

Interakcije lekova i DNK– osobine i detekcija

Mara M. Aleksić^{1*}, Vera Kapetanović²

¹Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Katedra za fizičku hemiju i instrumentalne metode, Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

²Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Katedra za analitičku hemiju, Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

*adresa za korespondenciju: Mara Aleksić,

Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet, Katedra za fizičku hemiju i instrumentalne metode, tel: +38111 3951 294; e-mail:mar@pharmacy.bg.ac.rs

Kratak sadržaj

Komplekse sa dezoksiribonukleinskom kiselinom (DNK) gradi veliki broj neorganskih i organskih jedinjenja, među kojima su od posebnog značaja lekovi iz grupe hemioterapeutika. U radu je dat pregled strukturnih karakteristika DNK molekula i tipova interakcija (kovalentne i nekovalentne) koje se javljaju između molekula leka i DNK. Kovalentno vezivanje leka za DNK je ireverzibilno i vodi ka kompletnoj inhibiciji funkcija DNK što dovodi do smrti ćelije, dok je nekovalentno vezivanje reverzibilno i zasniva se na principu molekularnog prepoznavanja. Posebna pažnja je posvećena objašnjenju specifičnih mesta u molekulu DNK na kojima dolazi do vezivanja leka, u zavisnosti od strukturnih karakteristika molekula leka. Najveći broj lekova koji reaguju nekovalentno su interkalatni agensi, a pored njih postoje i lekovi koji se vezuju za mali ili veliki žleb molekula DNK.

Prilikom građenja ovih kompleksa nastaju promene kako na molekulu DNK tako i na molekulu leka. U radu je dat pregled metoda koje se koriste u ispitivanju interakcija između leka i DNK sa ciljem detekcije i objašnjenja nastalih promena. U ovu svrhu koriste se spektroskopske metode, kao što su UV/VIS, infracrvena, ramanska i NMR spektroskopija, zatim spektroskopije polarizovane svetlosti: metode linearnog i cirkularnog dihiroizma, fluorescentne anizotropije ili rezonancije, a u novije vreme i osetljivi DNK-biosenzori. Predstavljeni su literaturni rezultati dobijeni primenom navedenih metoda koji se koriste za utvrđivanje oštećenja na DNK molekulu, određivanje mesta specifičnog vezivanja leka, redosleda vezivanja, kao i za detekciju konformacionih promena nastalih usled lek-DNK interakcije.

Ključne reči: Lek, DNK, interakcija, spektroskopske metode, DNK-biosenzori.

Uvod

Dezoksiribonukleinska kiselina (DNK) [1-3] je prirodni produkt od ogromnog značaja za razumevanje mehanizma genetskih procesa, rasta, razvića i starenja ćelije. Otuda je razumljiv interes za proučavanje procesa na nivou interakcija DNK sa lekovima iz grupe hemioterapeutika. Vezivanje peptida, malih organskih i neorganskih molekula za DNK može uticati na brojne biološke procese u kojima učestvuje DNK, kao što su transkripcija ili replikacija [2, 3]. DNK započinje transkripciju ili replikaciju kada dobije signal od regulatornog proteina koji se vezao za njen određeni deo. Ako se umesto regulatornog proteina umeša neki drugi mali molekul, funkcija DNK se veštački menja, bilo da se inhibira ili aktivira. Ovi uticaji s jedne strane mogu usporiti ili potpuno sprečiti rast ćelije, dok s druge strane mogu dovesti do prekomerne produkcije nekog proteina i nekontrolisanog rasta ćelije. Kada nastala aktivacija ili inhibicija funkcije DNK deluje tako da leči ili kontroliše bolest, mali molekul predstavlja lek, dok je u suprotnom slučaju - citotoksični agens. Veoma obimnim hemijskim i biohemijskim ispitivanjima okarakterisan je veliki broj supstanci koje reaguju sa DNK molekulima, među njima su antivirusni, antibakterijski, antiprotozoalni i antitumorski agensi. Neki od njih se primenjuju u kliničkoj praksi, dok su drugi još uvek u fazi ispitivanja.

Primenom kristalografskih i NMR ispitivanja [4-6], u prethodnih dvadesetak godina, mnogo se saznalo o konformacionoj fleksibilnosti DNK molekula, kao i o uticaju sekvence baza i ulozu molekula vode i kontraiona na ove parametre. Usledio je veliki izazov, prikupiti navedene podatke o kompleksima leka i DNK i na osnovu njih saznati što više o pravilima po kojima se dešava redosled specifičnog vezivanja leka (*eng. sequence specific binding*), te tako steći uvid u korelaciju između DNK strukture, sekvence vezivanja leka i aktivnosti.

Cilj ovoga rada je da se prikaže literaturni pregled postojećih fizičko-hemijskih metoda koje se koriste u proučavanju interakcija između leka i DNK. Predstavljene su odabrane optičke i elektrohemijske metode koje se primenjuju u ispitivanju mehanizma interakcije lek-DNK, za određivanje mesta specifičnog vezivanja leka, kao i za utvrđivanje oštećenja nastalih na DNK molekulu. Iako sve metode predstavljene u ovom radu imaju svoje specifičnosti, zajednički im je cilj da merljive biofizičke parametre povežu sa citotoksičnošću, tj. antitumorskom aktivnošću leka.

