

Interakce DNA s proteiny

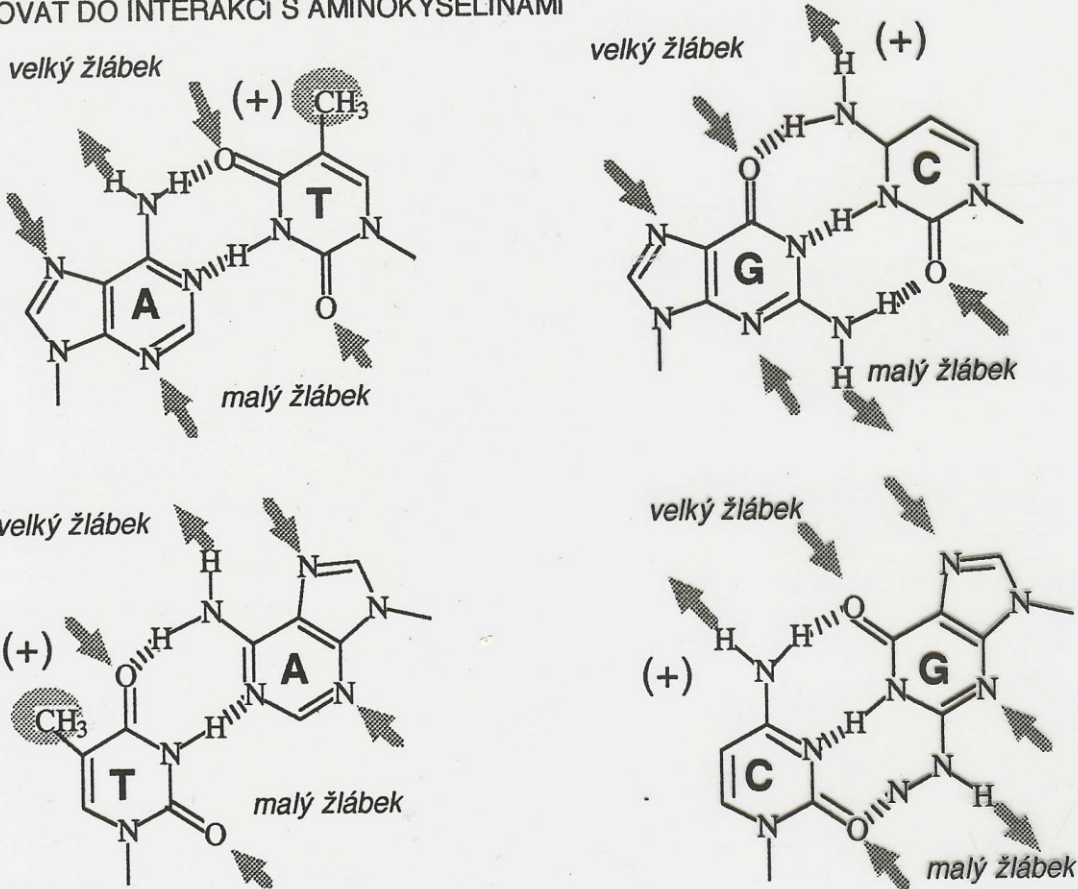
-veškeré funkce DNA: replikace, transkripce, rekombinace, regulace těchto procesů, opravy poškozené DNA

-výstavba chromatinu (a analogických struktur u prokaryot)

-interakce *sekvenčně specifické*: zejm. vodíkové vazby, solné můstky se zbytky bází v malém a velkém žlábkou

-interakce *sekvenčně nespecifické*: obecně interakce s cukrfofátovým řetězcem

FUNKČNÍ SKUPINY V PÁRECH BAZÍ, KTERÉ MOHOU VSTUPOVAT DO INTERAKCÍ S AMINOKYSELINAMI



- ← vodíková vazba
- van der Waalsova interakce
- (+) elektrostatická interakce

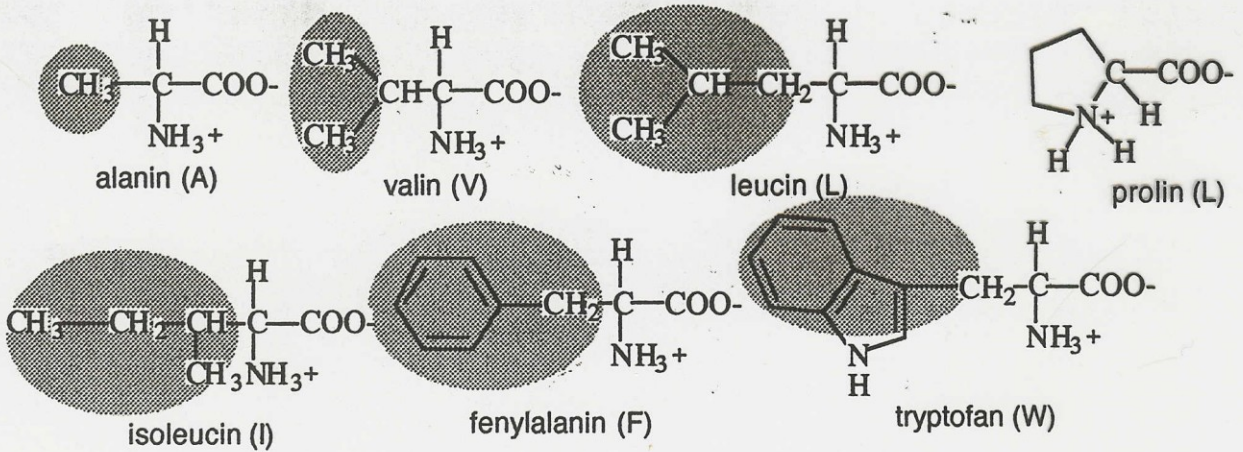
Velký žlábek: jeden donor a dva akceptory vodíkové vazby u všech bp; metylová skupina u T (a u 5-meC)

Malý žlábek: dva akceptory vodíkové vazby u všech bp; u C.G a G.C navíc je N2 (aminoskupina) G donorem vodíkové vazby

