

mgr Dominika Janiszek

Warszawa, 28.02.2020 r.

Pracownia Elektroanalizy Chemicznej

Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.

„Elektrochemiczne badania oddziaływań plazmidowego DNA z substancjami o właściwościach przeciwnowotworowych, przeciwgrzybiczych, przeciwbakteryjnych i przeciwutleniających”

Promotor: prof. dr hab. Paweł J. Kulesza

Promotor pomocniczy: dr Hanna Majewska-Elżanowska

Poznanie sposobów oddziaływania leków z poszczególnymi elementami komórek, w szczególności komórek nowotworowych, jest istotnym elementem projektowania nowych związków o specyficznych, ściśle określonych właściwościach. Celem działania wielu leków jest kwas dezoksyrybonukleinowy (DNA). Informacje na temat oddziaływania DNA z nowo zsyntetyzowanymi związkami, które w przyszłości mogą być użyte jako leki, oraz ich wpływu na strukturę DNA, mogą pozwolić na określenie mechanizmu ich działania. Dlatego też celem niniejszej pracy było opracowanie metody, która pozwoli na porównanie wpływu różnych typów związków chemicznych na DNA i znalezienie cech charakterystycznych dla danej grupy związków. Większość związków używanych w tej pracy należy do znanej grupy związków, tzn. przeciwnowotworowych, przeciwbakteryjnych, przeciwgrzybiczych lub przeciwutleniaczy, ale są to nowe, nowo zsyntetyzowane związki, których działanie jest określone, ale nie jest znana siła tego oddziaływania, czyli efektywność ewentualnego leku. Celem badań jest zatem powiązanie cech charakterystycznych dla danego związku, np. własności redoks lub tendencji do kondensacji z możliwością tworzenia wiązań związek-DNA.

Bardzo ważnym etapem badań było zaplanowanie procedury tworzenia powtarzalnych warstw DNA na elektrodzie z węgla szklanego i przy użyciu niezwykle małych stężeń DNA, rzędu pg/ml, zamiast zwykle stosowanych µg/ml. W rezultacie, można było użyć niskich stężeń badanych związków. Jest to istotny element tej pracy, ponieważ nowo zsyntetyzowane

związki są zwykle otrzymywane w małych ilościach. Możliwość zastosowania niezwykle niskich stężeń DNA była również istotna ze względu na zastosowanie plazmidowego DNA, także otrzymanego w małych ilościach.

W badaniach zastosowano plazmidowe DNA w dwóch formach: superhelikalnej i liniowej. Używane plazmidy posiadają taką samą sekwencję oraz ilość par zasad, a różnią się trójwymiarową strukturą. Przeprowadzone badania AFM wskazują, że warstwy plazmidów liniowych i superhelikalnych na powierzchni z węgla szklanego można rozróżnić. W obydwu przypadkach widoczne jest równomierne ułożenie cząsteczek DNA w warstwach. Należy zwrócić uwagę na to, że plazmidy liniowe mogą związać się na powierzchni elektrody i przypominać kształtem struktury superhelikalne (choć ich nie tworzą), co jest widoczne w trakcie elektrochemicznej adsorpcji tych form plazmidów na powierzchni GC, gdzie różnice w akumulacji pomiędzy nimi są niewielkie. Jednak poszczególne związki badane w pracy inaczej reagują z tymi dwiema formami DNA, wskazując na ważną rolę trzeciorzędowej struktury DNA w oddziaływaniach DNA - związek. Świadczy to nie tylko o kompleksowaniu DNA, ale również wskazuje na ewentualną rolę tych związków w rozplataniu DNA, które zachodzi w procesie replikacji i transkrypcji.

Do badań elektrochemicznych oddziaływania DNA ze związkami, zastosowałam metody pulsowe: woltamperometrię fali prostokątnej (SWV) i pulsową różnicową (DPV) oraz woltamperometrię zmiennoprądową (ACV) z detekcją fazy 0° i 90° . Metody pulsowe służyły do rejestracji sygnałów redoks badanych związków i DNA, a zmiennoprądowe do monitorowania zmian oporu i pojemności warstw DNA – związek oraz procesów redoks. Te cztery metody były stosowane jedna po drugiej, najpierw w pierwszym etapie doświadczenia, gdzie adsorbowałam przez 3-4 godziny warstwę superhelikalnego lub liniowego DNA, a następnie przy dodawaniu badanego związku i akumulowaniu go w otrzymanej warstwie DNA.