Veliki broj jedinjenja gradi komplekse sa DNK i to uglavnom kada je DNK u nativnoj formi, u obliku dvolančane spirale. Komplekse grade kako organski mali molekuli (prirodni ili sintetički proizvodi), tako i neorganska jedinjenja, kao što je cis-platina. Pre razmatranja metoda detekcije nastalih kompleksa, dat je kratak pregled strukturnih karakteristika dvolančane spirale molekula DNK, uz osvrt na raspoloživa mesta za interakciju sa lekovima i tip hemijskih veza koje se uspostavljaju između leka i molekula DNK.

Delovi molekula DNK preko kojih se odvijaju interakcije s malim molekulima su: negativno naelektrisane fosfatne grupe (atomi kiseonika) u kičmi spirale, funkcionalne grupe u malom ili velikom žljebu koje mogu biti akceptori ili donori vodonika i aromatične hidrofobne komponente koje stupaju u Van der Valsove interakcije. Treba uzeti u obzir i to da je geometrija dvostruke spirale, dubina i širina malih i velikih žljebova različita u različitim konformacijama (A, B i Z forma) DNK molekula. Pored ovoga, važnu ulogu u stabilnosti DNK molekula, ali i lek-DNK kompleksa, ima hidratacija, jer se smatra da i proces hidratacije zavisi od sekvence baza.

Tipovi DNK – lek interakcija

Lekovi stupaju u reakciju s molekulom DNK kovalentnim i nekovalentnim interakcijama.

Kovalentno vezivanje leka za DNK je ireverzibilno i nedvosmisleno vodi ka kompletnoj inhibiciji funkcija DNK, što dovodi do smrti ćelije. Cis-platina (Tabela I) je antitumorski lek i najpoznatije jedinjenje koje se kovalentno vezuje za DNK. Kovalentne veze se ostvaruju između atoma hlora cis-platine i atoma azota guanina, pri čemu dolazi do ukrštanja u samom lancu, kao i između lanaca DNK [7]. Pored cis-platine, još su dva antitumorska antibiotika našla veliku primenu u kliničkoj praksi. Mitioicin C je antitumorski antibiotik koji gradi kovalentne veze sa guaninom DNK samo u redukovanom stanju, tj. posle reduktivne aktivacije, a antramicin se kovalentno vezuje za azot N2 u guaninu smeštenom u malom žljebu DNK molekula.

Nekovalentno vezivanje leka za DNK je reverzibilno i poželjnije od kovalentnog, ako se imaju u vidu metabolizam leka i potencijalni toksični efekti. Jedan od glavnih principa hemije DNK je molekularno prepoznavanje, tj. proces u kome molekuli (mali ili veliki) selektivno prepoznaju jedni druge. Ovo se ispoljava kroz nekoliko tipova interakcija: elektrostatičke, vodonične veze i Van der Valsove (dipol-dipol). Stabilnost nagrađenog kompleksa lek-DNK zavisi od intenziteta ovih interakcija.

Lekovi koji reaguju nekovalentno mogu se svrstati u nekoliko grupa:

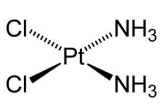
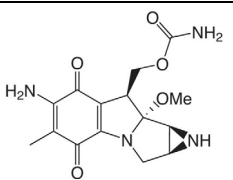
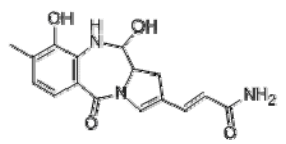
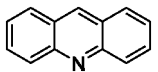
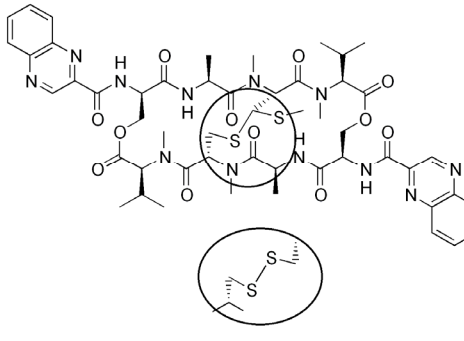
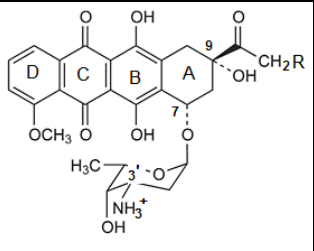
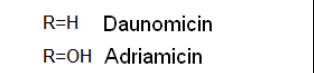
1. Interkalatni agensi
2. Lekovi koji se vezuju za mali žljeb
3. Lekovi koji se vezuju za veliki žljeb

Interkalatni agensi

Karakteristika interkalatora je da poseduju planarnu aromatičnu hromoforu koju čini nekoliko spojenih (fuzionisanih) šestočlanih prstenova s različitim supstituentima i amino šećerni ostatak. Interkalatori se dele na mono- i bifunkcionalne interkalatore, u zavisnosti od toga da li imaju jednu ili dve aromatične hromofore. Postoje prosti mono-interkalatori kao npr. akridin i oni složenije strukture (daunomicin, antraciklin) sa četiri

aromatična prstena i supstituentima u položajima 7 i 9 (Tabela I). Dve aromatične grupe u bifunkcionalnim interkalatorima razdvojene su nekim voluminoznim sistemom, kao što je krut ciklični peptidni sistem koji je kod ehinomicina i triostina A u svom centru stabilizovan kovalentno vezanim disulfidnim mostom (Tabela I).