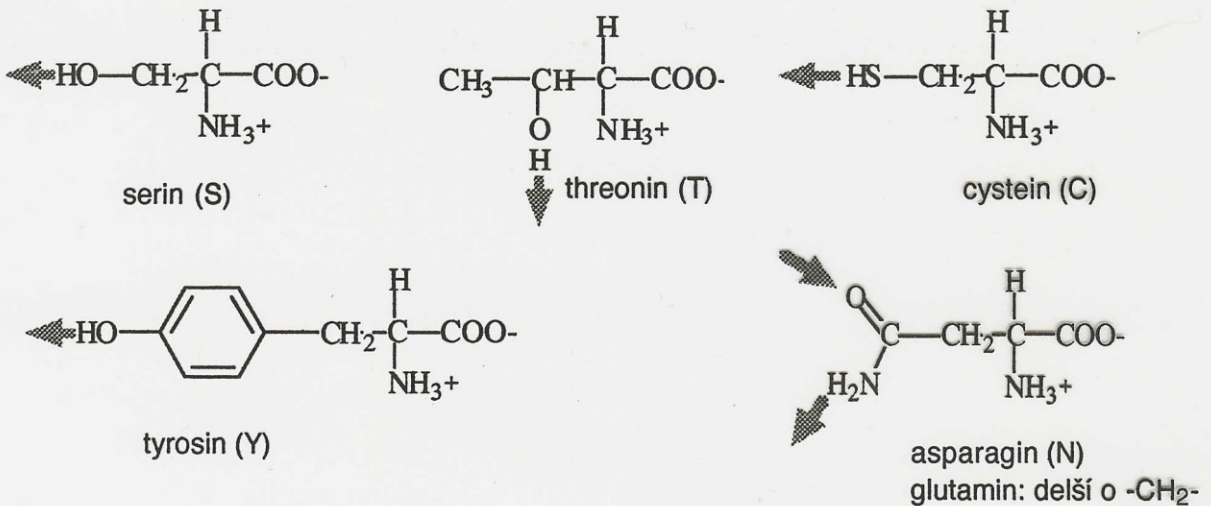
rozmístění interakcí je charakteristické pro každý bp

FUNKČNÍ SKUPINY AMINOKYSELIN

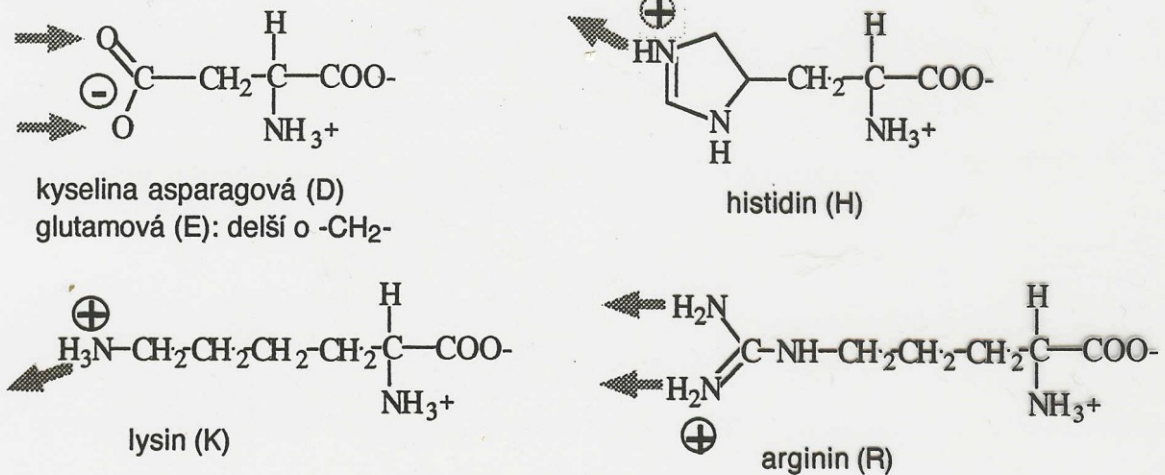
a/ nepolární boční řetězec



b/ polární

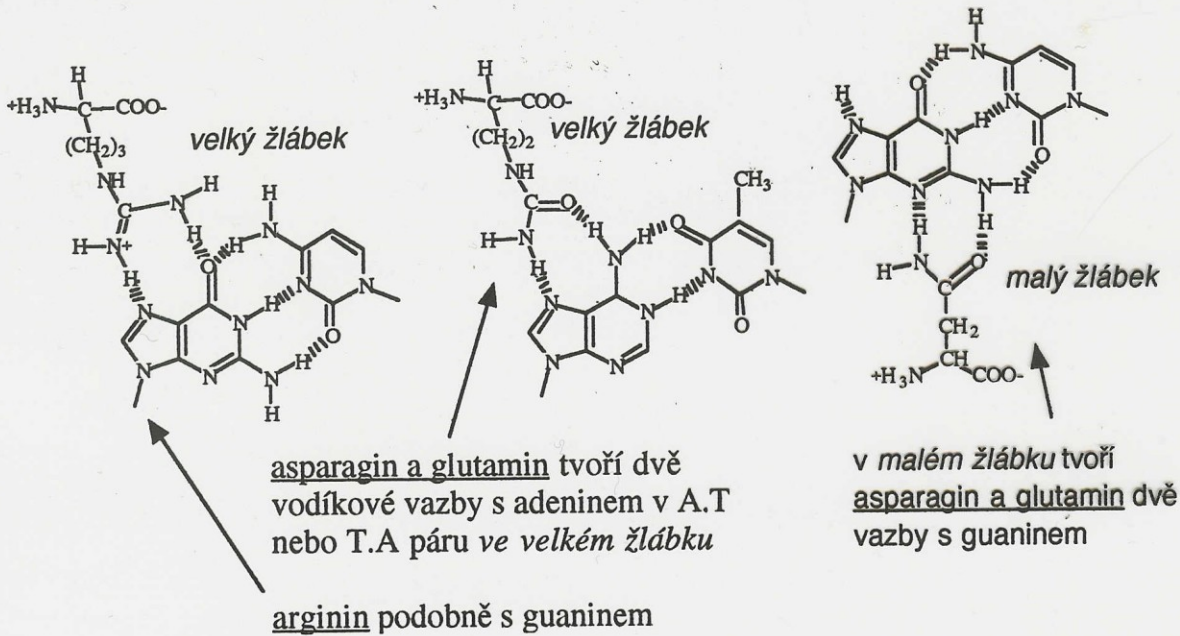


c/ nabíť



NEJVÝHODNĚJŠÍ INTERAKCE bp SE ZBYTKY AMINOKYSELIN

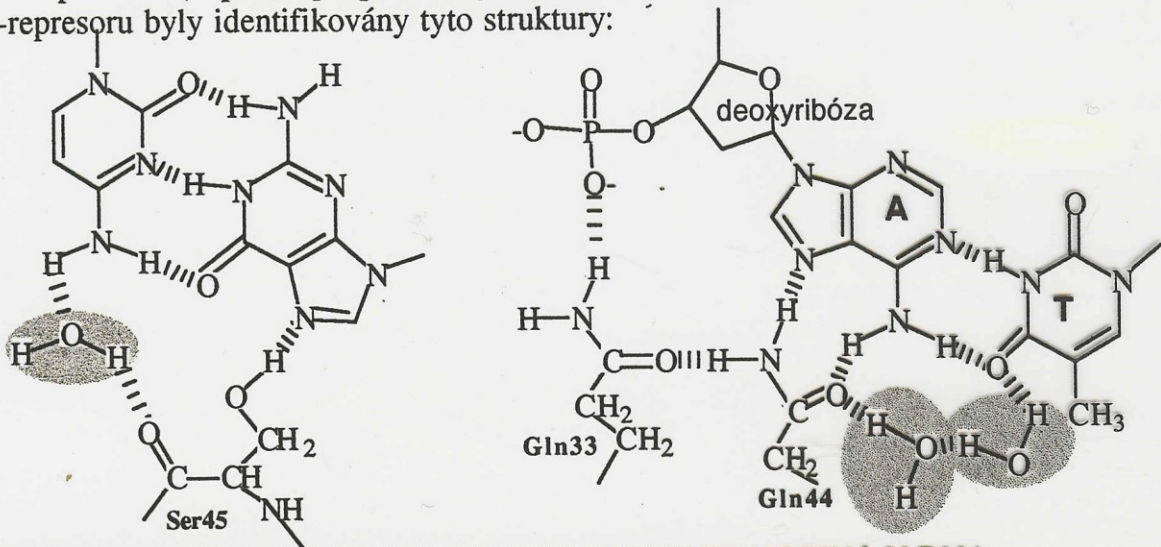
(těch, které tvoří více vazeb)



