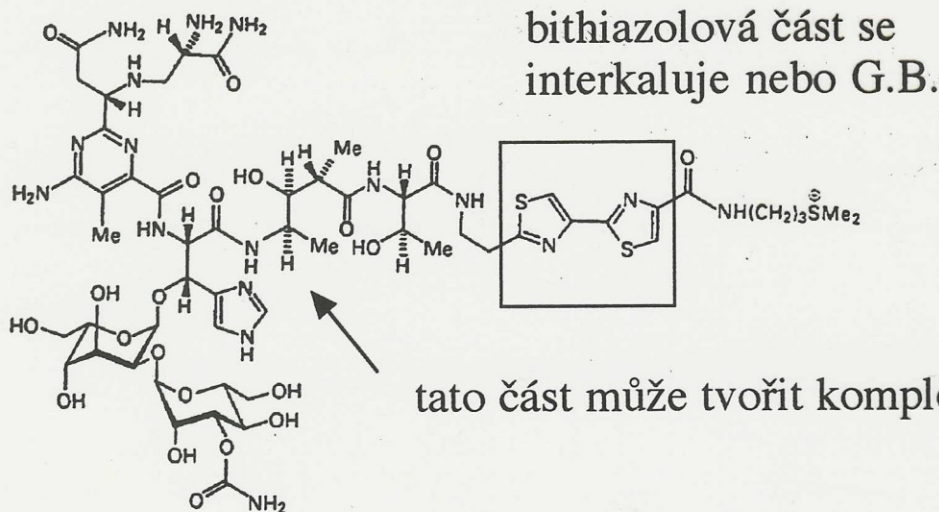
v **G:C** oblastech se interkaluje

(v A:T místech je vazba do žlábků výhodnější než v G:C, při interkalaci je tomu mírně naopak)



# Činidla štěpící DNA

## antibiotika - bleomycin A2 a deriváty

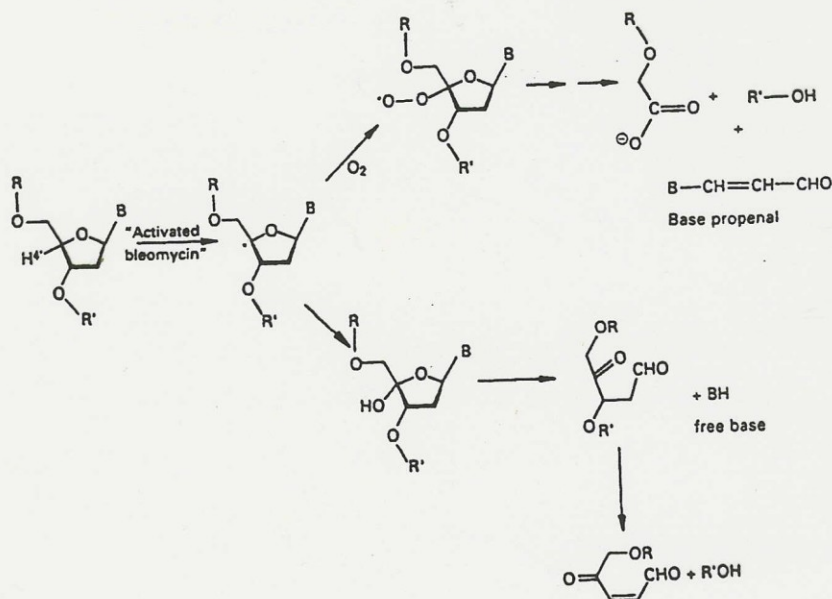


bleomycin štěpí DNA se selektivitou pro Pu.Py sekvence, značný podíl dvouřetězcových zlomů

nejčastěji komplexy s Fe(II), aktivovaný je ternární komplex

bleo-Fe(II)-O<sub>2</sub> po jednoelektronové redukci na radikál (další

molekulou bleo-Fe(II)->bleo(Fe(III)); oxidovaný komplex se může reaktivovat thioley nebo askorbátem; reakcí s peroxidem vodíku vzniká aktivovaný komplex přímo r bleo-Fe(III))



reakce začne odtržením vodíku z 4' uhlíku deoxyribózy, čímž vznikne radikál v DNA

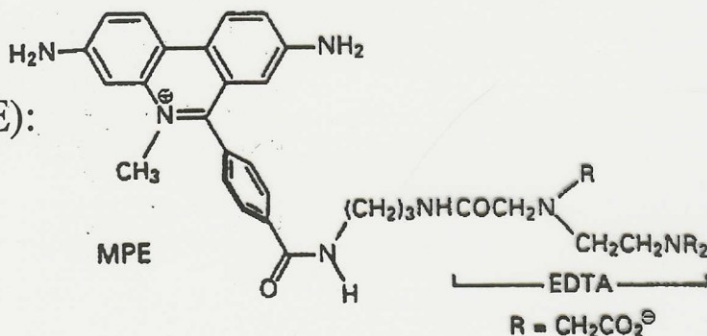
- v konečném důsledku vznikají volné báze a bázemi substituované propenaly, a zlomy v

## Umělá činidla štěpící DNA (vesměs kovové komplexy)

-porfyriny

-[Cu(II)(phen)<sub>2</sub>]

-methidiumpropyl(EDTA) (MPE):



činidlo pro footprinting, neselektivní chemická nukleáza v přítomnosti Fe(II), O<sub>2</sub> a redukčních činidel

methidiová část se interkaluje

EDTA je v malém žlábků

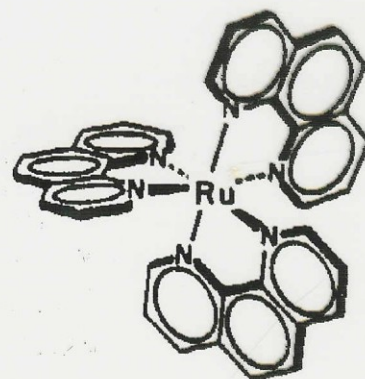
v reakční směsi jsou generovány hydroxylové radikály (ty jsou - na rozdíl od bleomycinu - volné, mohou difundovat - ale na rozdíl od volného Fe/EDTA činidla - vznikají přímo v blízkosti DNA, kterou štěpí

distamycin-EDTA : podobný, ale selektivita pro A:T oblasti

adukty EDTA s homoPy oligonukleotidy: štěpení v

homoPu.homoPy sekvencích, které s činidlem tvoří triplex

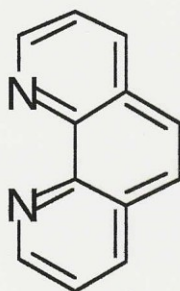
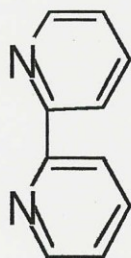
# Metalointerkalátory



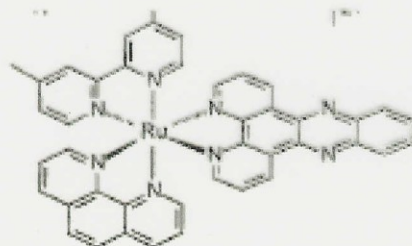
centrální atom: Ru, Rh, Os, Co...

náboj ovlivňuje způsob interakce (interkalace vs. elektrostaticky)

struktura ligandu rovněž (interkalace vs. do žlábků)



1,10-  
fenantrolin



interkalace

studie struktury DNA

přenosu náboje v DNA

hybridizace DNA, vývoj senzorů

interakcí s proteiny