Tabela I Lekovi koji reaguju s molekulom DNK kovalentnim i nekovalentnim interakcijama
Table I Drugs interacting with DNA, covalently and noncovalently

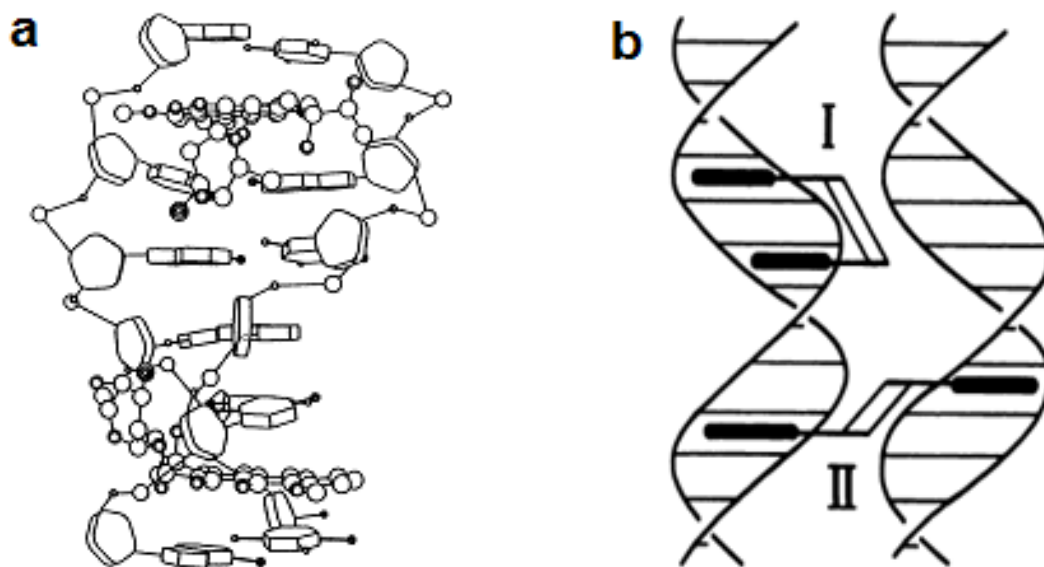
| Lekovi koji stupju u kovalentne interakcije sa DNK | | | |
|---|--|---|---|
| Cis-platina | | Mitioicin C | Antramycin |
|  | |  |  |
| Interkalatni agensi | | | |
| Mono-interkalatori | | Bifunkcionalni interkalatori | |
| Akridin |  | Ehinomicin |  |
| Daunomicin |  | Triostin A | |
| Adriamicin |  R=H Daunomicin R=OH Adriamicin | | |

Fenomen interkalacije predstavlja smeštanje aromatičnog dela molekula leka između parova baza (Slika 2a) [8]. Interkalatni agensi stupaju u hidrofobne interakcije s DNK, jer ovi lekovi imaju hidrofobne aromatične grupe koje reaguju s aromatičnim grupama baza DNK. Ukupna količina površinski vezane vode smanjuje se posle formiranja kompleksa. Interkalacija dovodi do povećanja rastojanja između susednih

parova baza, što bi moglo da prouzrokuje distorziju heliksa. Srećom, kičma spirale koju čini lanac šećernofosfatnih ostataka prilagođava se nastaloj promeni (odmotava se do određenog stepena) i kompenzuje nastalu distorziju. Veze koje se uspostavljaju između aromatičnih struktura u leku i baza DNK predstavljaju osnovni faktor stabilnosti nastalog kompleksa. Tako se formiraju direktne vodonične veze između funkcionalnih grupa koje su odgovorne za dejstvo leka (kao što je hidroksilna grupa prstenu A ili NH_3^+ grupa u položaju 3' kod daunomicina) i azota N2 i N3 guanina ili O2 citozina na mestu interkalacije. Često se umesto direktnih vodoničnih veza između leka i DNK formiraju H-veze posredstvom molekula vode (*eng. water mediated contacts*).

Pored ove, opšte šeme stvaranja kompleksa, veze koje se ostvaruju između određenog leka i DNK zavise od sekvence baza na mestu interkalacije i hemijskih modifikacija samog leka.

Bifunkcionalni interkalatori mogu interkalirati u molekul DNK na dva različita načina: **I** - intramolekulskim ukrštanjem lanaca (obe aromatične grupe interkaliraju u jedan DNK molekul) i **II** - intermolekulskim ukrštanjem lanaca (dve aromatične grupe interkaliraju u dva DNK molekula) (Slika 2b) [8]. Maksimalni prinos kompleksa u idealnom slučaju nastaje kada je odnos DNA : lek = 1 : 0,125.