ÚLOHA MOLEKUL VODY

-hydratační obal DNA a proteinů musí být rozrušen

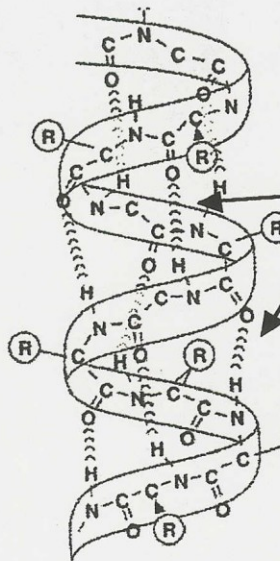
-jednotlivé molekuly vody často tvoří můstky zprostředkující vodíkové vazby mezi molekulami DNA a proteinů (např. v *trp* operátoru jsou všechny vodíkové vazby zprostředkovány vodou; v λ -repressoru byly identifikovány tyto struktury:



NEPŘÍMÉ ROZPOZNÁNÍ URČITÝCH SEKVENČNÍCH MOTIVŮ V DNA:

-vazba proteinů citlivá na *specifickou sekundární strukturu DNA, která je daná určitou sekvencí* (ta určuje lokální „twist“, „tilt“, „roll“ bází, ohyby dvoušroubovice a šířku žlábků a tím přesnou vzájemnou polohu donorových a akceptorových skupin vodíkových vazeb jak v bp, tak v cukrfosfátové kostře - její geometrie často postačuje ke specifickému rozpoznání určité oblasti v DNA určitým proteinem)

ZÁKLADNÍ STRUKTURNÍ MOTIVY PROTEINŮ



α -helix

-pravotočivá šroubovice s 3.6 aminokyseliny na otáčku

-stabilizace vodíkovými vazbami mezi vodíkem amidové skupiny a karbonylovým kyslíkem o čtyři aminokyseliny dále

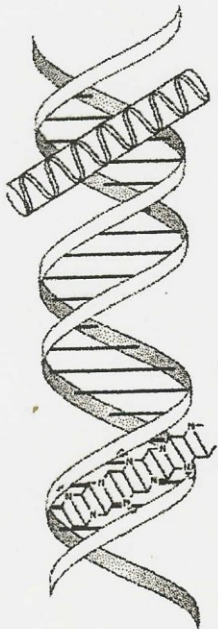
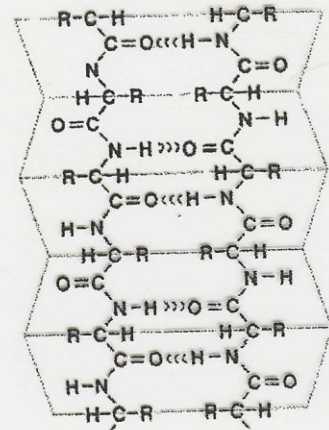
-postranní funkční skupiny aminokyselin jsou exponovány vně helixu a přístupné interakci s funkčními skupinami v DNA nebo s jinými segmenty téže molekuly proteinu (terciární struktura) či s dalším polypeptidovým řetězcem (kvarterní struktura)

β -(skládáný) list

-řetězce uloženy lineárně vedle sebe, antiparalelně nebo paralelně (mohou být ze stejné nebo různých molekul); relativně plochá struktura

-stabilizace vodíkovými vazbami mezi vodíkem amidoskupiny a karbonylovým kyslíkem

-postranní funkční skupiny aminokyselin směřují nad a pod rovinu β -listu



α -helix obvykle interaguje s DNA ve velkém žlábků (osa helixu ve směru dlouhé osy žlábků)

-postranní skupiny proteinu mohou interagovat s fosfátovými skupinami i pronikat žlábkem dovnitř dvoušroubovice a interagovat s páry bází (pravděpodobná tvorba specifické vazby)

β -listu se předpokládá nspecifická vazba do malého žlábků, kde vytváří vodíkové vazby amidoskupin peptidové vazby a fosfáty

INTERAKCE MOTIVU HELIX-OTÁČKA-HELIX S DNA

-dvacetiaminokyselinový motiv nalezený u řady proteinů interagujících s DNA

- 8 AK v helixu, pak pravotočivá otáčka ze tří AK a další helix z 9 AK

-přičemž jsou konzervovány: alanin v pozici 5, glycin 9 (první AK v otáčce) isoleucin nebo valin v 9 (tyto AK zřejmě udržují strukturu motivu)

-v ostatních pozicích vysoká heterogenita (zachována je hydrofilita těch částí helixů, které směřují „ven z proteinu“ do rozotku nebo k DNA; „vnitřní“ povrchy helixů jsou hydrofobní)

-interaguje s DNA ve *velkém žlábk*u, jemuž odpovídá rozměry (typický α -helix má průměr 1.2 nm, velký žlábek je v B-DNA 1.2 nm široký a 0.6 - 0.8 nm hluboký)

-pokud je α -helix paralelně se žlábkem, může interagovat s **4-6 bp**, než žlábek „zahne“; na této délce dochází k rozpoznání specifické sekvence určitými AK

λ -repressor

-236 AK protein, dimerní

-dvě funkční domény: N-koncová (AK 1-92) se váže na DNA, C-koncová má dimerizační funkci

-N-koncová doména sestává 5 α -helixů; z nich 2. a 3. a pět AK mezi nimi vytváří *helix-otáčka-helix* motiv

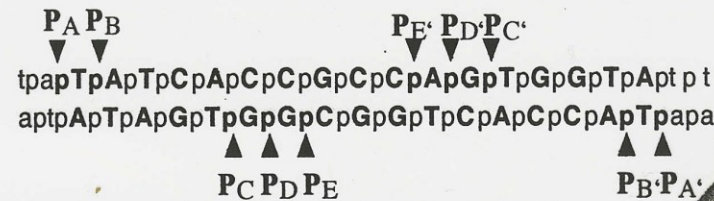
-řada specifických *vodíkových vazeb* na bp (Asn, Gln, Ser, Lys)

-Lys 4 tvoří *solný můstek* G v šestém bp

-*van der Waalsovy kontakty* (mezi hydrofobními skupinami proteinu a metylskupinami T)

-vazby zprostředkované *molekulami vody*

-interakce helixu 3 s *fosfátovými skupinami*:

