



Πανεπιστήμιο
Κύπρου

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΙΚΡΟΙ ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ ΓΙΑ
ΤΕΤΡΑΠΛΕΣ ΕΛΙΚΕΣ ΓΟΥΑΝΙΝΗΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΘΕΜΙΣΤΟΚΛΕΟΥΣ

2024



Πανεπιστήμιο
Κύπρου

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Μικροί Μοριακοί Ανιχνευτές για Τετραπλές Έλικες
Γουανίνης**

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΘΕΜΙΣΤΟΚΛΕΟΥΣ

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Διατριβή υποβλήθηκε προς απόκτηση του μεταπτυχιακού τίτλου σπουδών του Τμήματος Χημείας στο Πανεπιστημίου Κύπρου.

ΜΑΙΟΣ, 2024

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΘΕΜΙΣΤΟΚΛΕΟΥΣ

ΣΕΛΙΔΑ ΕΓΚΡΙΣΗΣ

Μεταπτυχιακή Διατριβή

ΜΙΚΡΟΙ ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ ΓΙΑ ΤΕΤΡΑΠΛΕΣ ΕΛΙΚΕΣ ΓΟΥΑΝΙΝΗΣ

Παρουσιάστηκε από
Αλέξανδρο Θεμιστοκλέους

Εξεταστική Επιτροπή:

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Σοφία Χ. Hayes

Πρόεδρος Επιτροπής

Επίκουρος Καθηγητής Σάββας Γ. Γεωργιάδης

Μέλος Επιτροπής

Καθηγητής Επαμεινώνδας Λεοντίδης

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΔΗΛΩΣΗ

Δηλώνω υπεύθυνα ότι

1. Η παρούσα Μεταπτυχιακή Διατριβή πραγματοποιήθηκε εξ' ολοκλήρου από εμένα τον ίδιο.
2. Δεν υπήρξε συνεισφορά άλλων προσώπων στη διεξαγωγή των πειραμάτων και στην ανάλυση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων/δεδομένων, εκτός από τις παρακάτω συνεισφορές:
 - i. Υποψήφιο Διδάκτορα Ιωακείμ Αντωνίου που μου παρείχε βοήθεια για το σκέλος της οργανικής σύνθεσης και των μετρήσεων NMR και IR.
 - ii. Καθηγητή Αναστάσιο Κεραμιδά που μου παρείχε βοήθεια με τους υπολογισμούς DFT.
 - iii. Καθηγητή Ivo Piantanida του Ruđer Bošković Institute στην Κροατία που μου παρείχε την ανάλυση χρησιμοποιώντας το λογισμικό Specfit.

Αλέξανδρος Θεμιστοκλέους

Όνομα Φοιτητή

Σοφία Χαραλάμπους - Hayes

Όνομα Επιβλέπουσας Καθηγήτριας

Υπογραφή Φοιτητή

Υπογραφή Επιβλέπουσας Καθηγήτριας

ΠΝΕΥΜΑΤΙΚΑ ΔΙΚΑΙΩΜΑΤΑ

Copyright © Αλέξανδρος Θεμιστοκλέους, 2024

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η έγκριση της μεταπτυχιακής διατριβής από το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κύπρου δεν υποδηλώνει απαραίτητως και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ολοένα και περισσότερα στοιχεία δείχνουν ότι οι μη κανονικές δομές νουκλεϊκών οξέων, που ονομάζονται τετραπλές έλικες γουανίνης, παίζουν λειτουργικό ρόλο σε βασικές βιολογικές διεργασίες που κυμαίνονται από τη αναστολή της τελομεράσης έως τη γονιδιακή ρύθμιση. Ως εκ τούτου, υπάρχει σημαντικό ενδιαφέρον για τον έλεγχο της λειτουργίας τους με σκοπό την επίτευξη θεραπευτικών αποτελεσμάτων. Ωστόσο, η αρχική πρόκληση έγκειται στον εντοπισμό του σημείου όπου σχηματίζονται αυτές οι δομές εντός των κυττάρων *in vivo*. Για το σκοπό αυτό, συντέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν τρία νέα μικρά μόρια (TO-BF, TO-Morpho και TO-Thio) που μπορούν να αλληλοεπιδράσουν και να ανιχνεύουν αυτές τις δομές *in vitro*. Η αξιολόγηση της σταθεράς πρόσδεσης αυτών των μορίων με διάφορες τοπολογίες DNA μέσω φασματοσκοπίας απορρόφησης και φθορισμού αποκάλυψε μέτρια επιλεκτικότητα προς οποιαδήποτε συγκεκριμένη μορφή τετραπλής έλικας, εκτός από το TO-Thio, το οποίο επέδειξε μερική προτίμηση για τις τετραπλές έλικες που σχηματίζονται από την τελομερική αλληλουχία. Η ενίσχυση της έντασης του φθορισμού όλων των μορίων μετά την πρόσδεση στην αντιπαράλληλη τετραπλή έλικα της τελομερικής αλληλουχίας είναι αρκετά μεγαλύτερη κάτι που τα καθιστά καλούς οπτικούς ανιχνευτές για αυτή την δομή. Στη συνέχεια, συνδυάζοντας ένα ανιονικό πολυμερές, το PDV.Li, με αυτά τα μικρά μόρια, δημιουργήθηκε ένας οπτικός βιοαισθητήρας τύπου διακόπτη για την ενίσχυση της ευαισθησίας ανίχνευσης των τετραπλών ελίκων σε διάλυμα, απαιτώντας μόνο όγκους μικρολίτρων και νανομοριακές συγκεντρώσεις.

Λέξεις Κλειδιά: Τετραπλές Έλικες Γουανίνης, Βιοαισθητήρας, Χρωστικές, Αλληλεπιδράσεις Μικρών Μορίων - DNA

ABSTRACT

Mounting evidence suggests that non-canonical structures in nucleic acids, known as G-quadruplexes, are involved in vital biological processes, spanning from telomerase inhibition to gene regulation. Consequently, there's significant interest in modulating their function for therapeutic purposes. However, the initial challenge lies in pinpointing where these structures form within cells *in vivo*. To address this, three novel small molecules (TO-BF, TO-Morpho, and TO-Thio) were synthesised and characterized to interact with and detect these structures *in vitro*. Assessment of the binding affinities of these molecules with various DNA topologies via absorption and fluorescence spectroscopy revealed modest selectivity towards any specific quadruplex form, except for TO-Thio, which displayed partial preference for G-Quadruplex formed from the telomeric sequence. Notably, all molecules exhibited a substantial increase in fluorescence intensity upon binding to the antiparallel G-quadruplex formed from the telomeric sequence, rendering them effective optical probes for this structure. Subsequently, by combining an anionic polymer, PDV.Li, with these small molecules, a switch-type optical biosensor was engineered to enhance the detection sensitivity of quadruplex helices in solution, requiring mere microliter volumes and nanomolar concentrations.

Keywords: G-Quadruplex, Biosensor, Dyes, Small Molecule – DNA Interactions

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με το πέρας της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους η βοήθεια και οι υποδείξεις τους υπήρξαν πολύτιμες για την εκπόνηση αυτής. Πρωτίστως ευχαριστώ θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, Δρ. Σοφία Χαραλάμπους-Hayes, για την πολύτιμη καθοδήγηση και στήριξη που μου πρόσφερε καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω πολύ τους συμφοιτητές και φίλους μου Κάλια, Αλεξάνδρα, Νεφέλη, Παναγιώτη, Άγγελο, Μιχάλη, Μαριλένα, Μάριο, Ειρήνη, Φλορίν και Νεκτάριο που έκαναν αυτά τα 3 χρόνια εμπειρία ζωής με την στήριξη τους.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω και στον Δρ. Σάββα Γεωργιάδη για το σημαντικό χρόνο που αφιέρωσε και τις εποικοδομητικές συμβουλές που μου έδωσε. Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Δρ. Επαμεινώνδα Λεοντίδη και Δρ. Σάββα Γεωργιάδη για τη συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή και το χρόνο που αφιέρωσαν. Επιπλέον, εκτιμώ βαθύτατα τον υποψήφιο διδάκτορα Ιωακείμ Αντωνίου που προσέφερε απλόχερα την τεχνογνωσία, τη βοήθεια και την υποστήριξή του για το κομμάτι της σύνθεσης και χαρακτηρισμού των ενώσεων με τις φασματοσκοπίες NMR και IR. Επίσης, ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή Σάββα Γεωργιάδη για την παραχώρηση του εργαστηρίου και των υλικών για το κομμάτι της σύνθεσης. Ευχαριστώ την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ευτυχία Πινακουλάκη για την παραχώρηση του εργαστηρίου της για τις μετρήσεις των φασμάτων Raman με διέγερση στα 405 nm. Επιπρόσθετα, θέλω να ευχαριστήσω όλη την ερευνητική ομάδα της Μοριακής Φασματοσκοπίας για τη βοήθεια και την άριστη συνεργασία μας.

Θα ήθελα ακόμη να εκφράσω ιδιαίτερα θερμές ευχαριστίες, όπως επίσης και την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου για την αμέριστη αγάπη, συνεχή συμπαράσταση και στήριξη, για τις πολύτιμες συμβουλές τους και για όλα όσα μου πρόσφεραν όλα αυτά τα χρόνια της ζωής μου αλλά και καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Στην Γιαγιά και στον Παππού μου,

Ανδρέα και Ευαγγελία

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

I. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	VIII
II. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	XVI
III. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ ΚΑΙ ΣΥΜΒΟΛΩΝ.....	XVII
IV. ΦΥΣΙΚΕΣ ΣΤΑΘΕΡΕΣ	XXI
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1. Σκοπός και στόχοι.....	2
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΤΕΤΡΑΠΛΕΣ ΕΛΙΚΕΣ ΚΑΙ ΜΙΚΡΑ ΜΟΡΙΑ.....	3
2.1. Τετραπλές Έλικες Γουανίνης.....	8
2.2. Βιολογική Σημασία.....	10
2.2.1. Συντήρηση Τελομερών	11
2.2.2. Αντιγραφή DNA.....	14
2.2.3. Γονιδιακή έκφραση	16
2.3. Κυτταρική απεικόνιση	21
2.4. Σχεδιασμός μικρών μορίων	22
2.5. Φασματοσκοπικές Τεχνικές στην Βιοανάλυση	27
2.5.1. Φασματοσκοπία Φωτοφωταύγειας.....	27
2.5.2. Φασματοσκοπία UV-Vis.....	27
2.5.3. Φασματοσκοπία Raman Συντονισμού (Resonance Raman Spectroscopy-RRS)	29
2.5.4. Κυκλικός Διχρωϊσμός (Circular Dichroism-CD)	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ	33
3.1. Οπτικοί Βιοαισθητήρες.....	33
3.2. Χρωστικές και DNA	35
3.2.1. Thiazole Orange	36
3.3. Διακόπτες Φθορισμού.....	37
3.3.1. Ανάλυση Stern - Volmer και Μηχανισμοί Απόσβεσης.....	40
3.3.2. Φαινόμενο FRET.....	43
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	47
4.1. Γενικές Διαδικασίες.....	47

4.2. Σύνθεση Μικρών Μορίων	47
4.2.1. Σύνθεση της 4-μορφολινοβενζαλδεΐδης (1)	47
4.2.2. Σύνθεση της 4-(θειοφαιν-2-υλ)βενζαλδεΐδης (2).....	49
4.2.3. Σύνθεση της 4-(βενζοφουραν-2-υλ)βενζαλδεΐδης (3)	49
4.2.4. Σύνθεση του ιωδιούχου 1,2-διμεθυλοβενζοθειαζολ-1-ίου (A).....	49
4.2.5. Σύνθεση του ιωδιούχου 4-χλώρο-1,2-διμεθυλοκινολιν-1-ίου (B).....	50
4.2.6. Σύνθεση του (Z) 1,2-διμεθυλο-4-((3-μεθυλοβενζο[d]θειαζολ-2(3H)-υλιδένιο)μεθυλο) κινολιν-1-ίου (C)	50
4.2.7. Σύνθεση του TO-BF (4)	50
4.2.8. Σύνθεση του TO-Morpho (5)	51
4.2.9. Σύνθεση του TO-Thio (6).....	51
4.3. Επιδράσεις Διαλύτη	51
4.4. Υπολογιστική Μοντελοποίηση και Μοριακή Προσομοίωση.....	51
4.5. Ολιγονουκλεοτίδια για <i>in vitro</i> Μελέτες	52
4.6. Μετρήσεις Κυκλικού Διχρωϊσμού DNA	53
4.7. Τιτλοδοτήσεις απορρόφησης και εκπομπής μικρών μορίων	53
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΟΠΤΙΚΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ ΓΙΑ ΤΕΤΡΑΠΛΕΣ ΕΛΙΚΕΣ	
ΓΟΥΑΝΙΝΗΣ	55
5.1. Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός Μικρών Μορίων.....	55
5.1.1. Υπολογιστική προσομοίωση ηλεκτρονιακών μεταπτώσεων.....	57
5.1.2. Εύρεση Συντελεστή Μοριακής Απορροφητικότητας.....	61
5.1.3. Εξάρτηση Φάσματος Απορρόφησης Παραγώγων του TO από το διαλύτη.....	62
5.2. Οπτικές Μελέτες Αλληλεπίδρασης Μικρών Μορίων με Μοντέλα DNA	64
5.2.1. Τιτλοδοτήσεις UV-Vis μοντέλων DNA με τα μικρά μόρια	64
5.2.2. Τιτλοδοτήσεις Φωτοφωταύγειας μοντέλων DNA με τα μικρά μόρια	68
5.2.3. Φασματοσκοπία CD	71
5.3. Μελέτες Δομής και Αλληλεπιδράσεων Μορίων/DNA.....	73
5.3.1. Φάσματα Vis-RR μικρών μορίων με διέγερση στα 473 nm.....	73
5.3.2. Φάσματα Vis-RR μικρών μορίων και συμπλόκων με DNA με διέγερση στα 408 nm.....	79
5.3.3. Μοριακή Προσομοίωση Πρόσδεσης.....	80
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΒΑΣΙΣΜΕΝΟΣ ΣΕ ΑΝΙΟΝΙΚΟ	
ΠΟΛΥΜΕΡΕΣ	91
6.1. Απόσταση Förster μεταξύ πολυμερούς και μικρών μορίων	92
6.2. Προσδιορισμός των Σταθερών Απόσβεσης Stern-Volmer	93
6.3. Έλεγχος Λειτουργίας Βιοαισθητήρα	96
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ.....	100
V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	103