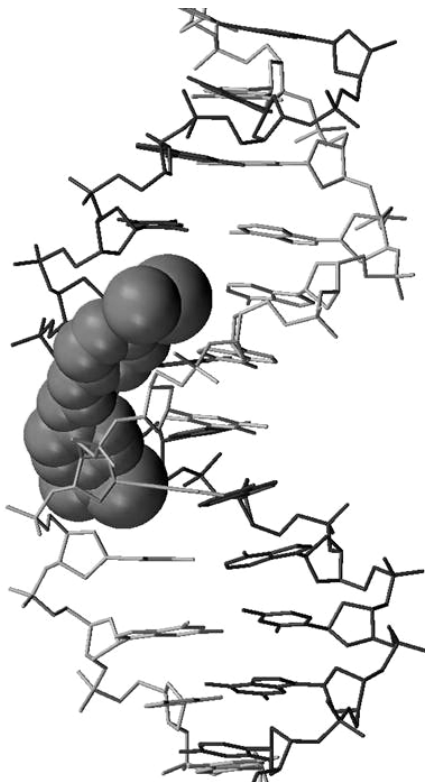


Slika 2. Stilizovani dijagram interkalacije daunomicina. (a) Atomi daunomicina predstavljeni su kružićima, a baze i šećerni ostaci diskovima [1]; (b) I- intramolekulsko ukrštanje lanaca i II intermolekulsko ukrštanje lanaca [8]

Figure 2. Stylised diagram of daunomycin intercalation. (a) Atoms of daunomycin are shown as circles, the sugar and base components of the nucleotides are represented as disks [1]; (b) I- intramolecular cross-link and II intermolecular cross-link [8]

Lekovi koji se vezuju za mali žljeb

Najpoznatiji lekovi koji se vezuju za mali žljeb DNK su netropsin, distamicin, berenil i spermin. Ovi molekuli su najčešće oblika polumeseca i komplementarni su žljebu DNK [9,10] (Slika 3) [11]. Smeštaju se u njega i većinom uspostavljaju Van der Valsove veze, dok neki od ovih lekova grade i vodonične veze sa azotom (N3) iz adenina ili kiseonikom (O2) iz timina. U svim nagrađenim kompleksima lek se smešta u šupljinu žljeba i zamenjuje hidratni sloj koji je tu bio prisutan. Iako izgleda da, prilikom nastanka ovakvog kompleksa, ne bi trebalo da dođe do promene u geometriji DNK, ipak dolazi do uvrtanja dvostruke spirale u suprotnu stranu, usled rotiranja jedne od baza, kako bi se omogućilo formiranje vodonične veze s lekom. Vodonična veza može da se ostvari direktno između odgovarajućih grupa leka i DNK, ali i preko molekula vode iz hidratnog sloja kao medijatora. Ovaj drugi slučaj je veoma čest i tako ostvarene veze predstavljaju glavni stabilizirajući faktor u kompleksu. Van der Valsove sile su takođe prisutne i doprinose stabilnosti kompleksa, a mogu dovesti i do znatnih perturbacija dvostruke spirale DNK u odnosu na normalnu, tzv. Watson-Krik geometriju.



Slika 3. Berenil u malom žljebu DNK [11]

Figure 3. Berenil bound to DNA minor groove [11]

Pored promena DNK molekula, primećeno je da u nastalim kompleksima i molekul leka trpi konformacione promene. Ove promene posledica su formiranja maksimalnog broja interakcija, a sve sa ciljem postizanja što veće stabilnosti kompleksa.

Lekovi koji se vezuju za veliki žljeb

Većina lekova koji se vezuju za žljeb DNK spirale „bira“ mali žljeb. To su lekovi koji u bočnim lancima imaju šećerne ostatke ili modifikovane peptidne lance s hidrofobnim karakterom, pa su komplementarni s hidrofobnim oblastima zidova žljeba. Znatno je manji broj supstanci koje se nekovalentno vezuju za veliki žljeb. Razlog verovatno leži u tome što su, za razliku od malog, u velikom žljebu atomi azota i kiseonika parova baza orijentisani ka unutrašnjosti, tj. ka osi heliksa, što ih čini dostupnim za proteine [12]. Na taj način proteini „prepoznaju“ sekvence baza i stupaju u specifične interakcije u velikom žljebu. Stoga je bilo potrebno naći takve ligande da specifična ligand-DNK interakcija inhibira protein-DNK interakcije.

Prvi jasni dokazi o vezivanju manjih molekula (metilzeleno) za veliki žljeb DNK datiraju iz 1993. godine [13]. Kasnije su sintetizovani neki antitumorski agensi sa akridin karboksiamidnim skeletom [12], aminoglukozidni antibiotik tobramicin i drugi agensi, kao što su pluramicini, aflatoksini, azinomycin i neokarcinostatin [14,15]. Nažalost, i dalje je broj ovakvih lekova relativno skroman, a da bi se povećao, neophodno je bolje poznavanje prirode hemijskih interakcija između DNK i liganada, kao i racionalan dizajn još efikasnijih struktura kao potencijalnih lekova koji se vezuju za veliki žljeb DNK.

