

**M A S A R Y K O V A
U N I V E R Z I T A**

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

**Stabilizace nekanonických struktur DNA alkaloidy escholidinem,
kolumbaminem a fagaroninem**

PAVEL HANNIG

Vedoucí práce: doc. Mgr. Petr Tábořský, Ph.D.

Konzultantka: Mgr. Petra Jarošová

Brno 2021

Bibliografický záznam

Autor:	Pavel Hannig Přírodovědecká fakulta Masarykova univerzita
Název práce:	Stabilizace nekanonických struktur DNA alkaloidy escholidinem, kolumbaminem a fagaroninem
Studijní program:	Chemie
Studijní obor:	Analytická chemie
Vedoucí práce	doc. Mgr. Petr Táborský, Ph.D.
Konzultantka	Mgr. Petra Jarošová
Rok:	2021
Počet stran:	62
Klíčová slova:	escholidin, kolumbamin, fagaronin, DNA, G-kvadruplex, i-motiv, cirkulární dichroismus, teplota tání oligonukleotidu, stechiometrie interakce, asociační konstanta

Bibliographic record

Author: Pavel Hannig
Faculty of science
Masaryk University

Title of Thesis: Stabilization of non-canonic structures of DNA by alkaloids
escholidine, columbamine and fagaronine

Degree Programme: Chemistry

Field of Study: Analytical chemistry

Supervisor: doc. Mgr. Petr Táborský, Ph.D.

Consultant: Mgr. Petra Jarošová

Year: 2021

Number of Pages: 62

Keywords: escholidine, columbamine, fagaronine, DNA, G-quadruplex,
i-motif, circular dichroism, melting point of oligonucleotide,
interaction stoichiometry, association constant

Abstrakt

Tato diplomová práce je zaměřena na stabilizaci nekanonických struktur DNA pomocí rostlinných alkaloidů. Zkoumány byly dva protoberberinové alkaloidy – escholidin a kolumbamin, a jeden benzo[c]fenanthridinový alkaloid – fagaronin. Mezi zkoumanými strukturami byl paralelní a antiparalelní G-kvadruplex a tři i-motivy. Teploty tání čistých struktur i komplexů s ligandem byly stanoveny pomocí cirkulárního dichroismu. Tyto hodnoty byly porovnány a byl zjištěn stabilizační účinek alkaloidu na příslušnou strukturu.

Bylo zjištěno, že všechny alkaloidy stabilizují struktury G-kvadruplexů, přičemž fagaronin nejvíce a escholidin nejméně. Na žádný z i-motivů neměly alkaloidy výraznější stabilizační vliv. U escholidinu a fagaroninu byly také provedeny titrace k určení asociační konstanty a stechiometrického poměru, ve kterém se alkaloid na strukturu váže. Escholidin interaguje se strukturami v poměru 1:4 nebo 1:5. Fagaronin se na G-kvadruplexy váže v poměru 1:4, zatímco na i-motivy v poměru 1:3.

Abstract

This thesis focuses on stabilizing non-canonical DNA structures by plant alkaloids. Two protoberberine alkaloids were studied – escholidine and columbamine, and one benzo[c]phenanthridine alkaloid – fagaronine. Among researched structures, there were parallel and antiparallel G-quadruplex and three i-motifs. Melting points of pure structures and oligonucleotide:ligand complex were obtained by circular dichroism measurements. These values were compared, and the degree of stabilization was determined.

All three alkaloids stabilized G-quadruplex structures, with fagaronine the most and escholidine the least. Any of the alkaloids did not stabilize i-motifs. Escholidine and fagaronine were also titrated to determine the association constant and stoichiometric ratio at which the alkaloid binds to the structure. Escholidine interacts in ratio 1:4 or 1:5. Fagaronine binds with G-quadruplexes in ratio 1:4, while with i-motifs 1:3.

ZADÁNÍ
DIPLOMOVÉ PRÁCE

Akademický rok: 2020/2021

Ústav:	Ústav chemie
Student:	Bc. Pavel Hannig
Program:	Chemie
Specializace:	Analytická chemie

Ředitel ústavu PřF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje diplomovou práci s názvem:

Název práce:	Stabilizace nekanonických struktur DNA alkaloidy escholidinem, kolumbaminem a fagaroninem
Název práce anglicky:	Stabilization of non-canonic structures of DNA by alkaloids escholidine, columbamine and fagaronine
Jazyk závěrečné práce:	čeština
Oficiální zadání: Studium stabilizace vybraných nekanonických struktur DNA (i-motiv, g-kvadruplex) bude prováděno pomocí CD spektrometrie a fluorescenční spektrometrie.	
Vedoucí práce:	doc. Mgr. Petr Tábořský, Ph.D.
Konzultant:	Mgr. Petra Jarošová
Datum zadání práce:	11. 12. 2020
V Brně dne:	15. 5. 2021

Zadání bylo schváleno prostřednictvím IS MU.

Bc. Pavel Hannig, 3. 3. 2021

doc. Mgr. Petr Tábořský, Ph.D., 13. 5. 2021

doc. Mgr. Marek Nečas, Ph.D., 15. 5. 2021

Poděkování

Tímto bych rád poděkoval doc. Mgr. Petru Táborskému, Ph.D. za cenné a odborné rady při zpracovávání této diplomové práce. Také bych rád poděkoval konzultantce Mgr. Petře Jarošové za pomoc při přípravě experimentálního plánu a vyhodnocování výsledků.

Dále děkuji Středoevropskému technologickému institutu – CEITEC, u nichž byla naměřena část dat k této diplomové práci.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci vypracoval samostatně s užitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

V Brně dne 13. května 2021

.....

Pavel Hannig

Obsah

Úvod.....	8
Teoretická část.....	9
1 Alkaloidy.....	9
1.1 Escholidin.....	9
1.2 Kolumbamin.....	10
1.3 Fagaronin.....	11
2 Deoxyribonukleová kyselina (DNA).....	11
2.1 G-kvadruplex.....	12
2.2 I-motiv	14
3 Využité metody.....	16
3.1 Fluorescenční spektroskopie	16
3.2 Církulární dichroismus (CD).....	19
Experimentální část.....	22
4 Použité přístroje	22
5 Použité chemikálie.....	22
6 Metodika	23
6.1 Příprava roztoků.....	23
6.2 Postup měření.....	24
7 Stanovení teploty tání oligonukleotidů	26
7.1 Oligonukleotid DL40.....	26
7.2 Oligonukleotid GG1	30
7.3 Oligonukleotid nmyc01	33
7.4 Oligonukleotid nmyc01m.....	37
7.5 Oligonukleotid 22nt	40
8 Stanovení asociační konstanty a stechiometrického poměru DNA:ligand	44
8.1 Titrace escholidinu.....	44
8.2 Titrace fagaroninu.....	48
Diskuze	53
Závěr	57
Seznam zkratk	58
Seznam referencí.....	59

Úvod

Alkaloidy jsou dusíkaté sloučeniny běžně se vyskytující v organismech. Dnes jich známe více než 6000 a najdeme je nejčastěji v rostlinách, případně také v živočiších nebo houbách.¹ Jedná se o sekundární metabolity aminokyselin, které v organismech zastávají primárně ochrannou funkci. Jelikož se jedná o zásadité molekuly, bývají zpravidla velice hořké a zároveň vysoce toxické.^{1,2} I přes to jsou díky jejich psychotropním a bioaktivním vlastnostem využívány od pradávna v lékařství.³ Mezi nejznámější alkaloidy, se kterými se můžeme setkat v běžném životě nebo našly uplatnění v lékařství, patří např. kofein, chinin, kokain nebo morfin.

Mezi rostlinné alkaloidy patří mimo jiné skupiny protoberberinových a benzo[c]fenanthridinových alkaloidů. Tyto alkaloidy se hojně vyskytují v čeledích *Papaveraceae* (makovité)⁴, *Ranunculaceae* (pryskyřníkovité)⁵, *Rutaceae* (routovité)⁶, *Annonaceae* (láhevnickovité)⁷ a dalších. Po staletí se rostliny obsahující tyto alkaloidy využívaly jako sedativa a analgetika, v protizánětlivé léčbě nebo jako antimalarika.⁸⁻¹⁰

Bylo dokázáno, že alkaloidy mohou interagovat s nukleovými kyselinami v jádrech živých buněk.^{11,12} Po interakci s DNA mohou ovlivnit její stabilitu, proto se terčem zájmu staly nekanonické struktury (G-kvadruplex, i-motiv), jejichž výskyt může ovlivňovat běžné buněčné procesy, jakými jsou transkripce či replikace.¹³ Zvýšení stability nekanonických struktur prostřednictvím rostlinných alkaloidů může vést k inhibici nádorového bujení. Z tohoto důvodu jsou již některé alkaloidy využívány jako doplňky při léčbě rakoviny.^{13,14}

Teoretická část

1 Alkaloidy

1.1 Escholidin

Escholidin je jeden z přírodních kvartérních alkaloidů vyskytujících se v rostlinách *Eschscholzia californica* (Sluncovka kalifornská) a *Hunnemannia fumariifolia* (Hunemanie).¹⁵ Tyto rostliny patří do řádu makovitých a rostou ve vyšších nadmořských výškách Severní Ameriky. Již původní obyvatelé používali tyto byliny k přípravě extraktů a tinktur ke zlepšení kvality spánku. Dnes se využívají k výrobě sedativ či analgetik.^{10,16,17}

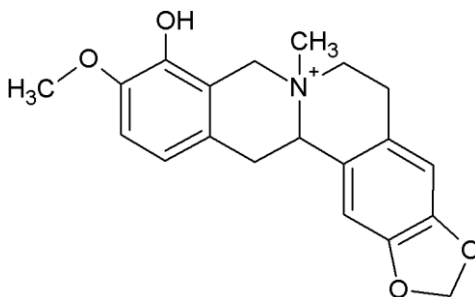


Obrázek č. 1 - Sluncovka kalifornská¹⁸



Obrázek č. 2- Hunemanie¹⁹

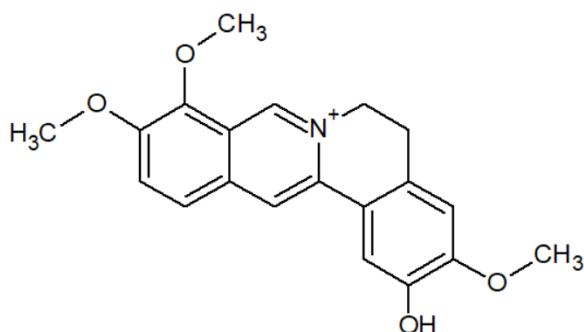
Escholidin patří mezi protoberberinové alkaloidy, jejichž základem je tetracyklická struktura protoberberinu založena na systému dibenzo[a,g]chinolizidinu.²⁰ Ze skupiny protoberberinů se ve výše zmíněných rostlinách nachází ještě alkaloidy koptizin, kryptopin nebo hunemanin. Vedle protoberberinových alkaloidů obsahují velké množství benzo[c]fenanthridinových alkaloidů, těmi nejběžnějšími jsou sanguinarin, chelirubin nebo makarpin.^{17,21}



Obrázek č. 3 - Struktura escholidinu

1.2 Kolumbamin

Kolumbamin se stejně jako escholidin řadí mezi protoberberinové alkaloidy.



Obrázek č. 4 - Struktura kolumbaminu

Kolumbamin se přirozeně vyskytuje ve velkém množství rostlin. Například v čeledích *Annonaceae* (láhevnikovité)^{7,22,23}, *Ranunculaceae* (pryskyřníkovité)^{5,24,25}, *Berberidaceae* (dřišťálovité)^{26,27}, *Menispermaceae* (lunoplodovité)²⁸ nebo *Papaveraceae* (makovité)⁴. Rostlina *Coptis chinensis* (Koptis čínský) z čeledi *Ranunculaceae* se využívá v tradiční čínské medicíně k léčbě hypertenze, zánětů či rakoviny.⁸ Je také složkou kůry stromu *Enantia chlorantha* z čeledi *Annonaceae*, jehož extrakt se využívá k léčbě malárie v afrických zemích.²² V rostlinách se často vyskytuje s velice podobnými alkaloidy jatrorrhizinem a palmatinem.²⁹ Kolumbamin také inhibuje proliferaci nádorových buněk v kostních nádorech, jeví se tak jako potenciální cytostatikum, které na rozdíl od ostatních cytostatických alkaloidů není příliš toxické.³⁰



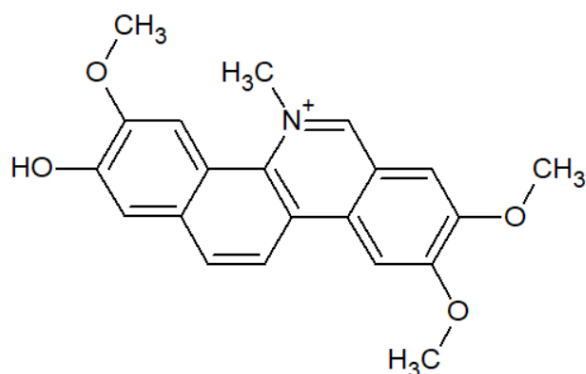
Obrázek č. 5 - Koptis čínský³¹



Obrázek č. 6 - Enantia chlorantha³²

1.3 Fagaronin

Fagaronin se řadí mezi benzo[c]fenanthridinové alkaloidy. Poprvé byl extrahován z kořenů africké rostliny *Fagara zanthoxyloides*, která patří do čeledi *Rutaceae* (routovité). V dnešní době existuje již spousta syntetických cest, kterými se tento alkaloid připravuje.^{6,9,33}



Obrázek č. 7 - Struktura fagaroninu



Obrázek č. 8 - *Fagara zanthoxyloides*³⁴

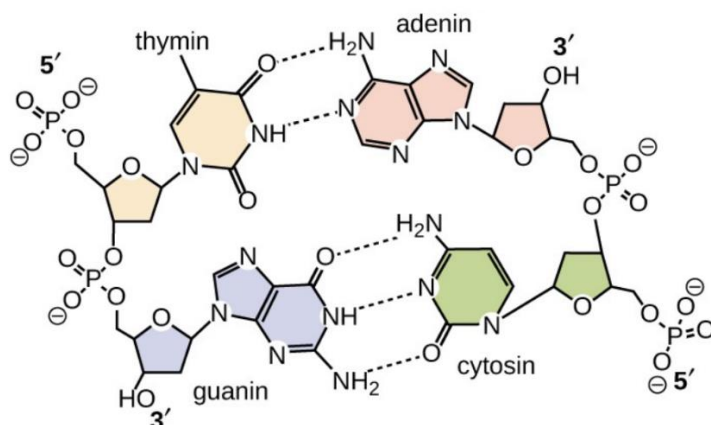
Fagaronin dokáže interkalovat do struktury DNA a jeho vysoce elektronegativní kyslík z OH skupiny tvoří vodíkové vazby s NH₂ skupinou guaninu. Po navázání na DNA inhibuje aktivitu topoizomerázy I i II. Pozornost se také upíná na elektrofilní iminiovou vazbu přítomnou v benzo[c]fenanthridinových alkaloidech, která by mohla hrát roli v tvorbě komplexů s DNA.^{35,36} Při pokusech na myších byly dokázány antileukemické účinky fagaroninu, a proto je testován jako léčivo proti rakovinným onemocněním.⁶ Na druhou stranu je cytotoxický a způsobuje rozpad chromozomů a ztrátu spermií.³⁷ Fagaronin je také prokázaným antimalarikem proti rodům *Plasmodium* (zimničky).^{9,38} Podobné účinky jako fagaronin mají také jeho deriváty nitidin a etoxidin.^{35,39}

2 Deoxyribonukleová kyselina (DNA)

Deoxyribonukleová kyselina je nositelkou genetické informace a řídí buněčné procesy u většiny organismů. Výjimkou jsou některé nebuněčné organismy, kde ji nahrazuje ribonukleová kyselina (RNA). Poprvé byla popsána Watsonem a Crickem v roce 1953.⁴⁰

Stavbu DNA můžeme rozdělit do několika úrovní. Primární strukturu tvoří pořadí nukleotidů v řetězci, které je zásadní pro informační vlastnosti DNA. Každý nukleotid se skládá z deoxyribózy, fosfátu a nukleové báze. Deoxyribóza je pentóza ve furanové formě. Přes uhlíky 3' a 5' se na ni esterovou vazbou vážou fosfáty a tvoří tzv. cukr-fosfátovou kostru DNA. Na 1' uhlík se váže pomocí N-glykosidové vazby nukleová báze. Nukleové báze jsou dusíkaté

heterocyklické sloučeniny, které mají purinový nebo pyrimidinový základ. Základní purinové báze jsou adenin (A) a guanin (G), pyrimidinové jsou thymin (T) a cytosin (C). Polynukleotidová vlákna drží při sobě díky vodíkovým můstkům, které jsou tvořeny mezi komplementárními dvojicemi nukleových bází. Adenin se vždy váže s thyminem a tvoří mezi sebou dva vodíkové můstky. Guanin se vždy váže s cytosinem a tvoří tři vodíkové můstky.^{41,42}



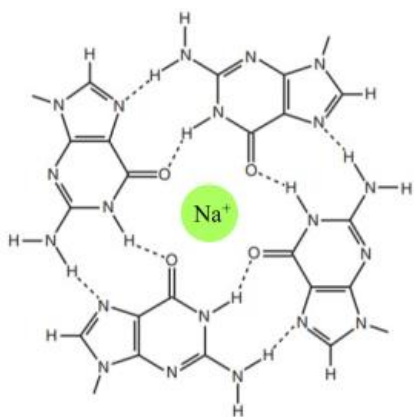
Obrázek č. 9 - Struktura DNA⁴³

Sekundární struktura popisuje tvar a uspořádání makromolekuly DNA. Základní uspořádání je dvoušroubovice. Tvoří ji dvě vlákna DNA, která jsou spojena antiparalelním způsobem (každé směřuje jiným směrem) a společně se obtáčí kolem osy. Nejběžnějším typem dvoušroubovice je B-DNA, která je pravotočivá a na jednu otočku připadá 10,5 bází. Mezi méně v organismech zastoupené typy patří A-DNA, která je také pravotočivá, ale oproti B-DNA je více plochá, a proto na jednu otočku připadá 11 bází. V těle se může vyskytovat také Z-DNA, která je oproti výše popsaným levotočivá. DNA se tvaruje ještě do vyšších terciárních struktur, tento proces se nazývá nadšroubovicové vinutí.^{42,44}

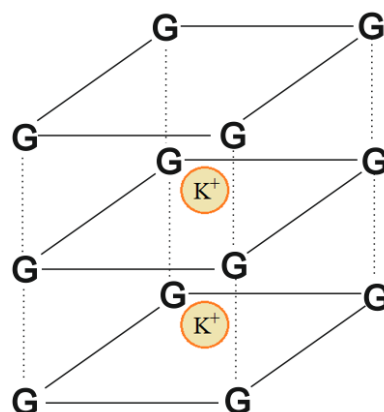
Mezi méně obvyklé struktury, které mohou vznikat pouze při specifických podmínkách, patří například G-kvadruplexy a i-motivy, které nazýváme nekanonické struktury.⁴²

2.1 G-kvadruplex

G-kvadruplex se tvoří na vláknech DNA s vysokým podílem guaninu. Každý G-kvadruplex je tvořen dvěma nebo více guaninovými tetradami (G-kvartet), které jsou naskládány nad sebou. G-kvartet tvoří čtyři guaniny, které jsou v planárním uspořádání. Každé dva sousední guaniny jsou vzájemně pootočený o 90° a spojují je dva Watson-Crick-Hoogsteenovy vodíkové můstky (Obrázek č. 10).^{13,42}



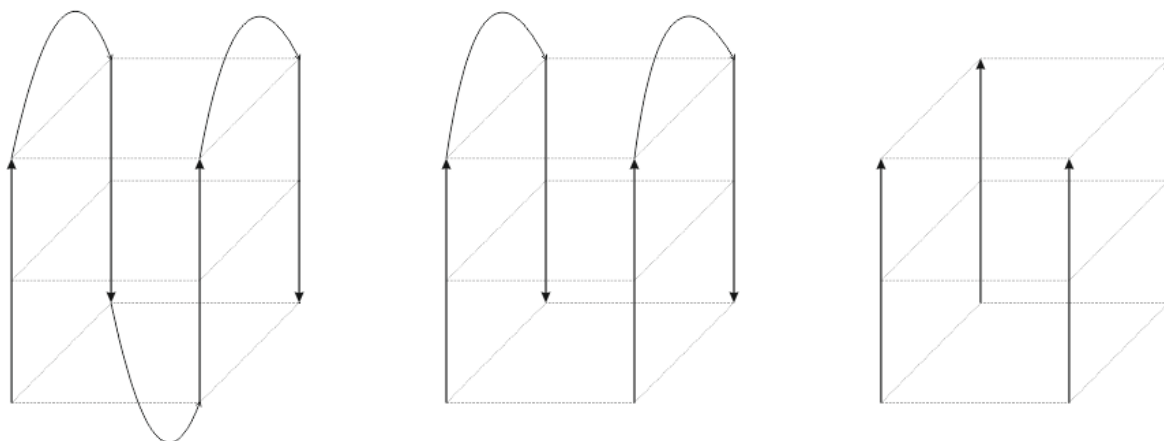
Obrázek č. 10 - G-kvartet⁴⁵



Obrázek č. 11 - Struktura G-kvadruplexu

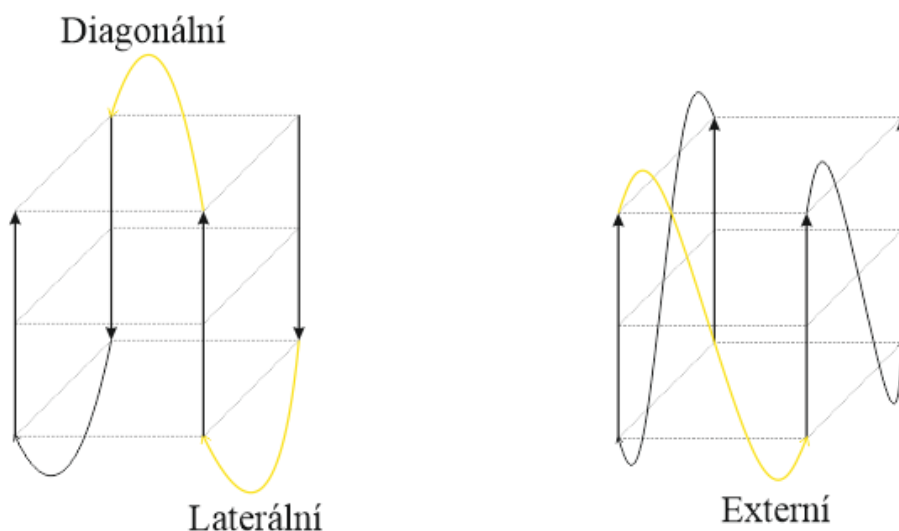
Stabilita G-kvadruplexu závisí na počtu G-kvartetů, kdy s rostoucím počtem roste také stabilita celé struktury. Vliv má také délka a složení smyček spojující jednotlivá vlákna.⁴⁶ Kromě samotné stavby G-kvadruplexu má velký vliv na stabilitu teplota a přítomnost Na^+ , K^+ a NH_4^+ iontů, které se obvykle nacházejí uvnitř samotné struktury. Menší sodné ionty se mohou vyskytovat v rovině G-kvartetu, větší draselné nebo amonné pouze mezi jednotlivými rovinami.^{42,46-48} Stabilitu mohou ovlivňovat také některé větší molekuly, jako například rostlinné alkaloidy a jejich deriváty.⁴⁹⁻⁵¹