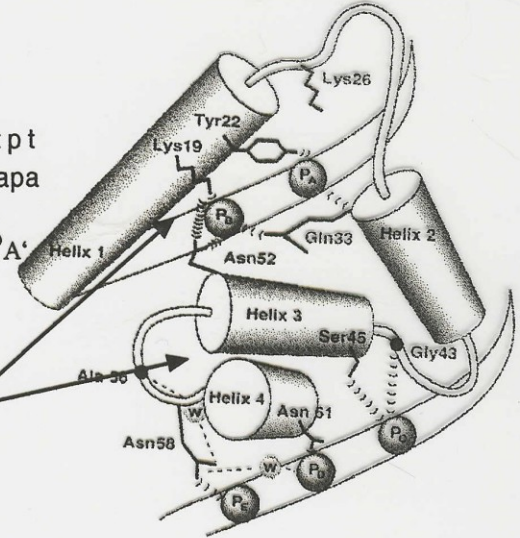
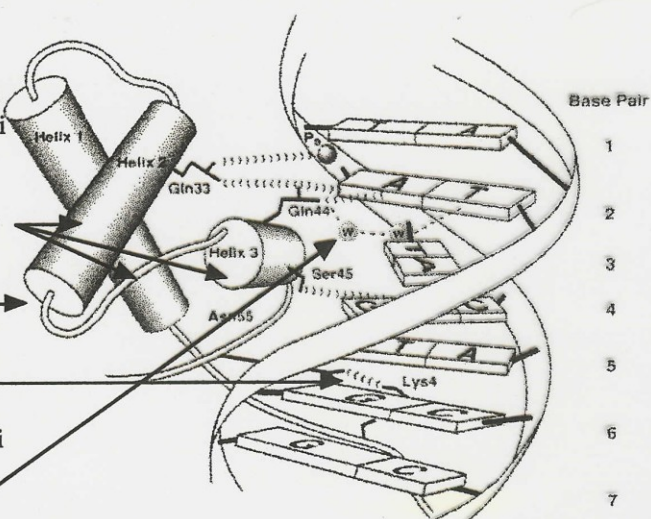


vzhledem k otáčce dvoušroubovice jsou vyznačené fosfáty A-E a A'-E' vždy ve stejném místě velkého žlábků (značení odpovídá převrácené symetrii operátoru)

-vodíkové vazby s fosfáty tvoří *dvě třídy*:

a/vazby ve velkém žlábků tvořené motivem *helix-otáčka-helix* a helixem 4

b/mimo velký žlábek od aminokyselin z helix 1 a AK mezi helixy 1 a 2



INTERAKCE Zn-VAZEBNÝCH DOMÉN S DNA

-velký počet proteinů specificky interagujících s DNA váže zinečnaté ionty (často regulační proteiny)

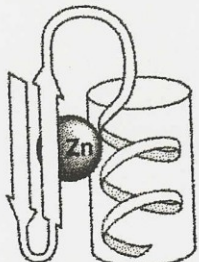
-tři typy Zn-vazebných domén:

Zinkový „prst“ - Zn(Cys₂-His₂)

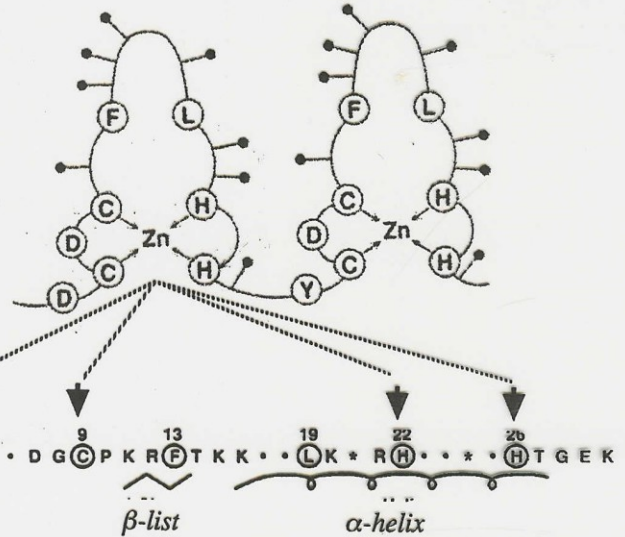
transkripční faktor IIIA:(1985)

třicetiaminokyselinový repetitivní motiv, v němž jsou konzervovány tyto aminokyseliny:

-cysteiny a histidiny koordinují zinečnatý ion



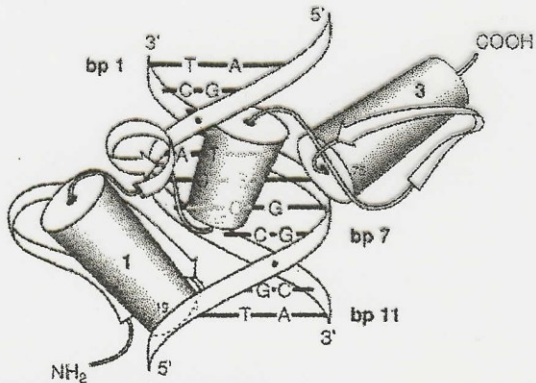
β -list α -helix



zbytky 2-14 a 3-17 tvoří *antiparalelní* β -list, z jehož jedné strany váží cysteiny 4 a 9 Zn

zbytky 16-27 tvoří α -helix, který je „přidržován“ podél β -listu koordinací histidinů 22 a 26 se Zn

V TFIIIA je devět těchto motivů, vazebné místo zahrnuje 27 bp -na obou koncích *tři* vnější „obtáčejí“ dvoušroubovici a sledují směr osy velkého žlábků (interagují vždy s 10 bp - trojice) -*tři* centrální interagují napříč malým žlábkem z jedné strany dvoušroubovice:



Protein Zif268 : kokystalová struktura

-tři Zn-prsty váží 11 bp sekvenci A GCG TGG GCG T, každý k jednomu podtrženému trinukleotidu

-protein „obtáčí“ DNA podél *velkých žlábků* a váže se na *guaniny* v rekogniční sekvenci

-N konec každého α -helixu směřuje do velkého žlábků

-před helixem každého prstu je *arginin* (polohy 18, 46, 84), který tvoří *vodíkovou vazbu* s *posledním* guaninem každého tripletu

-helix prvního a třetího prstu má uprostřed další *arginin* (24 a 80), vázající se na *první* guaniny příslušných tripletů; v prostředním helixu je *histidin* (49), vázající *centrální* guanin

-množství vazeb na fosfáty

-struktury zcela odlišná od helix-otáčka-helix!