W swoich badaniach użyłam nowo zsyntetyzowane, potencjalne związki przeciwnowotworowe, które różnią się między sobą grupami funkcyjnymi: IPBD, Cl-IPBD (z dodatkowym atomem chloru), Et-IPBD (z grupą etylową) i Me-IPBD (z grupą metylową). Wszystkie związki mają właściwości redoks i utleniają się przy pięciu lub sześciu potencjałach. Tworzenie kompleksów pomiędzy plazmidami, a IPBD i pochodnymi tego związku jest widoczne w pomiarach elektrochemicznych w przesunięciach potencjałów redoks sygnałów utleniania badanych związków, o 10 mV - 30 mV, a także we wzroście wysokości sygnałów spowodowane oddziaływaniem z DNA. Dokładna analiza jednego z sygnałów redoks związku Cl-IPBD ujawniła że związek ten oddziałuje w odmienny sposób z

plazmidami w zależności od stężenia. Pierwszy typ oddziaływania, przy niskich stężeniach, określono jako Orientacja I, a przy wysokich jako Orientacja II. Wynik ten może mieć znaczenie medyczne, ponieważ związek ten jako lek przeciwnowotworowy może działać w odmienny sposób zależny od zastosowanej dawki. Skutkiem oddziaływania plazmidów z potencjalnymi związkami przeciwnowotworowymi jest także wpływ na sygnały utleniania zasad azotowych w plazmidach oraz zmiany oporu i pojemności warstw DNA – związek, które sugerują kondensację DNA na powierzchni elektrody i/lub wskazują na zmiany zachodzące w trójwymiarowej strukturze DNA. Największe zmiany zaobserwowano dla pochodnej zawierającą grupę etylową. Ważną rolę w tych badaniach odgrywa helikalność DNA, ponieważ każdy z potencjalnych związków przeciwnowotworowych oddziaływał silniej z jedną z form plazmidów: IPBD, Cl-IPBD i Me-IPBD z formą liniową, a Et-IPBD superhelikalną.

Kompleksowanie DNA potencjalnymi związkami przeciwnowotworowymi zostały również potwierdzone przez badania spektroskopowe UV-Vis, gdzie zaobserwowano przesunięcia maksimów absorpcji DNA w stronę fal krótszych. Na podstawie tych danych obliczono stałe kompleksowania, które dla wszystkich pochodnych są rzędu 10^5 M^{-1} , a najwyższa z nich odpowiada pochodnej z grupą etylową. Wykonano także doświadczenia z użyciem dichroizmu kołowego (CD), z których wynika, że przy niskich ilościach związków dochodzi do zmiany formy B-DNA w A-DNA, a przy wyższych ilościach widoczne są kolejne zmiany w strukturze plazmidów. Dla pochodnej z grupą metylową widoczne są tylko zmiany w strukturze DNA przy wysokich stężeniach związku.

Wyniki badań elektrochemicznych dotyczące różnego oddziaływania DNA z potencjalnym związkiem przeciwnowotworowym w zależności od stężenia (Orientacja I i II) mają swoje potwierdzenie w badaniach na nowotworowych liniach komórkowych, gdzie dla związku Cl-IPBD przy niskich stężeniach znacznie spada żywotność komórek, zaś przy wysokich nie widać już znaczących zmian w ich ilości. Badania na liniach komórkowych wykazały, że IPBD i jego pochodne są cytotoksyczne. Badania żywotności i śmiertelności komórek nowotworowych od stężenia potencjalnych związków przeciwnowotworowych korelują się z elektrochemicznymi zależnościami opisującymi akumulację badanych związków w DNA. Jest to dodatkowy dowód na powiązanie zmian procesów redoks związków na skutek oddziaływania z DNA, a efektem zmniejszenia żywotności komórek w badaniach biologicznych.

Interesujący sposób akumulacji Cl-IPBD w plazmidach skłonił mnie do wykonania dalszych badań, aby określić w jaki sposób potencjalny związek przeciwnowotworowy

oddziałuje z DNA. Jako związek porównawczy wybrano pentamidynę, której sposób oddziaływania z DNA jest znany i został potwierdzony w badaniach krystalograficznych. Związek ten wchodząc w interakcje z DNA, lokuje się w małym rowku helisy. Wykonano także eksperymenty, w których badano jednoczesny wpływ Cl-IPBD i pentamidyny na plazmidy. W oddziaływaniu Cl-IPBD i pentamidyny z DNA można wyróżnić podobieństwa i różnice. W przeciwieństwie do potencjalnego związku przeciwnowotworowego, pentamidyna nie ma właściwości redoks, ale efektem jej oddziaływania z DNA jest uszkodzenie plazmidu, co zaobserwowano jako dodatkowe sygnały powstającej 8-oksyguaniny. Natomiast do podobieństw należy wpływ na sygnały utleniania DNA oraz obniżenie sygnału związanego ze zmianami oporu i pojemności warstwy DNA-związek, który może oznaczać kondensację lub zmianę struktury DNA. Zmianę formy B-DNA w Z-DNA potwierdzają badania spektroskopowe.