Podle seskupení můžeme rozlišit více druhů G-kvadruplexů. V závislosti na tom, kolik různých molekul DNA ho tvoří, rozlišujeme, intramolekulární, bimolekulární a tetramolekulární G-kvadruplexy. V intramolekulární struktuře tedy najdeme tři smyčky spojující jednotlivá vlákna, v bimolekulární dvě a v tetramolekulární žádnou, protože každé vlákno pochází z jiné molekuly DNA (Obrázek č. 12).^{46,52}



Obrázek č. 12 - Struktura intramolekulárního, bimolekulárního a tetramolekulárního G-kvadruplexu

Rozlišujeme tři typy smyček. Smyčka externí spojuje sousední vlákna v paralelním uspořádání, laterální v antiparalelním a smyčka diagonální spojuje protilehlá vlákna také v antiparalelním uspořádání. Orientace vlákna se popisuje od konce 5' po konec 3'. Paralelní G-kvadruplexy mají všechna vlákna se stejnou orientací, zatímco antiparalelní mají alespoň jedno vlákno s opačnou (Obrázek č. 13).^{47,53}

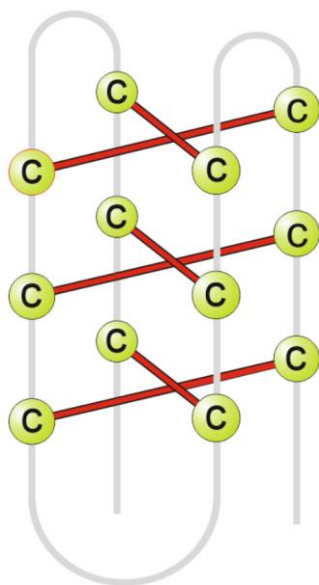


Obrázek č. 13 - Znázornění antiparalelního a paralelního G-kvadruplexu s popsanými smyčkami

G-kvadruplexy přítomné v živém organismu splňují několik funkcí. Jejich vysoká koncentrace na telomerách reguluje jejich délku a zároveň chrání jejich konce.⁵⁴⁻⁵⁶ Předpokládá se, že hrají také roli při přepínání typu imunoglobulinů.⁵⁷ Přítomnost G-kvadruplexů na vláknech DNA může ovlivňovat také běžné buněčné procesy, jakými jsou například transkripce nebo replikace. Při dostatečné stabilizaci G-kvadruplexu jsou tyto procesy výrazně omezeny, což vede k inhibici dělení genetické informace a s tím i souvisejícího buněčného dělení. Z tohoto důvodu jsou G-kvadruplexy terčem výzkumu při hledání nových protinádorových léčiv.^{14,58}

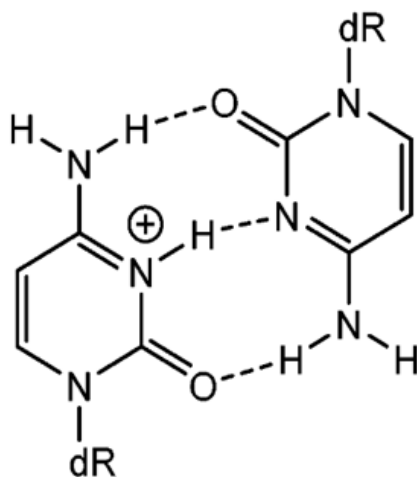
2.2 I-motiv

I-motivy se tvoří na sekvencích DNA bohatých na cytosin, vznikají tedy na vláknech komplementárních k G-kvadruplexům. Strukturu i-motivu tvoří dva paralelní duplexy, které jsou do sebe interkalovány antiparalelně. Jednotlivá vlákna jsou pospojována smyčkami, jejichž počet se odvíjí od typu i-motivu (intramolekulární, bimolekulární a tetramolekulární) stejně jako tomu je u G-kvadruplexů.^{42,59-61}



Obrázek č. 14 - Struktura i-motivu

Vazbu mezi cytosiny tvoří tři vodíkové můstky, k jejichž vzniku je potřeba, aby jeden z nich byl v protonované formě (Obrázek č. 15). To je důvod, proč je tvorba i-motivů vysoce závislá na přítomném pH. Struktura dokáže existovat pouze v kyselých podmínkách, jelikož kolem pH 6,2 - 6,5 se cytosin deprotonuje, zanikají vodíkové můstky a tím i celá struktura.^{61,62}



Obrázek č. 15 - Znázornění vazby mezi dvěma cytosiny

Krom pH má velký vliv na stabilitu i-motivu teplota, která také ovlivňuje vznik a zánik vodíkových můstků. Studie prokázaly, že stabilitu ovlivňují také smyčky, konkrétně jejich délka a nukleotidové složení. Brooks ve výzkumu z roku 2010 tvrdí, že s delší smyčkou roste také stabilita struktury.⁶³ Ovšem Gurung ve výzkumu z roku 2015 tento fakt vyvrací a říká, že i-motivy s kratší smyčkou jsou stabilnější.⁶⁴

Jelikož i-motivy potřebují k existenci kyselé podmínky, předpokládalo se, že nemohou existovat ve fyziologickém pH, a tak jim nebyla věnována taková pozornost jako G-kvadruplexům. Nedávné studie ovšem zjistily přítomnost i-motivů jak ve fyziologickém pH, tak v nádorových buňkách, ve kterých může pH klesnout až na hodnotu 6,2. V posledních letech se tedy staly atraktivním cílem výzkumu.^{60,65,66}

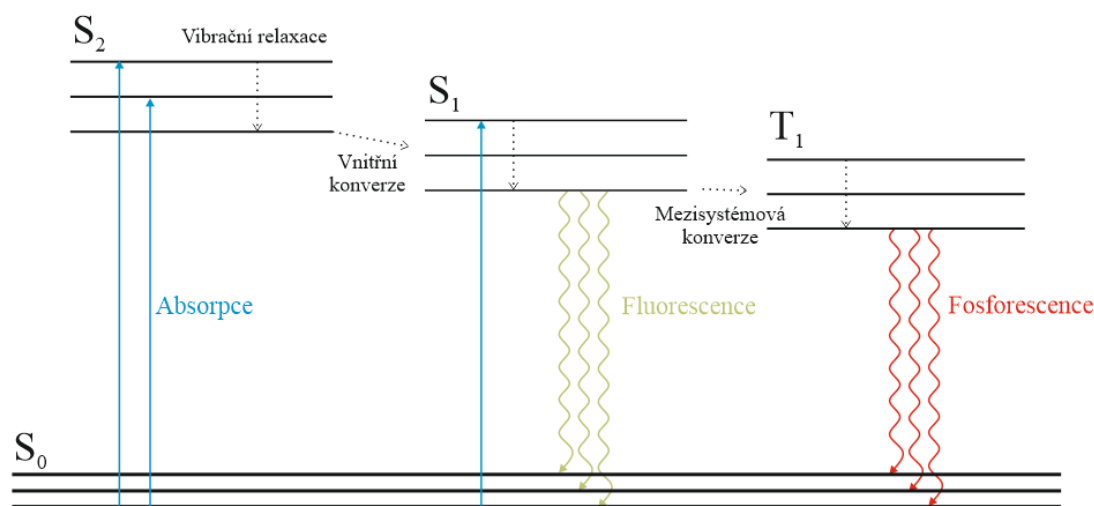
I-motiv stejně jako G-kvadruplex ovlivňuje funkci enzymů (helikáza, telomeráza) v živých organismech, což má vliv na replikaci či transkripci DNA. Předpokládá se, že i-motivy také ovlivňují regulaci a expresi genů.^{66,67}

3 Využité metody

3.1 Fluorescenční spektroskopie

Luminiscence je záření, které vzniká při zářivém přechodu elektronu z excitované hladiny do základní. Luminiscenční záření můžeme rozdělit na fluorescenci a fosforescenci. Fluorescence je přechod elektronu mezi singletovými stavy. Singletový stav je takový, kde má excitovaný i neexcitovaný elektron opačný spin. Excitovaný tak může sestoupit na nižší hladinu, aniž by byl porušen Pauliho vylučovací princip. Děje se tomu velice rychle, řádově 10^{-7} - 10^{-9} s. Fluorescence dostala název podle minerálu fluoritu, u kterého byl tento jev poprvé zpozorován.⁶⁸

Fosforescence je jev, při kterém přechází elektron z tripletového (metastabilního) stavu na základní hladinu. Takový elektron nemůže sestoupit ihned, jako tomu bylo u fluorescence, protože má stejný spin jako elektron v základní hladině a byl by tak porušen Pauliho vylučovací princip. Excitovaný elektron musí prvně změnit svůj spin a až poté může sestoupit, proto fosforescence trvá 10^{-3} - 10^3 s. Oba tyto jevy popisuje Jablonského diagram (Obrázek č. 16).⁶⁸



Obrázek č. 16 - Jablonského diagram

Ne všechny látky mohou fluoreskovat. Ty, které toho jsou schopné, nazýváme fluorofory. Fluorofory jsou látky, které bývají zpravidla planární a aromatické. Z tohoto důvodu je fluorescence pozorována především u organických látek. Prvním pozorovaným fluoroforem byl již v polovině 19. století chinin, který je obsažen například v toniku. Také další fluorofory lze potkat v běžném životě. Například fluoreskující látky v barvivech, fluorescein či rhodamin v nemrznoucích směsích nebo fosforeskující látky v signalizačních a reflexních nátěrech. Lze je využít také jako fluorescenční značky při značení molekul.⁶⁸

Podle způsobu excitace můžeme rozlišit více druhů luminiscence:⁶⁸

photoluminiscence - luminiscence vyvolání elektromagnetickým zářením

elektroluminiscence - luminiscence vyvolána průchodem proudem

chemiluminiscence - luminiscence vyvolána chemickou reakcí

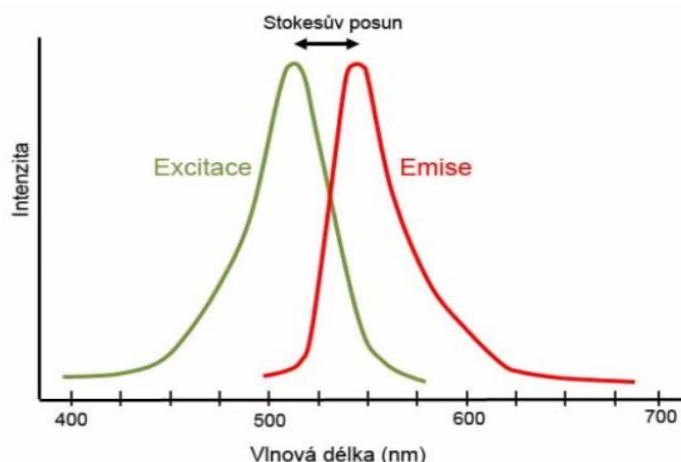
termoluminiscence - luminiscence vyvolána zvýšením teploty

triboluminiscence - luminiscence vyvolána mechanicky

radioluminiscence - luminiscence vyvolána ionizujícím zářením

Fluorofor charakterizují dvě spektra – excitační a emisní. Excitační spektrum je měřeno při konstantní emisní vlnové délce a udává, při jakých vlnových délkách je fluorofor excitován a zároveň která z nich je k excitaci nejúčinnější (vlnová délka maxima). Excitační spektrum je častokrát velice podobné absorpčnímu spektru. Emisní spektrum je měřeno při konstantní vlnové délce budícího záření a znázorňuje emitované vlnové délky s odpovídající intenzitou. Bývá zpravidla zrcadlovým obrazem excitačního spektra. Tyto spektra charakterizuje také

Stokesův posun, který udává rozdíl mezi vlnovou délkou maxima excitačního a emisního spektra.⁶⁸



Obrázek č. 17 - Excitační a emisní spektrum

Každý fluorofofor má odpovídající kvantový výtěžek (φ), který udává, s jakou pravděpodobností bude absorbovaný foton opět vyzařen. Může nabývat hodnot 0-1 a lze ho vypočítat jako poměr emitovaných fotonů ku absorbovaným. Čím vyšší má fluorofofor kvantový výtěžek, tím je účinnější. Jedním z nejúčinnějších je například fluorescein, jehož kvantový výtěžek se blíží jedné.⁶⁸

$$\varphi = \frac{N_{em}}{N_{abs}} \quad (1)$$

Fluorofofor může být charakterizován také dobou života fluorescence, která udává střední hodnotu, jak dlouho se elektron nachází v excitovaném stavu. Tento jev se využívá v metodě časově rozlišené fluorescence, která zobrazuje pokles intenzity fluorescence v čase.

$$I_t = I_0 e^{-t/\tau} \quad (2)$$

I_t - Intenzita fluorescence v čase t

I_0 - Intenzita fluorescence v čase 0

τ - Střední doba života fluorescence

Intenzitu fluorescence lze vyhodnotit také pomocí Bouguer-Lambert-Beerova zákona.

$$I_F = k \cdot I_0 \cdot (1 - 10^{-\varepsilon \cdot b \cdot c}) \quad (3)$$

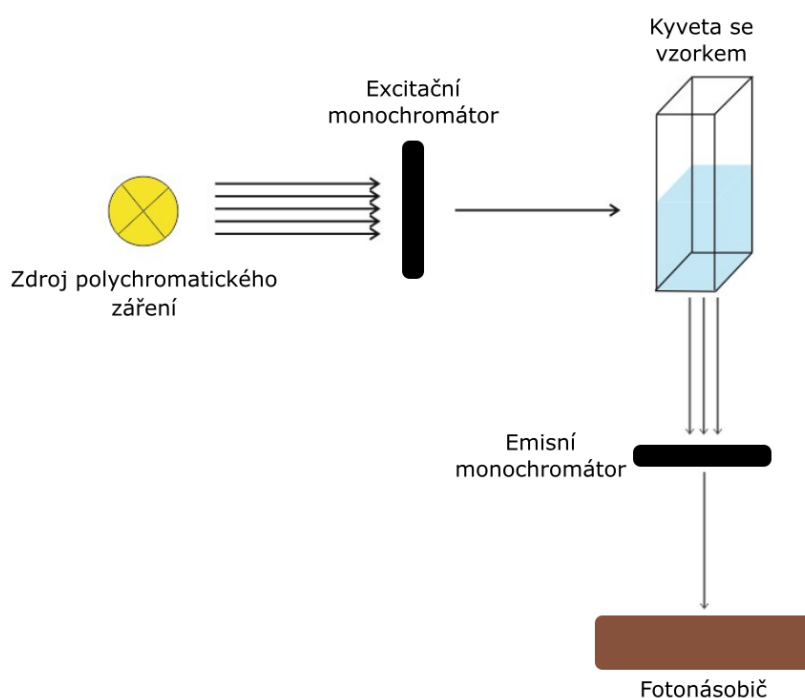
I_F - Intenzita fluorescence

k - Konstanta zahrnující podmínky měření

I_0 - Intenzita budícího záření

Instrumentace

Přístroje sloužící k měření fluorescence se nazývají spektrofluorimetry. Obsahují zdroj záření, ze kterého putuje polychromatické světlo na excitační monochromátor. Excitační záření dopadá na vzorek v kyvetě a fluorescence je pozorována pod úhlem 90° . Fluorescenční záření putuje přes emisní monochromátor na fotonásobič, kde se násobí jeho intenzita a je zaznamenáván signál.

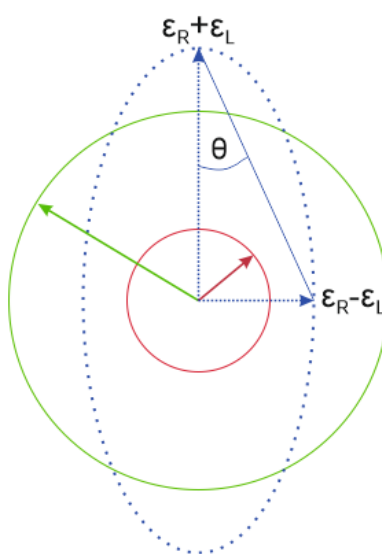


Obrázek č. 18 - Schéma spektrofluorimetru

3.2 Cirkulární dichroismus (CD)

Některé molekuly mohou obsahovat chirální centra, což jsou atomy, v případě organických molekul uhlíky, na které jsou v tetraedrickém uspořádání navázány čtyři různé substituenty. Substituenty mohou být poskládány na chirálním atomu v uspořádání R nebo S, což z nich dělá opticky aktivní molekuly. Tyto molekuly nazýváme enantiomery a jsou si navzájem zrcadlovým obrazem. Chirální molekuly stáčí rovinu polarizovaného světla, což se využívá při získávání strukturních vlastností organických molekul.⁶⁹

Elektromagnetické záření je příčné vlnění složené z magnetické a elektrické složky. Magnetickou složku popisuje vektor magnetické indukce a elektrickou složku vektor elektrického pole. Tyto vektory jsou navzájem kolmé a kmitají kolmo na směr šíření vlny. Běžné elektromagnetické záření kmitá ve všech směrech, proto se v CD spektroskopii využívá polarizátorů, které propustí pouze záření kmitající v jedné rovině – polarizované světlo. To se dá rozložit na kruhově polarizované složky – pravotočivou a levotočivou. V případě, že jsou obě tyto složky absorbovány stejně, jedná se o rovinně polarizované světlo. Ovšem opticky aktivní molekuly mohou absorbovat tyto složky rozdílně a získáváme tak elipticky polarizované světlo.^{69,70}



Obrázek č. 19 - Vznik elipticky polarizovaného světla

CD spektroskopie využívá rozdílné absorpce pravotočivé a levotočivé složky polarizovaného záření. Tento rozdíl se dá vyjádřit jako rozdíl molárních absorpčních koeficientů.

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_R - \varepsilon_L = \frac{(A_R - A_L)}{b \cdot c} \quad [dm^3 \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}] \quad (4)$$

Nejčastěji se CD signál vyjadřuje v jednotkách elipticity (θ), kterou lze vypočítat jako tangentu hlavní a vedlejší poloosy elipsy. Tyto poloosy vyjadřují součet a rozdíl molárních absorpčních koeficientů.⁷⁰

$$\theta = \frac{\varepsilon_R - \varepsilon_L}{\varepsilon_R + \varepsilon_L} \quad [mdeg] \quad (5)$$

Tento vztah jde pro výpočetní účely zjednodušit na tvar:

$$\theta = 32,98 \cdot \Delta A \quad [mdeg] \quad (6)$$

CD spektroskopie se využívá společně s NMR spektroskopií a RTG krystalografií ke studiu struktury molekul. Jelikož opticky neaktivní molekuly neposkytují CD signál, využívá se také ke studiu interakce molekul a zkoumání termodynamických vlastností biomolekul.

Instrumentace

CD spektrometry jsou vybaveny zdrojem polychromatického záření. To putuje přes monochromátor a polarizátor ke vzorku v kyvetě. Kyvetový prostor je vybaven termostatem a magnetickým mícháním. Pravotočivá i levotočivá složka světla je zaznamenávána na fotonásobiči.

Experimentální část

4 Použité přístroje

CD spektrometr J-815, JASCO, Japonsko

- kontinuální xenonová výbojka (450 W)
- detektor: fotonásobič
- mřížkový monochromátor
- prostor pro kyvetu s termostatem a magnetickým mícháním
- rozsah vlnových délek 163-1100 nm
- rychlost snímání 1-10000 nm·min⁻¹

Spektrofluorimetr Aminco Bowman Series 2, model FA-357, Thermo Spectronic, USA

- kontinuální (150 W) a záblesková (7 W) xenonová výbojka
- detektor: fotonásobič
- 2 mřížkové monochromátory
- rozsah vlnových délek 220-850 nm
- rychlost snímání 3-6000 nm·min⁻¹

5 Použité chemikálie

Oligonukleotidy:

- DL40 (5'-GGTTTTGGCAGGGTTTTGGT-3'), HPLC čistota, Thermo Fisher Scientific, USA
- GG1 (5'-GGGCGGGCGCGAGGGAGGGT-3'), HPLC čistota, Thermo Fisher Scientific, USA
- nmyc01 (5'-ACCCCCTGCATCTGCATGCCCCCTCCCACCCCCT-3'), HPLC čistota, Thermo Fisher Scientific, USA
- nmyc01m (5'-ACCCCCTGCATCTTTTTGCCCCCTCCCACCCCCT-3'), HPLC čistota, Thermo Fisher Scientific, USA
- 22nt (5'-CCCTAACCCTAACCCTAACCCT-3'), HPLC čistota, Thermo Fisher Scientific, USA

Alkaloidy:

- Escholidin ($C_{20}H_{18}NO_4^+$), Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno
- Kolumbamin chlorid ($C_{20}H_{20}ClNO_4^+$), Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno
- Fagaronin ($C_{21}H_{20}NO_4^+$), Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno

Ostatní chemikálie:

- Chlorid draselný (KCl), p.a., Lach-ner, s.r.o., Česká republika
- Hydrogenfosforečnan draselný (K_2HPO_4), p.a., Lach-ner, s.r.o., Česká republika
- Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4), p.a., Lach-ner, s.r.o., Česká republika
- Kyselina chlorovodíková (HCl), p.a., Lach-ner, s.r.o., Česká republika
- Trihydrát octanu sodného ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$), p.a., Lach-ner, s.r.o., Česká republika
- Kyselina octová (CH_3COOH), p.a., Lach-ner, s.r.o., Česká republika

6 Metodika

6.1 Příprava roztoků

Roztok escholidinu

Ve fosfátovém pufru s přidavkem 10% methanolu bylo rozpuštěno 7,7 mg escholidinu. Roztok byl kvantitativně převeden do odměrné baňky a doplněn po rysku. Výsledná koncentrace escholidinu byla $7 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Roztok kolumbaminu

Ve vodě bylo rozpuštěno takové množství kolumbamin chloridu, že jeho výsledná koncentrace byla $1,4 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Roztok fagaroninu

V 10 ml methanolu bylo rozpuštěno 1,08 mg fagaroninu. Výsledná koncentrace byla $3,11 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Fosfátový pufr pH 7

Ve vodě bylo rozpuštěno 1,1582 g K_2HPO_4 , 0,6460 g KH_2PO_4 a 0,7634 KCl. Pomocí HCl bylo upraveno pH na 7 a roztok byl kvantitativně převeden do 50 ml odměrné baňky a doplněn po rysku.