VI. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	117
VI.A. Φασματοσκοπία NMR.....	117
VI.B. Φασματοσκοπία IR.....	125
VI.C. Τιτλοδοτήσεις UV-Vis.....	126
VI.C.1. Τιτλοδοτήσεις TO-BF	126
VI.C.2. Τιτλοδοτήσεις TO-Morpho	127
VI.C.3. Τιτλοδοτήσεις TO-Thio.....	128
VI.D. Τιτλοδοτήσεις Φθορισμού	129
VI.D.1. Τιτλοδοτήσεις TO-BF	130
VI.D.2. Τιτλοδοτήσεις TO-Morpho	131
VI.D.3. Τιτλοδοτήσεις TO-Thio	132
VI.E. Φάσματα Raman Συντονισμού των μορίων και των συμπλόκων τους με τα DNA.....	133
VI.E.1. Ταυτοποίηση κορυφών βάσει των θεωρητικών φασμάτων	134
VI.F. Υπολογιστική Μοντελοποίηση και Μοριακή Προσομοίωση	137
VI.F.1. Μοριακή πρόσδεση στα μοντέλα DNA	137
VI.F.2. Δίδρες Γωνίες και Συζυγικό Σύστημα.....	140
VI.G. Χρονικά Φάσματα Ελέγχου Λειτουργίας Βιοαισθητήρα.....	141
VI.G.1. Έλεγχος Βιοαισθητήρα με TO-BF	141
VI.G.2. Έλεγχος Βιοαισθητήρα με TO-Morpho	143
VI.G.3. Έλεγχος Βιοαισθητήρα με TO-Thio.....	145
VI.H. Μελέτη Τιτλοδοτήσεων UV-Vis με χρήση του προγράμματος SpecFit	148

I. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 2.1: Η κρυσταλλική δομή του κανονικού δίκλωνου DNA (1BNA) ^[4] σύζευξη βάσεων Watson-Crick και νουκλεοτιδική αρίθμηση.	3
Σχήμα 2.2: Η κρυσταλλική δομή του tRNA φαινυλαλανίνης ζύμης (1EHZ) ^[6] και η σχηματική αναπαράστασή της.	4
Σχήμα 2.3: Οι δομικές διαφορές μεταξύ του δίκλωνου DNA της μορφής A, B και Z.	5
Σχήμα 2.4: Η δομή διαλύματος του τρίκλωνου DNA (1D3X) ^[23] και η σύζευξη βάσεων που εμπλέκεται.	6
Σχήμα 2.5: Η δομή διαλύματος ενός i-motif (1A83), ^[27] η σχηματική αναπαράστασή του και η βάση ζεύξης.	7
Σχήμα 2.6: Η δομή μιας τετραπλής έλικας γουανίνης.	8
Σχήμα 2.7: Δομική και σχηματική αναπαράσταση του ποικίλου φάσματος διαμορφώσεων G-τετραπλής έλικας που υιοθετεί η ανθρώπινη τελομερική αλληλουχία (πολυμορφισμός).	9
Σχήμα 2.8: Σχηματική επισκόπηση των τελομερών, των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με αυτά (ιδίως της shelterin και η τελομεράση), τις προστατευτικές δομές που μπορούν να υιοθετήσουν τα τελομερή (βρόχος T)	12
Σχήμα 2.9: Η μοριακή δομή των προσδετών G4 BRACO-19, RHPS4, πυριδοστατίνης και τελομεστατίνη.	13
Σχήμα 2.10: Σχηματική αναπαράσταση της καθυστέρησης της αντιγραφής του DNA που προκαλείται από G4.	14
Σχήμα 2.11: Σχηματική αναπαράσταση της συστροφής και του υπερσπειρώματος της διπλής έλικας του DNA.	16
Σχήμα 2.12: Σχηματική αναπαράσταση των υποκινητών γονιδίων και των υποτιθέμενων ρόλων που παίζουν οι G τετραπλές έλικες στην καθοδηγούμενη από τον υποκινητή γονιδιακή έκφραση.	17
Σχήμα 2.13: Σύγκριση των αντισωμάτων χρώσης G4 σε βλεφαρίδες (A, πράσινο) και ανθρώπινα κύτταρα (B-D, κόκκινο).	22
Σχήμα 2.14: Εξωτερικές αλληλεπιδράσεις π - π στοίβαξης των G4 προσδετών RHPS4, Phen-DC-3 και το παράγωγο της τελομεστατίνης LH2H2-6M(2)OTD (όλα κίτρινα, η μοριακή δομή φαίνεται κάτω) με G-τετράδες (κόκκινο) βάσει δομικών μελετών NMR (1NZM, ^[147] 2MGN ^[148] και 2MB3 ^[149] αντίστοιχα).	23
Σχήμα 2.15: Αλληλεπιδράσεις των προσδετών G4 TMPyP4, BMSG-SH-4 και νικελίου σαλφαίνης (κίτρινο αρωματικός πυρήνας, μοβ "πλευρικές" ομάδες, η μοριακή δομή φαίνεται από κάτω) με G4 (κόκκινη φωσφορική ραχοκοκαλιά) με βάση το NMR (2A5R) ^[151] και την κρυσταλλογραφία ακτίνων X (3T5E ^[152] και 3QSF ^[153]) αντίστοιχα.	24
Σχήμα 2.16: Εναλλακτικοί τρόποι πρόσδεσης του G-τετράπλευρου που παρουσιάζει ένα παράγωγο της διαμυκίνης A (κίτρινο και πράσινο, σύνδεση με αύλακα) και TMPyP4	

(κίτρινο, αλληλεπιδράσεις βρόχου) με βάση μελέτες NMR (2KVY) ^[157] και κρυσταλλογραφικές μελέτες ακτίνων Χ (2HRI) ^[160] αντίστοιχα.	25
Σχήμα 2.17: Μια επιλογή από προσδέτες G4 και η κατά προσέγγιση σταθερά διάσπασης (K _d) για G4 και δίκλωνο DNA (ή/και της επιλεκτικότητας έναντι του δίκλωνου DNA).	26
Σχήμα 2.18: Σχηματική ποιοτική αναπαράσταση των επιδράσεων του διαλύτη στην ηλεκτρονιακή ενέργεια μετάβασης αυξανόμενης πολικότητας διαλύτη.	28
Σχήμα 2.19: Φάσματα Raman των βάσεων νουκλεϊκών οξέων με διέγερση στα 266 nm (αριστερά) ^[198] και 785 nm (δεξιά). ^[199]	29
Σχήμα 2.20: Απεικόνιση κυκλικά δεξιόστροφου πολωμένου φωτός.	31
Σχήμα 2.21: Σχηματική αναπαράσταση ενός φασματοπολομέτρου CD.	31
Σχήμα 2.22: Το ελλειπτικό πολωμένο φως (βιολετί) αποτελείται από άνιση συνεισφορά δεξιού (μπλε) και αριστερού (κόκκινου) κυκλικού πολωμένου φωτός.	32
Σχήμα 3.1: Χημικές δομές χρωστικών που χρησιμοποιούνται για χρώση DNA.	35
Σχήμα 3.2: Η απόκριση φθορισμού κατά την ενεργοποίηση της χρωστικής πορτοκαλί της θειαζόλης (TO).	36
Σχήμα 3.3: Αναπαράσταση βιοαισθητήρα άμεσης δέσμησης με μοριακό φάρο.	38
Σχήμα 3.4: Απεικόνιση της ανάλυσης σάντουιτς.	39
Σχήμα 3.5: Διαμορφώσεις ανάλυσης.	40
Σχήμα 3.6: Αναπαράσταση Στατικής και Δυναμικής Απόσβεσης.	42
Σχήμα 3.7: Φασματική επικάλυψη (σημειώνονται με διαγώνιες γραμμές) μεταξύ της εκπομπής του δότη και την απορρόφηση δέκτη απαιτείται για FRET σε ένα ζεύγος δότη-δέκτη.	44
Σχήμα 4.1: Συνθετική Πορεία των μικρών μορίων.	48
Σχήμα 5.1: Κανονικοποιημένα Φάσματα Απορρόφησης των τριών μορίων και του TO διαλυμένα σε DMSO.	56
Σχήμα 5.2: Κανονικοποιημένα Φάσματα Απορρόφησης των τριών μορίων και του TO διαλυμένα σε DMSO:H ₂ O 1:10.	56
Σχήμα 5.3: Μοριακά Τροχιακά για τα τρία μόρια που υπολογίστηκαν σε επίπεδο θεωρίας B3LYP/6-311+G(d,p). (A) TO-BF (B) TO-Morpho (Γ) TO-Thio.	58
Σχήμα 5.4: Σύγκριση των θεωρητικών φασμάτων που υπολογίστηκαν σε σχέση με τα πειραματικά φάσματα των διαλυμάτων των μικρών μορίων σε DMSO.	60
Σχήμα 5.5: Φάσματα UV-Vis του TO-BF σε DMSO σε διάφορες συγκεντρώσεις.	61
Σχήμα 5.6: Φάσματα UV-Vis του TO-Morpho σε DMSO σε διάφορες συγκεντρώσεις από 0.07 μM μέχρι 26.1 μM σε θερμοκρασία δωματίου.	62
Σχήμα 5.7: Φάσματα UV-Vis του TO-Thio σε DMSO σε διάφορες συγκεντρώσεις από 0.1 μM μέχρι 38.9 μM σε θερμοκρασία δωματίου.	62
Σχήμα 5.8: Εξάρτηση Φάσματος UV-Vis του TO-BF από το διαλύτη (Κανονικοποιημένα Φάσματα).	63
Σχήμα 5.9: Εξάρτηση Φάσματος UV-Vis του TO-Morpho αναλόγως από το διαλύτη (Κανονικοποιημένα Φάσματα).	63

Σχήμα 5.10: Εξάρτηση Φάσματος UV-Vis του TO-Thio αναλόγως από το διαλύτη (Κανονικοποιημένα Φάσματα).....	64
Σχήμα 5.11: Αριστερά: Αντιπροσωπευτική τιτλοδότηση απορρόφησης για το TO-BF (~20 μM , 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με την αντιπαράλληλη διαμόρφωση G4 της τελομερικής αλληλουχίας DNA (ap22AG). Δεξιά: Προσαρμογή εξίσωσης Hill στα δεδομένα A προς [ap22AG].	65
Σχήμα 5.12: Αριστερά: Αντιπροσωπευτική τιτλοδότηση απορρόφησης για το TO-Morpho (~20 μM , 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με ap22AG. Δεξιά: Προσαρμογή εξίσωσης Hill στα δεδομένα A προς [ap22AG]......	65
Σχήμα 5.13: Αριστερά: Αντιπροσωπευτική τιτλοδότηση απορρόφησης για το TO-Thio (~20 μM , 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με ap22AG. Δεξιά: Προσαρμογή εξίσωσης Hill στα δεδομένα A προς [ap22AG].	66
Σχήμα 5.14: Σταθερές συγγένειας ($K_a \pm \sigma$) που προσδιορίστηκαν με τιτλοδοτήσεις απορρόφησης για τα μικρά μόρια με διαφορετικές τοπολογίες DNA.....	66
Σχήμα 5.15: Φάσματα UV-Vis διαλύματος ~20 μM TO-Morpho πριν και μετά την προσθήκη 17.5 μM διαφορετικών DNA.....	67
Σχήμα 5.16: Αριστερά: Αντιπροσωπευτική τιτλοδότηση φθορισμού για το TO-BF (~20 μM , 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με την αντιπαράλληλη διαμόρφωση G4 της τελομερικής αλληλουχίας DNA (ap22AG). Δεξιά: Προσαρμογή εξίσωσης Hill στα δεδομένα F/F ₀ προς [ap22AG]......	69
Σχήμα 5.17: Αριστερά: Αντιπροσωπευτική τιτλοδότηση φθορισμού για το TO-Morpho (~20 μM , 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με ap22AG. Δεξιά: Προσαρμογή εξίσωσης Hill στα δεδομένα F/F ₀ προς [ap22AG]......	69
Σχήμα 5.18: Αριστερά: Αντιπροσωπευτική τιτλοδότηση φθορισμού για το TO-Thio (~20 μM , 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με ap22AG. Δεξιά: Προσαρμογή εξίσωσης Hill στα δεδομένα F/F ₀ προς [ap22AG].	69
Σχήμα 5.19: Σταθερές συγγένειας ($K_a \pm \sigma$) που προσδιορίστηκαν με τιτλοδοτήσεις φθορισμού για τα μικρά μόρια με διαφορετικές τοπολογίες DNA.	70
Σχήμα 5.20: Αποκρίσεις Φθορισμού που προσδιορίστηκαν με τιτλοδοτήσεις φθορισμού για τα μικρά μόρια με διαφορετικές τοπολογίες DNA.	70
Σχήμα 5.21: Φάσματα CD των μοντέλων DNA.....	71
Σχήμα 5.22: Φάσματα CD των μοντέλων DNA πριν (πράσινο) και μετά (μπλε, ροζ και κίτρινο) το τέλος των τιτλοδοτήσεων με τα μικρά μόρια.	72
Σχήμα 5.23: Φάσματα CD των μοντέλων DNA με το TO-Morpho. Ένθετο: Φάσμα CD του TO-Morpho κατά την τιτλοδότηση με ap22AG.	73
Σχήμα 5.24: Φάσμα RR μικρών μορίων και της χρωστικής TO με διέγερση στα 473 nm.	74
Σχήμα 5.25: Χημικές δομές των μικρών μορίων μετά τη βελτιστοποίηση της γεωμετρίας τους. Με δεξιόστροφη σειρά: TO-BF, TO-Morpho και TO-Thio (Γκρίζο: C, Μπλε: N, Κίτρινο: S, Κόκκινο: O).....	75
Σχήμα 5.26: Σύγκριση θεωρητικού (μπλε) και πειραματικού (κόκκινο) φάσματος RR του TO-BF με διέγερση στα 473 nm.....	76
Σχήμα 5.27: Σύγκριση θεωρητικού (μπλε) και πειραματικού (κόκκινο) φάσματος RR του TO-Morpho με διέγερση στα 473 nm.....	76