Zn.,twist“ - [Zn(Cys4)]₂ doména

receptory pro steroidní hormony (glukokortikoidy, estrogeny):(1990)

-šedesátiaminokyselinová vazebná doména, obsahuje dvě oblasti -

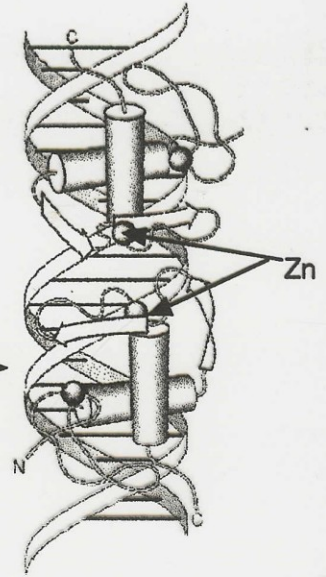
každá s dvěma cysteiny; vysoce konzervativní

-vazebná doména je uspořádána do globulární struktury tvořené dvěma na sebe kolmými α -helixy

-Zn je vázán poblíž N-konce α -helixů, které obsahují množství bazických zbytků soustředěných na jedné straně helixů

-tyto zbytky tvoří množství specifických vodíkových vazeb ve velkém žlábků DNA

- vazebné místo DNA je dimerní, zcela symetrické



Zn.,klastr“ - Zn₂(Cys₆) doména

kvasničný transkripční faktor GAL4

-třicetiaminokyselinová vazebná doména, obsahuje šest cysteinových zbytků

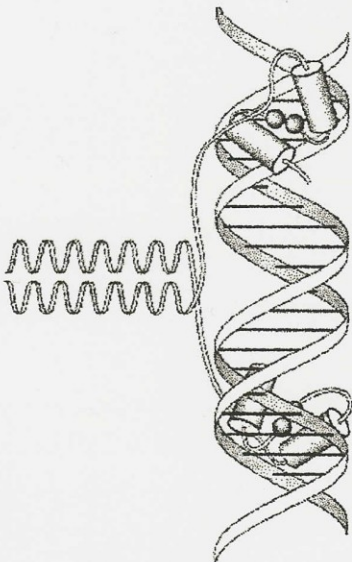
-rozmístění cysteinů je vysoce konzervativní u řady druhů kvasinek a hub

-vždy dvojice cysteinů váže zinek, dva atomy Zn jsou spojeny můstkem z další dvojice: Cys₂-Zn-Cys₂-Zn-Cys₂

-cysteiny jsou organizovány okolo dvoujaderného zinkového klastru do dvou α -helixů, spojených smyčkou na druhé straně atomů zinku (po dvou cysteinech v helixech, dva ve smyčce)

- jeden z helixů interaguje s DNA ve velkém žlábků s tripletem CCG

-vazebné místo DNA je dimerní (celkem 17 bp), podjednotky spojené „svinutým klubkem“ (coiled coil) hydrofobních zbytků interagují z opačných stran dvoušroubovice (CCG triplety jsou separovány 1.5 otáčky dvoušroubovice)



LEUCINOVÝ „ZIP“

Trankripční faktory rodiny bZip (kvasničné faktory GCN4, onkoproteiny fos a jun)

-obsahují dimerizační doménu a bazický motiv interagující s DNA

-**dimerizační doména** - tzv. **leucinový zip** - je tvořena

amfipatickým α -helixem, ve kterém je každá sedmá AK leucin:

protože otáčka α -helixu je 3.6 AK, vychází všechny leuciny *na jednu stranu helixu* (ob otáčku)

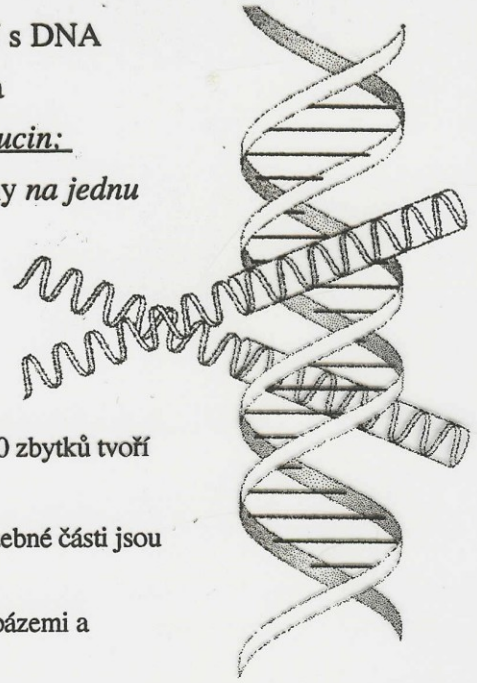
-dimerizační domény obou podjednotek spolu interagují hydrofobními vazbami leucinů, tvoří „svinuté klubko“

-**vazebná doména** obsahuje bazické AK zbytky

-monomer GCN4 obsahuje 56 AK a tvoří jeden kontinuální α -helix; 30 zbytků tvoří leucinový zip, 25 zbytků bazickou doménu

-“zip“ je v komplexu s DNA orientován kolmo k dvoušroubovici a vazebné části jsou „nastaveny“ do velkého žlábků na opačných stranách

-ve velkém žlábků tvoří vodíkové vazby zbytky Asp, Ser, Arg, Lys s bázemi a fosfáty



TATA-box -vazebné proteiny

-TBP: DNA-vazebná podjednotka proteinového komplexu, který rozpoznává TATA-box (8 bp)

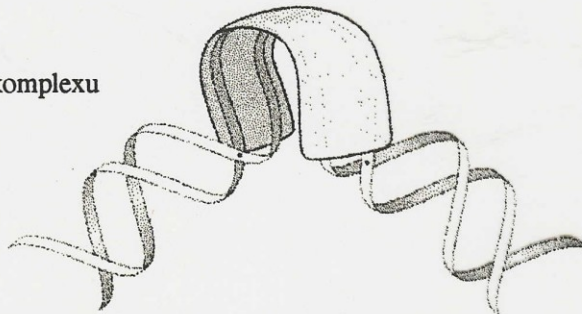
-TBP je tvořen *sedlovitě zakřiveným β -listem z 10 antiparalelních řetězců* ; na vrcholu této struktury jsou 4 α -helixy

-při tvorbě komplexu se DNA zakříví podle tvaru proteinu (o 100° ve směru malého žlábků); to způsobí odvinutí TATA boxu o 110°

-malý žlábek je otevřen, bp jsou exponovány uvnitř „sedla“

- na koncích TATA-elementu jsou mezi bp (tj bp 1,2 a 7,8) vsunuty dvě dvojice zbytků fenylalaninu

- DNA v těsném sousedství komplexu je normální B-forma!