Acetátový pufr pH 5

Ve vodě bylo rozpuštěno 1,3580 g $CH_3COONa \cdot 3H_2O$. Pomocí CH_3COOH bylo upraveno pH na 5 a roztok byl kvantitativně převeden do 50 ml odměrné baňky a doplněn po rysku.

Roztoky oligonukleotidů

Oligonukleotidy byly rozpuštěny ve vodě. Jejich výsledné koncentrace byly:

$$c_{DL40} = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$$

$$c_{GG1} = 2,39 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$$

$$c_{nmyc01} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$$

$$c_{nmyc01m} = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$$

$$c_{22nt} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$$

6.2 Postup měření

6.2.1 Teplota tání oligonukleotidů

K určení teploty tání oligonukleotidů bylo využito metody cirkulárního dichroismu. Struktury G-kvadruplexů (DL40, GG1) byly připraveny ve vodě s přidavkem fosfátového pufru o pH 7 tak, aby výsledná koncentrace draselných iontů byla $0,005 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Výsledná koncentrace oligonukleotidu byla $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a alkaloidu $8 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Vzorek byl připraven do výsledného objemu 2 ml.

Struktury i-motivů (nmyc01, nmyc01m, 22nt) byly připraveny v acetátovém pufru o koncentraci $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ do celkového objemu 2 ml. Koncentrace alkaloidu byla opět $8 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Všechny vzorky byly před samotným měřením zahřáty na 95°C a poté ponechány k samovolnému ochlazení, aby byla zajištěna přítomnost dostatečného množství pozorované struktury.

Vzorek byl převeden do křemenné kyvety a vložen do CD spektrometru. Kyvetový prostor je vybaven termostatem a magnetickým míchadlem. Do kyvety byl přes víčko zaveden teploměr, který zaznamenával reálnou teplotu vzorku během měření.

Jako první bylo naměřeno CD spektrum oligonukleotidu při 20 °C, aby byla potvrzena přítomnost pozorované struktury a zároveň k určení vlnové délky, při které CD signál dosahuje maximální intenzity. Poté byl CD spektrometr nastaven na zjištěnou vlnovou délku a oligonukleotid byl proměřen mezi 15-95 °C. Nárůst teploty byl nastaven na 1 °C/min, přičemž CD signál byl zaznamenán každých 0,2 °C. Stejně měření bylo provedeno také opačným směrem, kdy nebyl vzorek zahříván, ale chlazen, aby byl vyloučen vliv hystereze. Pro každý čistý oligonukleotid byla provedena nejméně dvě taková měření, pro komplex s alkaloidem nejméně šest měření.

Každé měření poskytlo esovitou křivku závislosti CD signálu na teplotě při odpovídající vlnové délce (261 nm pro paralelní G-kvadruplex, 291 nm pro antiparalelní G-kvadruplex a 287 nm pro i-motiv). Esovité křivky byly v programu Matlab proloženy přímkami v základních liniích a pomocí funkce Fraction, vytvořené Dr. Gargallem, byly vypočteny termodynamické parametry.^{71,72} Z těchto hodnot byla pomocí vzorce 7 vypočtena teplota tání daného oligonukleotidu. Teplota tání oligonukleotidu je teplota, při níž zaniklo právě 50 % sledované struktury. Tato teplota odpovídá inflexnímu bodu esovité křivky.

$$T_m = \frac{\Delta H^\circ}{\Delta S^\circ} \quad [K] \quad (7)$$

6.2.2 Stanovení stechiometrie komplexu DNA:ligand a asociační konstanty

Do kyvety bylo připraveno 600 µl roztoku alkaloidu (escholidin o koncentraci $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, fagaronin $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Roztok také obsahoval KCl o koncentraci $0,005 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a pufr o koncentraci $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (fosfátový pufr o pH 7 pro struktury G-kvadruplexu, acetátový pufr o pH 5 pro struktury i-motivu).

Ve vialce byl připraven roztok oligonukleotidu o takové koncentraci, aby po posledním přidavku tohoto roztoku do kyvety byla koncentrace oligonukleotidu přibližně stejná jako koncentrace alkaloidu. Roztok oligonukleotidu také obsahoval alkaloid, KCl i pufr o stejné koncentraci jako v roztoku alkaloidu, aby se neměnila jejich koncentrace v kyvetě.

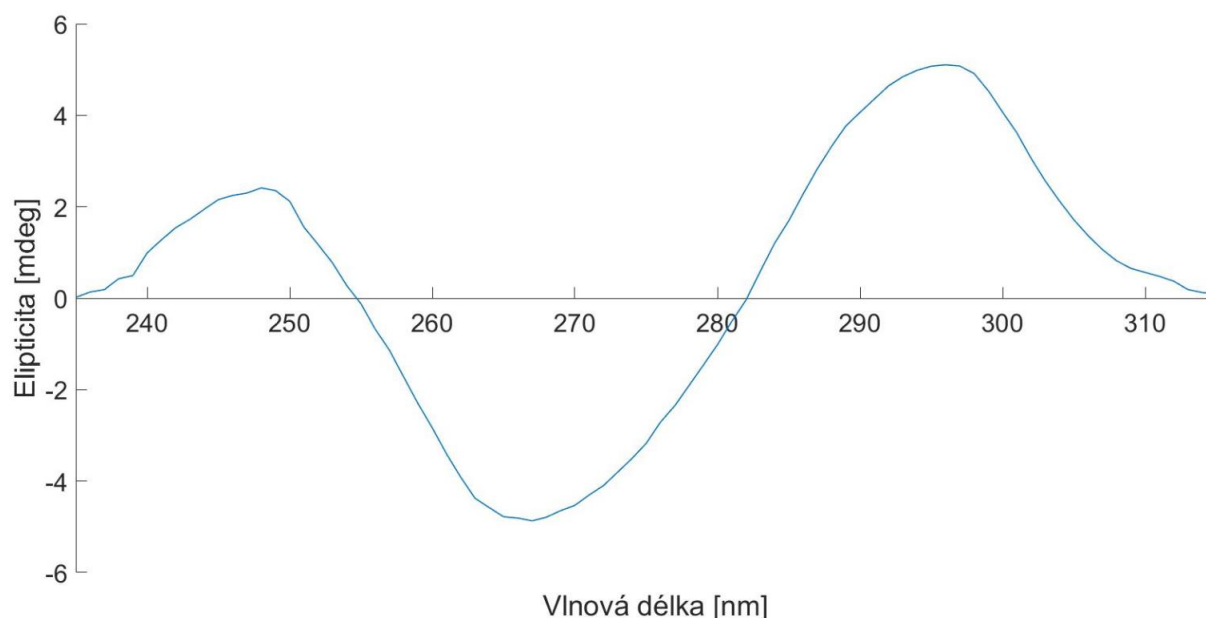
Jako první bylo změřeno fluorescenční spektrum čistého roztoku alkaloidu. Poté byl roztok alkaloidu titrován roztokem oligonukleotidu a po každém přidavku bylo změřeno fluorescenční spektrum.

Všechna spektra byla převedena do programu Matlab, kde byly pomocí funkce `equispec` proloženy křivkami odpovídajícím jednotlivým stechiometrickým poměrům. Metodou nejmenších čtverců bylo vybráno nejlepší proložení a tím byl určen stechiometrický poměr komplexu DNA:ligand. Funkce vypočítala také asociační konstantu.

7 Stanovení teploty tání oligonukleotidů

7.1 Oligonukleotid DL40

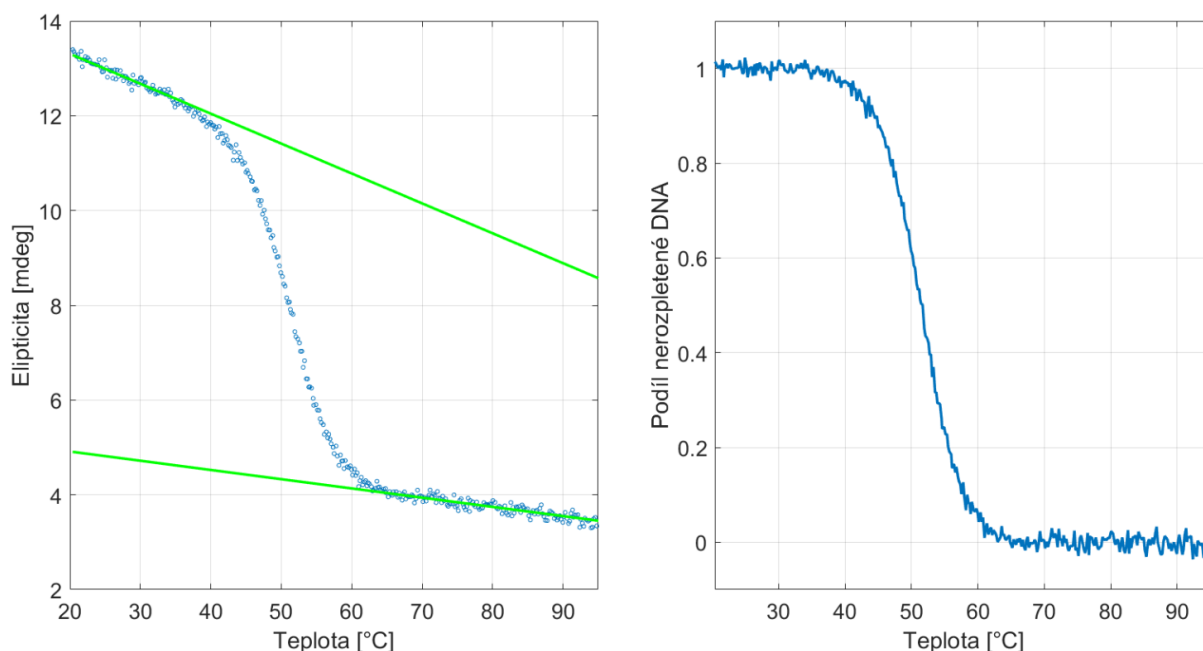
Oligonukleotid DL40 tvoří strukturu antiparalelního G-kvadruplexu, který je složen ze dvou G-kvartetů. Jeho CD spektrum tvoří kladný pík okolo 295 nm, záporný pík okolo 265 nm a menší kladný pík okolo 245 nm. Pro výpočet teploty tání byly zaznamenávány hodnoty elipticity při 291 nm.



Graf č. 1 - CD spektrum DL40 při 20 °C

Hodnoty elipticity v závislosti na teplotě byly v programu Matlab proloženy přímkami v základních liniích. Funkcí `Fraction` byly vypočteny termodynamické parametry křivky

a z nich byla vypočtena teplota tání dané sktruktury. Dále byla vykreslena esovitá křivka tání, která znázorňuje podíl nerozpletené DNA v závislosti na teplotě.



Graf č. 2 a 3 - Naměřená křivka proložena přímkami v základních liniích a esovitá křivka tání sledované struktury

Teplota tání čistého DL40 byla změřena dvakrát.

Chyba měření je uváděna jako směrodatná odchylka (s).

Teploty v tabulkách jsou uváděny ve °C.

T_{m1}	T_{m2}	$\tilde{T}_m$	s
28,1	29,4	28,8	0,9

Tabulka č. 1 - Teplota tání pro čistý DL40

Interakce oligonukleotidu DL40 s alkaloidem escholidinem

Teplota tání oligonukleotidu DL40 s escholidinem byla změřena šestkrát.

T_{m1}	T_{m2}	T_{m3}	T_{m4}	T_{m5}	T_{m6}	$\tilde{T}_m$	s	ΔT_m
32,7	34,0	35,3	34,1	33,7	33,9	34,0	0,8	5,2

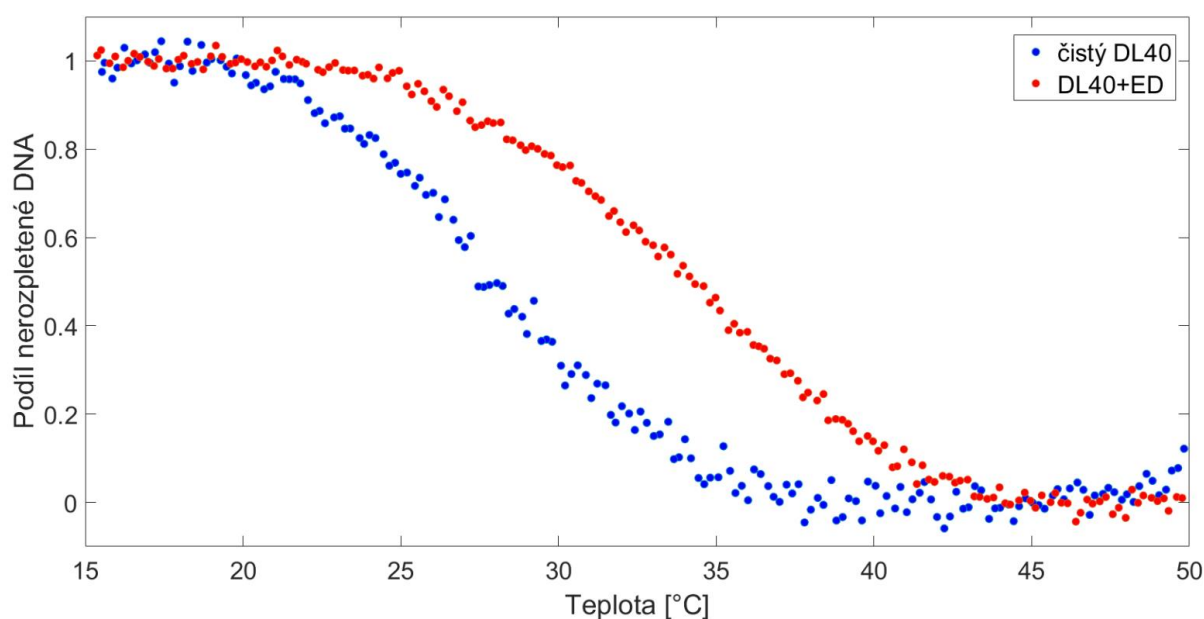
Tabulka č. 2 - Naměřené teploty tání pro komplex DL40 + ED

Pomocí vzorce 8 byl u každého měření vypočten počet stupňů volnosti, abychom získali kritickou hodnotu t-testu. Tato hodnota byla porovnána s výslednou hodnotou t-testu (vzorec 9). Tento test slouží k porovnání dvou výsledků.

$$v = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{1}{n_1-1}\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2 + \frac{1}{n_2-1}\left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2} \quad (8)$$

$$t = \frac{|\tilde{x}_1 - \tilde{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} = \frac{|28,8 - 34,0|}{\sqrt{\frac{0,9^2}{2} + \frac{0,8^2}{6}}} = 7,72 > t_{krit,2} = 4,30 \quad (9)$$

Teplota tání komplexu DL40 + escholidin je o 5,2 °C vyšší než teplota tání čistého DL40. T-test test prokázal, že tato změna je statisticky významná a escholidin tak stabilizuje strukturu antiparalelního G-kvadruplexu tvořeného oligonukleotidem DL40.



Graf č. 4- Porovnání esovitých křivek tání čistého DL40 a komplexu DL40 + ED (měření 2)

Interakce oligonukleotidu DL40 s alkaloidem kolumbaminem

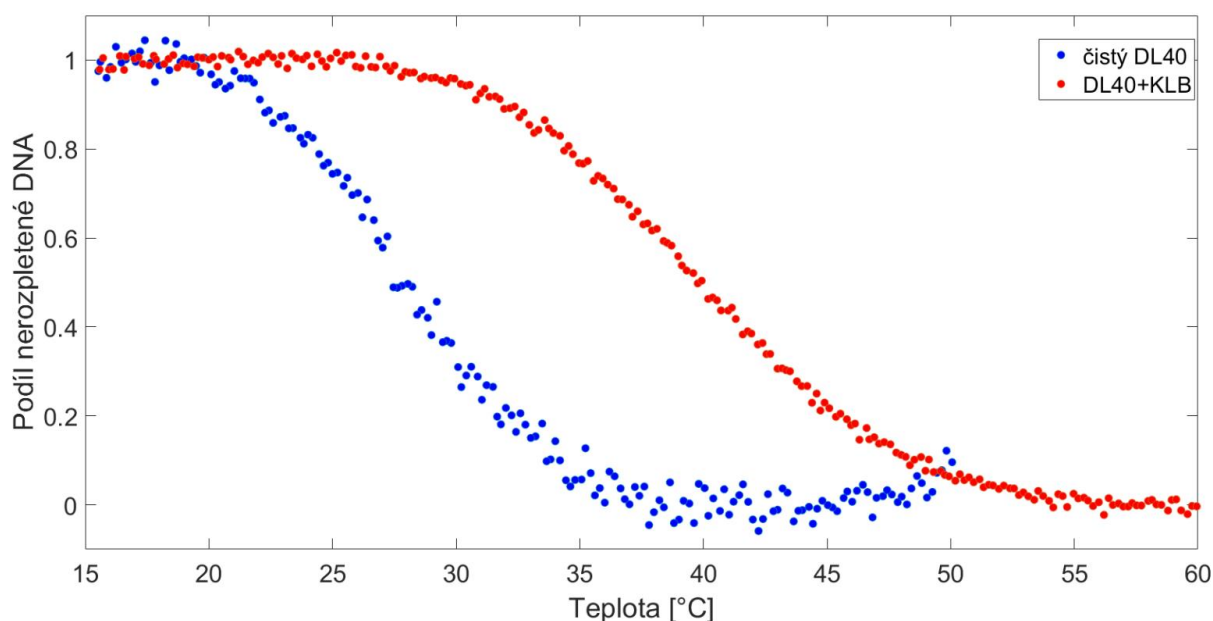
Teplota tání oligonukleotidu DL40 s kolumbaminem byla změřena šestkrát.

T_{m1}	T_{m2}	T_{m3}	T_{m4}	T_{m5}	T_{m6}	$\tilde{T}_m$	s	ΔT_m
40,1	40,2	40,1	38,9	39,0	39,9	39,7	0,6	10,9

Tabulka č. 3 - Naměřené teploty tání pro komplex DL40 + KLB

$$t = \frac{|\tilde{x}_1 - \tilde{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} = \frac{|28,8 - 39,7|}{\sqrt{\frac{0,9^2}{2} + \frac{0,6^2}{6}}} = 15,98 > t_{krit,1} = 12,71$$

Teplota tání komplexu DL40 + kolumbamin je o 10,9 °C vyšší než teplota tání čistého DL40. T-test test dokázal, že tato změna je statisticky významná a kolumbamin tak stabilizuje strukturu antiparalelního G-kvadruplexu tvořeného oligonukleotidem DL40.



Graf č. 5- Porovnání esovitých křivek tání čistého DL40 a komplexu DL40 + KLB (měření 6)

Interakce oligonukleotidu DL40 s alkaloidem fagaroninem

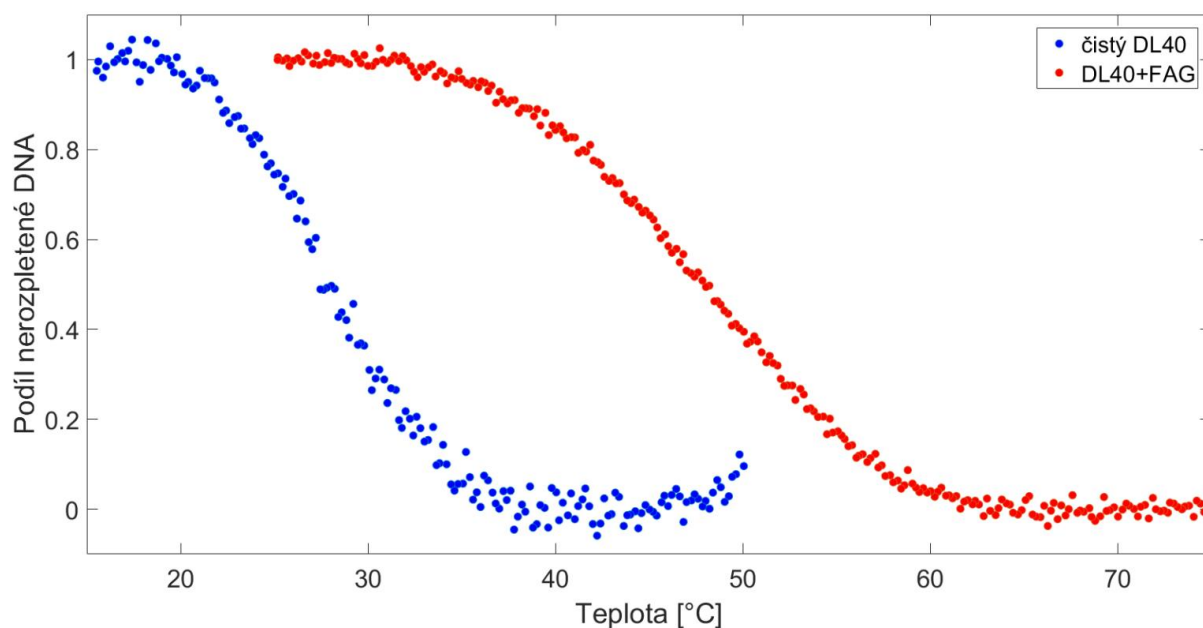
Teplota tání oligonukleotidu DL40 s fagaroninem byla změřena šestkrát.