Σχήμα 5.28: Σύγκριση θεωρητικού (μπλε) και πειραματικού (κόκκινο) φάσματος RR του TO-Morpho με διέγερση στα 473 nm.....	76
Σχήμα 5.29: Φάσματα Vis-RR του TO-Thio με διέγερση στα 473 nm (ροζ) και 405 nm και του συμπλόκου με τα DNA.	80
Σχήμα 5.30: Αριστερά: Αποτέλεσμα της μοριακής πρόσδεσης του TO-Thio στην αντιπαράλληλη τετραπλή έλικα που σχηματίζεται από την τελομερική αλληλουχία (ap22AG). Δεξιά: Δυσδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων	81
Σχήμα 5.31: Αριστερά: Αποτέλεσμα της μοριακής πρόσδεσης του TO-Thio στην παράλληλη τετραπλή έλικα που σχηματίζεται από τον προαγωγέα του ογκογονιδίου c-myc. Δεξιά: Δυσδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων	81
Σχήμα 5.32: Αριστερά: Αποτέλεσμα της μοριακής πρόσδεσης του TO-Thio στο μοντέλο δίκλωνης έλικας (ds26). Δεξιά: Δυσδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων.....	82
Σχήμα 5.33: Αριστερά: Αποτέλεσμα της μοριακής πρόσδεσης του TO-Thio στην υβριδική τετραπλή έλικα που σχηματίζεται από την τελομερική αλληλουχία (h22AG). Δεξιά: Δυσδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων	82
Σχήμα 5.34: Με μπλε σκίαση φαίνονται τα άτομα που ορίζουν τις διέδρες γωνίες. Διέδρη Γωνία Α της ομάδας θειοφαινείου/μορφολίνης/βενζοφουράνιου και της βενζυλικής ομάδας, Διέδρη Γωνία Β της βενζυλικής ομάδας με τον διπλό δεσμό, Διέδρη Γωνία Γ του διπλού δεσμού με τη ομάδα της κινολίνης.	83
Σχήμα 5.35: Αποκλίσεις των διέδρων γωνιών (ΔΑ) του TO-Thio από την επιπεδότητα πριν και μετά την αλληλεπίδραση με τα μοντέλα DNA.....	84
Σχήμα 5.36: Μέσος όρος της απόκλισης από την επιπεδότητα των μικρών μορίων πριν και μετά την αλληλεπίδραση με τα μοντέλα DNA.	85
Σχήμα 5.37: Υπολογισμός του μεγέθους του συζυγιακού συστήματος βάσει του μέσου όρου της απόκλισης από την επιπεδότητα. Όσο πιο κοντά στην μονάδα τόσο πιο μεγάλο το συζυγιακό σύστημα.	86
Σχήμα 5.38: Η κορυφή του θειοφαινείου μετά την αποσυνέλιξη της κορυφής στους 1429 cm^{-1}	87
Σχήμα 5.39: Θεωρητικά Φάσματα Raman του TO-Thio στις διάφορες δομές που παίρνει όταν προσδεθεί σε DNA. Το πλάτος των γκαουσιανών κορυφών καθορίστηκε σε 4 cm^{-1} . Ο άξονας χ των φασμάτων είναι πολλαπλασιασμένος με διορθωτικό όρο 0.988.....	88
Σχήμα 6.1: Κανονικοποιημένα φάσματα απορρόφησης των μικρών μορίων μαζί με τα φάσματα απορρόφησης και φθορισμού του πολυμερούς.	91
Σχήμα 6.2: Απόδοση φαινομένου FRET ως προς την απόσταση των διπόλων δότη και δέκτη. Με γκριζες γραμμές σημειώνονται οι τιμές R_0 των τριών μορίων.....	93
Σχήμα 6.3: Τιτλοδότηση PDV.Li με TO-BF.	94
Σχήμα 6.4: Γραφική Stern-Volmer τιτλοδότησης PDV.Li με το TO-BF.....	94
Σχήμα 6.5: Τιτλοδότηση PDV.Li με TO-Morpho (αριστερά) και γραφική Stern-Volmer (δεξιά).	95
Σχήμα 6.6: Τιτλοδότηση PDV.Li με TO-Thio (αριστερά) και γραφική Stern-Volmer (δεξιά).	95
Σχήμα 6.7: Χρονικό Φάσμα Φθορισμού Αλληλεπίδρασης Διαλύματος 49 nM TO-Morpho και 16.5 nM PDV.Li μετά την προσθήκη c-myc με διέγερση στα 370 nm. Η απόσταση μεταξύ των μετρήσεων ήταν 1 λεπτό.	96

Σχήμα 6.8: Διατομή Φάσματος στην κορυφή του PDV.Li (475 nm). Δεδομένα από Σχήμα 6.7.	97
Σχήμα 6.9: Χρονικό Φάσμα Φθορισμού Αλληλεπίδρασης Διαλύματος 49 nM TO-Morpho και 16.5 nM PDV.Li μετά την προσθήκη 1.5 μ M c-myc και σύγκριση με φάσμα εκπομπής διαλύματος μόνο πολυμερούς στην ίδια συγκέντρωση.	98
Σχήμα 6.10: Το ποσοστό επιστροφής της έντασης φθορισμού του πολυμερούς μετά την προσθήκη του μοντέλου DNA.	99
Σχήμα Π- 1: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της Ένωσης A.	117
Σχήμα Π- 2: Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ της Ένωσης A.	117
Σχήμα Π- 3: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της Ένωσης B.	118
Σχήμα Π- 4: Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ της Ένωσης B.	118
Σχήμα Π- 5: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του TO-BF.	119
Σχήμα Π- 6: Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ του TO-BF.	119
Σχήμα Π- 7: Φάσμα 2D-NMR COSY του TO-BF.	120
Σχήμα Π- 8: Φάσμα 2D-NMR HSQC του TO-BF.	120
Σχήμα Π- 9: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του TO-Morpho.	121
Σχήμα Π- 10: Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ του TO-Morpho.	121
Σχήμα Π- 11: Φάσμα 2D-NMR COSY του TO-Morpho.	122
Σχήμα Π- 12: Φάσμα 2D-NMR HSQC του TO-Morpho.	122
Σχήμα Π- 13: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του TO-Thio.	123
Σχήμα Π- 14: Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ του TO-Thio.	123
Σχήμα Π- 15: Φάσμα 2D-NMR COSY του TO-Thio.	124
Σχήμα Π- 16: Φάσμα 2D-NMR HSQC του TO-Thio.	124
Σχήμα Π- 17: Πειραματικό (κόκκινο) και θεωρητικό (μπλε) φάσμα IR του TO-BF.	125
Σχήμα Π- 18: Πειραματικό (κόκκινο) και θεωρητικό (μπλε) φάσμα IR του TO-Morpho.	125
Σχήμα Π- 19: Πειραματικό (κόκκινο) και θεωρητικό (μπλε) φάσμα IR του TO-Thio.	125
Σχήμα Π- 20: Τιτλοδότηση απορρόφησης για το TO-BF (~20 μ M, 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με c-myc.	126
Σχήμα Π- 21: Τιτλοδότηση απορρόφησης για το TO-BF (~20 μ M, 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με h22AG.	126
Σχήμα Π- 22: : Τιτλοδότηση απορρόφησης για το TO-BF (~20 μ M, 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με ds26.	126
Σχήμα Π- 23: Τιτλοδότηση απορρόφησης για το TO-Morpho (~20 μ M, 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με c-myc.	127
Σχήμα Π- 24: Τιτλοδότηση απορρόφησης για το TO-Morpho (~20 μ M, 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με h22AG.	127
Σχήμα Π- 25: Τιτλοδότηση απορρόφησης για το TO-Morpho (~20 μ M, 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με ds26.	127

Σχήμα Π- 26: Τιτλοδότηση απορρόφησης για το TO-Thio (~20 μM , 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με c-myc.....	128
Σχήμα Π- 27: Τιτλοδότηση απορρόφησης για το TO-Thio (~20 μM , 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με h22AG.....	128
Σχήμα Π- 28: Τιτλοδότηση απορρόφησης για το TO-Thio (~20 μM , 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με ds26.	128
Σχήμα Π- 29: Τρισδιάστατο Φάσμα Εκπομπής του πολυμερούς PDV.Li. Με διέγερση στην περιοχή 390 - 410 nm έχουμε μέγιστη εκπομπή στην περιοχή 470 - 500 nm.....	129
Σχήμα Π- 30: Ανίχνευση δύο καναλιών για ap22AG από ένα διάλυμα TO-BF και TO-Morpho.....	129
Σχήμα Π- 31: Τιτλοδότηση φθορισμού για το TO-BF (~20 μM , 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με c-myc.....	130
Σχήμα Π- 32: Τιτλοδότηση φθορισμού για το TO-BF (~20 μM , 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με h22AG.....	130
Σχήμα Π- 33: Τιτλοδότηση φθορισμού για το TO-BF (~20 μM , 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με ds26.	130
Σχήμα Π- 34: Τιτλοδότηση φθορισμού για το TO-Morpho (~20 μM , 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με c-myc.....	131
Σχήμα Π- 35: Τιτλοδότηση φθορισμού για το TO-Morpho (~20 μM , 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με h22AG.....	131
Σχήμα Π- 36: Τιτλοδότηση φθορισμού για το TO-Morpho (~20 μM , 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με ds26.	131
Σχήμα Π- 37: Τιτλοδότηση φθορισμού για το TO-Thio (~20 μM , 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με c-myc.....	132
Σχήμα Π- 38: Τιτλοδότηση φθορισμού για το TO-Thio (~20 μM , 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με ds26.	132
Σχήμα Π- 39: Τιτλοδότηση φθορισμού για το TO-Thio (~20 μM , 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με h22AG.....	132
Σχήμα Π- 40: Φάσματα Vis-RR του TO-BF με διέγερση στα 473 nm (ροζ) και 405 nm και του συμπλόκου με τα DNA. Η κορυφή στους $\sim 1425 \text{ cm}^{-1}$ είναι κορυφή του διαλυτή και με αστερίσκο επισημαίνεται ένα τεχνούργημα.....	133
Σχήμα Π- 41: Φάσματα Vis-RR του TO-BF με διέγερση στα 473 nm (ροζ) και 405 nm και του συμπλόκου με τα DNA. Η κορυφή στους $\sim 1425 \text{ cm}^{-1}$ είναι κορυφή του διαλυτή και με αστερίσκο επισημαίνεται ένα τεχνούργημα.....	133
Σχήμα Π- 42: Υπόμνημα Μοριακών Αλληλεπιδράσεων.	137
Σχήμα Π- 43: Αριστερά: Αποτέλεσμα της Μοριακής πρόσδεσης του TO-BF στην αντιπαράλληλη τετραπλή έλικα που σχηματίζεται από την τελομερική αλληλουχία (ap22AG). Δεξιά: Δυσδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ του TO-BF και του ap22AG.....	137
Σχήμα Π- 44: Αριστερά: Αποτέλεσμα της Μοριακής πρόσδεσης του TO-Morpho στην αντιπαράλληλη τετραπλή έλικα που σχηματίζεται από την τελομερική αλληλουχία (ap22AG). Δεξιά: Δυσδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ του TO-Morpho και του ap22AG.....	137