DIMERNÍ VAZEBNÁ MÍSTA

- častý jev zejména u regulačních proteinů (dimerní rekogniční místo interaguje s dimerní nebo tetramerní molekulou proteinu)
- tím se zvyšuje afinita vazby (více vazebných míst neboli větší vazebné místo znamená více interakcí) a její specificita (protein se musí navázat na obě místa současně)

organizace dimerních vazebných míst: v zásadě je možná jako

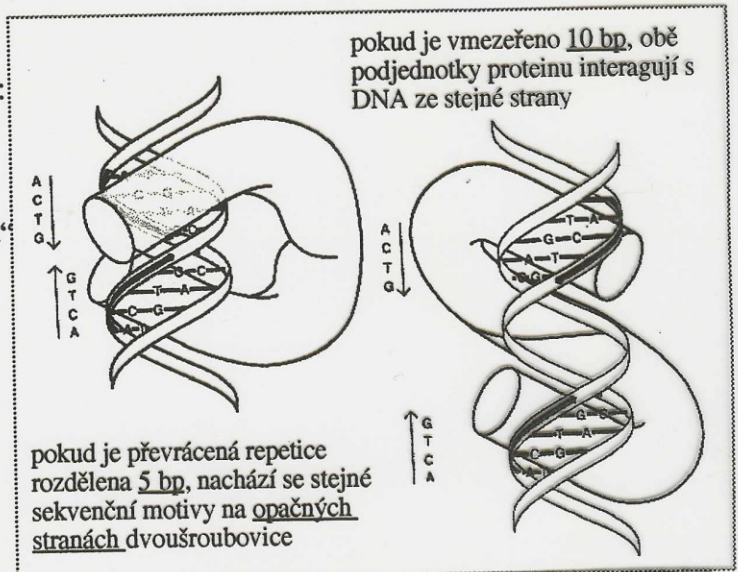


-nejobvyklejší je *převrácená* repeticie (*lac operátor*, λ -*operátor*; *restriktázy*):

nejvíce symetrie

-*přímé* (*tandemové*) repeticie jsou typické pro proteiny s tzv. „*Zn-prstec*“

-interakce dimerního proteinu se *zrcadlovou* *repeticí* je málo pravděpodobná z důvodu nedostatku symetrie takové sekvence v dvoušroubovici (nicméně případy jsou známy)



SEKVENČNĚ NESPECIFICKÉ INTERAKCE

-využívají zejména cukrfosfátové kostry, která má *relativně uniformní tvar* (s výjimkou lokálních změn konformace, které jsou závislé na určité sekvenci) a *negativní elektrický náboj*

-DNA-polymeráza I: (musí „projít“ celou molekulou a kontaktovat každý bp), interaguje s fosfátovými skupinami

-nespecifická vazba restriktáz typu II: silná závislost na iontové síle ukazuje na značný podíl elektrostatické interakce; u *EcoRV* bylo identifikováno 5 vodíkových vazeb na fosfátové skupiny (žádná na báze)

-bakteriální HU protein: účast β -listu zanořeného do malého žlábků, který interaguje vodíkovými vazbami mezi argininovými zbytky a fosfátovými skupinami

-DNáza I: vodíkové vazby mezi 10 aminokyselinami a fosfátovými zbytky; kromě toho stacking interakce mezi tyrosinovým kruhem a pyrimidinovým zbytkem a 3 vodíkové vazby mezi argininovým zbytkem a O-atomy v pyrimidinovém zbytku

REVERZIBILNÍ INTERAKCE DNA S MALÝMI MOLEKULAMI

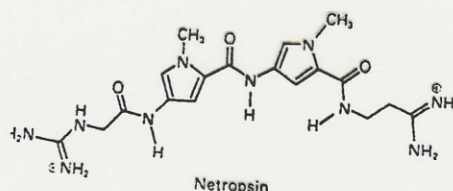
tři základní typy interakcí:

1. nespecifická vnější vazba podél molekuly DNA -

elektrostatického původu (Na^+ , 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



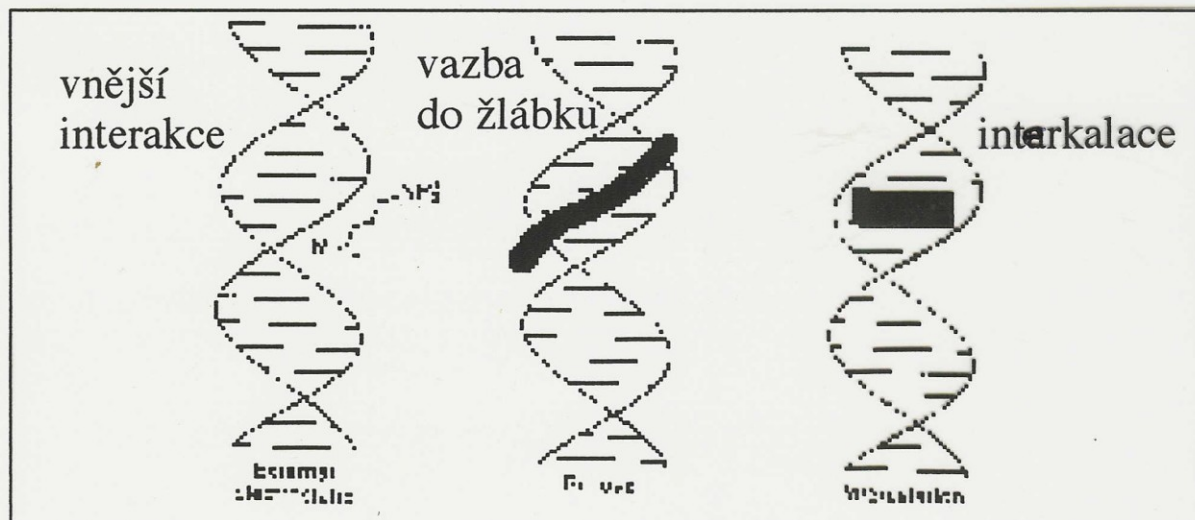
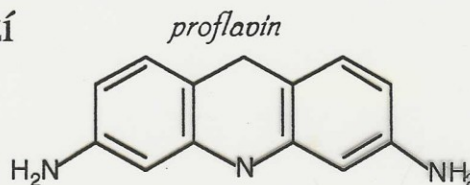
3. interkalace - planární aromatické (heterocyklické) molekuly
mezi páry bází; elektrostatické plus vodíkové plus stacking
interakce

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 (π - π)

pokud jsou nabité (proflavin), odpuzují se;

pokud ovšem zároveň interagují

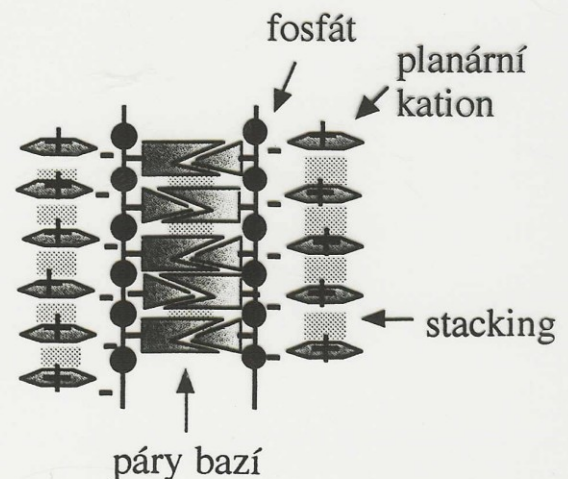
s opačně nabitým polyelektrolytem (DNA),

mohou vytvořit stacking komplexy

podél jeho molekul

(vnější stacking planárních kationtů);

efektivní jen při nízké iontové síle

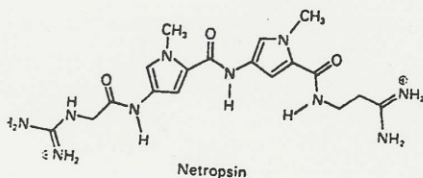


Vazba do žlábků (groove binding => dále G.B. molekuly)