Lek - DNK interakcija u vodenoj sredini

Sve reakcije lekova sa DNK u živom organizmu, predstavljaju interakcije koje se odigravaju u vodenoj sredini. Kako je DNK polianjon, a i molekul leka često nosi izvesno naelektrisanje, razumljivo je da su u vodenoj sredini obe supstance hidratizane. U blizini svih ovih naelektrisanja nalaze se kontrajoni (negativno naelektrisane grupe DNK privlače pozitivne kontrajone, kao što su Na^+ , Ca^{2+} ili Mg^{2+}), koji su takođe delimično hidratizani. Hidratacija (dehidratacija) je veoma složen proces i uzrokovan je dejstvom hidrofobnih sila, elektrostatičke solvatacije, Van der Valsove solvatacije, a zavisi i od prirode kontrajona.

Kada dođe do interakcije i uspostavljanja novih veza između molekula DNK i leka, dolazi do izmeštanja rastvarača (molekula vode) na mestima gde će se nagraditi veza. Prisustvo malih kontrajona olakšava vezivanje leka, jer zaklanjaju negativnu površinu DNK čime ometaju prilaz proteina, a omogućavaju prolaz neelektrolitima i malim pozitivno naelektrisanim ligandima. Kako su DNK i lek suprotno naelektrisani,

doći će do delimične kompenzacije naelektrisanja, pa deo kontrajona odlazi u unutrašnjost rastvarača potpuno hidratisan.

Nastanak novih veza dovešće do nekih strukturnih deformacija/adaptacija kako DNK, tako i molekula leka. Nastale strukturne promene praćene su energetskim promenama, a sve to je u krajnjem ishodu praćeno promenom entropije. Potvrđeno je da dvostruka DNK spirala u prisustvu interkalatnog agensa gradi kompleks s manjom toplotom formiranja u odnosu na sam DNK molekul, tj. sistem koji je termodinamički stabilniji. Pored toga, u slučaju nekovalentnih interakcija uspostavljanje veza predstavlja ravnotežni proces, a konstante vezivanja koje karakterišu date ravnoteže, mogu se odrediti merenjem koncentracije slobodnog leka i koncentracije leka vezanog za DNK.

Metode detekcije lek – DNK interakcija

Cilj savremenih istraživanja jeste da poveže merljive biofizičke parametre sa citotoksičnošću, tj. da antitumorsku aktivnost leka poveže sa njihovom sposobnošću da interkaliraju u DNK dvostruku spiralu. Detekcija i objašnjenje nastalih promena predstavlja veliki izazov i čini osnovu na kojoj se zasniva primena savremenih fizičko-hemijskih metoda u ove svrhe.

Veoma je veliki broj tehnika koje proučavaju interakcije između leka i DNK, od klasične UV-VIS spektrofotometrije, preko savremenih tehnika, kao što su dvodimenzionalna (2D) i trodimenzionalna (3D) NMR spektroskopija, pa sve do najsavremenijih biosenzora.

Interakcija između leka i DNK može se detektovati spektrofotometrijski, praćenjem promena UV-VIS apsorpcionih spektara bilo leka, bilo molekula DNK. Hipsohromni pomeraj u spektru javlja se po izvršenoj denaturaciji DNK, ali i kao posledica interakcije DNK sa lekom [16,17]. Infracrvena (IC) spektroskopija je veoma zastupljena u strukturnoj analizi DNK, jer se na osnovu infracrvenih spektara mogu razlikovati A, B i Z oblici DNK, kao neke druge strukturne karakteristike. Naročito je značajno što se ova tehnika može koristiti za ispitivanje uzoraka i u čvrstom i u tečnom agregatnom stanju, pa se kombinacijom rezultata dolazi do podataka o mehanizmu interakcije leka i DNK, ali i o samom mehanizmu dejstva leka. Karakteristične četiri oblasti (trake) IC spektara nukleinskih kiselina su detaljno ispitane [18]. Pomeranje ovih traka oslikava nastale interakcije, ili promenu konformacije DNK molekula. Infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR) se sve više koristi za određivanje mesta specifičnog vezivanja leka, redosleda vezivanja, kao i za detekciju konformacionih promena nastalih usled lek-DNK interakcije [19-21].

Tehnika nuklearne magnetne rezonancije (NMR) zasniva se na činjenici da jezgra atoma sa neparnim brojem protona ili neutrona poseduju nuklearni spin, tj. kao mali

magnetni dipoli obrću se oko svoje ose. Kada se ovakav atom nađe u spoljašnjem magnetnom polju, njegov nuklearni spin se orijentiše u pravcu polja i uspostavlja rezonantnu NMR frekvenciju. Step en orijentacije nuklearnog spina zavisi od jačine magnetnog polja, ali i od tipa jezgra i njegovog hemijskog okruženja. U analizi DNK koriste se ^1H , ^{13}C , ^{15}N i ^{31}P jezgra, od kojih je ^{31}P naročito koristan za ispitivanje efekata vezivanja liganda za fosforne grupe DNK molekula. NMR eksperimenti su veoma informativni jer se mogu izvoditi na različitim temperaturama i u sredinama različitih pH, jonskih jačina i dielektričnih konstanti. Karakterističan hemijski pomak u protonskom NMR spektru DNK određen je pre dvadesetak godina [22] i svaka njegova promena pripisuje se interakciji sa ligandom [23,24]. Hemijski pomak u ^{31}P -NMR spektru pruža korisne informacije konformacionim promenama koje prate vezivanje interkalatora za DNK. U novije vreme sve su značajnije 2D-NMR eksperimentalne tehnike koje pružaju informacije o prirodi kovalentnih veza i prostornom rasporedu atoma (relativno jedan u odnosu na drugi), čime se zaključuje da li je dvostruki heliks levo ili desno orijentisan.