Σχήμα Π- 45: Αριστερά: Αποτέλεσμα της Μοριακής πρόσδεσης του TO-BF στην παράλληλη τετραπλή έλικα που σχηματίζεται από τον προαγωγέα ογκογονιδίου c-myc. Δεξιά: Δυσδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ του TO-BF και του c-myc.....	138
Σχήμα Π- 46: Αριστερά: Αποτέλεσμα της Μοριακής πρόσδεσης του TO-Morpho στην παράλληλη τετραπλή έλικα που σχηματίζεται από τον προαγωγέα ογκογονιδίου c-myc. Δεξιά: Δυσδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ του TO-Morpho και του c-myc.....	138
Σχήμα Π- 47: Αριστερά: Αποτέλεσμα της Μοριακής πρόσδεσης του TO-BF στο μοντέλο διπλής έλικας (ds26). Δεξιά: Δυσδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ του TO-BF και του ds26.	138
Σχήμα Π- 48: Αριστερά: Αποτέλεσμα της Μοριακής πρόσδεσης του TO-Morpho στο μοντέλο διπλής έλικας (ds26). Δεξιά: Δυσδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ του TO-Morpho και του ds26.	139
Σχήμα Π- 49: Αριστερά: Αποτέλεσμα της Μοριακής πρόσδεσης του TO-BF στην υβριδική τετραπλή έλικα που σχηματίζεται από την τελομερική αλληλουχία (h22AG). Δεξιά: Δυσδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ του TO-BF και του h22AG.	139
Σχήμα Π- 50: Αριστερά: Αποτέλεσμα της Μοριακής πρόσδεσης του TO-Morpho στην υβριδική τετραπλή έλικα που σχηματίζεται από την τελομερική αλληλουχία (h22AG). Δεξιά: Δυσδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ του TO-Morpho και του h22AG.	139
Σχήμα Π- 51: Σύγκριση τιμών συγγένειας (σε μονάδες ενέργειας) των μικρών μορίων με τα διάφορα DNA, όπως αυτές υπολογίστηκαν από τις μοριακές προσομοιώσεις πρόσδεσης.	140
Σχήμα Π- 52: Αποκλίσεις των διέδρων γωνιών του TO-BF από την επιπεδότητα πριν και μετά την αλληλεπίδραση με τα μοντέλα DNA.....	140
Σχήμα Π- 53: Αποκλίσεις των διέδρων γωνιών του TO-Morpho από την επιπεδότητα πριν και μετά την αλληλεπίδραση με τα μοντέλα DNA.....	140
Σχήμα Π- 54: Χρονικό φάσμα βιοαισθητήρα με TO-BF και ap22AG. Πρώτο φάσμα: 16 nM PDV.Li. Δεύτερο Φάσμα: προσθήκη 49 nM TO-BF. Τρίτο Φάσμα: προσθήκη 1.5 μM ap22AG.....	141
Σχήμα Π- 55: Χρονικό φάσμα βιοαισθητήρα με TO-BF και c-myc. Πρώτο φάσμα: 16 nM PDV.Li. Δεύτερο Φάσμα: προσθήκη 49 nM TO-BF. Τρίτο Φάσμα: προσθήκη 1.5 μM c-myc.....	141
Σχήμα Π- 56: Χρονικό φάσμα βιοαισθητήρα με TO-BF και ds26. Πρώτο φάσμα: 16 nM PDV.Li. Δεύτερο Φάσμα: προσθήκη 49 nM TO-BF. Τρίτο Φάσμα: προσθήκη 1.5 μM ds26.	142
Σχήμα Π- 57: Χρονικό φάσμα βιοαισθητήρα με TO-BF και h22AG. Πρώτο φάσμα: 16 nM PDV.Li. Δεύτερο Φάσμα: προσθήκη 49 nM TO-BF. Τρίτο Φάσμα: προσθήκη 1.5 μM h22AG.....	142
Σχήμα Π- 58: Σύγκριση έντασης φθορισμού στα 475 nm διαλύματος πολυμερούς PDV.Li και TO-BF μετά την προσθήκη διαφόρων DNA.....	143
Σχήμα Π- 59: Χρονικό φάσμα βιοαισθητήρα με TO-Morpho και ap22AG. Πρώτο φάσμα: 16 nM PDV.Li. Δεύτερο Φάσμα: προσθήκη 49 nM TO-Morpho. Τρίτο Φάσμα: προσθήκη 1.5 μM ap22AG.	143

Σχήμα Π- 60: Χρονικό φάσμα βιοαισθητήρα με TO-Morpho και ds26. Πρώτο φάσμα: 16 nM PDV.Li. Δεύτερο Φάσμα: προσθήκη 49 nM TO-Morpho. Τρίτο Φάσμα: προσθήκη 1.5 μM ds26.	144
Σχήμα Π- 61: Χρονικό φάσμα βιοαισθητήρα με TO-Morpho και h22AG. Πρώτο φάσμα: 16 nM PDV.Li. Δεύτερο Φάσμα: προσθήκη 49 nM TO-Morpho. Τρίτο Φάσμα: προσθήκη 1.5 μM h22AG.	144
Σχήμα Π- 62: Σύγκριση έντασης φθορισμού στα 475 nm διαλύματος πολυμερούς PDV.Li και TO-Morpho μετά την προσθήκη διαφόρων DNA.	145
Σχήμα Π- 63: Χρονικό φάσμα βιοαισθητήρα με TO-Thio και ap22AG. Πρώτο φάσμα: 16 nM PDV.Li. Δεύτερο Φάσμα: προσθήκη 49 nM TO-Thio. Τρίτο Φάσμα: προσθήκη 1.5 μM ap22AG.	145
Σχήμα Π- 64: Χρονικό φάσμα βιοαισθητήρα με TO-Thio και c-myc. Πρώτο φάσμα: 16 nM PDV.Li. Δεύτερο Φάσμα: προσθήκη 49 nM TO-Thio. Τρίτο Φάσμα: προσθήκη 1.5 μM c-myc.	146
Σχήμα Π- 65: Χρονικό φάσμα βιοαισθητήρα με TO-Thio και ds26. Πρώτο φάσμα: 16 nM PDV.Li. Δεύτερο Φάσμα: προσθήκη 49 nM TO-Thio. Τρίτο Φάσμα: προσθήκη 1.5 μM ds26.	146
Σχήμα Π- 66: Χρονικό φάσμα βιοαισθητήρα με TO-Thio και h22AG. Πρώτο φάσμα: 16 nM PDV.Li. Δεύτερο Φάσμα: προσθήκη 49 nM TO-Thio. Τρίτο Φάσμα: προσθήκη 1.5 μM h22AG.	147
Σχήμα Π- 67: Σύγκριση έντασης φθορισμού στα 475 nm διαλύματος πολυμερούς PDV.Li και TO-Thio μετά την προσθήκη διαφόρων DNA.	147
Σχήμα Π- 68: (αριστερά) Δεδομένα τιτλοδότησης, τα οποία μεταφορτώθηκαν στο Specfit (δεξιά) εξάρτηση του A ₅₄₆ από [c-myc].	148
Σχήμα Π- 69: Ανάλυση Κύριων Συντελεστών: 2 πιθανά UV ενεργά είδη, 3ο δυνατό.	148
Σχήμα Π- 70: Αποτέλεσμα της στοιχειομετρίας 2:1.	149
Σχήμα Π- 71: (Α) Συμφωνία μεταξύ πειραματικών (■) και υπολογισμένων (●) δεδομένων για στοιχειομετρία 2:1 (Β) μεταβολή του ποσοστού των φασματοσκοπικά ενεργών ειδών σε σχέση με [c-myc] (Γ) φάσμα UV-Vis της χρωστικής (μαύρο) και του συμπλόκου 2:1 (κόκκινο).	149

II. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2.1: Περίληψη υποκινητών G4 και των λειτουργικών αναλύσεων που πραγματοποιήθηκαν για την επικύρωση του ρόλου τους.....	20
Πίνακας 4.1: Οι αλληλουχίες και ε των μοντέλων G4 και DNA	52
Πίνακας 5.1: Υπολογισμένες ηλεκτρονικές μεταπτώσεις, ενέργειες κάθετης διέγερσης και οι αναθέσεις τους για τα τρία μόρια με τη χρήση του ZINDO-CI σε βελτιστοποιημένες δομές B3LYP/6-311+G(d,p). H: HOMO, L: LUMO	57
Πίνακας 5.2: Ταυτοποίηση Κορυφών Φάσματος TO-BF βάσει του θεωρητικού υπολογισμού DFT/B3LYP)	77
Πίνακας 5.3: Ταυτοποίηση Κορυφών Φάσματος TO-Morpho βάσει του θεωρητικού υπολογισμού DFT/B3LYP).	78
Πίνακας 5.4: Ταυτοποίηση Κορυφών Φάσματος TO-Thio βάσει του θεωρητικού υπολογισμού DFT/B3LYP).	79
Πίνακας 5.5: Διέδρες Γωνίες της πλευρικής ομάδας και διαφορά από την επιπεδότητα....	84
Πίνακας 5.6: Κορυφές του φάσματος Vis-RR του TO-Thio που μετατοπίζονται με την αλληλεπίδραση με τα μοντέλα DNA. Η σκιασμένη κορυφή περιλαμβάνει τα αποτελέσματα της αποσυνέλιξης της κορυφής στους 1429 cm^{-1}	89
Πίνακας 6.1: Αποστάσεις Förster μικρών μορίων με το PDV.Li.....	92
Πίνακας Π- 1: Ταυτοποίηση Όλων των Κορυφών του φάσματος Raman του TO-BF βάσει του θεωρητικού υπολογισμού DFT/B3LYP).....	134
Πίνακας Π- 2:Ταυτοποίηση Όλων των Κορυφών του φάσματος Raman του TO-Morpho βάσει του θεωρητικού υπολογισμού DFT/B3LYP).....	135
Πίνακας Π- 3: Ταυτοποίηση Όλων των Κορυφών του φάσματος Raman του TO-Thio βάσει του θεωρητικού υπολογισμού DFT/B3LYP).....	136

III. ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΥΝΤΜΗΣΕΩΝ ΚΑΙ ΣΥΜΒΟΛΩΝ

A	Adenosine	Αδενίνη
ATP	Adenosine Triphosphate	Τριφωσφορική Αδενοσίνη
B	Benzene	Βεζόλιο
b	Cuvette Length	Μήκος Κυψελίδες
BF	Benzofuran	Βενζοφουράνιο
bp	Base Pair	Ζεύγος Βάσης
BS	Buffer Solution	Ρυθμιστικό Διάλυμα
BT	Benzotheizole	Βενζοθειαζόλη
C	Cytosine	Κυτοσίνη
CCD	Charged Coupled Device	Συσκευή Συζευγμένου Φορτίου
CD	Circular Dichroism	Κυκλικός Διχρωϊσμός
COSY	Correlation Spectroscopy	Φασματοσκοπία συσχετισμού
D	Dipole Strength	Διπολική Ισχύς
DA	Dihedral Angle	Δίεδρη Γωνία
DCM	Dichloromethane	Διχλωρομεθάνιο
DFT	Density Functional Theory	Θεωρία Συναρτησιακής Πυκνότητας
DMF	Dimethylformamide	Διμέθυλοφορμαμίδιο
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Διμέθυλοσουλφοξειδίο
DNA	Deoxyribonucleic Acid	Δεοξυριβονουκλικό Οξύ
DPSSL	Diode-pumped Solid-State Laser	Λειζερ Στερεάς Κατάστασης με Διοδική Άντληση

F	Fluorescence Intensity	Ένταση Φθορισμού
f	Oscillator Strength	Ένταση Ταλάντωσης
F₀	Initial Fluorescent Intensity	Αρχική Ένταση Φθορισμού
F_D	Fluorescence Spectral Distribution	Φασματική Κατανομή Φθορισμού
FRET	Förster Resonance Energy Transfer	Μεταφορά Ενέργειας Συντονισμού Förster
G	Guanine	Γουανίνη
G4	G-Quadruplex	Τετραπλή Έλικά
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital	Υψηλότερο Κατειλημμένο Μοριακό Τροχιακό
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence	Ετεροπυρηνική Ενιαία Κβαντική Συνοχή
I_a	Light Absorption Rate	Ρυθμός Απορρόφησης Φωτός
IR	(Near) Infrared Light	(Εγγύς) Υπέρυθρό
ITC	Isothermal Titration Calorimetry	Θερμιδομετρία Ισοθερμικής Τιτλοδότησης
J	Spectral Overlap Integral	Ολοκλήρωμα Φασματικής Επικάλυψης
K₀	Static Quenching Constant	Σταθερά Στατικής Απόσβεσης
K₂CO₃	Potassium Carbonate	Ανθρακικό Κάλιο
K_a	Association Constant	Σταθερά Δέσμευσης
K_d	Dissociation Constant	Σταθερά Διάσπασης
k_f	Emission Rate Constant	Σταθερά Ρυθμού Φθορισμού
k_{ic}	Internal Conversion Constant	Σταθερά Εσωτερικής Μετατροπής
k_{isc}	Intersystem Crossing Constant	Σταθερά Διασυστηματικής Διασταύρωσης