T_{m1}	T_{m2}	T_{m3}	T_{m4}	T_{m5}	T_{m6}	$\bar{T}_m$	s	ΔT_m
47,2	48,5	47,8	48,5	47,5	46,9	47,7	0,7	18,9

Tabulka č. 4 - Naměřené teploty tání pro komplex DL40 + FAG

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} = \frac{|28,8 - 47,7|}{\sqrt{\frac{0,9^2}{2} + \frac{0,7^2}{6}}} = 27,09 > t_{krit,1} = 12,71$$

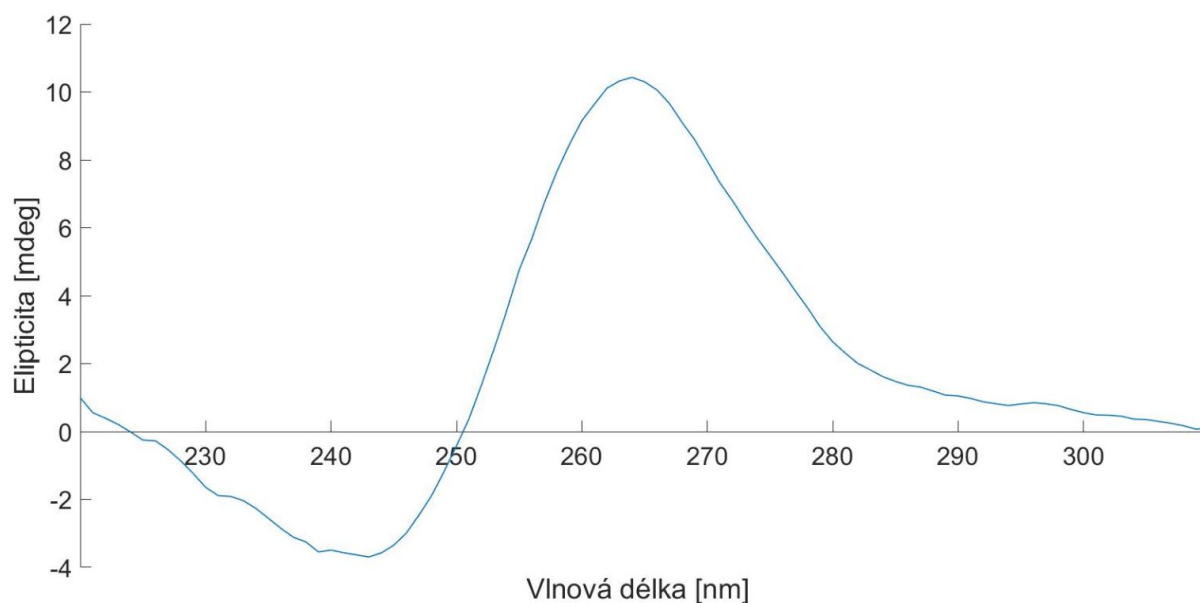
Teplota tání komplexu DL40 + fagaronin je o 18,9 °C vyšší než teplota tání čistého DL40. T-test dokázal, že tato změna je statisticky významná a fagaronin tak stabilizuje strukturu antiparalelního G-kvadruplexu tvořeného oligonukleotidem DL40.



Graf č. 6- Porovnání esovitých křivek tání čistého DL40 a komplexu DL40 + FAG (měření 3)

7.2 Oligonukleotid GG1

Oligonukleotid GG1 tvoří strukturu paralelního G-kvadruplexu, který je složen ze tří G-kvartetů. Jeho CD spektrum tvoří kladný pík okolo 265 nm a menší záporný pík okolo 240-245 nm. Pro výpočet teploty tání byly zaznamenávány hodnoty elipticity při 261 nm.



Graf č. 7- CD spektrum GG1 při 20 °C

Teplota tání čistého GG1 byla změřena třikrát.

T_{m1}	T_{m2}	T_{m3}	$\tilde{T}_m$	s
47,6	48,3	48,4	48,1	0,4

Tabulka č. 5 - Teplota tání pro čistý GG1

Interakce oligonukleotidu GG1 s alkaloidem escholidinem

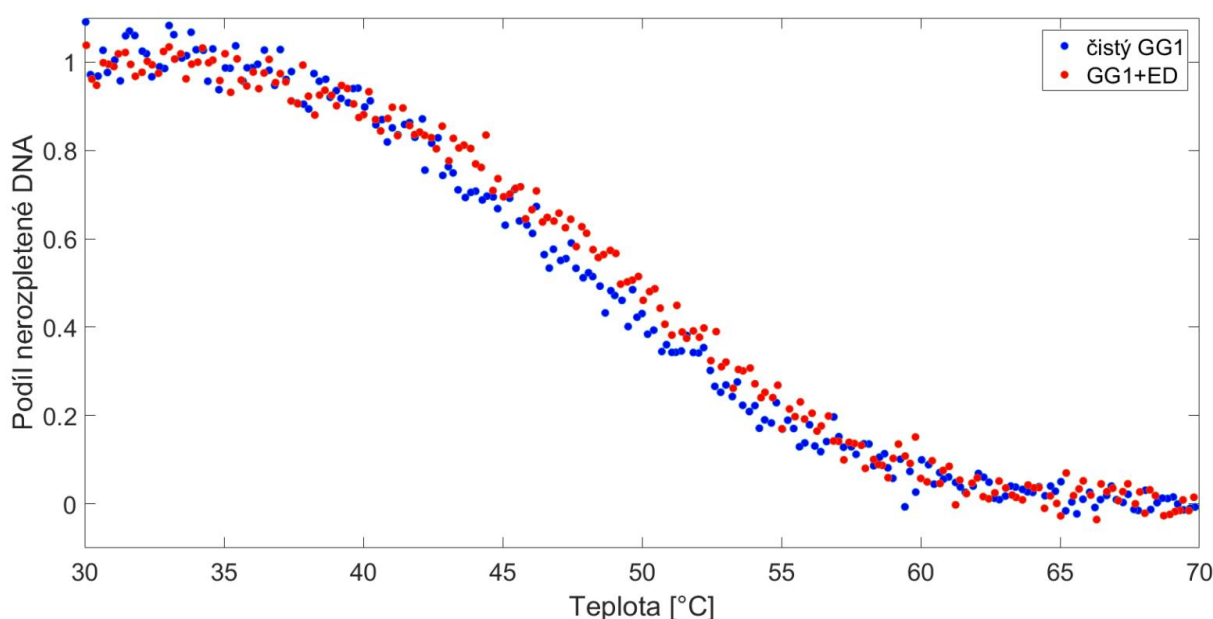
Teplota tání oligonukleotidu GG1 s escholidinem byla změřena šestkrát.

T_{m1}	T_{m2}	T_{m3}	T_{m4}	T_{m5}	T_{m6}	$\tilde{T}_m$	s	ΔT_m
49,6	48,9	50,4	49,3	50,4	50,4	49,8	0,6	1,7

Tabulka č. 6 - Naměřené teploty tání pro komplex GG1 + ED

$$t = \frac{|\tilde{x}_1 - \tilde{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} = \frac{|48,1 - 49,8|}{\sqrt{\frac{0,4^2}{3} + \frac{0,6^2}{6}}} = 5,05 > t_{krit,6} = 2,45$$

Teplota tání komplexu GG1 + escholidin je o 1,7 °C vyšší než teplota tání čistého GG1. T-test dokázal, že tato změna je statisticky významná a escholidin tak stabilizuje strukturu paralelního G-kvadruplexu tvořeného oligonukleotidem GG1.



Graf č. 8 - Porovnání esovitých křivek tání čistého GG1 a komplexu GG1 + ED (měření 1)

Interakce oligonukleotidu GG1 s alkaloidem kolumbaminem

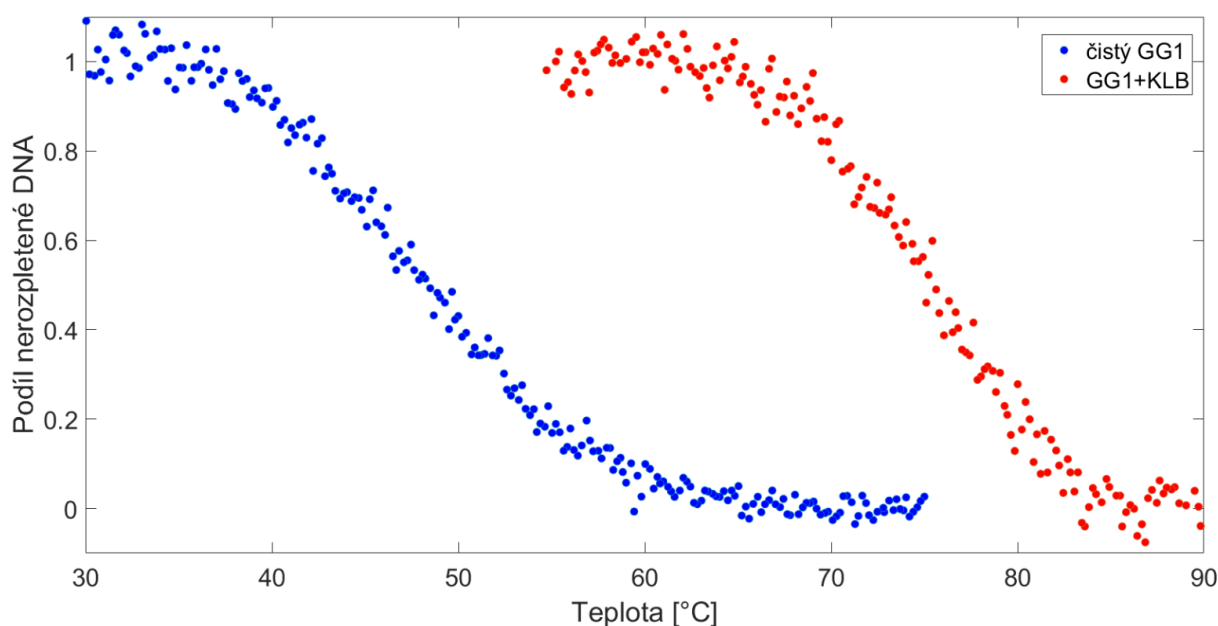
Teplota tání oligonukleotidu GG1 s kolumbaminem byla změřena šestkrát.

T_{m1}	T_{m2}	T_{m3}	T_{m4}	T_{m5}	T_{m6}	$\hat{T}_m$	s	ΔT_m
77,8	74,3	76,6	74,6	75,3	74,9	75,6	1,4	27,5

Tabulka č. 7 - Naměřené teploty tání pro komplex GG1 + KLB

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} = \frac{|48,1 - 75,6|}{\sqrt{\frac{0,4^2}{3} + \frac{1,4^2}{6}}} = 44,61 > t_{krit,6} = 2,45$$

Teplota tání komplexu GG1 + kolumbamin je o 27,5 °C vyšší než teplota tání čistého GG1. T-test dokázal, že tato změna je statisticky významná a kolumbamin tak stabilizuje strukturu paralelního G-kvadruplexu tvořeného oligonukleotidem GG1.



Graf č. 9 - Porovnání esovitých křivek tání čistého GG1 a komplexu GG1 + KLB (měření 5)

Interakce oligonukleotidu GG1 s alkaloidem fagaroninem

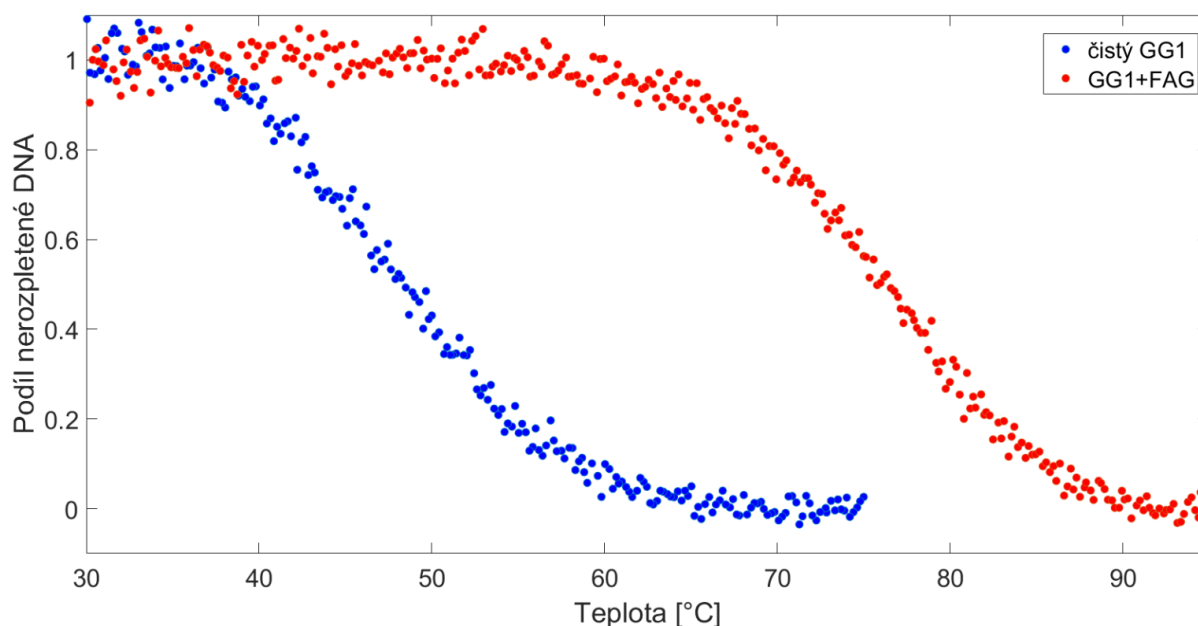
Teplota tání oligonukleotidu GG1 s fagaroninem byla změřena šestkrát.

T_{m1}	T_{m2}	T_{m3}	T_{m4}	T_{m5}	T_{m6}	$\tilde{T}_m$	s	ΔT_m
76,8	76,0	76,2	78,5	75,3	75,2	76,3	1,2	28,2

Tabulka č. 8 - Naměřené teploty tání pro komplex GG1 + FAG

$$t = \frac{|\tilde{x}_1 - \tilde{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} = \frac{|48,1 - 76,3|}{\sqrt{\frac{0,4^2}{3} + \frac{1,2^2}{6}}} = 52,07 > t_{krit,7} = 2,37$$

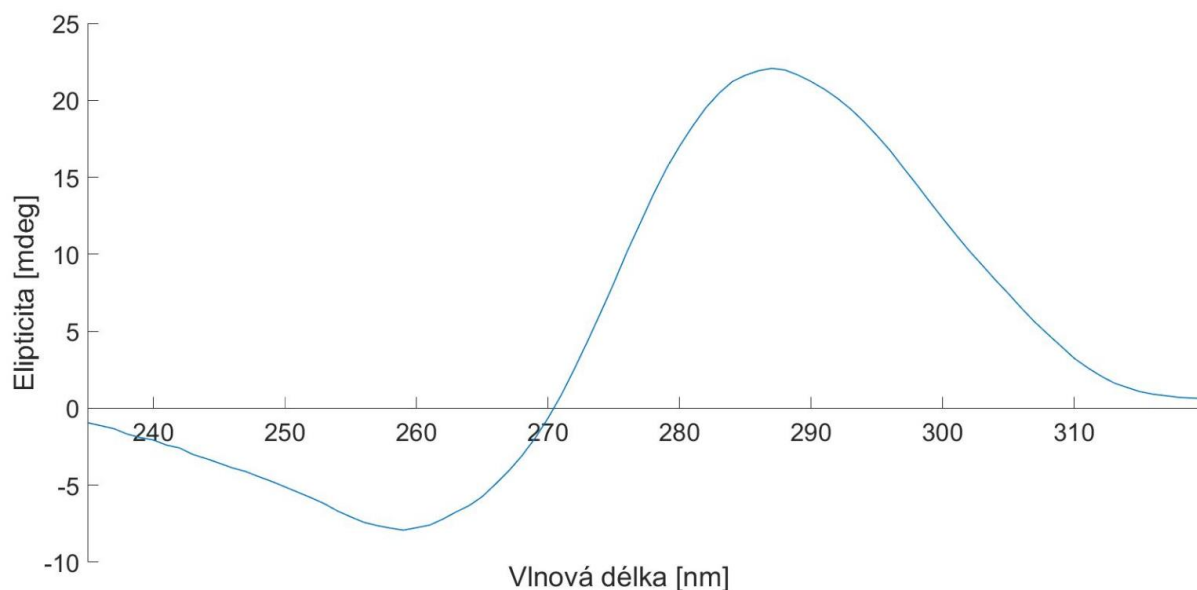
Teplota tání komplexu GG1 + fagaronin je o 28,2 °C vyšší než teplota tání čistého GG1. T-test dokázal, že tato změna je statisticky významná a fagaronin tak stabilizuje strukturu paralelního G-kvadruplexu tvořeného oligonukleotidem GG1.



Graf č. 10 - Porovnání esovitých křivek tání čistého GG1 a komplexu GG1 + FAG (měření 2)

7.3 Oligonukleotid nmyc01

Oligonukleotid nmyc01 tvoří strukturu i-motivu. Jeho CD spektrum tvoří kladný pík okolo 285-290 nm a menší záporný pík okolo 260 nm. Pro výpočet teploty tání byly zaznamenávány hodnoty elipticity při 287 nm.



Graf č. 11 - CD spektrum nmyc01 při 20 °C

Teplota tání čistého nmyc01 byla změřena dvakrát.

T_{m1}	T_{m2}	$\tilde{T}_m$	s
58,4	57,8	58,1	0,4

Tabulka č. 9 - Teplota tání pro čistý nmyc01

Interakce oligonukleotidu nmyc01 s alkaloidem escholidinem

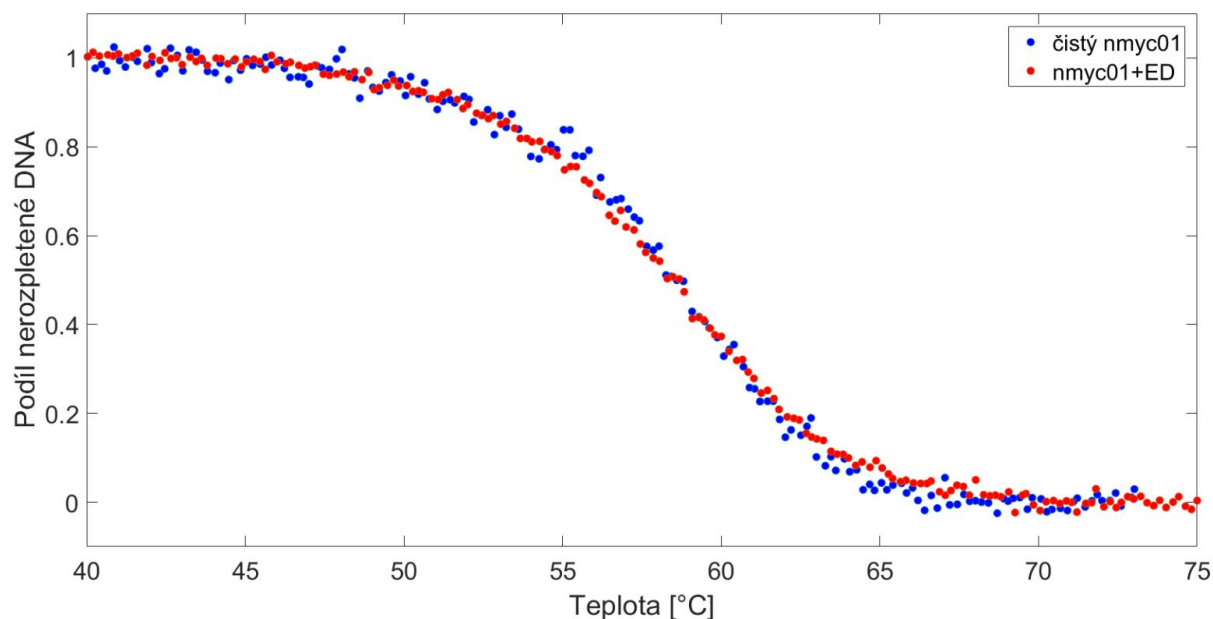
Teplota tání oligonukleotidu nmyc01 s escholidinem byla změřena osmkrát.

T_{m1}	T_{m2}	T_{m3}	T_{m4}	T_{m5}	T_{m6}	T_{m7}	T_{m8}	$\tilde{T}_m$	s	ΔT_m
57,7	55,8	57,4	55,3	58,6	59,6	58,3	59,7	57,8	1,6	-0,3

Tabulka č. 10 - Naměřené teploty tání pro komplex nmyc01 + ED

$$t = \frac{|\tilde{x}_1 - \tilde{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} = \frac{|58,1 - 57,8|}{\sqrt{\frac{0,4^2}{2} + \frac{1,6^2}{8}}} = 0,47 < t_{krit,8} = 2,31$$

Teplota tání komplexu nmyc01 + escholidin je o 0,3 °C nižší než teplota tání čistého nmyc01. T-test dokázal, že tato změna je statisticky nevýznamná a escholidin tak nemá vliv na stabilitu struktury i-motivu tvořeného oligonukleotidem nmyc01.