Doświadczenia, w których badano jednoczesny wpływ obydwu związków Cl-IPBD i pentamidyny na plazmidy, wykazały wzmocnienie dwóch sygnałów utleniania Cl-IPBD w warstwie DNA przy zwiększającym się stężeniu pentamidyny. Natomiast w badaniach spektroskopowych zaobserwowano, że w obecności Cl-IPBD i pentamidyny dochodzi również do transformacji prawoskrętnej formy B-DNA w lewoskrętną Z, tylko, że to przekształcenie zachodzi przy znacznie niższych stężeniach pentamidyny w porównaniu z efektem obserwowanym dla kompleksu DNA – pentamidyna. Podobny efekt jest widoczny w badaniach na liniach komórkowych, gdzie jednoczesne podawanie obydwu związków spowodowało znaczny spadek liczby komórek nowotworowych w porównaniu do sytuacji, gdzie Cl-IPBD i pentamidyna były stosowane oddzielnie. Badania te wykazały, że Cl-IPBD i pentamidyna w połączeniu oddziałują silniej z plazmidami niż każdy z tych związków z osobna.

Niniejsza praca doktorska zawiera także elektrochemiczne badania dotyczące oddziaływania plazmidowego DNA z przeciwutleniaczami: rutyną i witaminą C. Obydwa badane przeciwutleniacze ulegają utlenianiu w warstwach DNA, ale oddziałują z DNA w odmienny sposób. Rutyna, podobnie jak potencjalne związki przeciwnowotworowe oraz pentamidyna, powoduje kondensację warstw plazmidowego DNA zakumulowanych na elektrodzie GC w odróżnieniu od witaminy C, dla której efekt ten jest słabo widoczny nawet przy wysokich stężeniach związku. Niewielki wpływ witaminy C na warstwę DNA wskazuje na słabe oddziaływania, które jednak mogą być istotne w połączeniu z innymi związkami, jak np. związki przeciwnowotworowe.

Praca doktorska zawiera również opis oddziaływania DNA ze związkami przeciwbakteryjnymi i przeciwgrzybicznymi, które zdecydowanie można badać za pomocą metod elektrochemicznych. Dla każdej ze zbadanych grup związków można zauważyć pewne podobieństwa i różnice. Związki przeciwbakteryjne (TDDT i DMPT) trudno utleniają się na elektrodzie GC oraz w warstwach DNA, w przeciwieństwie do substancji przeciwgrzybiczych (DBT i DIT), które utleniają się łatwo, podobnie jak związki przeciwnowotworowe. Różnice obserwuje się także w stopniu kondensacji w warstwach DNA-związek. Należy zwrócić uwagę, że kondensacja warstw DNA towarzyszy oddziaływaniu większości związków badanych w niniejszej pracy doktorskiej i stanowi jej ważny element. Oddziaływanie plazmidów ze związkami przeciwbakteryjnymi i przeciwgrzybicznymi zależy także od helikalności DNA, związki przeciwgrzybicze silniej oddziałują z formą superhelikalną, podobnie jak jeden ze związków przeciwbakteryjnych DMPT, zaś drugi, TDDT, z formą liniową.

Za pomocą metod elektrochemicznych również można badać oddziaływanie DNA ze składnikami roślinnego ekstraktu *U. tomentosa*, który posiada właściwości przeciwtleniające i przeciwnowotworowe. Składniki ekstraktu utleniają się na czystej elektrodzie GC oraz w warstwie plazmidów, a także powodują kondensację DNA, tak jak potencjalne związki przeciwnowotworowe. Badania spektroskopowe potwierdziły oddziaływanie DNA z *U. tomentosa*. Ważne, że zaobserwowano zmianę formy DNA z B-DNA w Z-DNA, podobnie jak dla kompleksu DNA z pentamidyną oraz DNA z mieszaniną związku przeciwnowotworowego (CI-IPBD) i pentamidyny.

Reasumując, chciałabym podkreślić, że porównanie oddziaływania DNA z wieloma różnego typu związkami możliwe było przy zastosowaniu plazmidowego DNA (uzyskanego przy pomocy dr hab. Agnieszki Girstun) i specyficznej elektrochemicznej metody tworzenia stabilnych warstw elektrodowych (uwidocznionych przez prof. Sławomira Sęka metodą AFM) zawierających związki, których detekcja przebiegała w znacznym zakresie stężeń. Ten sposób przeprowadzenia doświadczeń pozwolił mi na elektrochemiczną obserwację zmian w ułożeniu poszczególnych związków w helisie DNA. Zmiany te mogły być dalej skorelowane z moimi badaniami spektroskopowymi i biologicznymi mgr Anity Kośmider, a przede wszystkim korelacje te mogły być przeprowadzone przy użyciu nowo zsyntetyzowanych przez dr Monikę Karpińską związków o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych, które z powodzeniem dodatkowo połączyłam z innego typu związkami w celu zbadania oddziaływań DNA-związki.