K_{sv}	Stern-Volmer (Quenching) Constant	Σταθερά Stern-Volmer
k_t	FRET Rate Constant	Σταθερά Ρυθμού FRET
L	Arbitrary Conjugation Length	Αυθαίρετο Μήκος Συζυγίας
LN₂	Liquid Nitrogen	Υγρό Άζωτο
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital	Χαμηλότερο Μη Κατειλημμένο Μοριακό Τροχιακό
Morpho	Morpholine	Μορφολίνη
n	Hill Coefficient	Συντελεστής Hill
Na₂CO₃	Sodium Carbonate	Ανθρακικό Νάτριο
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός
PC	Photonic Crystal	Φωτονικός Κρύσταλλος
Pd(PPh₃)₄	Tetrakis(triphenylphosphine) palladium (0)	Τετράκις(τριφαινυλοφωσφίνη) Παλλάδιο (0)
PDB	Protein Data Bank	
PDV.Li	Poly(4'-((E)-styryl)-4-((E)-2-sulfonatostyryl)-[1,1'-biphenyl]-3-sulfonate)	Πολυ(4'-((E)-στυρυλ)-4-((E)-2-σουλφονατοστυρυλ)-[1,1'-διφαινυλ]-3-σουλφονικό)
PEM	Photoelastic Modulator	Φωτοελαστικός Διαμορφωτής
PET	Photoinduced Electron Transfer	Μεταφορά Ηλεκτρονίων με Φωτοδιέγερση
PL	Photoluminescence	Φωτοφωταύγεια
PMT	Photomultiplier Tube	Σωλήνας Φωτοπολλαπλασιαστή
PNA	Peptide Nucleic Acid	Πεπτιδικό Νουκλεϊκό οξύ
Q	Quinoline	Κινολίνη
QD	Quantum Dot	Κβαντική Τελεία
Q_D / Φ	Quantum Yield	Κβαντική Απόδοση

R0	Förster Distance	Απόσταση Förster
RNA	Ribonucleic Acid	Ριβονουκλικό Οξύ
RR	Resonance Raman	Raman Συντονισμού
S_i	Raman Activity	Ενεργότητα Raman
scXRD	Single Crystal X-Ray Diffraction	Περίθλαση Ακτίνων-X Μονοκρυσταλλού
SERS	Surface Enhanced Raman Scattering	Επιφανειακά Ενισχυμένη Σκέδαση Raman
(L)SPR	(Localized) Surface Plasmon Resonance	(Εντοπισμένος) Συντονισμός Επιφανειακού Πλασμονίου
T	Thymine	Θυμίνη
Thio	Thiophene	Θειοφαίνιο
ΔE	Vertical Excitation Energy	Ενέργεια Κάθετης Διέγερσης
ε	Molar Extinction Coefficient	Συντελεστής Μοριακής Απορροφητικότητας
κ²	Orientation Factor	Παράγοντας Προσανατολισμού
τ_D	Fluorescence Half Life	Διάρκεια Ζωής Φθορισμού
ν̂	Excitation Energy	Ενέργεια Διέγερσης

IV. ΦΥΣΙΚΕΣ ΣΤΑΘΕΡΕΣ

Μάζα ηλεκτρονίου	m_e	$9.109 \times 10^{-31} \text{ kg}$
Φορτίο ηλεκτρονίου	e	$1.6022 \times 10^{-19} \text{ C}$
Ταχύτητα του φωτός	c	$2.9979 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$
Διαπερατότητα κενού	ϵ_0	$8.854 \times 10^{-12} \text{ F m}^{-1}$
Σταθερά του Planck	h	$6.626 \times 10^{-34} \text{ J s}$
Σταθερά του Boltzmann	k_B	$1.3807 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$
Αριθμός Avogadro	N_A	$6.022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$
Δείκτης διάθλασης (νερού)	n	1.333
Αριθμητική σταθερά	π	3.14159
Θερμοκρασία Δωματίου	T	298 K

Προθέματα

kilo	k	10^3
centi	c	10^{-2}
milli	m	10^{-3}
micro	μ	10^{-6}
nano	n	10^{-9}

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο καρκίνος είναι η δεύτερη πιο διαδεδομένη ασθένεια παγκοσμίως, με ανησυχητική αύξηση των ποσοστών θνησιμότητας τα τελευταία χρόνια. Η πρόγνωση για τους ασθενείς παραμένει αβέβαιη λόγω των προκλήσεων που συνεπάγεται η διάγνωση και η θεραπεία του καρκίνου. Η έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου είναι υψίστης σημασίας για την αποτελεσματική παρέμβαση. Οι βιοδείκτες διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην έγκαιρη ανίχνευση του καρκίνου και στην επακόλουθη αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Ωστόσο, η περίπλοκη βιολογία του καρκίνου, που χαρακτηρίζεται από μυριάδες κυτταρικές αλλοιώσεις και μεταλλάξεις, υπογραμμίζει την απουσία ενός καθολικά αποδεκτού βιοδείκτη καρκίνου.

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, οι τετραπλές έλικες νουκλεϊκών οξέων (G4) έχουν αναδειχθεί σε κεντρικό σημείο της έρευνας για τον καρκίνο. Αυτές οι δομές επηρεάζουν τη μεταγραφική ρύθμιση, την αντιγραφή, τη σταθερότητα των τελομερών και την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, καθιστώντας τις δυνητικούς στόχους για τη θεραπεία και την ανίχνευση του καρκίνου. Η αναγνώριση της βιολογικής σημασίας των G4 έχει ωθήσει τη διερεύνηση των προσδετών G4. Ο εντοπισμός των γονιδιωματικών δομών G4 σε λειτουργικά κρίσιμες περιοχές, όπως τα ανθρώπινα τελομερή και οι υποκινητές ογκογονιδίων, άνοιξε το δρόμο για την ανάπτυξη επιλεκτικών ανιχνευτών φθορισμού. Μια πληθώρα προσδετών που στοχεύουν G4 έχει εξεταστεί διεξοδικά, ενώ πολλοί από αυτούς έχουν καταγραφεί στη βάση δεδομένων G4 Ligands Database 2.1 (<http://www.g4ldb.com>).

Τα κοινά δομικά χαρακτηριστικά μεταξύ των προσδετών G4 περιλαμβάνουν έναν ετεροαρωματικό πυρήνα που διευκολύνει τις αλληλεπιδράσεις π-π στοίβαξης με τις επίπεδες τετράδες γουανίνης, παράλληλα με θετικά φορτισμένα τμήματα που εμπλέκουν τις φωσφορικές ομάδες της ραχοκοκαλιάς του DNA για αλληλεπιδράσεις με τις αύλακες και τους βρόχους. Η σταθερά διάσπασης (K_D) χρησιμεύει ως ζωτικό μέτρο της συγγένειας πρόσδεσης, η οποία συνήθως πέφτει κάτω από 10^{-6} M για τα περισσότερα σύμπλοκα πρόσδεσης G4. Ωστόσο, η επίτευξη επιλεκτικότητας μεταξύ των τοπολογιών G4 και του δίκλωνου DNA είναι επιτακτική ανάγκη. Ειδικότερα, ορισμένοι γνωστοί προσδέτες, όπως το BRACO-19^[1] και το TMPyP4,^[2] παρουσιάζουν χαμηλή εκλεκτικότητα για δομές G4 έναντι δίκλωνου DNA.

Πρόσφατες προτάσεις συνηγορούν υπέρ των μελετών σχέσης δομής-δραστικότητας για τη βελτίωση των ιδιοτήτων του προσδέτη, επιτυγχάνοντας τη βέλτιστη ισορροπία μεταξύ συγγένειας και εκλεκτικότητας. Εξακολουθούν να υπάρχουν κενά στην κατανόηση των αλληλεπιδράσεων του προσδέτη με τις τετραπλές έλικες όταν συνυπάρχει με δίκλωνο DNA και σε περιβάλλοντα χρωματίνης. Οι πρώτες ενδείξεις της παρουσίας του G4 στα άκρα των τελομερών και στις περιοχές υποκινητών ογκογονιδίων τροφοδότησαν σημαντική προσοχή στην ανάπτυξη αντικαρκινικών προσδετών G4 DNA.

1.1. Σκοπός και στόχοι

Η συγκέντρωση στοιχείων δείχνει ότι οι τετραπλές έλικες γουανίνης υπάρχουν στα κύτταρα και διαδραματίζουν λειτουργικό ρόλο. Η εργασία που περιγράφεται εδώ αποσκοπεί στην αναγνώριση τους με τη χρήση νεοσυντεθέντων μικρών μορίων ανιχνευτών.

Πρώτον, στο Κεφάλαιο 5, αναπτύσσονται τρεις νέοι οπτικοί ανιχνευτές βασισμένοι στην χρωστική πορτοκαλί της θειαζόλης (Thiazole Orange, TO) με διαφορετικές πλευρικές αλυσίδες και εξετάζεται η δέσμευση τους σε νουκλεϊκά οξέα, είτε διπλής έλικας ή διαφόρων διαμορφώσεων τετραπλής έλικας. Μελετώντας τον τρόπο απόκρισης φθορισμού στα διάφορα νουκλεϊκά οξέα διερευνάται έτσι η ικανότητά τους να αναγνωρίζουν επιλεκτικά τετραπλές έλικες γουανίνης *in vitro*. Επιπρόσθετα, χαρακτηρίζονται τα μικρά μόρια με τη χρήση των φασματοσκοπιών Raman, IR και κυκλικού διχρωϊσμού με σκοπό την μελέτη των δομικών τους αλλαγών κατά την πρόσδεση, για καλύτερη κατανόηση των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται με τα νουκλεϊκά οξέα. Οι φασματοσκοπικές μελέτες συμπληρώνονται με μελέτες μοριακής προσομοίωσης της δέσμευσης (molecular docking simulations) για μια πιο ολοκληρωμένη μοριακή εικόνα του τρόπου ανίχνευσης των τετραπλών ελίκων.

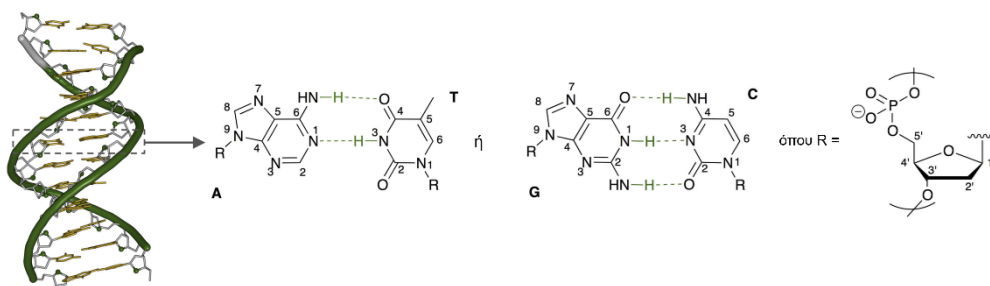
Στο Κεφάλαιο 6, αναπτύσσεται ένας βιοαισθητήρας / διακόπτης φθορισμού για την ενίσχυση της ευαισθησίας ανίχνευσης των G4 με την χρήση των τριών μορίων και ενός ανιονικού συζυγιακού πολυμερούς, του PDV.Li. Παρουσιάζονται εδώ μελέτες απόσβεσης της έντασης του φθορισμού του πολυμερούς στην παρουσία των μορίων και την επαναφορά αυτής κατά την πρόσδεση των μικρών μορίων με τετραπλές έλικες γουανίνης.

Σε γενικές γραμμές, οι κύριοι άξονες της παρούσας μελέτης είναι ο χαρακτηρισμός των συστατικών του βιοαισθητήρα, οι μεταξύ αυτών αλληλεπιδράσεις, όπως επίσης και οι αλλαγές στις φυσικοχημικές ιδιότητες τους αναλόγως του περιβάλλοντος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΤΕΤΡΑΠΛΕΣ ΕΛΙΚΕΣ ΚΑΙ ΜΙΚΡΑ ΜΟΡΙΑ

Μια από τις πιο εμβληματικές εικόνες στην επιστήμη είναι η διπλή ελικοειδής δομή του δεοξυριβονουκλεϊνικού οξέος (Deoxyribonucleic acid, DNA). Αρχικά σχεδιάστηκε ως μια ελικοειδής σκάλα,^[3] της οποίας η βιολογική λειτουργία εντριγκάρει τους επιστήμονες ενώ η αισθητική της ομορφιά συναρπάζει το ευρύ κοινό. Καθώς ο χρόνος προχωρούσε, η δομή του DNA παρέμεινε παγωμένη στο μυαλό του κοινού. Από την άλλη πλευρά, οι επιστήμονες ανακάλυψαν ότι το DNA κρύβει πολλά περισσότερα μυστικά και ότι η διπλή έλικα αποτελεί απλώς ένα σημείο εκκίνησης.