Graf č. 12 - Porovnání esovitých křivek tání čistého nmyc01 a komplexu nmyc01 + ED (měření 7)

Interakce oligonukleotidu nmyc01 s alkaloidem kolumbaminem

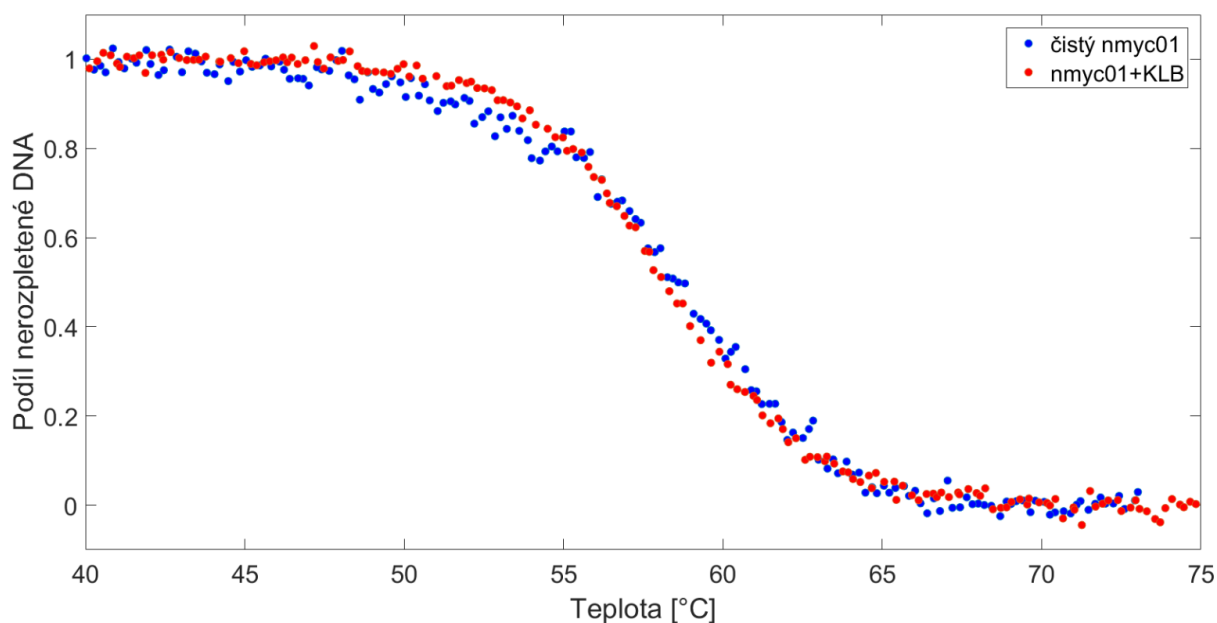
Teplota tání oligonukleotidu nmyc01 s kolumbaminem byla změřena šestkrát.

T_{m1}	T_{m2}	T_{m3}	T_{m4}	T_{m5}	T_{m6}	$\tilde{T}_m$	s	ΔT_m
59,0	58,3	58,0	58,6	57,8	58,3	58,3	0,4	0,2

Tabulka č. 11 - Naměřené teploty tání pro komplex nmyc01 + KLB

$$t = \frac{|\tilde{x}_1 - \tilde{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} = \frac{|58,1 - 58,3|}{\sqrt{\frac{0,4^2}{2} + \frac{0,4^2}{6}}} = 0,61 < t_{krit,2} = 4,30$$

Teplota tání komplexu nmyc01 + kolumbamin je o 0,2 °C vyšší než teplota tání čistého nmyc01. T-test dokázal, že tato změna je statisticky nevýznamná a kolumbamin tak nemá vliv na stabilitu struktury i-motivu tvořeného oligonukleotidem nmyc01.



Graf č. 13 - Porovnání esovitých křivek tání čistého nmyc01 a komplexu nmyc01 + KLB (měření 2)

Interakce oligonukleotidu nmyc01 s alkaloidem fagaroninem

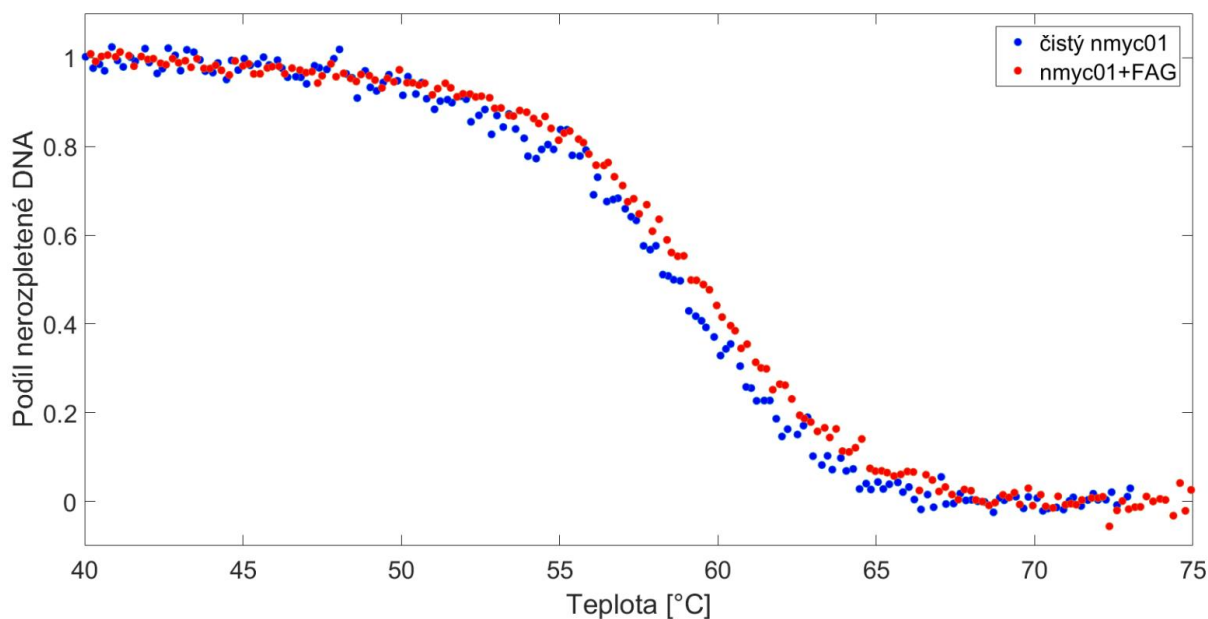
Teplota tání oligonukleotidu nmyc01 s fagaroninem byla změřena šestkrát.

T_{m1}	T_{m2}	T_{m3}	T_{m4}	T_{m5}	T_{m6}	$\tilde{T}_m$	s	ΔT_m
60,2	59,2	58,1	58,7	58,6	60,1	59,1	0,8	1,0

Tabulka č. 12 - Naměřené teploty tání pro komplex nmyc01 + FAG

$$t = \frac{|\tilde{x}_1 - \tilde{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} = \frac{|58,1 - 59,1|}{\sqrt{\frac{0,4^2}{2} + \frac{0,8^2}{6}}} = 2,31 < t_{krit,4} = 2,78$$

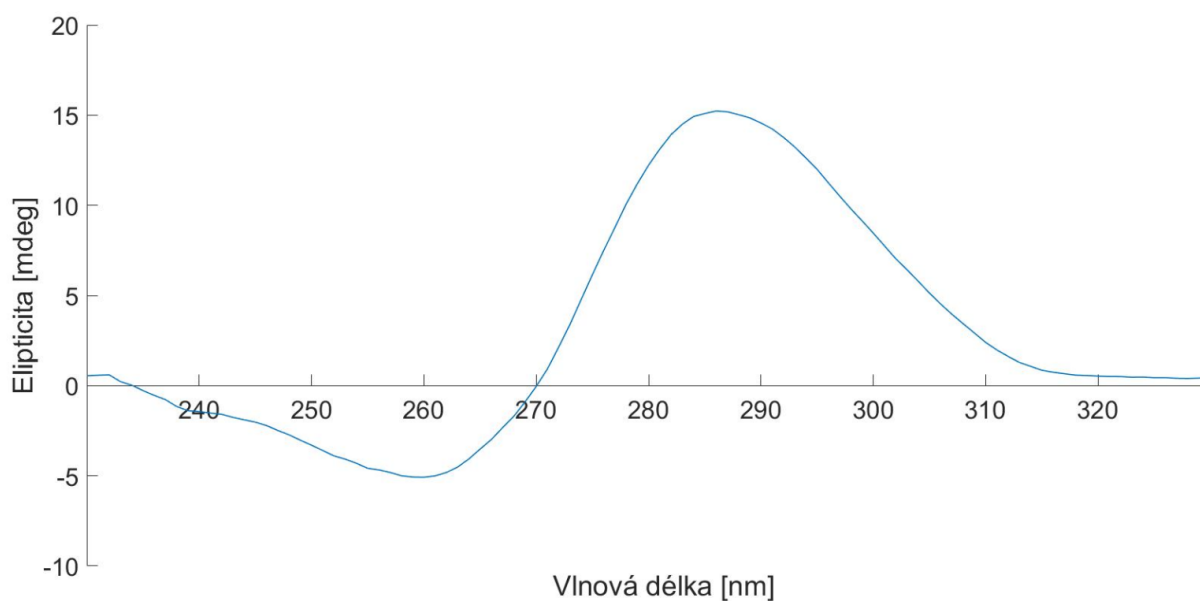
Teplota tání komplexu nmyc01 + fagaronin je o 1,0 °C vyšší než teplota tání čistého nmyc01. T-test dokázal, že tato změna je statisticky nevýznamná a fagaronin tak nemá vliv na stabilitu struktury i-motivu tvořeného oligonukleotidem nmyc01.



Graf č. 14 - Porovnání esovitých křivek tání čistého nmyc01 a komplexu nmyc01 + FAG (měření 2)

7.4 Oligonukleotid nmyc01m

Oligonukleotid nmyc01m tvoří strukturu i-motivu. Od oligonukleotidu nmyc01 se liší stavbou smyčky. Zatímco smyčka nmyc01 má složení GCAT, nmyc01m je mutovaný a jeho smyčka má složení TTTT. Jeho CD spektrum tvoří kladný pík okolo 285-290 nm a menší záporný pík okolo 260 nm. Pro výpočet teploty tání byly zaznamenávány hodnoty elipticity při 287 nm.



Graf č. 15 - CD spektrum nmyc01m při 20 °C

Teplota tání čistého nmyc01m byla změřena čtyřikrát.

T_{m1}	T_{m2}	T_{m3}	T_{m4}	$\tilde{T}_m$	s
55,2	54,8	56,5	56,5	55,8	0,9

Tabulka č. 13 - Teplota tání pro čistý nmyc01m

Interakce oligonukleotidu nmyc01m s alkaloidem escholidinem

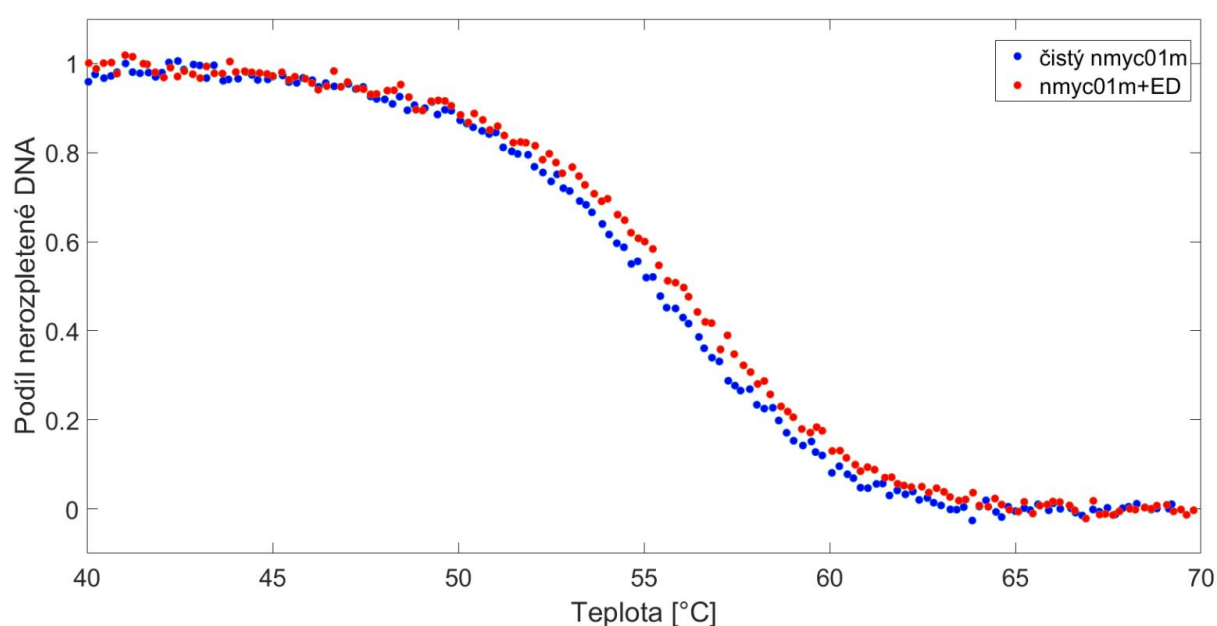
Teplota tání oligonukleotidu nmyc01m s escholidinem byla změřena šestkrát.

T_{m1}	T_{m2}	T_{m3}	T_{m4}	T_{m5}	T_{m6}	$\tilde{T}_m$	s	ΔT_m
55,5	53,9	54,7	54,3	55,8	56,8	55,2	1,1	-0,6

Tabulka č. 14 - Naměřené teploty tání pro komplex nmyc01m + ED

$$t = \frac{|\tilde{x}_1 - \tilde{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} = \frac{|55,8 - 55,2|}{\sqrt{\frac{0,9^2}{4} + \frac{1,1^2}{6}}} = 0,94 < t_{krit,7} = 2,37$$

Teplota tání komplexu nmyc01m + escholidin je o 0,6 °C nižší než teplota tání čistého nmyc01m. T-test dokázal, že tato změna je statisticky nevýznamná a escholidin tak nemá vliv na stabilitu struktury i-motivu tvořeného oligonukleotidem nmyc01m.



Graf č. 16 - Porovnání esovitých křivek tání čistého nmyc01m a komplexu nmyc01m + ED (měření 5)

Interakce oligonukleotidu nmyc01m s alkaloidem kolumbaminem

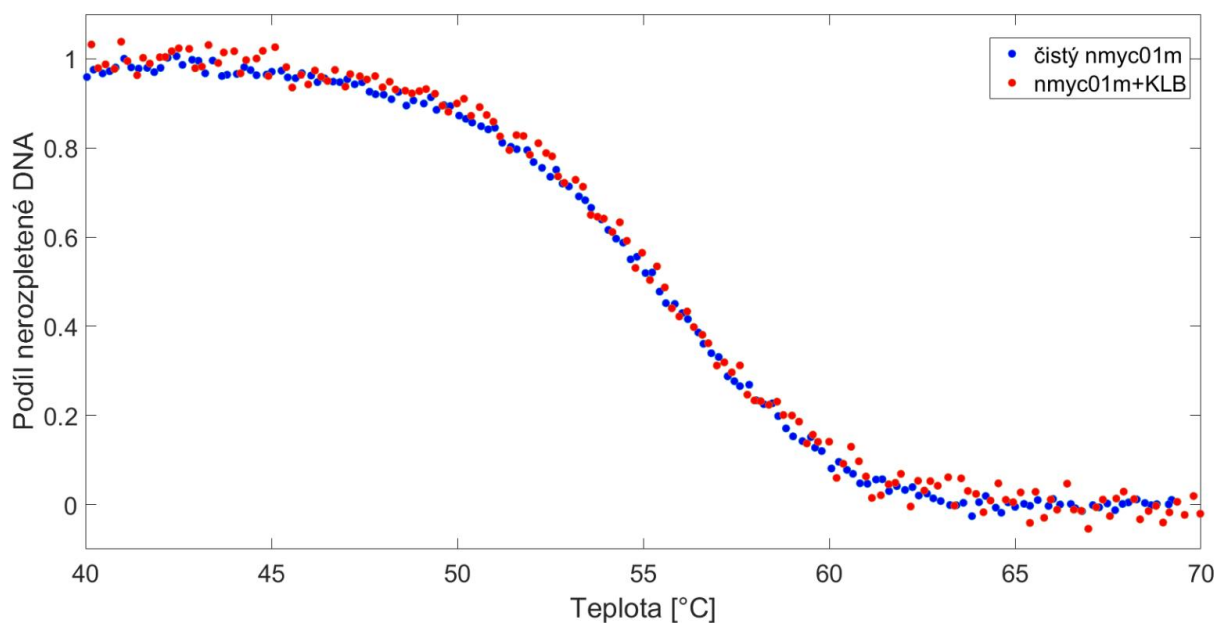
Teplota tání oligonukleotidu nmyc01m s kolumbaminem byla změřena šestkrát.

T_{m1}	T_{m2}	T_{m3}	T_{m4}	T_{m5}	T_{m6}	$\tilde{T}_m$	s	ΔT_m
54,9	55,0	54,8	55,4	54,6	55,1	55,0	0,3	-0,8

Tabulka č. 15 - Naměřené teploty tání pro komplex nmyc01m + KLB

$$t = \frac{|\tilde{x}_1 - \tilde{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} = \frac{|55,8 - 55,0|}{\sqrt{\frac{0,9^2}{4} + \frac{0,3^2}{6}}} = 1,72 < t_{krit,1} = 12,71$$

Teplota tání komplexu nmyc01m + kolumbamin je o 0,8 °C nižší než teplota tání čistého nmyc01m. T-test dokázal, že tato změna je statisticky nevýznamná a kolumbamin tak nemá vliv na stabilitu struktury i-motivu tvořeného oligonukleotidem nmyc01m.



Graf č. 17 - Porovnání esovitých křivek tání čistého nmyc01m a komplexu nmyc01m + KLB (měření 2)

Interakce oligonukleotidu nmyc01m s alkaloidem fagaroninem

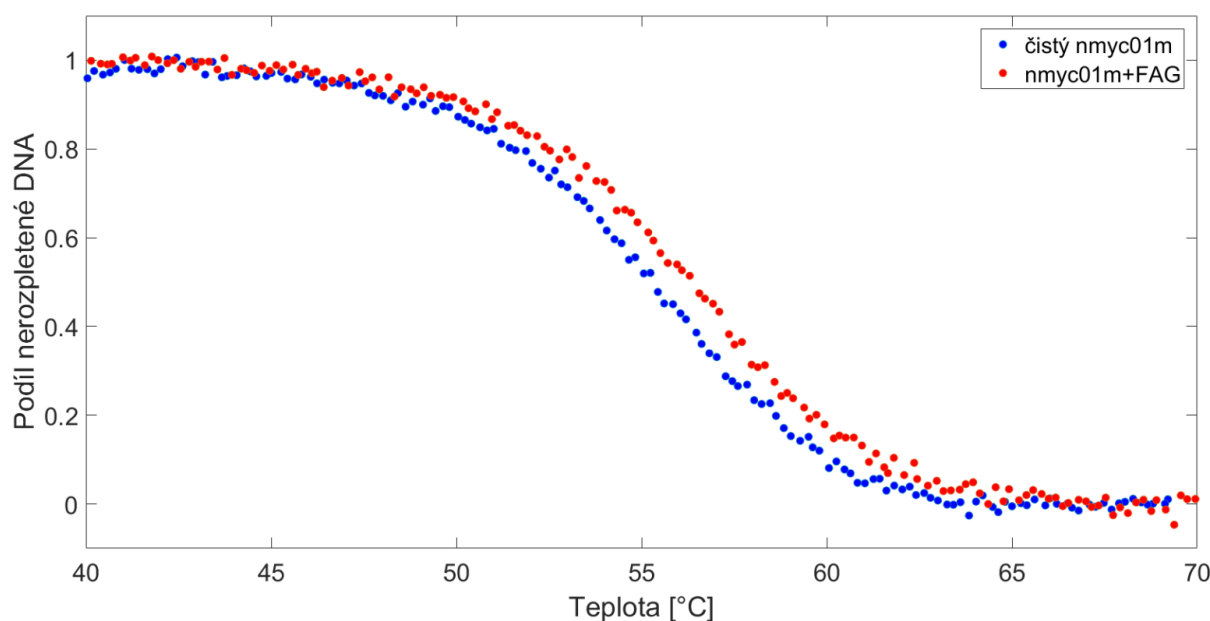
Teplota tání oligonukleotidu nmyc01m s fagaroninem byla změřena šestkrát.

T_{m1}	T_{m2}	T_{m3}	T_{m4}	T_{m5}	T_{m6}	$\tilde{T}_m$	s	ΔT_m
56,8	56,4	55,4	56,2	56,0	55,8	56,1	0,5	0,3

Tabulka č. 16 - Naměřené teploty tání pro komplex nmyc01m + FAG

$$t = \frac{|\tilde{x}_1 - \tilde{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} = \frac{|55,8 - 56,1|}{\sqrt{\frac{0,9^2}{4} + \frac{0,5^2}{6}}} = 0,61 < t_{krit,4} = 2,78$$

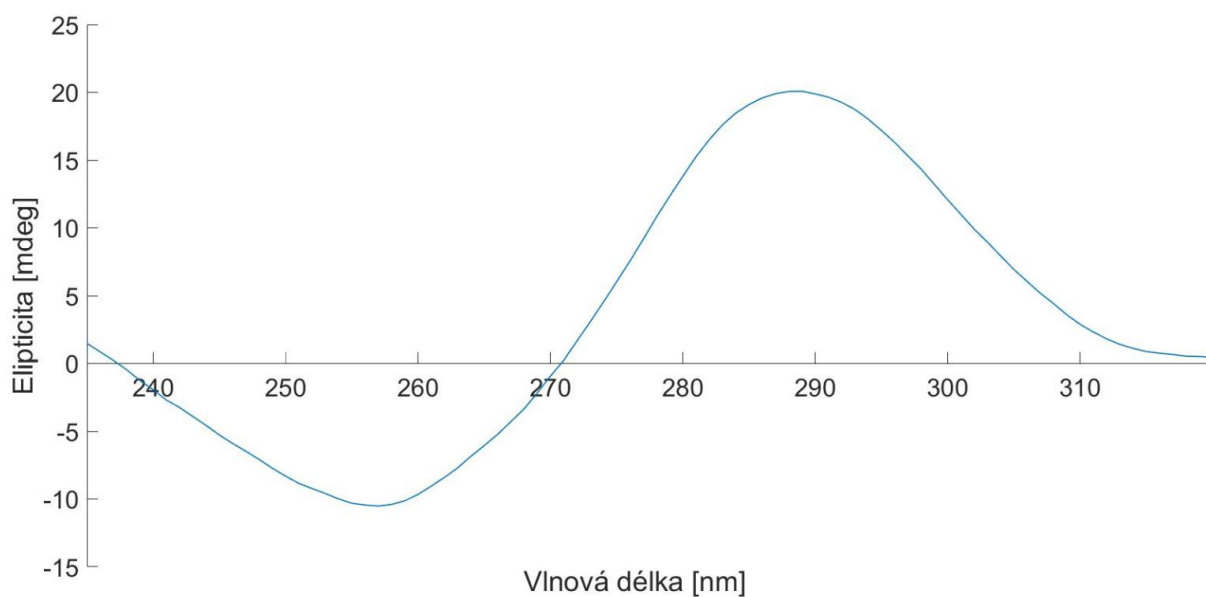
Teplota tání komplexu nmyc01m + fagaronin je o 0,3 °C vyšší než teplota tání čistého nmyc01m. T-test dokázal, že tato změna je statisticky nevýznamná a fagaronin tak nemá vliv na stabilitu struktury i-motivu tvořeného oligonukleotidem nmyc01m.