Cirkularni i linearni dihiroizam su takođe korisne tehnike za ispitivanje nekovalentnih lek-DNK interakcija. To su spektroskopije polarizovane svetlosti kojima se dobijaju informacije o relativnoj orijentaciji vezanog leka u odnosu na uzdužnu osu DNK molekula [25,26]. Orijetacija liganada koji nose fluorifore, kao i njihova udaljenost od DNK baznih parova, može se pratiti tehnikama fluorescentne anizotropije ili fluorescentne rezonancije [27,28].

U novije vreme su razvijene tehnike korišćenja enzima, kao što je tzv. tehnika „*footprinting*”, kojom se određuje redosled selektivnosti jedinjenja koja se vezuju za DNK na osnovu sposobnosti samog jedinjenja da zaštiti narušavanje strukture DNK na mestu vezivanja [29]. Ideja ove metode rodila se još 1978. godine, kada su je autori rada [30] koristili za proučavanje interakcija između proteina i DNK, a od tada pa do danas je identifikovan redosled vezivanja velikog broja lekova [29,31], određene su jačine uspostavljenih veza i vrednosti konstanti brzina ovih procesa asocijacije [29].

Devedesetih godina prošlog veka DNK je počela da se koristi kao bioprepoznatljiv element u biosenzorima. Tako je nastala nova generacija DNK-biosenzora koji pokazuju specifičan odgovor nastao kao posledica selektivnosti i bioafiniteta molekula DNK prema analitu. Ipak, za razliku od konvencionalnih enzimskih i imuno senzora koji se prvenstveno koriste za određivanje koncentracije analita, DNK biosenzori se prevashodno koriste za ispitivanje interakcija između DNK i analita, kao i za utvrđivanje oštećenja na DNK molekulu [32-34].

Osnovni princip detekcije ovih biosenzora zasniva se na tome da elektroda registruje promenu nastalu na molekulima DNK koji su imobilisani na površini elektrode. Signal potiče od procesa oksidacije ili redukcije određenih delova molekula DNK ili elektroaktivnih grupa u molekulu leka. Ta promena intenziteta, položaja ili

oblika signala može biti posledica promene koncentracije, orijentacije ili promene u strukturi usled oštećenja ili denaturacije samog molekula DNK [35-37]. S druge strane, do promene signala biosenzora može doći usled nekovalentnih interakcija DNK s drugim supstancama koje dovode do hibridizacije, asocijacije ili građenja kompleksa s DNK molekulima [38-40]. Najveći broj supstanci, koje reverzibilno reaguju s DNK, su elektroaktivni interkalatori i tada se može pratiti i promena redoks signala interkalatora kao posledica nastale interakcije [41-45]. Značajna prednost DNK biosenzora nad drugim instrumentalnim tehnikama jeste u tome što je jednostavan za rad, brz, komercijalno pristupačan, malih dimenzija, i njime se mogu ispitivati hemijske i fizičke interakcije s drugim malim molekulima u *in vitro* uslovima.

Zaključak

Uzevši u obzir da je DNK jedan od najznačajnijih biomakromolekula, mogućnost detekcije i objašnjenje promena nastalih usled interakcije DNK s lekovima iz grupe hemioterapeutika zaslužuje veliku pažnju. Od izuzetne je važnosti korišćenje najsavremenijih metoda u analizi lekova i toksičnih jedinjenja koja mogu izazvati promene u strukturi DNK. Izbor odgovarajuće fizičko-hemijske metode kojom je moguće pratiti navedene interakcije, omogućava detaljno poznavanje prirode i tipa ovih interakcija. Primena postojećih i razvoj novih tehnika i metoda ima za cilj da proširi granice ispitivanja, kako u pogledu selektivnosti i bioafiniteta molekula DNK prema leku, tako i u oblasti fundamentalnih istraživanja ovih interakcija. Interakcije između lekova i DNK predstavljaju oblast za kojom interesovanje neprekidno raste i sva do sada stečena znanja mogu se primeniti u dizajnu novih DNK liganada, kako bi se omogućilo *in vitro* i *in vivo* praćenje genetskih bolesti.

Zahvalnica

Ovaj rad finansiran je od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, projekat broj 172033.

Literatura

1. Boyer R. Concepts in Biochemistry, 3rd Edition. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons; 2006. p. 282-332.
2. Voet DJ, Voet JG, Pratt CW. Principles of biochemistry. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons; 2008. p. 40-76.
3. Zubay GL, Parson WW, Vance DE. The principles of Biochemistry. Boston: McGraw-Hill College; 1995. p. 627-677.