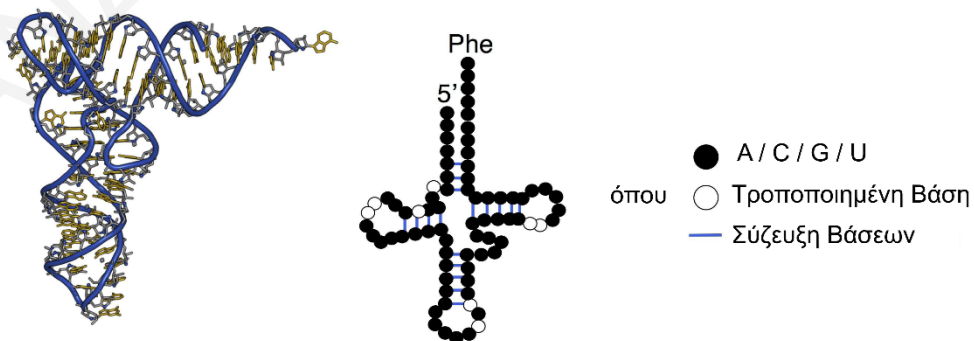
Ο διαχωρισμός των αλληλένδετων κλώνων αποκαλύπτει μια καθορισμένη αλληλουχία μοριακών δομικών στοιχείων (νουκλεοτίδια). Κάθε δομικό στοιχείο περιέχει ένα φωσφορικό τμήμα σακχάρου (5' και 3' άκρο αντίστοιχα) που συνδέεται με γειτονικές μονάδες με ισχυρούς ομοιοπολικούς δεσμούς. Σε κάθε σάκχαρο συνδέεται μία από τις τέσσερις μοναδικές νουκλεοβάσεις - αδενίνη (A), κυτοσίνη (C), γουανίνη (G) και θυμίνη (T). Οι νουκλεοβάσεις σε ένα κλώνο σχηματίζουν διαμοριακούς δεσμούς υδρογόνου με εκείνες της άλλης αλυσίδας. Όπως περιεγράφηκε από τους Watson και Crick,^[3] η αδενίνη αλληλεπιδρά κατά προτίμηση με τη θυμίνη, ενώ η κυτοσίνη με τη γουανίνη. Κατά συνέπεια, η αλληλουχία της μιας αλυσίδας καθορίζει τη σύνθεση της άλλης. Επιπλέον, η αντιστρεπτή φύση αυτών των δεσμών μεταξύ των αλυσίδων επιτρέπει την εύκολη πρόσβαση στις κωδικοποιημένες πληροφορίες. Αυτό το κομψό σύστημα (Σχήμα 2.1) επιτρέπει σε κάθε κύτταρο του σώματός μας να αποθηκεύει περίπου 1.5 gigabytes δεδομένων μέσα σε 6-7 πικογραμμάρια υλικού, η βάση του οποίου αποτελεί το σχέδιο για όλες τις κυτταρικές λειτουργίες.



Σχήμα 2.1: Η κρυσταλλική δομή του κανονικού δίκλωνου DNA (1BNA).^[4] σύζευξη βάσεων Watson-Crick και νουκλεοτιδική αρίθμηση.




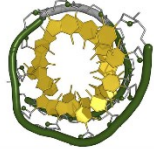
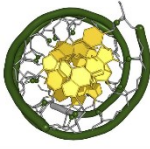
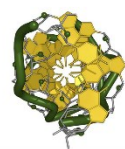
Ωστόσο, δεδομένης της εξαιρετικά διαφορετικής λειτουργίας των κυττάρων ανάλογα με την προέλευση των ιστών, είναι προφανές ότι δεν είναι όλα τα δεδομένα εξίσου προσβάσιμα ανά πάσα στιγμή. Μια τέλεια επαναλαμβανόμενη διπλή έλικα θα παρείχε λίγα σημεία αναφοράς για τις αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών και την επακόλουθη γονιδιακή έκφραση. Αντίθετα, μικρές διαταραχές στην τοπική δομή λόγω θέσεων παράλειψης βάσης, τροποποίησης βάσεων (π.χ. μεθυλίωση), εξογκώματα και κακοτεχνίες, ή ακόμη και μεγαλύτερες παραμορφώσεις στη δομή λόγω κάμψης και μεταβολών του πλάτους των αυλάκων, θα παρείχαν ιδανικά μοτίβα αναγνώρισης για την πρωτεΐνη που θα εκμεταλλευόταν και θα περιόριζε την πρόσβαση σε περιττές πληροφορίες. Για το σκοπό αυτό, το κανονικό μοντέλο της διπλής έλικας του DNA κρύβει μια σειρά από πιο πολύπλοκες δομές που επηρεάζουν την κυτταρική λειτουργία.

Σημαντική πρόοδος στην κατανόηση της μη κανονικής δομής των νουκλεϊκών οξέων έχει επιτευχθεί από τη μελέτη των ριβονουκλεϊκών οξέων (Ribonucleic acid, RNA) σε αντίθεση με τα DNA. Το RNA σχηματίζεται με την αντιγραφή του DNA (μεταγραφή) και δρα ως παροδικό μήνυμα προς το κύτταρο. Προκειμένου να γίνει το μήνυμα πιο εύκολα διαθέσιμο, δεν έχει συμπληρωματική αλυσίδα και είναι μονόκλωνο. Από χημική άποψη, ωστόσο, αναμένει κανείς ότι οι υδρόφοβες νουκλεοβάσεις θα αυτοσυνδεθούν είτε διαμοριακά είτε ενδομοριακά για να ελαχιστοποιηθεί η έκθεση στο υδατικό περιβάλλον. Η προκύπτουσα σύζευξη βάσεων είναι ατελής και προκαλεί πολλές από τις παραμορφώσεις της δίκλωνης δομής που σημειώθηκαν προηγουμένως (Σχήμα 2.2). Επιπλέον, αυτές οι τοπολογίες RNA φαίνεται να είναι κάτι περισσότερο από απλές χημικές ιδιομορφίες. Μοναδικές τριτοταγείς δομές του RNA, όπως οι φουρκέτες και οι ψευδόκομποι, έχουν αποδειχθεί ότι έχουν λειτουργική σημασία στα κύτταρα.^[5]



Σχήμα 2.2: Η κρυσταλλική δομή του tRNA φαινυλαλανίνης ζύμης (1EHZ)^[6] και η σχηματική αναπαράστασή της. Το tRNA εμφανίζει πολλά από τα κλασικά μη κανονικά δομικά χαρακτηριστικά που υιοθετούνται από το RNA, συμπεριλαμβανομένων βρόχων στελέχους, τροποποιημένων βάσεων RNA και μονόκλωνων εξογκωμάτων. Phe = φαινυλαλανίνη.

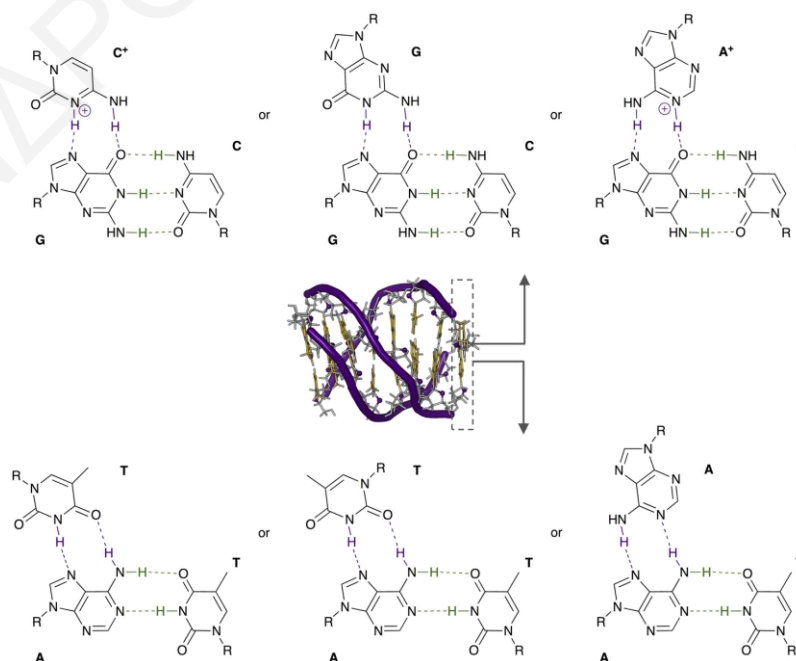
Είναι ενδιαφέρον ότι το δίκλωνο σύμπλεγμα που σχηματίζεται από το RNA (Α-μορφή) είναι επίσης τοπολογικά διαφορετικό από αυτό του κανονικού DNA (Β-μορφή). Η μορφή Α είναι πιο συμπαγής και λιγότερο ενυδατωμένη από τη μορφή Β (Σχήμα 2.3). Το RNA υιοθετεί τη μορφή Α λόγω της ριβοζικής 2' υδροξυλομάδας - αν το RNA υιοθετούσε τη μορφή Β, η ομάδα αυτή θα δημιουργούσε δυσμενείς στερικές αλληλεπιδράσεις με την παρακείμενη φωσφορική ομάδα.^[7] Δεδομένου ότι το DNA δεν διαθέτει αυτή την ομάδα, μπορεί να υιοθετήσει οποιαδήποτε διαμόρφωση, με τη μορφή Β να ευνοείται γενικά υπό φυσιολογικές συνθήκες. Παρ' όλα αυτά, ο ενεργειακός φραγμός μεταξύ των δύο μορφών είναι χαμηλός,^[8,9] και το DNA της μορφής Α μπορεί να επαχθεί υπό συνθήκες αφυδάτωσης^[10] και από πρωτεΐνες όπως η TBP.^[11,12] Παρομοίως, υπό συνθήκες υψηλής ιοντικής ισχύος ή δέσμωσης πρωτεϊνών (π.χ. ADAR11^[13,14]), επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες πουρίνης (Α ή G) - πυριμιδίνης (C ή T) μπορούν να σχηματίσουν μια τρίτη μορφή δίκλωνης τοπολογίας (μορφή Ζ, Σχήμα 2.3)^[15]. Σε αντίθεση με τις αντίστοιχες μορφές Α και Β, το DNA της μορφής Ζ έχει αριστερή αντί για δεξιά ελικοειδή περιστροφή και είναι το λιγότερο συμπαγές.

	A-DNA	B-DNA	Z-DNA
Πλάγια Όψη			
Ελικοειδής Στροφή	11 bp 25.3 Å	10.4 bp 35.4 Å	12 bp 45.6 Å
Διάμετρος	25.5 Å	23.7 Å	18.4 Å
Στρέψη	Δεξιόστροφη	Δεξιόστροφη	Αριστερόστροφη
Μεγάλη Αύλακα	Στενή βαθιά	Ευρεία	Επίπεδη
Μικρή Αύλακα	Ευρεία	Στενή	Στενή βαθιά
Άνω Όψη			

Σχήμα 2.3: Οι δομικές διαφορές μεταξύ του δίκλωνου DNA της μορφής Α, Β και Ζ. Οι εικόνες βασίζονται σε μελέτες NMR και κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ (440D,^[16] 4OCB,^[17] και 1BNA^[4] αντίστοιχα). bp: ζεύγος βάσεων.

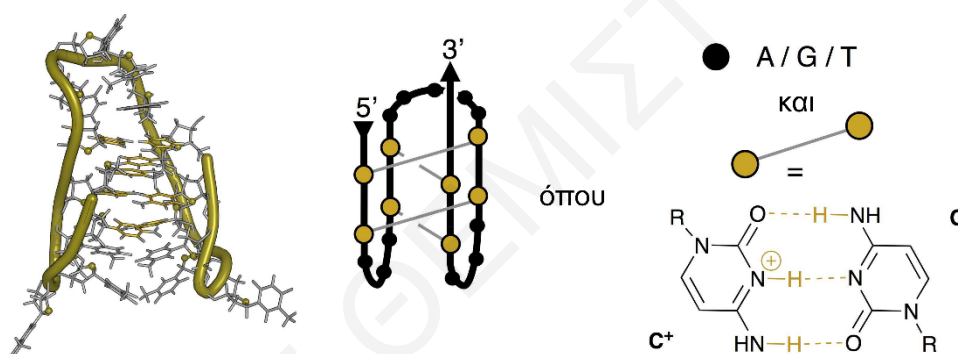
Ωστόσο, οι πιο συναρπαστικές τριτοταγείς δομές προκύπτουν από διαφορές στη δευτεροταγή δομή των νουκλεϊκών οξέων. Σε αντίθεση με τη σύζευξη βάσεων Watson-Crick, οι νουκλεοβάσεις μπορούν επίσης να σχηματίσουν δεσμούς υδρογόνου μέσω της σύζευξης βάσεων Hoogsteen. Για παράδειγμα, αυτό επιτρέπει σε μια τρίτη αλυσίδα

νουκλεϊκού οξέος να αλληλοεπιδράσει με δίκλωνο DNA/RNA. Οι προκύπτουσες δομές αναφέρονται ως τριπλές έλικες (Σχήμα 2.4). Από τους τρεις εμπλεκόμενους κλώνους, το στοιχείο Watson-Crick (διπλή έλικα) πρέπει να περιέχει έναν κλώνο πολυπουρίνης και πολυπυριμιδίνης (συνήθως ομοπολυμερή^[18]). Η τρίτη αλυσίδα μπορεί να είναι είτε πολυπουρίνη είτε πολυπυριμιδίνη, η οποία είναι προσανατολισμένη αντιπαράλληλα ή παράλληλα, αντίστοιχα, προς την κατεύθυνση 5' προς 3' της πολυπουρινικής αλυσίδας της διπλής έλικας. Στην περίπτωση του DNA, εάν αυτή η τρίτη αλυσίδα είναι άμεσα συνδεδεμένη με οποιαδήποτε από τις δύο αλυσίδες του στοιχείου Watson-Crick, η τριπλή έλικα αναφέρεται ως H-DNA. Γενικά, οι τριπλές έλικες είναι λιγότερο σταθερές από τις διπλές λόγω της ηλεκτροστατικής απόθησης μεταξύ των τριών πολυανιωνικών ραχοκοκαλιών και του βραδύτερου ρυθμού σχηματισμού τους.^[19] Επιπλέον, τα ζεύγη βάσεων Hoogsteen που περιλαμβάνουν κυτοσίνη απαιτούν την πρωτονιοποίησή της. Αυτό συμβαίνει σε pH (<6) χαμηλότερο από τις φυσιολογικές συνθήκες (~7.3), με αποτέλεσμα οι όξινες συνθήκες να ευνοούν το σχηματισμό της. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι το pKa της κυτοσίνης αυξάνεται σημαντικά κατά το σχηματισμό τριπλής έλικας (ελεύθερη βάση ~4.5 σε τριπλή έλικα ~9.0), υποδηλώνοντας έτσι ότι το σχηματιζόμενο ζεύγος βάσεων είναι ιδιαίτερα σταθερό.^[20] Παρά τη μεταβλητή σταθερότητά τους, οι τριπλές έλικες, όπου όλοι οι κλώνοι βασίζονται στο RNA, είναι σημαντικές για τη διατήρηση των RNA ψευδοκομβικών τριτοταγών δομών· οι δομές αυτές παίζουν κρίσιμο ρόλο σε διεργασίες όπως η καταλυτική δραστηριότητα του RNA και η μεταφραστική μετατόπιση του ριβοσωμικού πλαισίου.^[21,22]



Σχήμα 2.4: Η δομή διαλύματος του τρίκλωνου DNA (1D3X)^[23] και η σύζευξη βάσεων που εμπλέκεται.