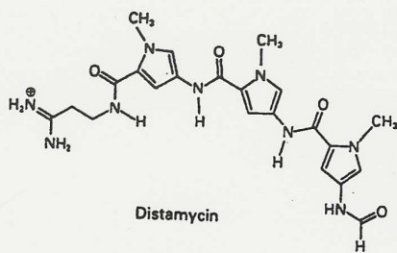
malé molekuly - většinou do malého žlábků

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

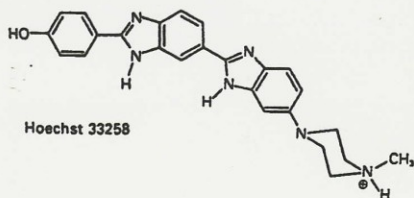
Typická molekula vázající se do m.ž.: několik aromatických kruhů (benzen, furan, pyrol) spojených vazbami s torzní volností



Netropsin



Distamycin



Hoechst 33258

-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 O²-T a N³-A

v GC párech je sterické bránění aminoskupinou G (tvoří vodíkovou vazbu O²-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 °

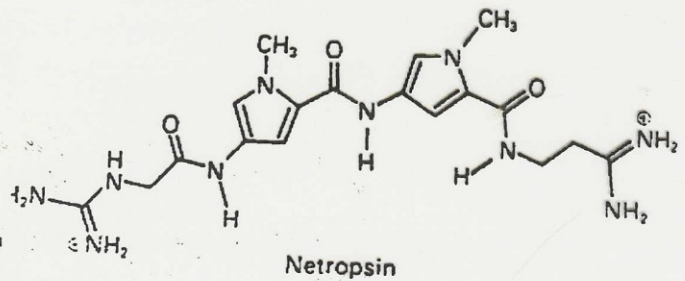
vazba netropsinu způsobuje ohyb osy dvoušrobovice a mírné

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

v GC - mnohem slabší vazba; při náhradě pyrolových kruhů

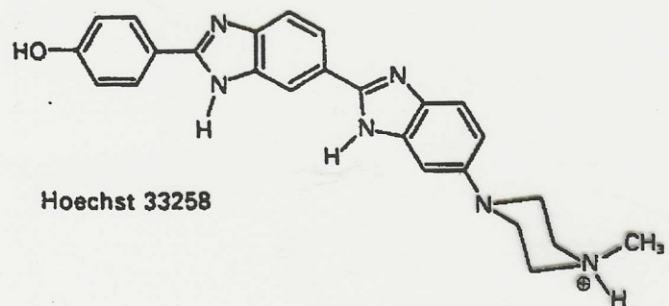
imidazolem (=> **lexitropsiny**), který je akceptorem vodíkové vazby

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



Hoechst 33258 - antibiotikum, barvení chromozómů, stranování 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

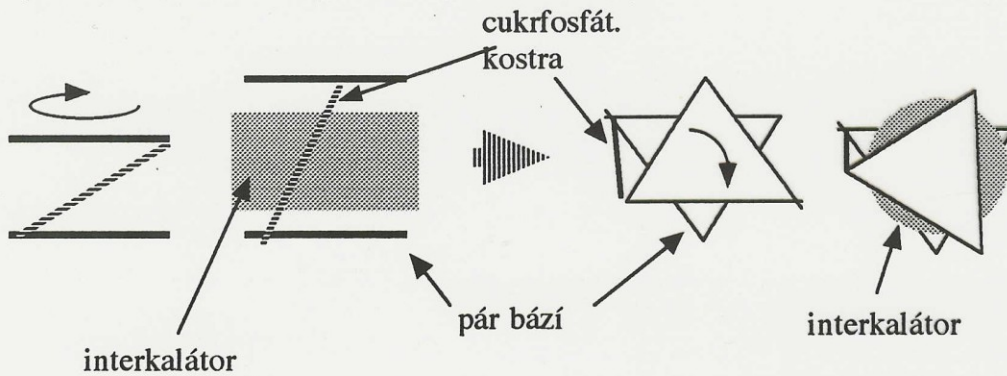
-to vede k prodloužení molekuly DNA (o efektivní tloušťku

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

hydrodynamických vlastností

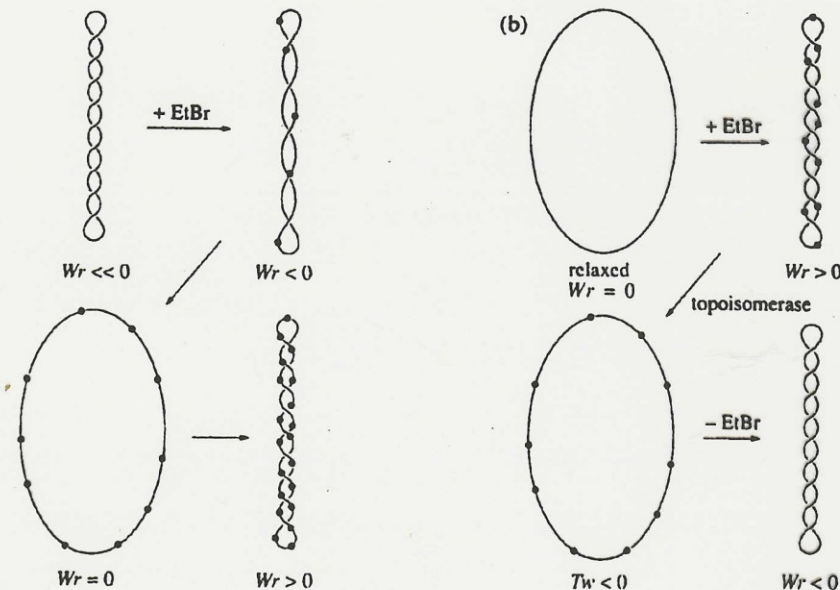
-to je spojeno s vzájemnou torzní rotací párů bází, zmenší se twist (z

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

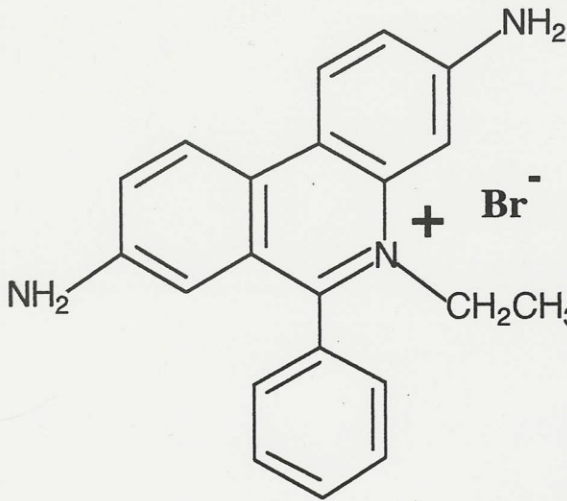
stacking - s páry bází

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

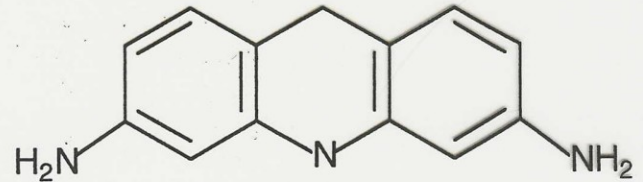
STRUKTURA: klasické interkalátory obsahují 2 - 3