4. Kennard O. DNA-drug interactions. *Pure App Chem.* 1993; 65(6): 1213-22.
5. Kennard O, Hunter WN. Single-Crystal X-Ray Diffraction Studies of Oligonucleotides and Oligonucleotide-Drug Complexes. *Angew Chem Int Ed Engl.* 1991; 30: 1254-77.
6. Wang AHJ, Liaw YC, Robinson H, Gao YG. in Pullman B, Jortner J, editors. *Molecular Basis of Specificity in Nucleic Acid-Drug Interactions.* Proceedings of the 23rd Jerusalem Symposium on Quantum Chemistry and Biochemistry; 1990, May 14-17; Jerusalem, Israel. Kluwer Academic Publishers. Heidelberg: Springer; 1990. p. 1-121
7. Chaires JB. Drug-DNA interactions. *Curr Opin Struc Biol.* 1998; 8: 314-20.
8. Huang CH, Mirabelli CK, Mong S, Crooke ST. Intermolecular Cross linking of DNA through Bifunctional Intercalation of an Antitumor Antibiotic, Luzopeptin A. *Cancer Res.* 1983; 43: 2718-24.
9. Moravek Z, Neidle S, Schneider B. Protein and drug interactions in the minor groove of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30: 1182-91.
10. Neidle S. DNA minor groove recognition by small molecules. *Nat Prod Rep.* 2001; 18: 291-309.
11. Hannon MJ. Supramolecular DNA recognition. *Chem Soc Rev.* 2007; 36: 280-95.
12. Neidle S. *Principles of Nucleic Acid Structure.* Amsterdam: Elsevier; 2008. p 151-158.
13. Kim SK, Norden B. Methyl green A DNA major-groove binding drug. *Fed Eur Biochem Soc Lett.* 1993; 315(1): 61-4.
14. Singh NN, Lambowitz AM. *J Mol Biol.* 2001; 309(2): 361-86.
15. Hamilton PL, Arya DP. Natural product DNA major groove binders. *Nat Prod Rep.* 2012; 29: 134-43.
16. Wu FY, Xiang YL, Wu YM, Xie FY. Study of the Interaction of a Fluorescent Probe with DNA. *J Lumin.* 2009; 129(11): 1286-91.
17. Islam MM, Chowdhury SR, Kumar GS. Spectroscopic and Calorimetric Studies on the Binding of Alkaloids Berberine, Palmatine and Coralyne to Double Stranded RNA Polynucleotides. *J Phys Chem B.* 2009; 113(4): 1210-24.
18. Banyay M, Sarkar M, Gräslund A. A library of IR bands of nucleic acids in solution. *Biophys Chem.* 2003; 104(2): 477-88.
19. Jangir DK, Tyagi G, Mehrotra R, Kundu S. Carboplatin interaction with calfthymus DNA: A FTIR spectroscopic approach. *J Mol Struct.* 2010; 969(1-3): 126-29.
20. Mandeville JS, N'soukpoé-Kossi CN, Neault JF, Tajmir-Riahi HA. Structural analysis of DNA interaction with retinol and retinoic acid. *Biochem Cell Biol.* 2010; 88(3): 469-77.
21. Neault JF, Tajmir-Riahi HA. Diethylstilbestrol-DNA Interaction Studied by Fourier Transform Infrared and Raman Spectroscopy. *J Biol Chem.* 1996; 271(14): 8140-3.
22. Barber J, Cross HF, Parkinson JA. High-Resolution NMR of DNA and Drug-DNA Interactions. In: Jones C, Mulloy B, Thomas AH, editors. *Methods in Molecular Biology, Spectroscopic Methods and Analyses: NMR, Mass Spectrometry, and Metalloprotein Techniques Vol 17.* Totowa (NJ): Humana Press; 1993. p 87-113.
23. Barber J, Cross HF, Parkinson JA. High-Resolution NMR of DNA and Drug-DNA Interactions Spectroscopic Methods and Analyses. *Methods Mol Biol.* 1993; 17: 87-113.
24. Nakamoto K, Tsuboi M, Strahan GD. *Drug-DNA Interactions: Structures and Spectra.* Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons; 2008. 378p.
25. Rodger A. Circular and linear dichroism of drug-DNA systems. *Methods Mol Biol.* 2010; 613: 37-54.
26. Eriksson M, Nordén B. Linear and circular dichroism of drug-nucleic acid complexes. *Methods Enzymol.* 2001; 340: 68-98.