Η σύζευξη βάσεων Hoogsteen μπορεί επίσης να συμβεί ανεξάρτητα από τη σύζευξη βάσεων Watson - Crick. Τα πιο χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι τα ζεύγη βάσεων κυτοσίνης - κυτοσίνης (Σχήμα 2.5) και οι τετράδες γουανίνης (Ενότητα 2.1). Το πρώτο παράδειγμα απαιτεί πρωτονίωση της κυτοσίνης και παρατηρείται κυρίως σε αλληλουχίες νουκλεϊκών οξέων πλούσιες σε C. Υπό όξινες συνθήκες (pH ~6), αυτές οι πλούσιες σε C αλυσίδες μπορούν να σχηματίσουν ζεύγη βάσεων κυτοσίνης - κυτοσίνης τα οποία διατρέχουν το ένα το άλλο. Η προκύπτουσα τετράκλωνη δομή αναφέρεται ως παρεμβαλλόμενη (intercalated) ή i-motif (Σχήμα 2.5). Ενδιαφέρον είναι ότι, υπό πανομοιότυπες συνθήκες, τα i-motifs του RNA αποσταθεροποιούνται σοβαρά σε σχέση με τη μορφή του DNA - με ανάλογο τρόπο με τα δίκλινα RNA της μορφής B, η 2' υδροξυλομάδα της ριβόζης του RNA δημιουργεί ανεπιθύμητες στερικές αλληλεπιδράσεις.^[24,25] Τα i-motifs είναι σταθερά μόνο σε όξινες συνθήκες και δεν σχηματίζονται σε φυσιολογικό pH και θερμοκρασία.^[26]

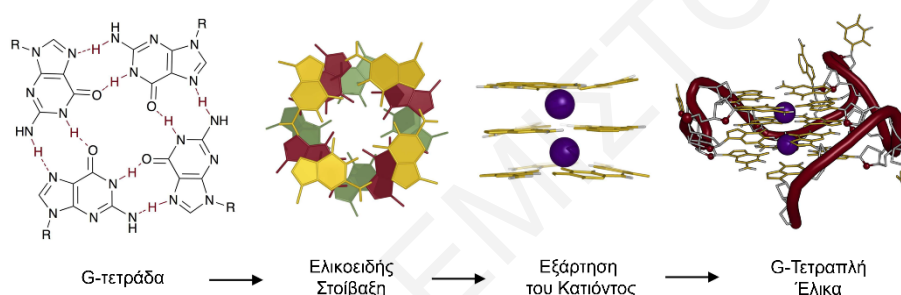


Σχήμα 2.5: Η δομή διαλύματος ενός i-motif (1A83),^[27] η σχηματική αναπαράστασή του και η βάση ζεύξης.

Από τις μη κανονικές δομές που έχουν παρουσιαστεί μέχρι σήμερα, η ύπαρξη και/ή η βιολογική λειτουργία του Z-DNA, των τριπλών ελίκων DNA και των i-motifs είναι οι πλέον αμφισβητούμενες. Αυτό οφείλεται στις συνθήκες τεχνητά υψηλής ιοντικής ισχύος ή χαμηλού pH που απαιτούνται για τον σταθερό σχηματισμό τους *in vitro*. Παρ' όλα αυτά, έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στην επικύρωση αυτών των δομών σε κυτταρικό πλαίσιο (Z-DNA,^[28] τριπλές έλικες^[29,30] και i-motif^[26]). Για παράδειγμα, μελέτες δείχνουν ότι ο σχηματισμός του i-motif από δίκλινο DNA διευκολύνεται από το σχηματισμό τριτοταγούς δομής στον πλούσιο σε G κλώνο (και αντίστροφα).^[31,32] Αυτό φαίνεται να αντισταθμίζει τις απαιτήσεις pH του i-motif και ελαχιστοποιεί την ενεργειακή ποινή που συνδέεται με την εκτύλιξη του δίκλινου DNA. Πράγματι, τα τελευταία χρόνια, οι τριτοταγείς δομές στον πλούσιο σε G κλώνο, οι τετραπλές έλικες γουανίνης, έχουν προσελκύσει σημαντική προσοχή και αποτελούν το επίκεντρο της εργασίας που περιγράφεται εδώ.

2.1. Τετραπλές Έλικες Γουανίνης

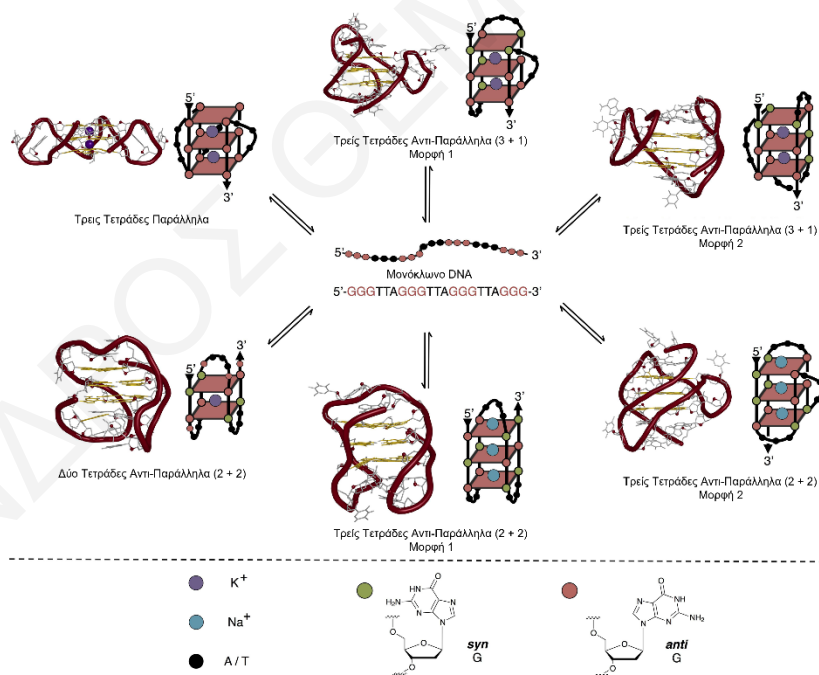
Τέσσερις γουανίνες μπορούν να αυτοσυναρμολογηθούν μέσω σύζευξης βάσεων Hoogsteen σε επίπεδες τετράδες. Αυτές οι τετράδες μπορούν στη συνέχεια να στοιβάζονται ελικοειδώς η μία πάνω στην άλλη για να μειώσουν την έκθεση των υδρόφοβων νουκλεοβάσεων στο τοπικό υδατικό περιβάλλον.^[33] Αυτό δημιουργεί ένα υψηλά φορτισμένο αρνητικό κεντρικό κανάλι λόγω της τετραγωνικής αντιπρισματικής διάταξης των καρβονυλικών ομάδων της γουανίνης. Ως αποτέλεσμα, η δομική ακεραιότητα εξαρτάται σημαντικά από την κατάληψη της κεντρικής κοιλότητας από κατιόντα. Όταν συνδυάζονται, οι ευνοϊκές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, οι αλληλεπιδράσεις van der Waals και οι δεσμοί υδρογόνου δημιουργούν μια εξαιρετικά σταθερή τριτοταγή δομή που ονομάζεται τετραπλή έλικα γουανίνης (G4, Σχήμα 2.6).



Σχήμα 2.6: Η δομή μιας τετραπλής έλικας γουανίνης. Η σύζευξη βάσεων Hoogsteen δημιουργεί G-τετράδες, οι οποίες στοιβάζονται ελικοειδώς η μία πάνω στην άλλη (κόκκινο, πράσινο και κίτρινο για κάθε στρώμα G-τετράδας) και εξαρτώνται καθοριστικά από μονοσθενή κατιόντα (στην προκειμένη περίπτωση κάλιο, μωβ) για τη σταθερότητά τους. Το παράδειγμα που παρουσιάζεται εδώ βασίζεται στα δομικά δεδομένα NMR μιας αλληλουχίας πλούσιας σε γουανίνη στον υποκινητή του γονιδίου *c-myc* που αναδιπλώνεται σε τετραπλή έλικα G (IXAV)^[34].

Οι τετραπλές έλικες G μπορούν να σχηματιστούν από μία, δύο ή τέσσερις αλυσίδες νουκλεϊκών οξέων (ολιγονουκλεοτίδια) πλούσιες σε γουανίνη. Σε βιολογικό πλαίσιο, ωστόσο, είναι πιθανό να προέρχονται από ένα μόνο σκέλος λόγω ευνοϊκής κινητικής ανεξάρτητης από τη συγκέντρωση. Ομοίως, ενώ μια σειρά μονοσθενών κατιόντων μπορεί να εγκλωβιστεί από τετραπλές έλικες G ($\text{Li}^+ < \text{NH}_4^+ < \text{Na}^+ < \text{K}^+$),^[35] σε φυσιολογικές συνθήκες μόνο το νάτριο και το κάλιο έχουν σημασία. Τα ιόντα νατρίου κάθονται κοντά ή στο κέντρο κάθε G-τετράδας και σχηματίζουν ισχυρότερους δεσμούς συντονισμού με τις καρβονυλικές ομάδες της γουανίνης από ό,τι τα ιόντα καλίου, τα οποία βρίσκονται μεταξύ δύο G-τετράδων λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους τους. Ωστόσο, η ενέργεια που απαιτείται για να μετατοπίσει το ολιγονουκλεοτίδιο τη σφαίρα ενυδάτωσης του νατρίου είναι μεγαλύτερη από εκείνη του καλίου.^[36] Αυτή η αλληλεπίδραση δυνάμεων σε συνδυασμό με τη χαμηλότερη κυτταρική αφθονία του νατρίου, έχει ως αποτέλεσμα οι τετραπλές έλικες να προτιμώνται να σχηματίζονται γύρω από κέντρα καλίου.

Το επόμενο βήμα της αναδίπλωσης ενός ολιγονουκλεοτιδίου στον εαυτό του είναι μια πιο σύνθετη διαδικασία (Σχήμα 2.7). Δεν μπορούν να ενσωματωθούν όλες οι νουκλεοβάσεις μέσα στις G-τετράδες. Ορισμένες παραμένουν ασύζευκτες και σχηματίζουν βρόχους ποικίλου μεγέθους, σύνθεσης και θέσης γύρω από την επιφάνεια της G-τετράδας. Επίσης, ενώνουν μεταξύ τους τις τέσσερις άκρες των στοιβαγμένων G-τετράδων. Οι ακμές αυτές μπορεί να είναι ευθυγραμμισμένες προς την ίδια (παράλληλες) ή αντίθετη κατεύθυνση (αντιπαράλληλες) μεταξύ τους. Αυτό εξαρτάται από τον σχετικό προσανατολισμό της νουκλεοβάσης σε σχέση με το σάκχαρο (*syn* ή *anti*) και δημιουργεί αύλακες διαφορετικού πλάτους γύρω από την επιφάνεια της G-τετράδας. Η τάση που προκαλείται από την ενδομοριακή αναδίπλωση προκαλεί επίσης την κάμψη και κλίση των τετράδων. Κατά συνέπεια, η συμμετρία των G-τετράδων σπάει και η επιπεδότητα διαταράσσεται ελαφρώς. Αυτό είναι πιο έντονο για τις εξωτερικές G-τετράδες λόγω της εγγύτητάς τους στους στερικά επιβαλλόμενους βρόχους. Συνολικά, αυτή η διαδικασία αναδίπλωσης επιτρέπει σε ένα ολιγονουκλεοτίδιο να υιοθετήσει δυναμικά πολλαπλές δομικά διαφορετικές διαμορφώσεις (πολυμορφισμός).^[37–39]



Σχήμα 2.7: Δομική και σχηματική αναπαράσταση του ποικίλου φάσματος διαμορφώσεων G-τετραπλής έλικας που υιοθετεί η ανθρώπινη τελομερική αλληλουχία (πολυμορφισμός). Οι δομές βασίζονται σε μελέτες NMR και κρυσταλλογραφικές μελέτες ακτίνων X των αλληλουχιών $d(A(GGGTTA)3GGG)$ (1KF1),^[40] $d(TA(GGGTTA)3GGG)$ (2JSM),^[41] $d(TA(GGGTTA)3GGGTT)$ (2JSL)^[41] [από πάνω αριστερά προς τα δεξιά αντίστοιχα], $d((GGGTTA)3GGGT)$ (2KF8),^[42] $d(A(GGGTTA)3GGG)$ (143D)^[43] και $d((TTAGGG)3TTA(BrG)GGTTA)$ (2MBJ)^[44] [από κάτω αριστερά προς τα δεξιά αντίστοιχα].