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)



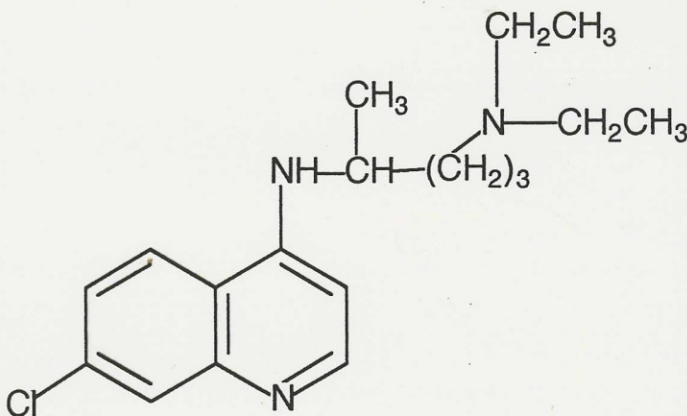
ethidium (bromid)



proflavin

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

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

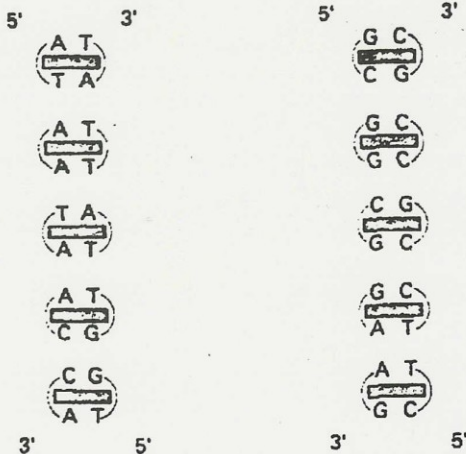
řada antibiotik: adriamycin, daunomycin, doxorubicin

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)

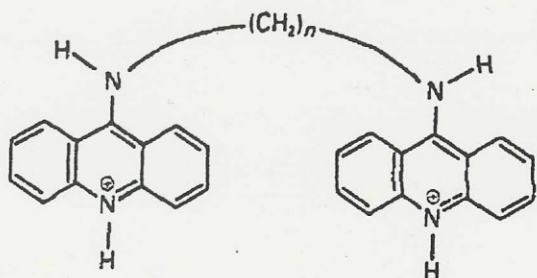
- některé bisinterkalátory >> toto pravidlo porušují

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

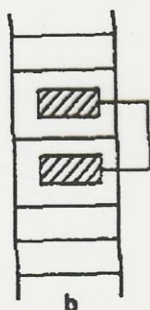
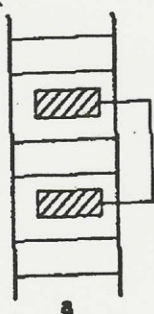


např. bisakridin s oligomethylenovým linkerem

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

$n = 6$ - bisinterkalace s porušením pravidla vyloučení

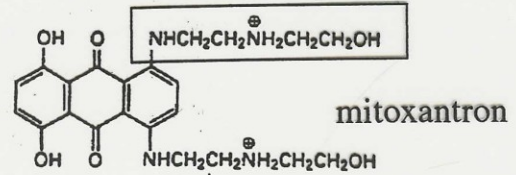
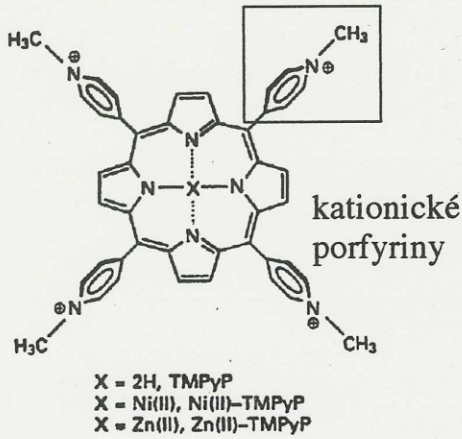
$n > 8$ - bisinterkalace bez porušení



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

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)

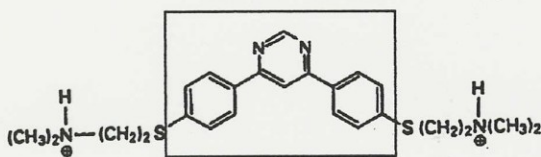


vazba jednoduchého klasického interkalátoru (proflavin) je dvoustupňová:

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 žlábcích, nebo elektrostatické s fosfáty => vysoké vazebné konstanty (navíc je kineticky blokována i disociace interkalačního komplexu)

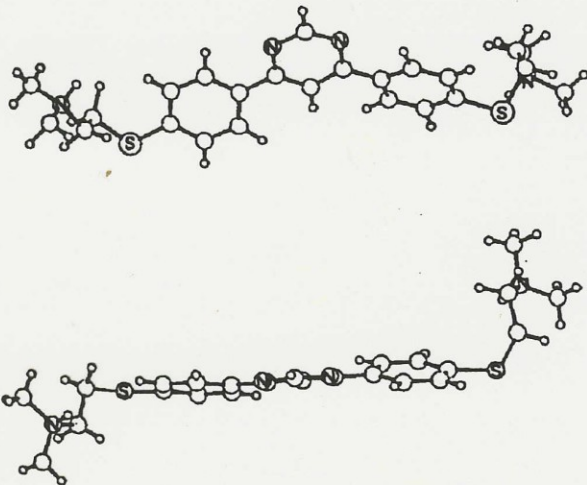
Interkalátory s „vrtulovým zkrutem“ - nekondenzované cyklické systémy (jako G.B. molekuly) - mají torzní volnost



4,6-difenylpyrimidin (a deriváty):

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

twist v molekule může kopírovat propeller-twist párů bází

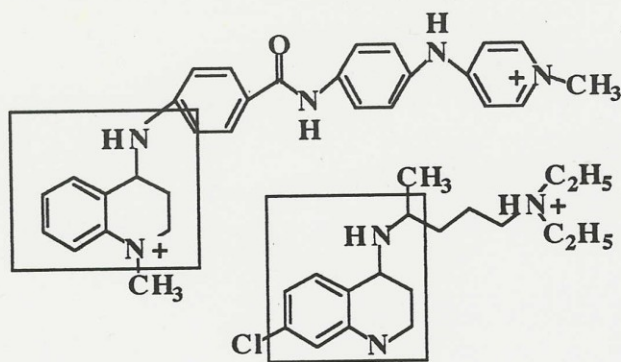


Interkalace vs. vazba do žlábků

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-fenylylindol): (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)