27. Suh D, Chaires JB. Criteria for the Mode of Binding of DNA Binding Agents. *Bioorg Med Chem.* 1995; 3(6): 723-8.
28. Kumar CV, Turner RS, Asuncion EH. Groove Binding of a Styrylcyanine Dye to the DNA Double Helix: the Salt Effect. *Journal Photochem Photobiol A: Chem.* 1993; 74(2-3): 231-8.
29. Hampshire AJ, Rusling DA, Broughton-Head VJ, Fox KR. Footprinting: A method for determining the sequence selectivity, affinity and kinetics of DNA-binding ligands. *Methods.* 2007; 42(2): 128–40.
30. Galas DJ, Schmitz A. DNAase footprinting- simple method for detection of protein-DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res.* 1978; 5(9): 3157-70.
31. Cardew AT, Fox KR. DNase I Footprinting, In: Fox KR, editor. *Methods in Molecular Biology. Drug-DNA Interaction Protocols.* Chapter 10. 2nd ed. Totowa (NJ): Humana Press; 1993. p 153-72.
32. Teles FRR, Fonseca LP. Trends in DNA biosensors. *Talanta,* 2008; 77(2): 606-23.
33. Kerman K, Kobayashi M, Tamiya E. Recent trends in electrochemical DNA biosensor technology. *Meas Sci Technol.* 2004; 15(2): R1- 11.
34. Tian X, Song Y, Dong H, Ye B. Interaction of anticancer herbal drug berberine with DNA immobilized on the glassy carbon electrode. *Bioelectrochem.* 2008; 73(1): 18-22.
35. Wang J. Electrochemical nucleic acid biosensors. In: Palecek E, Scheller F, Wang J, editors. *Electrochemistry of nucleic acids and proteins. Towards electrochemical sensors for genomics and proteomics.* Amstredam: Elsevier; 2005. p. 175-94.
36. Palecek E, Jelen F. In: Palecek E, Scheller F, Wang J, editors. *Electrochemistry of nucleic acids and proteins. Towards electrochemical sensors for genomics and proteomics.* Amstredam: Elsevier; 2005. p. 74-174.
37. Paleček E, Brabec V. The relation between the polarographic behaviour of DNA and its conformation in solution. *Biochim Biophys Acta Nucleic Acids Protein Synth.* 1972; 262: 125-34.
38. Ovádeková R, Labuda J. Electrochemical DNA biosensors for the investigation of dsDNA host-guest interactions and damage. *Curr. Top. Electrochem.* 2006; 11: 21-56.
39. Ovádeková R, Labuda J. DNA binding interactions, structural damage and protection investigated by electrochemical DNA biosensor. In: Adam V, Kizek R, editors. *Utilizing of Bio-Electrochemical and Mathematical Methods in Biological Research.* Kerala, (India): Research Signpost; 2007. p. 173-201.
40. Živanović M, Aleksić M, Ostatná V, Doneux T, Paleček E. Polylysine-Catalyzed Hydrogen Evolution at Mercury Electrodes. *Electroanalysis.* 2010; 22(17-18): 2064-70.
41. Šimkova D, Labuda J. Electrochemical DNA Biosensors and Flow-Through Analysis. *Curr. Anal. Chem.* 2011; 7: 2-7.
42. Labuda J, Brett AMO, Evtugyn G, Fojta M, Mascini M, Ozsoz M, Palchetti I, Paleček E, Wang J. Electrochemical nucleic acid-based biosensors: concepts, terms and methodology, IUPAC Technical Report. *Pure Appl Chem.* 2010; 82: 1161-87.
43. Radulović V, Aleksić MM, Kapetanović V. An electrochemical study of the adsorptive behaviour of varenicline and its interaction with DNA. *J. Serb. Chem. Soc.* 2012; 77(10): 1409–22.
44. Liébana S, Lermo A, Campoy S, Barbé J, Alegret S, Pividori MI. Magneto Immunoseparation of Pathogenic Bacteria and Electrochemical Magneto Genosensing of the Double-Tagged Amplicon. *Anal. Chem.* 2009; 81(14): 5812-20.
45. Brett AMO, Diculescu VC, Chiorcea-Paquim AM, Serrano SHP. DNA –electrochemical biosensors for investigating DNA damage S.H.P. In: Alegret S, Merkoci A, editors. *Electrochemical Sensors Analysis.* Amstredam: Elsevier Science B.V; 2007. p. 413-438.

Drug - DNA Interactions - Properties and Detection

Mara M. Aleksić^{1*}, Vera Kapetanović²

¹University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Physical Chemistry and Instrumental Methods, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

²University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Analytical Chemistry, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

Corresponding author: Mara Aleksić,
University of Belgrade, Faculty of Pharmacy,
Department of Physical Chemistry and Instrumental Methods,
tel: +381 11 3951 294; e-mail: mara@pharmacy.bg.ac.rs

Summary

Large number of inorganic and organic compounds is able to bind to DNA and form the complex. Among them, very important drugs are chemotherapeutics. This paper presents the overview of DNA structural characteristics and types of interactions (covalent and noncovalent) between drugs and DNA molecule. Covalent binding of the drug is irreversible and leads to complete inhibition of DNA function, what conclusively, causes the cell death. On the other hand, noncovalent binding is reversible and based on the principle of molecular recognition. Special attention is paid to explain the specific sites in DNA molecule for drug binding. According to their structural characteristics, drugs that react noncovalently with DNA are intercalators, minor or major groove binders.

When the complex between drug and DNA is formed, both the drug molecule, as well as DNA, experienced some modifications. This paper presents the overview of the methods used for the investigation of the interactions between drug and DNA with the aim of detection and explanation of the resulting changes. For this purpose many spectroscopic methods like UV/VIS, infrared and NMR, polarized light spectroscopies like circular and linear dichroism, fluorescence anisotropy or resonance, or very sensitive DNA-biosensors are used. The presented results summarize literature data obtained by the use of mentioned methods. The results are used to confirm the DNA damage, to determine drug binding sites and sequence preference, as well as conformational changes due to drug-DNA interaction.

Key words: Drug, DNA, interacion, spectroscopic methods, DNA-biosensors.