Graf č. 18 - Porovnání esovitých křivek tání čistého nmyc01m a komplexu nmyc01m + FAG (měření 4)

7.5 Oligonukleotid 22nt

Oligonukleotid 22nt tvoří strukturu i-motivu. Jeho CD spektrum tvoří kladný pík okolo 285-290 nm a menší záporný pík okolo 260 nm. Pro výpočet teploty tání byly zaznamenávány hodnoty elipticity při 287 nm.



Graf č. 19 - CD spektrum 22nt při 20 °C

Teplota tání čistého 22nt byla změřena dvakrát.

T_{m1}	T_{m2}	$\tilde{T}_m$	s
51,5	51,4	51,5	0,1

Tabulka č. 17 - Teplota tání pro čistý 22nt

Interakce oligonukleotidu 22nt s alkaloidem escholidinem

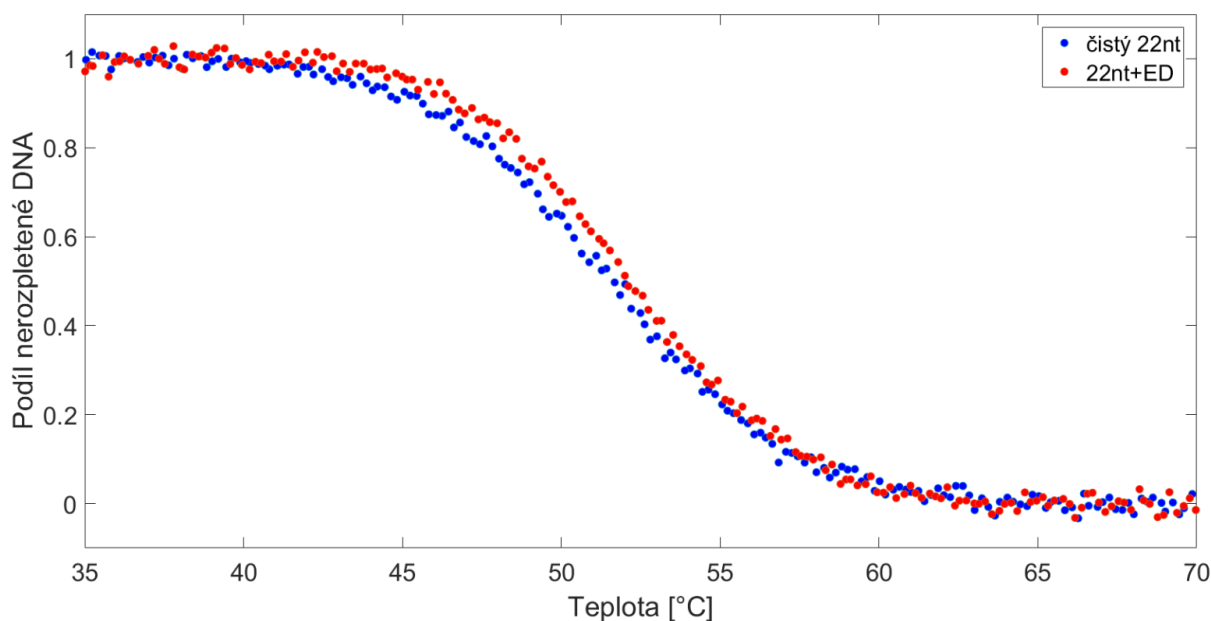
Teplota tání oligonukleotidu 22nt s escholidinem byla změřena šestkrát.

T_{m1}	T_{m2}	T_{m3}	T_{m4}	T_{m5}	T_{m6}	$\tilde{T}_m$	s	ΔT_m
52,5	52,2	51,3	52,7	52,1	52,4	52,2	0,5	0,7

Tabulka č. 18 - Naměřené teploty tání pro komplex 22nt + ED

$$t = \frac{|\tilde{x}_1 - \tilde{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} = \frac{|51,5 - 52,2|}{\sqrt{\frac{0,1^2}{2} + \frac{0,5^2}{6}}} = 3,24 > t_{krit,6} = 2,45$$

Teplota tání komplexu 22nt + escholidin je o 0,7 °C vyšší než teplota tání čistého 22nt. T-test dokázal, že tato změna je statisticky významná a escholidin tak stabilizuje strukturu i-motivu tvořeného oligonukleotidem 22nt.



Graf č. 20 - Porovnání esovitých křivek tání čistého 22nt a komplexu 22nt + ED (měření 2)

Interakce oligonukleotidu 22nt s alkaloidem kolumbaminem

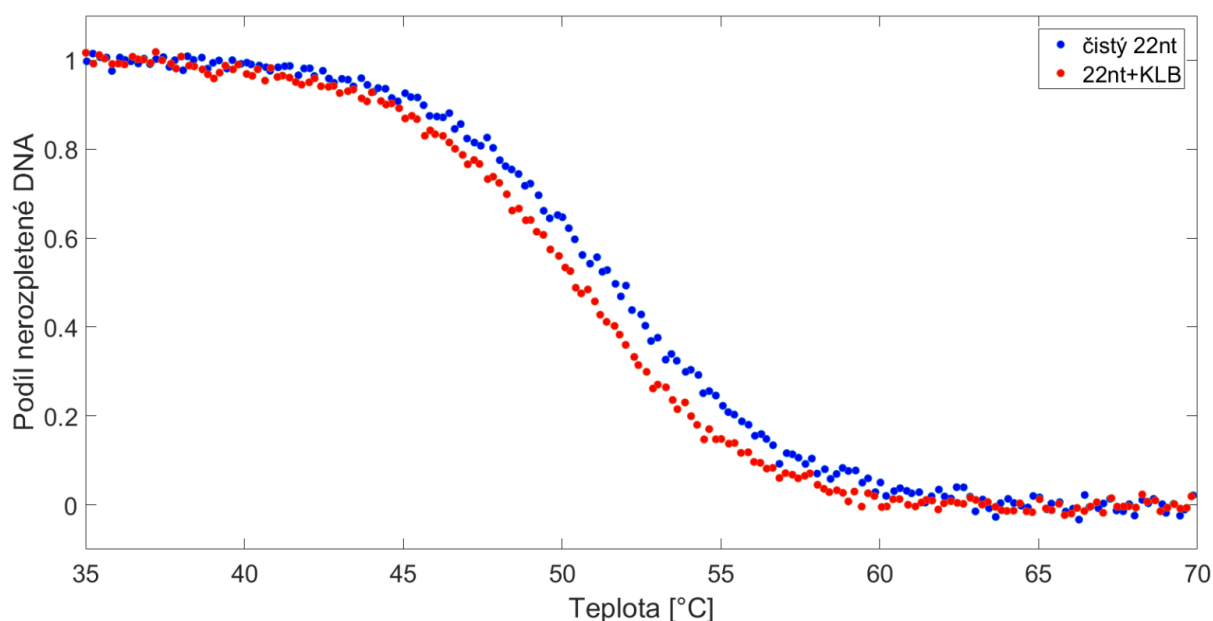
Teplota tání oligonukleotidu 22nt s kolumbaminem byla změřena šestkrát.

T _{m1}	T _{m2}	T _{m3}	T _{m4}	T _{m5}	T _{m6}	$\bar{T}_m$	s	ΔT_m
51,4	50,2	50,4	50,1	50,6	50,2	50,5	0,5	-1,0

Tabulka č. 19 - Naměřené teploty tání pro komplex 22nt + KLB

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} = \frac{|51,5 - 50,5|}{\sqrt{\frac{0,1^2}{2} + \frac{0,5^2}{6}}} = 4,63 > t_{krit,6} = 2,45$$

Teplota tání komplexu 22nt + kolumbamin je o 1,0 °C nižší než teplota tání čistého 22nt. T-test dokázal, že tato změna je statisticky významná a kolumbamin tak destabilizuje strukturu i-motivu tvořeného oligonukleotidem 22nt.



Graf č. 21 - Porovnání esovitých křivek tání čistého 22nt a komplexu 22nt + KLB (měření 3)

Interakce oligonukleotidu 22nt s alkaloidem fagaroninem

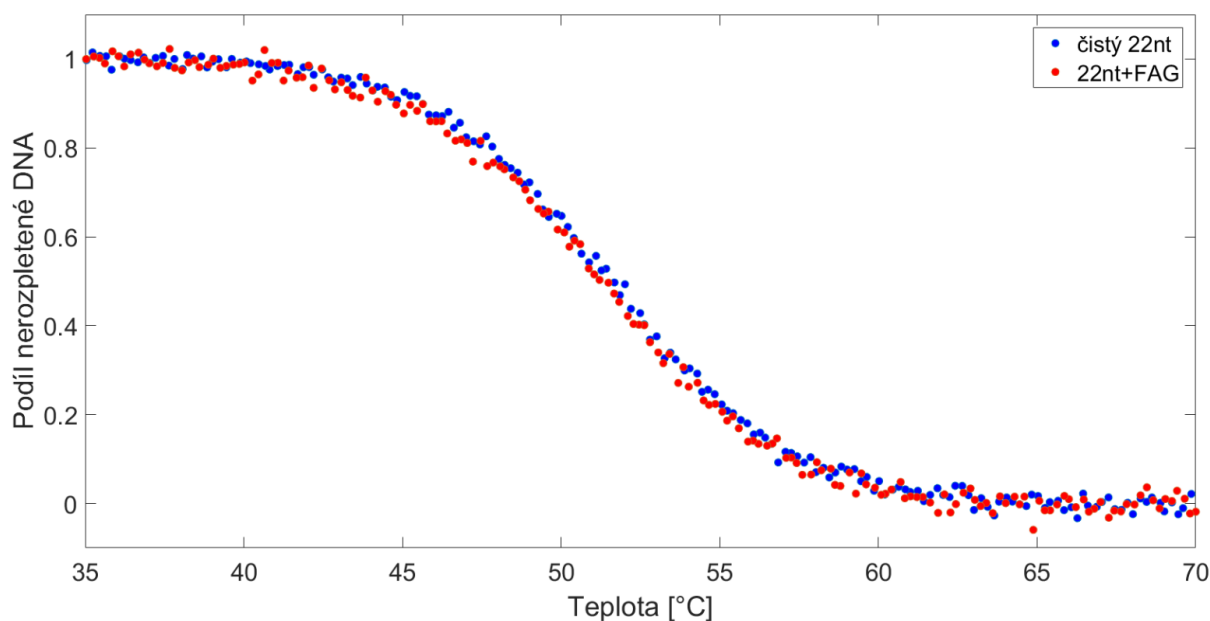
Teplota tání oligonukleotidu 22nt s fagaroninem byla změřena šestkrát.

T_{m1}	T_{m2}	T_{m3}	T_{m4}	T_{m5}	T_{m6}	$\tilde{T}_m$	s	ΔT_m
51,9	51,6	51,2	51,1	51,0	51,1	51,3	0,4	-0,2

Tabulka č. 20 - Naměřené teploty tání pro komplex 22nt + FAG

$$t = \frac{|\tilde{x}_1 - \tilde{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} = \frac{|51,5 - 51,3|}{\sqrt{\frac{0,1^2}{2} + \frac{0,4^2}{6}}} = 1,12 < t_{krit,6} = 2,45$$

Teplota tání komplexu 22nt + fagaronin je o 0,2 °C nižší než teplota tání čistého 22nt. T-test dokázal, že tato změna je statisticky nevýznamná a kolumbamin tak nemá vliv na stabilitu struktury i-motivu tvořeného oligonukleotidem 22nt.



Graf č. 22 - Porovnání esovitých křivek tání čistého 22nt a komplexu 22nt + FAG (měření 3)

8 Stanovení asociační konstanty a stechiometrického poměru DNA:ligand

Titrace k určení asociačních konstant byly provedeny pro každou strukturu s escholidinem i fagaroninem. Titrace s kolumbaminem nebyly provedeny z důvodu nízkého kvantového výtěžku tohoto alkaloidu.

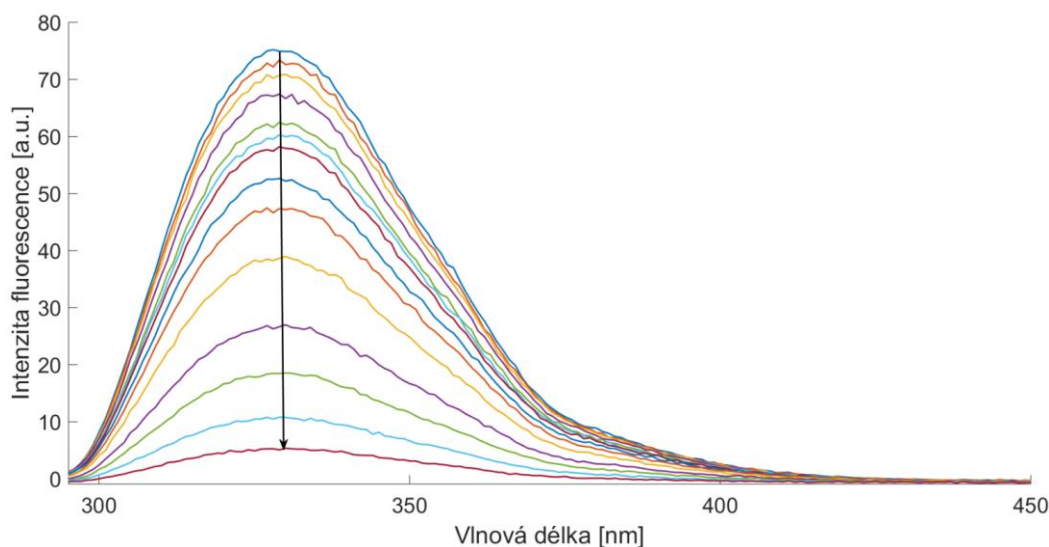
8.1 Titrace escholidinu

Koncentrace escholidinu v kyvetě byla $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Tento roztok byl titrován roztokem oligonukleotidu o koncentraci přibližně $6 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Přidávky byly 1,1,2,2,2,4,3,5,10,20,20,30 a 40 μl .

Excitační vlnová délka byla 285 nm. Spektra byla měřena v rozsahu 295-550 nm pro každý přídavek. Každá titrace byla provedena třikrát.

8.1.1 Titrace escholidinu oligonukleotidem DL40

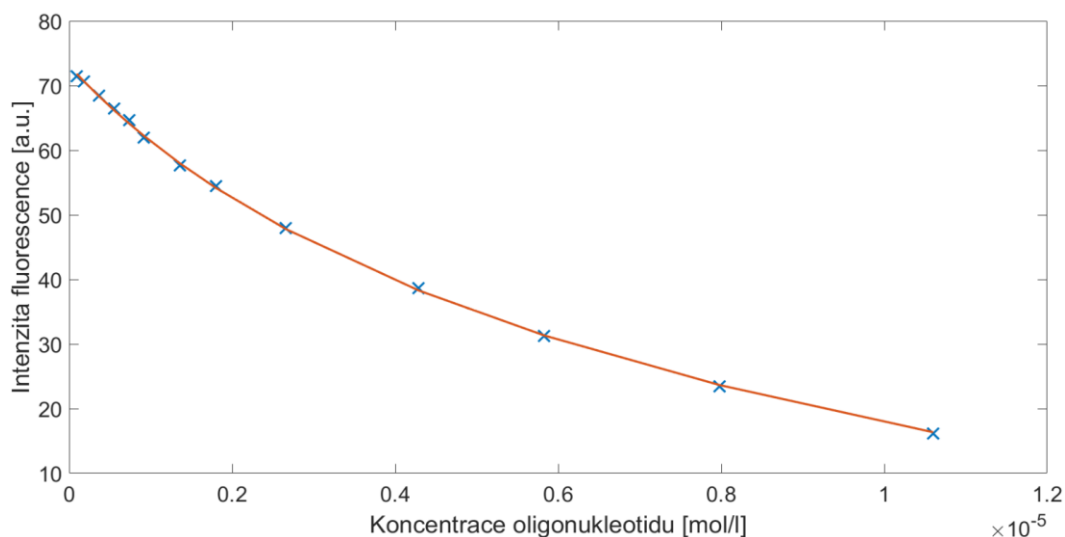
Bylo titrováno roztokem oligonukleotidu DL40 o koncentraci $6,45 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.



Graf č. 23 - Naměřená emisní spektra při zvyšující se koncentraci oligonukleotidu DL40

Při zvyšování koncentrace oligonukleotidu klesala intenzita fluorescence. Po posledním přidavku, kdy byly koncentrace escholidinu i oligonukleotidu DL40 přibližně stejné, fluorescence téměř vymizela.

Naměřené hodnoty při 330 nm byly proloženy křivkou v programu Matlab (Graf č. 24) a byl vypočten stechiometrický poměr komplexu DNA:alkaloid a asociační konstanta.

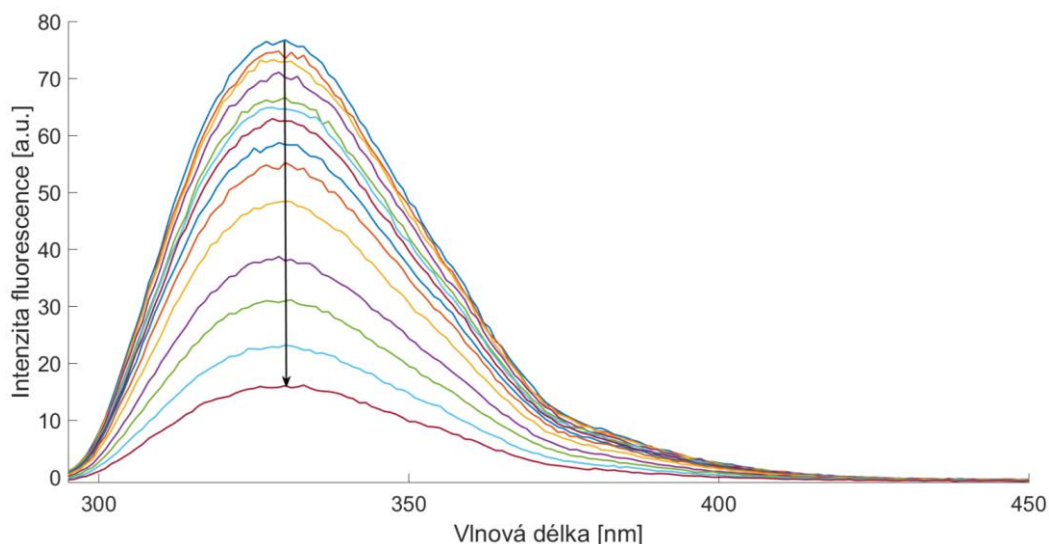


Graf č. 24 - Proložení naměřených hodnot při 330 nm

Bylo naměřeno, že oligonukleotid DL40 interaguje s escholidinem v poměru **1:4**. Asociační konstanta pro tento poměr je **$18,46 \pm 0,05$** .

8.1.2 Titrace escholidinu oligonukleotidem GG1

Bylo titrováno roztokem oligonukleotidu GG1 o koncentraci $5,58 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.



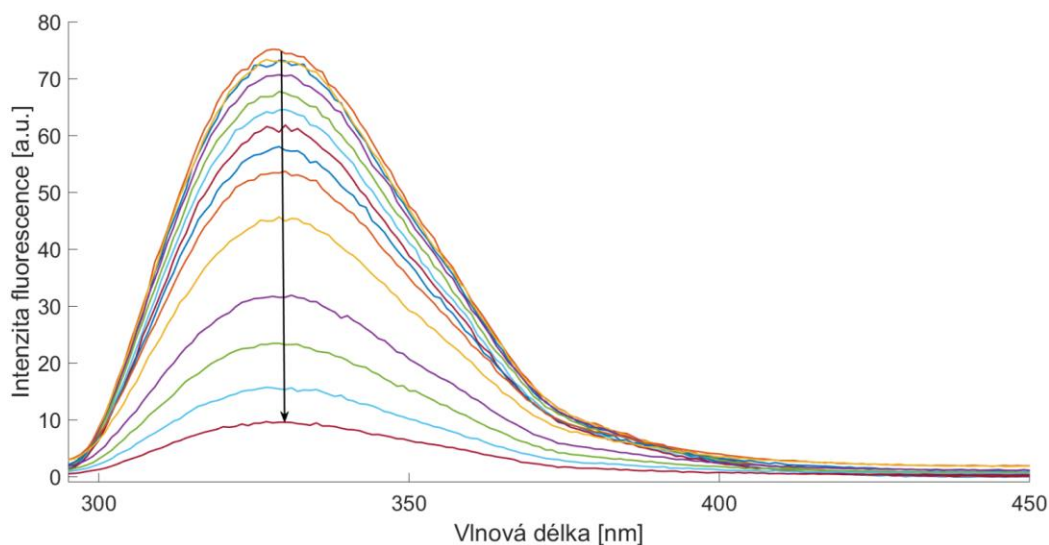
Graf č. 25 - Naměřená emisní spektra při zvyšující se koncentraci oligonukleotidu GG1

Při zvyšování koncentrace oligonukleotidu GG1 výrazně klesla intenzita fluorescence.

Bylo naměřeno, že oligonukleotid GG1 interaguje s escholidinem v poměru **1:5**. Asociační konstanta pro tento poměr je **$22,39 \pm 0,03$** .

8.1.3 Titrace escholidinu oligonukleotidem nmyc01

Bylo titrováno roztokem oligonukleotidu nmyc01 o koncentraci $6,70 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.



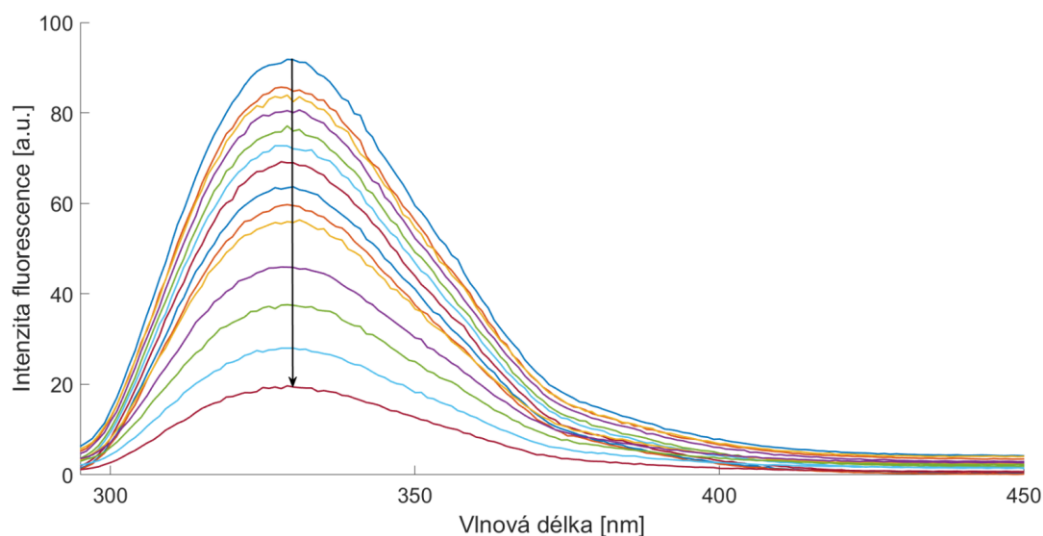
Graf č. 26 - Naměřená emisní spektra při zvyšující se koncentraci oligonukleotidu nmyc01

Při zvyšování koncentrace oligonukleotidu nmyc01 klesla intenzita fluorescence na minimum.

Bylo naměřeno, že oligonukleotid nmyc01 interaguje s escholidinem v poměru **1:4**. Asociační konstanta pro tento poměr je **$18,21 \pm 0,17$** .

8.1.4 *Titrace escholidinu oligonukleotidem nmyc01m*

Bylo titrováno roztokem oligonukleotidu nmyc01m o koncentraci $5,58 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.



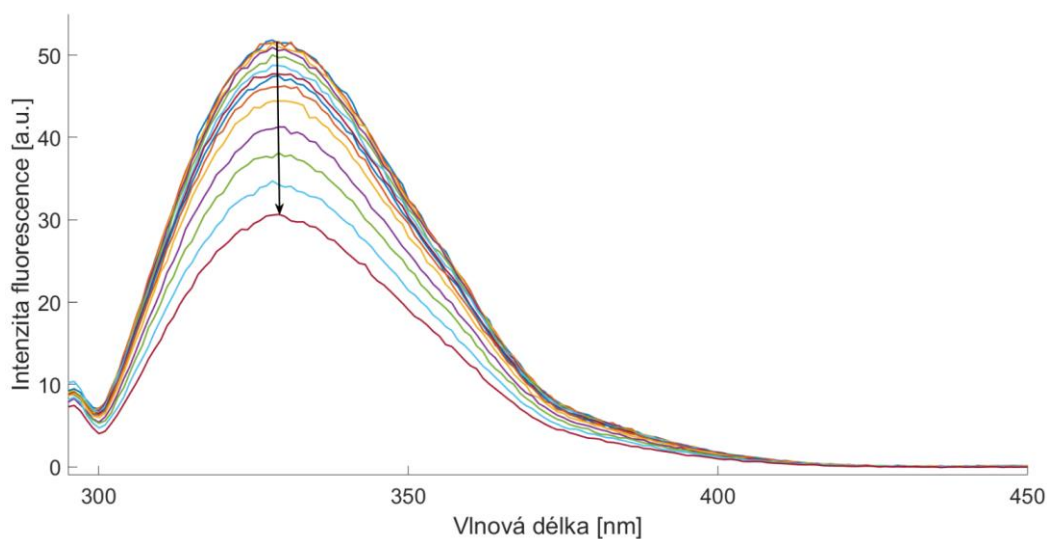
Graf č. 27 - Naměřená emisní spektra při zvyšující se koncentraci oligonukleotidu nmyc01m

Při zvyšování koncentrace oligonukleotidu nmyc01m výrazně klesla intenzita fluorescence.

Bylo naměřeno, že oligonukleotid nmyc01m interaguje s escholidinem v poměru **1:5**. Asociační konstanta pro tento poměr je **$22,61 \pm 0,08$** .

8.1.5 Titrace escholidinu oligonukleotidem 22nt

Bylo titrováno roztokem oligonukleotidu 22nt o koncentraci $5,58 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.



Graf č. 28 - Naměřená emisní spektra při zvyšující se koncentraci oligonukleotidu 22nt

Při zvyšující se koncentraci oligonukleotidu 22nt mírně klesala intenzita fluorescence.

Bylo naměřeno, že oligonukleotid 22nt interaguje s escholidinem v poměru **1:4**. Asociační konstanta pro tento poměr je **$17,64 \pm 0,12$** .

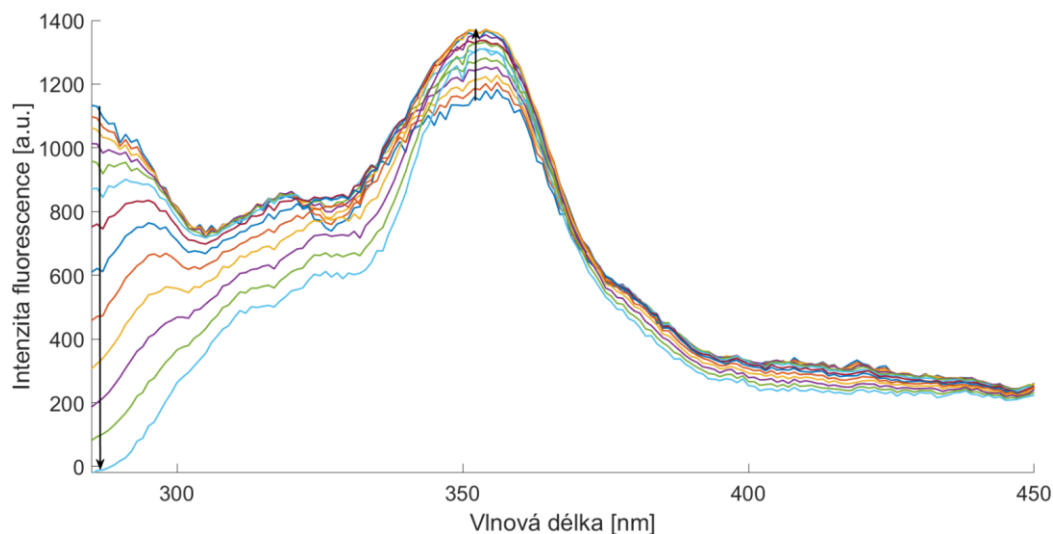
8.2 Titrace fagaroninu

Koncentrace fagaroninu v kyvetě byla $5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Tento roztok byl titrován roztokem oligonukleotidu o koncentraci přibližně $1,6 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Přídavky byly 1,1,2,2,4,5,10,15,20,40,60 a 90 μl .

Excitační vlnová délka byla 272 nm. Spektra byla měřena v rozsahu 285-530 nm pro každý přídavek. Každá titrace byla provedena dvakrát.

8.2.1 Titrace fagaroninu oligonukleotidem DL40

Bylo titrováno roztokem oligonukleotidu DL40 o koncentraci $1,61 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.



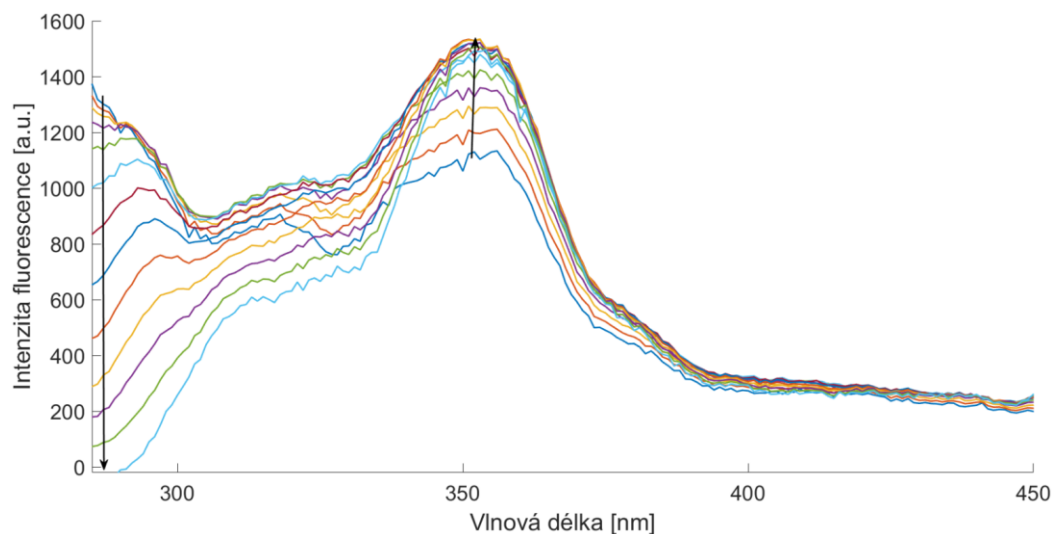
Graf č. 29 - Naměřená emisní spektra při zvyšující se koncentraci oligonukleotidu DL40

Při zvyšující se koncentraci oligonukleotidu DL40 mírně rostla intenzita fluorescence píku kolem 350 nm. Zároveň výrazně klesala fluorescence při 285 nm.

Pro výpočet stechiometrického poměru a asociační konstanty byly prokládány naměřené hodnoty při 352 nm. Bylo naměřeno, že oligonukleotid DL40 interaguje s fagaroninem v poměru **1:4**. Asociační konstanta pro tento poměr je **$17,49 \pm 0,96$** .

8.2.2 Titrace fagaroninu oligonukleotidem GG1

Bylo titrováno roztokem oligonukleotidu GG1 o koncentraci $1,65 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.



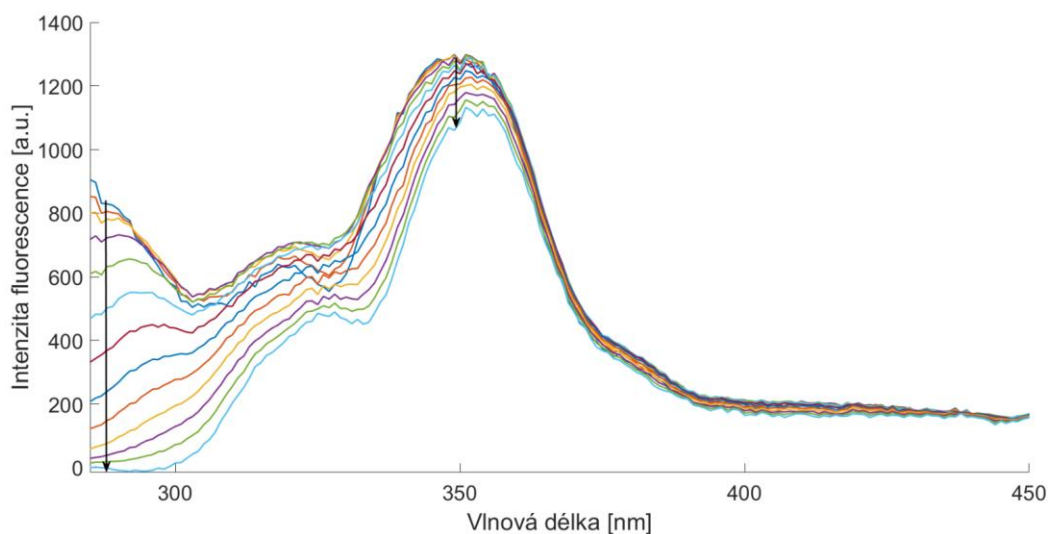
Graf č. 30 - Naměřená emisní spektra při zvyšující se koncentraci oligonukleotidu GG1

Při zvyšující se koncentraci oligonukleotidu GG1 mírně rostla intenzita fluorescence píku kolem 350 nm. Zároveň výrazně klesala fluorescence při 285 nm.

Bylo naměřeno, že oligonukleotid GG1 interaguje s fagaroninem v poměru **1:4**. Asociační konstanta pro tento poměr je **$17,32 \pm 1,01$** .

8.2.3 *Titrace fagaroninu oligonukleotidem nmyc01*

Bylo titrováno roztokem oligonukleotidu nmyc01 o koncentraci $1,57 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.



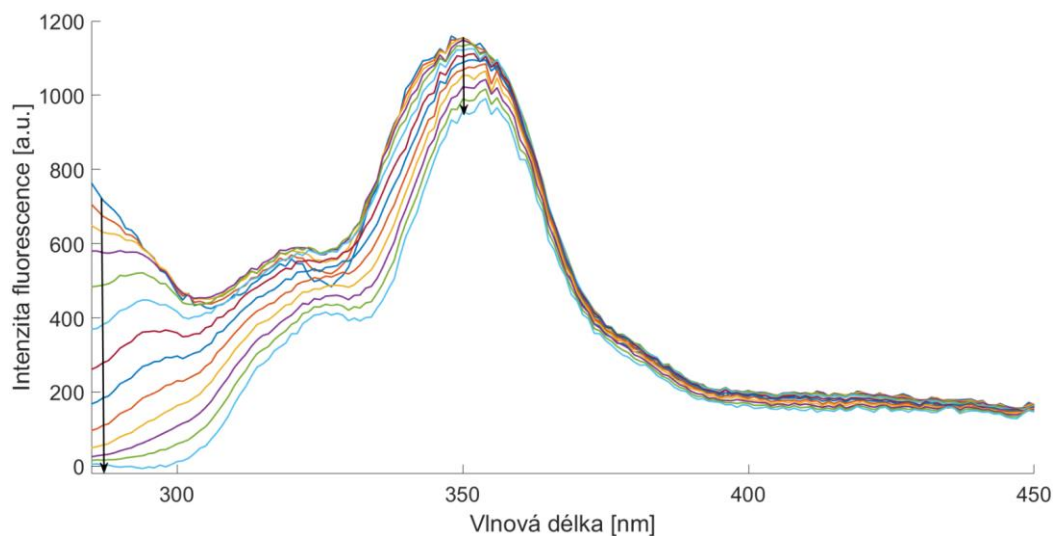
Graf č. 31 - Naměřená emisní spektra při zvyšující se koncentraci oligonukleotidu nmyc01

Při zvyšující se koncentraci oligonukleotidu nmyc01 mírně klesala intenzita fluorescence píku kolem 350 nm. Zároveň výrazně klesala fluorescence při 285 nm.

Bylo naměřeno, že oligonukleotid nmyc01 interaguje s fagaroninem v poměru **1:3**. Asociační konstanta pro tento poměr je **$14,82 \pm 1,60$** .

8.2.4 Titrace fagaroninu oligonukleotidem nmyc01m

Bylo titrováno roztokem oligonukleotidu nmyc01m o koncentraci $1,57 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.



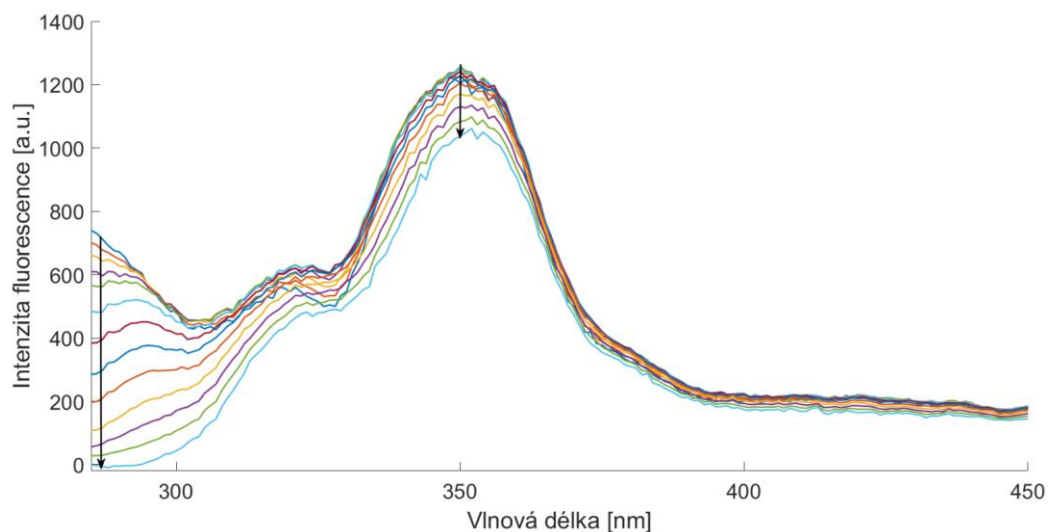
Graf č. 32 - Naměřená emisní spektra při zvyšující se koncentraci oligonukleotidu nmyc01m

Při zvyšující se koncentraci oligonukleotidu nmyc01m mírně klesala intenzita fluorescence píku kolem 350 nm. Zároveň výrazně klesala fluorescence při 285 nm.

Bylo naměřeno, že oligonukleotid nmyc01m interaguje s fagaroninem v poměru **1:3**. Asociační konstanta pro tento poměr je **$14,36 \pm 1,04$** .

8.2.5 Titrace fagaroninu oligonukleotidem 22nt

Bylo titrováno roztokem oligonukleotidu 22nt o koncentraci $1,57 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.



Graf č. 33 - Naměřená emisní spektra při zvyšující se koncentraci oligonukleotidu 22nt

Při zvyšující se koncentraci oligonukleotidu 22nt mírně klesala intenzita fluorescence píku kolem 350 nm. Zároveň výrazně klesala fluorescence při 285 nm.

Bylo naměřeno, že oligonukleotid 22nt interaguje s fagaroninem v poměru **1:3**. Asociační konstanta pro tento poměr je **$14,97 \pm 1,59$** .

Diskuze

Metodou cirkulárního dichroismu byly měřeny spektra jednotlivých oligonukleotidů. Bylo potvrzeno, že oligonukleotid DL40 tvoří strukturu antiparalelního G-kvadruplexu, který se vyznačuje kladnými píky při 245 a 295 nm a záporným píkem při 265 nm.^{73,74} Potvrzena byla také struktura paralelního G-kvadruplexu tvořeného oligonukleotidem GG1, který se vyznačuje kladným píkem při 265 nm a záporným píkem okolo 240 nm.^{73,74} I-motivy se vyznačují v CD spektru kladným píkem okolo 290 nm a záporným píkem při 260 nm.⁷⁵ Tomuto faktu odpovídají všechna tři námi naměřená spektra i-motivů tvořená oligonukleotidy nmyc01, nmyc01m a 22nt.

Z naměřených CD spekter byly stanoveny teploty tání čistých struktur a komplexů s alkaloidy. Všechny naměřené hodnoty pro G-kvadruplexy jsou shrnuty v tabulce č. 21, pro i-motivy v tabulce č. 22.

Teplota tání čistého oligonukleotidu DL40 je 28,8 °C, zatímco druhý z G-kvadruplexů GG1 má teplotu tání 48,1 °C. Tento rozdíl je způsoben především počtem kvartetů. Oligonukleotid DL40 tvoří G-kvadruplex pouze se dvěma kvartety, proto je jeho stabilita značně nižší než G-kvadruplexu GG1, který je tvořen třemi kvartety. Bylo naměřeno, že struktury obou G-kvadruplexů byly stabilizovány všemi třemi alkaloidy. V obou případech měl největší stabilizační vliv fagaronin, který stabilizoval paralelní G-kvadruplex o 18,9 °C a antiparalelní o 28,2 °C. Důvodem může být vysoce elektronegativní kyslík z OH skupiny, který se dokáže pomocí vodíkových můstků vázat na NH₂ skupiny guaninů.³⁵ Tyto výsledky také potvrdily, že benzo[c]fenanthridinové alkaloidy mají výrazný stabilizační vliv na struktury G-kvadruplexů, což ve svém výzkumu dokázali také Paroulek⁷⁶ nebo Jarošová a spol.^{50,77} Protoberberinové alkaloidy escholidin a kolumbamin dosahovaly menších stabilizačních účinků než fagaronin, což může být způsobeno horší planaritou těchto molekul. Escholidin stabilizoval antiparalelní G-kvadruplex DL40 o 5,2 °C, zatímco paralelní GG1 pouze o 1,7 °C. Kolumbamin stabilizoval G-kvadruplexy podstatně více, především paralelní, u kterého byla teplota tání zvýšena o 27,5 °C. Takto vysoký stabilizační vliv protoberberinovým alkaloidem je velice nevídaný. V minulosti byly provedeny měření s mnoha alkaloidy patřících do této skupiny, ovšem největší stabilizační vliv měli korysamin ($\Delta T_m \sim 8$ °C)⁷⁶ nebo berberin ($\Delta T_m \sim 16$ °C)⁷⁸. Důvodem takto vysoké stabilizace může být jeho relativně planární struktura vzhledem k některým protoberberinovým alkaloidům a také vysoce elektronegativní kyslík z OH skupiny, který mu umožňuje vázat se na DNA prostřednictvím vodíkových můstků.

Naopak velice nízká stabilizace escholidinem může být způsobena přítomnou methylovou skupinou na dusíku, která výrazně narušuje planaritu molekuly.

Vzorek	T_m [°C]	s [°C]	ΔT_m [°C]
čistý DL40	28,8	0,9	-
DL40 + ED	34,0	0,8	5,2
DL40 + KLB	39,7	0,6	10,9
DL40 + FAG	47,7	0,7	18,9
čistý GG1	48,1	0,4	-
GG1 + ED	49,8	0,6	1,7
GG1 + KLB	75,6	1,4	27,5
GG1 + FAG	76,3	1,2	28,2

Tabulka č. 21 - Souhrn naměřených teplot tání pro G-kvadruplexy

Teplota tání i-motivu nmyc01 je 58,1 °C. Jeho mutovaná verze nmyc01m má teplotu tání 55,8 °C. Tyto dva i-motivy se liší pouze složením smyčky, kde nmyc01 má ve smyčce báze TGCA, zatímco jeho mutovaná verze pouze TTTT. Fujii a spol. dokázali, že i-motivy se smyčkou složenou pouze z thyminů jsou méně stabilní než i-motivy, které mají ve své smyčce guaniny, které dokážou strukturu stabilizovat tvorbou vodíkových můstků.⁷⁹ U třetího zkoumaného i-motivu 22nt byla naměřena teplota tání 51,5 °C. Po přidání alkaloidů ke strukturám i-motivu nebyla změna teploty tání více než 1 °C. V případě i-motivu 22nt byla zvýšena stabilita o 0,7 °C v kombinaci s escholidinem a snížena stabilita o 1,0 °C s kolumbaminem. Ačkoli oba tyto výsledky jsou statisticky významné, rozdíly jsou velice malé a nemůžeme s jistotou říct, zda byla struktura opravdu stabilizována, respektive destabilizována. V minulosti nebylo provedeno mnoho měření stabilizace i-motivů protoberberinovými ani benzo[c]fenanthridinovými alkaloidy. Pagano a spol. ve studii z roku 2018 uvádí, že protoberberinový alkaloid berberin nemá stabilizační účinky na strukturu i-motivu.⁸⁰ Tento výsledek potvrdili v roce 2021 Gargallo a spol.⁷⁸

Vzorek	T_m [°C]	s [°C]	ΔT_m [°C]
čistý nmyc01	58,1	0,4	-
nmyc01 + ED	57,8	1,6	-0,3
nmyc01 + KLB	58,3	0,4	0,2
nmyc01 + FAG	59,1	0,8	1,0
čistý nmyc01m	55,8	0,9	-
nmyc01m + ED	55,2	1,1	-0,6
nmyc01m + KLB	55,0	0,3	-0,8
nmyc01m + FAG	56,1	0,5	0,3
čistý 22nt	51,5	0,1	-
22nt + ED	52,2	0,5	0,7
22nt + KLB	50,5	0,5	-1,0
22nt + FAG	51,3	0,4	-0,2

Tabulka č. 22 - Souhrn naměřených teplot tání pro i-motivy

Titracemi alkaloidů byly stanoveny stechiometrické poměry a asociační konstanty k jednotlivým strukturám. Při titraci escholidinu slábl signál fluorescence s každým přidavkem oligonukleotidu z důvodu tvorby komplexu oligonukleotid:escholidin, který již nesvítí. V některých případech došlo téměř k úplnému vymizení fluorescence. Bylo naměřeno, že se escholidin váže na struktury G-kvadruplexů i i-motivů v poměru 1:4 nebo 1:5. Navzdory takto vysokému poměru neměl escholidin výraznější stabilizační vliv na žádnou strukturu vyjma antiparalelnímu G-kvadruplexu DL40. Můžeme tedy konstatovat, že fakt že se alkaloid váže na nekanonickou strukturu automaticky neznamená, že ovlivňuje také její stabilitu. Byly také stanoveny asociační konstanty pro odpovídající stechiometrické poměry. Pro stechiometrii 1:1 vychází logaritmus asociační konstanty $\sim 4,5$. V minulosti bylo vydáno již několik publikací na protoberberinové alkaloidy. U některých z nich byly naměřeny asociační konstanty nižší než v našem případě (jatrorrhizin, berberin)^{78,81}, u jiných naopak vyšší (sanguinarin, koptizin)^{51,81}. Protoberberinové alkaloidy se tedy vzájemně velice liší afinitou k nekanonickým strukturám.

Oligonukleotid	Stechiometrie	Log K _a
DL40	1:4	18,46 ± 0,05
GG1	1:5	22,39 ± 0,03
nmyc01	1:4	18,21 ± 0,17
nmyc01m	1:5	22,61 ± 0,08
22nt	1:4	17,64 ± 0,12

Tabulka č. 23 - Stechiometrické poměry a asociační konstanty pro escholidin

Fagaronin se váže na struktury G-kvadruplexů v poměru 1:4, zatímco na i-motivy v poměru 1:3. Tento velký poměr DNA:fagaronin může vysvětlovat vysokou stabilizaci G-kvadruplexů naměřenou pomocí cirkulárního dichroismu. Při titrování fagaroninu oligonukleotidy nmyc01, nmyc01m a 22nt mírně klesala fluorescence píku při 350 nm. Toto snížení bylo nejpravděpodobněji způsobeno tvorbou komplexu i-motiv:fagaronin. Toto statické zhášení fluorescence můžeme lépe pozorovat při 285 nm, kdy ve všech spektrech klesla intenzita signálu na nulu. Zajímavý výsledek byl pozorován u titrací s G-kvadruplexy. Hlavní pík kolem 350 nm s přidávkou oligonukleotidů DL40 i GG1 mírně rostl. Tento jev byl způsoben postupnou přeměnou iminiové formy fagaroninu na formu aminoalkoholu. Bhuiya a spol. dokázali s jiným benzo[c]fenanthridinovým alkaloidem – chelerythrinem, že alkaloid ve formě aminoalkoholu vykazuje vyšší fluorescenci než v iminiové formě.⁸² Tato přeměna je možná již při mírně bazickém pH a dochází při ní k navázání OH skupiny do struktury alkaloidu. Z tohoto důvodu byla přeměna pozorovaná pouze u měření G-kvadruplexů, kde se pracovalo s pH 7.

Oligonukleotid	Stechiometrie	Log K _a
DL40	1:4	17,49 ± 0,96
GG1	1:4	17,32 ± 1,01
nmyc01	1:3	14,82 ± 1,60
nmyc01m	1:3	14,36 ± 1,04
22nt	1:3	14,97 ± 1,59

Tabulka č. 24 - Stechiometrické poměry a asociační konstanty pro fagaronin

Závěr

V této diplomové práci byla studována interakce a stabilizace nekanonických struktur DNA (G-kvadruplex, i-motiv) s rostlinnými alkaloidy escholidinem, kolumbaminem a fagaroninem. Tyto struktury plní na vlákně DNA ochranou funkci a předpokládá se, že také ovlivňují přepínání imunoglobulinů. Při zvýšení jejich stability navíc mohou značně ovlivnit běžné buněčné procesy, jakými jsou například transkripce nebo replikace DNA. Tuto skutečnost lze využít v léčbě nádorového bujení, které je při omezené replikaci DNA velice omezeno.

Bylo zjištěno, že obě struktury G-kvadruplexu byly stabilizovány všemi třemi alkaloidy. V případě paralelního G-kvadruplexu tvořeného oligonukleotidem GG1 měli výrazný stabilizační vliv kolumbamin a fagaronin. Escholidin stabilizoval tuto strukturu pouze nepatrně. Antiparalelní G-kvadruplex tvořený oligonukleotidem DL40 stabilizoval nejvíce fagaronin, zatímco escholidin nejméně.

U struktur i-motivů tvořených oligonukleotidy nmyc01 a nmyc01m nebyla pozorována žádná stabilizace, ačkoli bylo dokázáno, že všechny tři alkaloidy s těmito strukturami interagují. U i-motivu 22nt byla prokázána zvýšená stabilita komplexu s escholidinem a snížená stabilita komplexu s kolumbaminem oproti čisté struktuře. Oba tyto rozdíly byly však velice malé.

Fluorescenčně monitorovanými titracemi bylo zjištěno, že se escholidin váže na nekanonické struktury v poměru 1:4 (DL40, nmyc01, 22nt) nebo 1:5 (GG1, nmyc01m). Fagaronin preferuje poměr 1:3 s i-motivy a 1:4 s G-kvadruplexy.

Seznam zkratek

G	Guanin
C	Cytosin
A	Adenin
T	Thymin
ED	Escholidin
KLB	Kolumbamin
FAG	Fagaronin
CD	Církulární dichroismus
T _m	Teplota tání
K _a	Asociační konstanta
GG1	Oligonukleotid tvořící paralelní G-kvadruplex
DL40	Oligonukleotid tvořící antiparalelní G-kvadruplex
nmyc01	Oligonukleotid tvořící i-motiv
nmyc01m	Oligonukleotid tvořící i-motiv
22nt	Oligonukleotid tvořící i-motiv

Seznam referencí

1. Robbers JE SM, Tyler VE. *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*. **1996**.
2. Mithofer A, Boland W. Plant Defense Against Herbivores: Chemical Aspects. In: Merchant SS, ed. *Annual Review of Plant Biology, Vol 63*. Vol 63. Palo Alto: Annual Reviews; **2012**:431-450.
3. Ashihara A CM, Crozier A. Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure And Role In The Human Diet, Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure And Role In The Human Diet. **2006**.
4. Singh S, Singh TD, Singh VP, Pandey VB. Quaternary alkaloids of Argemone mexicana. *Pharmaceutical Biology*. **2010**;48(2):158-160.
5. Bentley KW. beta-phenylethylamines and the isoquinoline alkaloids. *Natural Product Reports*. **2002**;19(3):332-356.
6. Barret Y, Sauvaire Y. FAGARONINE - A NOVEL ANTILEUKEMIC ALKALOID. *Phytotherapy Research*. **1992**;6(2):59-63.
7. Bentley KW. beta-Phenylethylamines and the isoquinoline alkaloids. *Natural Product Reports*. **2000**;17(3):247-268.
8. Sun CL, Li J, Wang X, Duan WJ, Zhang TY, Ito Y. Preparative separation of quaternary ammonium alkaloids from Coptis chinensis Franch by pH-zone-refining counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*. **2014**;1370:156-161.
9. Rivaud M, Mendoza A, Sauvain M, Valentin A, Jullian V. Short synthesis and antimalarial activity of fagaronine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2012**;20(15):4856-4861.
10. Chamberland G. HERBAL COMPOSITIONS OF CALIFORNIA POPPY AND METHOD FOR THE TREATMENT OF SLEEP AND DREAM-RELATED DISORDERS. **2018**.
11. Slaninova I, Slanina J, Taborska E. Quaternary benzo c phenanthridine alkaloids - Novel cell permeant and red fluorescing DNA probes. *Cytometry Part A*. **2007**;71A(9):700-708.
12. Slaninova I, Slanina J, Taborska E. Fluorescence properties of quaternary benzo c phenanthridine alkaloids and their use as supravital DNA probes. *Chemicke Listy*. **2008**;102(6):427-433.
13. Mendoza O, Bourdoncle A, Boule JB, Brosh RM, Mergny JL. G-quadruplexes and helicases. *Nucleic Acids Research*. **2016**;44(5):1989-2006.
14. Sun DY, Thompson B, Cathers BE, et al. Inhibition of human telomerase by a G-quadruplex-interactive compound. *Journal of Medicinal Chemistry*. **1997**;40(14):2113-2116.
15. Slavik J, Dolejs L, Sedmera P. ALKALOIDS OF PAPAVERACEAE .44. QUATERNARY ALKALOIDS FROM ROOTS OF 3 ESCHOLTZIA SPECIES AND FROM AERIAL PART OF HUNNEMANNIA-FUMARIAEFOLIA SWEET - CONSTITUTION OF ESCHOLIDINE. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. **1970**;35(9):2597-&.
16. Rolland A, Fleurentin J, Lanhers MC, et al. BEHAVIORAL-EFFECTS OF THE AMERICAN TRADITIONAL PLANT ESCHSCHOLZIA-CALIFORNICA - SEDATIVE AND ANXIOLYTIC PROPERTIES. *Planta Medica*. **1991**;57(3):212-216.
17. Leitao da-Cunha EV, Fachine, I. M., Guedes, D. N., Barbosa-Filho, J. M., & Sobral da Silva, M. Protoberberine Alkaloids. **2005**.
18. www.seedsoftheprairie.com. (22.2.2021)
19. www.smgrowers.com. (22.2.2021)
20. Chudik S, Marek R, Seckarova P, Necas M, Dostal J, Slavik J. Revision of the structure of escholidine. *Journal of Natural Products*. **2006**;69(6):954-956.
21. Al-Snafi AE. ESCHSCHOLZIA CALIFORNICA: A PHYTOCHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL - REVIEW. *Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2017**;4(2):257-263.
22. Bourdat-Deschamps M, Herrenknecht C, Akendengue B, Laurens A, Hocquemiller R. Separation of protoberberine quaternary alkaloids from a crude extract of Enantia chlorantha

- by centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography A*. **2004**;1041(1-2):143-152.
23. Bentley KW. beta-Phenylethylamines and the isoquinoline alkaloids. *Natural Product Reports*. **2005**;22(2):249-268.
 24. Bentley KW. BETA-PHENYLETHYLAMINES AND THE ISOQUINOLINE ALKALOIDS. *Natural Product Reports*. **1992**;9(4):365-391.
 25. Shamma M, Rothenberg AS. ALKALOIDS OF THALICTRUM-DIOICUM. *Lloydia-the Journal of Natural Products*. **1978**;41(2):169-178.
 26. Bentley KW. beta-Phenylethylamines and the isoquinoline alkaloids. *Natural Product Reports*. **2006**;23(3):444-463.
 27. Bentley KW. beta-Phenylethylamines and the isoquinoline alkaloids. *Natural Product Reports*. **1997**;14(4):387-411.
 28. Bentley KW. beta-Phenylethylamines and the isoquinoline alkaloids. *Natural Product Reports*. **2001**;18(2):148-170.
 29. Grycova L, Dostal J, Marek R. Quaternary protoberberine alkaloids. *Phytochemistry*. **2007**;68(2):150-175.
 30. Bao MM, Cao ZF, Yu D, et al. Columbamine suppresses the proliferation and neovascularization of metastatic osteosarcoma U2OS cells with low cytotoxicity. *Toxicology Letters*. **2012**;215(3):174-180.
 31. mdidea.com. (1.3.2021)
 32. herbalzooservices.com. (1.3.2021)
 33. Smidrkal J. SYNTHESIS OF FAGARONINE. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. **1988**;53(12):3184-3192.
 34. westafricanplants.senckenberg.de. (3.3.2021)
 35. Fleury F, Sukhanova A, Ianoul A, et al. Molecular determinants of site-specific inhibition of human DNA topoisomerase I by fagaronine and ethoxidine - Relation to DNA binding. *Journal of Biological Chemistry*. **2000**;275(5):3501-3509.
 36. Larsen AK, Grondard L, Couprie J, et al. THE ANTILEUKEMIC ALKALOID FAGARONINE IS AN INHIBITOR OF DNA TOPOISOMERASE-I AND TOPOISOMERASE-II. *Biochemical Pharmacology*. **1993**;46(8):1403-1412.
 37. Perezchiesa Y, Cintron CN, Rodriguez A. EFFECT OF FAGARONINE ON CHROMOSOME BREAKS AND LOSS IN DROSOPHILA-MELANOGASTER. *Mutation Research*. **1987**;188(4):307-309.
 38. Messmer WM, Tinwa M, Trojanek J, et al. FAGARONINE, A NEW TUMOR INHIBITOR ISOLATED FROM FAGARA-ZANTHOXYLOIDES LAM (RUTACEAE). *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **1972**;61(11):1858-+.
 39. Wang LK, Johnson RK, Hecht SM. INHIBITION OF TOPOISOMERASE-I FUNCTION BY NITIDINE AND FAGARONINE. *Chemical Research in Toxicology*. **1993**;6(6):813-818.
 40. Watson JD, Crick FHC. MOLECULAR STRUCTURE OF NUCLEIC ACIDS - A STRUCTURE FOR DEOXYRIBOSE NUCLEIC ACID. *Nature*. **1953**;171(4356):737-738.
 41. Bowater RPaG, Andrew J. Nucleotides: Structure and Properties. **2015**
 42. G. Michael Blackburn MJG, David Loakes, David M. Williams. *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*. Third ed2006.
 43. courses.lumenlearning.com. (14.3.2021)
 44. Vladimir N. Potaman RRS. DNA Conformation and Transcription. **2005**.
 45. Phan AT. Human telomeric G-quadruplex: structures of DNA and RNA sequences. *Febs Journal*. **2010**;277(5):1107-1117.
 46. Bochman ML, Paeschke K, Zakian VA. DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures. *Nature Reviews Genetics*. **2012**;13(11):770-780.
 47. Huppert JL. Four-stranded nucleic acids: structure, function and targeting of G-quadruplexes. *Chemical Society Reviews*. **2008**;37(7):1375-1384.
 48. Lipps HJ, Rhodes D. G-quadruplex structures: in vivo evidence and function. *Trends in Cell Biology*. **2009**;19(8):414-422.

49. Hannig P. Studium interakce mitoxantronu a rheinu s vybranými strukturami DNA. **2019**.
50. Jarosova P, Paroulek P, Rajecky M, et al. Naturally occurring quaternary benzo c phenanthridine alkaloids selectively stabilize G-quadruplexes. *Physical Chemistry Chemical Physics*. **2018**;20(33):21772-21782.
51. Jarosova P, Sandor R, Slaninkova A, Vido M, Pes O, Taborsky P. Quaternary protoberberine alkaloids and their interactions with DNA. *Chemical Papers*. **2019**;73(12):2965-2973.
52. Song GT, Ren JS. Recognition and regulation of unique nucleic acid structures by small molecules. *Chemical Communications*. **2010**;46(39):7283-7294.
53. Burge S, Parkinson GN, Hazel P, Todd AK, Neidle S. Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Research*. **2006**;34(19):5402-5415.
54. Rice C, Skordalakes E. Structure and function of the telomeric CST complex. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. **2016**;14:161-167.
55. Rhodes D, Lipps HJ. G-quadruplexes and their regulatory roles in biology. *Nucleic Acids Research*. **2015**;43(18):8627-8637.
56. Huppert JL, Balasubramanian S. Prevalence of quadruplexes in the human genome. *Nucleic Acids Research*. **2005**;33(9):2908-2916.
57. Sen D, Gilbert W. FORMATION OF PARALLEL 4-STRANDED COMPLEXES BY GUANINE-RICH MOTIFS IN DNA AND ITS IMPLICATIONS FOR MEIOSIS. *Nature*. **1988**;334(6180):364-366.
58. Li Q, Xiang JF, Zhang H, Tang YL. Searching Drug-Like Anti-cancer Compound(s) Based on G-Quadruplex Ligands. *Current Pharmaceutical Design*. **2012**;18(14):1973-1983.
59. Alba JJ, Sadurni A, Gargallo R. Nucleic Acid i-Motif Structures in Analytical Chemistry. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. **2016**;46(5):443-454.
60. Abou Assi H, Garavis M, Gonzalez C, Damha MJ. i-Motif DNA: structural features and significance to cell biology. *Nucleic Acids Research*. **2018**;46(16):8038-8056.
61. Day HA, Pavlou P, Waller ZAE. i-Motif DNA: Structure, stability and targeting with ligands. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2014**;22(16):4407-4418.
62. Jin KS, Shin SR, Ahn B, Rho Y, Kim SJ, Ree M. pH-Dependent Structures of an i-Motif DNA in Solution. *Journal of Physical Chemistry B*. **2009**;113(7):1852-1856.
63. Brooks TA, Kendrick S, Hurley L. Making sense of G-quadruplex and i-motif functions in oncogene promoters. *Febs Journal*. **2010**;277(17):3459-3469.
64. Gurung SP, Schwarz C, Hall JP, Cardin CJ, Brazier JA. The importance of loop length on the stability of i-motif structures. *Chemical Communications*. **2015**;51(26):5630-5632.
65. Shirmanova MV, Druzhkova IN, Lukina MM, et al. Intracellular pH imaging in cancer cells in vitro and tumors in vivo using the new genetically encoded sensor SypHer2. *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*. **2015**;1850(9):1905-1911.
66. Wright EP, Huppert JL, Waller ZAE. Identification of multiple genomic DNA sequences which form i-motif structures at neutral pH. *Nucleic Acids Research*. **2017**;45(6):2951-2959.
67. Takahashi S, Bhattacharjee S, Ghosh S, Sugimoto N, Bhowmik S. Preferential targeting cancer-related i-motif DNAs by the plant flavonol fisetin for theranostics applications. *Scientific Reports*. **2020**;10(1):13.
68. Lakowicz JR. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Third ed. **2006**.
69. Ranjbar B, Gill P. Circular Dichroism Techniques: Biomolecular and Nanostructural Analyses- A Review. *Chemical Biology & Drug Design*. **2009**;74(2):101-120.
70. Woody RW. *Methods in Enzymology: Circular dichroism*. **1995**.
71. Puglisi JD, Tinoco I. ABSORBENCY MELTING CURVES OF RNA. *Methods in Enzymology*. **1989**;180:304-325.
72. Breslauer KJ. Extracting thermodynamic data from equilibrium melting curves for oligonucleotide order-disorder transitions. *Energetics of Biological Macromolecules*. **1995**;259:221-242.
73. Xu Y, Noguchi Y, Sugiyama H. The new models of the human telomere d AGGG(TTAGGG)(3) in K⁺ solution. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2006**;14(16):5584-5591.

74. Smargiasso N, Rosu F, Hsia W, et al. G-quadruplex DNA assemblies: Loop length, cation identity, and multimer formation. *Journal of the American Chemical Society*. **2008**;130(31):10208-10216.
75. Li T, Famulok M. I-Motif-Programmed Functionalization of DNA Nanocircles. *Journal of the American Chemical Society*. **2013**;135(4):1593-1599.
76. Paroulek P. Studium interakce benzo[c]fenanthridinových alkaloidů s DNA. In:2014.
77. Jarosova P. Studium interakce benzo[c]fenanthridinových alkaloidů s nekanonickými strukturami DNA. **2017**.
78. Gargallo R, Avino A, Eritja R, et al. Study of alkaloid berberine and its interaction with the human telomeric i-motif DNA structure. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. **2021**;248:12.
79. Fujii T, Sugimoto N. Loop nucleotides impact the stability of intrastrand i-motif structures at neutral pH. *Physical Chemistry Chemical Physics*. **2015**;17(26):16719-16722.
80. Pagano A, Iaccarino N, Abdelhamid MAS, et al. Common G-Quadruplex Binding Agents Found to Interact With i-Motif-Forming DNA: Unexpected Multi-Target-Directed Compounds. *Frontiers in Chemistry*. **2018**;6:13.
81. Jarosova P. STUDIUM INTERAKCE ALKALOIDŮ KORYPALMINU, JATRORRHIZINU A KOLUMBAMINU S DNA. **2015**.
82. Bhuiya S, Haque L, Das S. Association of iminium and alkanolamine forms of the benzo c phenanthridine alkaloid chelerythrine with human serum albumin: photophysical, thermodynamic and theoretical approach. *New Journal of Chemistry*. **2018**;42(3):2180-2196.