Προς το παρόν, είναι πολύ δύσκολο να προβλεφθεί η κύρια ενδομοριακή διαμόρφωση της G-τετραπλής έλικας που σχηματίζεται *in vitro*. Οι μόνοι καθιερωμένοι κανόνες βασίζονται

σε στερικά επιχειρήματα: οι μικροί βρόχοι μιας βάσης περιορίζουν τις διαμορφώσεις της G-τετραπλής έλικας στην εντελώς παράλληλη μορφή,^[45] ενώ απαιτούνται τουλάχιστον τρεις ή περισσότερες βάσεις για να περάσει ένας βρόχος διαγώνια από την πλευρά της G-τετράδας.^[46] Για πιο πολύπλοκες αλληλουχίες, δεν είναι δυνατόν να προβλεφθεί η κύρια διαμόρφωση. Για παράδειγμα, η ανθρώπινη τελομερική αλληλουχία d((GGGTTA)₃GGG) υιοθετεί τουλάχιστον έξι διαφορετικές διαμορφώσεις *in vitro* (Σχήμα 2.7).^[40,41,52,42-44,47-51] Κάθε δομή είναι θερμοδυναμικά σταθερή και προκαλείται από μικρές μεταβολές στις ακραίες 5' και 3' βάσεις που την πλαισιώνουν, τις τροποποιημένες βάσεις, το μέγεθος του βρόχου και το κατιόν που χρησιμοποιείται (νάτριο ή κάλιο). Κινητικές μελέτες έχουν αποκαλύψει ένα ευρύ φάσμα ενδιάμεσων καταστάσεων (π.χ. G-τριπλές έλικες) μέσω των οποίων οι G-τετραπλές έλικες διπλώνονται και ξεδιπλώνονται.^[53-56]

Ωστόσο, η λεπτή αλληλεπίδραση των κατιόντων, της ιοντικής ισχύος, της συγκέντρωσης του ολιγονουκλεοτιδίου, της σύνθεσης της αλληλουχίας και της θερμοκρασίας σε αυτή τη διαδικασία αποκρύπτει την ικανότητά μας να καθορίσουμε ποια μονοπάτια θα ευνοηθούν σε ένα δεδομένο πλαίσιο. Επί του παρόντος, ο μόνος προβλέψιμος τρόπος ελέγχου του πολυμορφισμού *in vitro* των G-τετραπλών ελίκων είναι μέσω της προσθήκης αφυδατικών παραγόντων (π.χ. αιθανόλη, ακετονιτρίλιο και πολυαιθυλενογλυκόλη)^[57] ή της παρουσίας συγκεκριμένου κατιόντος. Αυτοί οι συνδυασμοί ευνοούν την παράλληλη διαμόρφωση της G-τετραπλής έλικας για τις τελομερικές αλληλουχίες.^[58] Ωστόσο, το κατά πόσον αυτές οι συνθήκες είναι αντιπροσωπευτικές του κυτταρικού μοριακού συνωστισμού, και επομένως της δομής της G-τετραπλής έλικας *in vivo*, παραμένει εξαιρετικά αμφισβητούμενο.^[59,60]

Με βάση τα θερμοδυναμικά, κινητικά και δομικά δεδομένα που έχουν συλλεχθεί μέχρι σήμερα,^[46,61] είναι προφανές ότι οι G-τετραπλές έλικες είναι εξαιρετικά σταθερές και τοπολογικά ποικίλες σε φυσιολογικές συνθήκες *in vitro*. Ωστόσο, προκύπτουν δύο ερωτήματα - σχηματίζονται αυτές οι δομές σε ζωντανά κύτταρα και, αν ναι, τι ρόλο παίζουν;

2.2. Βιολογική Σημασία

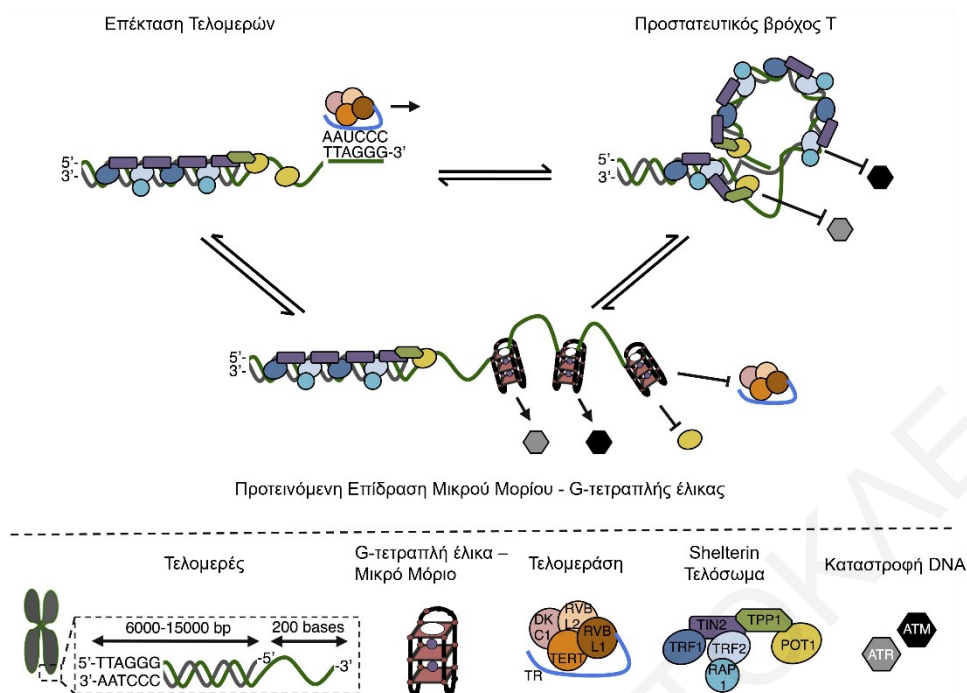
Για να αρχίσουμε να εξετάζουμε αυτά τα ερωτήματα, είναι χρήσιμο να εξετάσουμε για άλλη μια φορά τα δεδομένα *in vitro*. Υπάρχει ένα σαφές μοτίβο στα ολιγονουκλεοτίδια που σχηματίζουν ενδομοριακές G-τετραπλές έλικες. Οι περισσότεροι κλώνοι περιέχουν τέσσερις συνεχόμενες σειρές γουανίνης (δηλαδή κάθε σειρά συνεισφέρει μία γουανίνη ανά G-τετράδα) που ενώνονται μεταξύ τους με τρεις σύντομες σειρές βάσεων απροσδιόριστης σύνθεσης (δηλαδή βρόχους). Η συστηματική διερεύνηση του μεγέθους της σειράς γουανίνης και του μήκους των βρόχων έχει δείξει ότι οι G-τετραπλές έλικες τριών τετράδων

με βρόχους από μία έως επτά βάσεις σχηματίζουν τις πιο θερμοδυναμικά σταθερές G-τετραπλές έλικες.^[45,62,63] Επομένως, έχει προταθεί ότι αλληλουχίες της μορφής $d(G_3+N_1-7G_3+N_1-7G_3+N_1-7G_3+)$, όπου N = A, C, G ή T, θα αναδιπλωθούν σε G-τετραπλές έλικες.^[64,65]

Όπως συμβαίνει με κάθε κανόνα, υπάρχουν γνωστές εξαιρέσεις *in vitro* και, πιθανότατα, πολύ περισσότερες άγνωστες εξαιρέσεις *in vivo*. Για παράδειγμα, αποκλείονται οι σταθερές G-τετραπλές έλικες δύο και τεσσάρων τετράδων,^[42,66] καθώς και G-τετραπλές έλικες που ενσωματώνουν βάσεις από τους βρόχους ή τις πλευρικές βάσεις εντός των G-τετράδων.^[67] Ως εκ τούτου, ο κανόνας είναι πιθανό να υποεκτιμά το δυναμικό σχηματισμού G-τετραπλών ελίκων. Παρ' όλα αυτά, παρέχει ένα χρήσιμο σημείο εκκίνησης για την αξιολόγηση του κυτταρικού δυναμικού για G-τετραπλές έλικες. Η εφαρμογή του υποδηλώνει ότι υπάρχουν ~350.000 αλληλουχίες που σχηματίζουν G-τετραπλές έλικες στο ανθρώπινο γονιδίωμα.^[64,65] Είναι ενδιαφέρον ότι παρατηρήθηκε ότι οι αλληλουχίες αυτές είναι εμπλουτισμένες σε λειτουργικά σημαντικές περιοχές, όπως οι υποκινητές γονιδίων^[68] και οι αμετάφραστες περιοχές του RNA,^[69] υποδηλώνοντας έτσι έναν βιολογικό ρόλο. Επιπλέον, αυτό δεν λαμβάνει καν υπόψη τις υψηλής πυκνότητας επαναλήψεις της αλληλουχίας που μπορούν να βρεθούν στα τελομερή - την αρχική σπίθα για το ενδιαφέρον σε αυτές τις δομές.

2.2.1. Συντήρηση Τελομερών

Λειτουργικά, τα τελομερή είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της γενετικής ακεραιότητας.^[70,71] Βρίσκονται στα άκρα κάθε χρωμοσώματος και είναι επαναλήψεις έξι έως δεκαπέντε χιλιάδων ζευγών βάσεων της αλληλουχίας $d(TTAGGG)$. Ενώ η συντριπτική πλειονότητα του τελομερούς είναι δίκλωνη, μια μικρή περιοχή στο 3' άκρο είναι μονόκλωνη (~50-200 βάσεις). Δεδομένης της ευθραυστότητας του μονόκλωνου DNA στο εσωτερικό ενός κυττάρου, ολόκληρη η περιοχή περικλείεται από ένα προστατευτικό πρωτεϊνικό σύμπλεγμα. Αποτελείται από έξι συστατικά (TRF1, TRF2, POT1, RAP1, TIN2 και TPP1), το σύμπλοκο ονομάζεται shelterin ή τελόσωμα.^[72] Αλληλεπιδρά με πλήθος πρωτεϊνών για την καταστολή της απόκρισης σε βλάβη του DNA σταματώντας μονοπάτια μη ομόλογης σύνδεσης άκρων, διατηρώντας το μήκος του τελομερούς και προωθώντας το σχηματισμό βρόχου T^[73] ως μέσο περαιτέρω θωράκισης του τελομερούς της μονόκλωνης προεξοχής (Σχήμα 2.8).

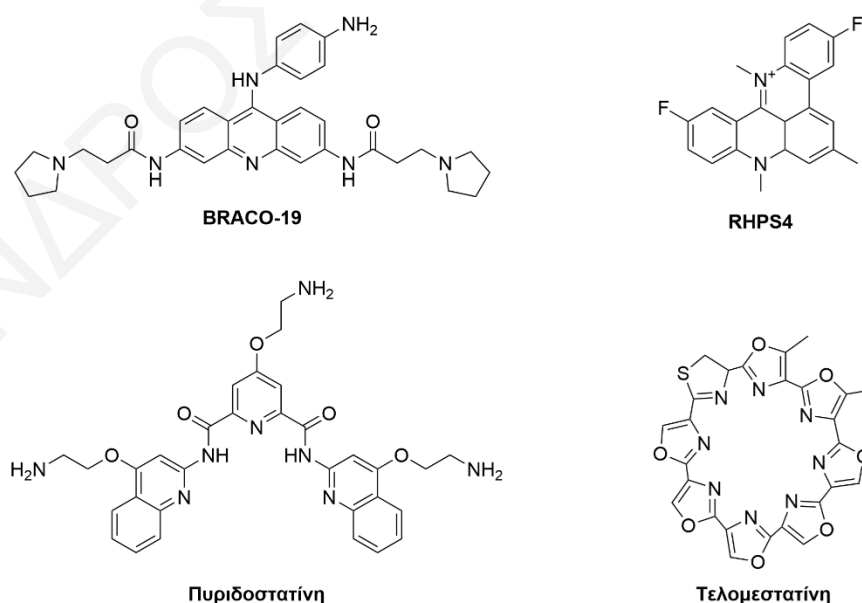


Σχήμα 2.8: Σχηματική επισκόπηση των τελομερών, των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με αυτά (ιδίως της shelterin και η τελομεράση), τις προστατευτικές δομές που μπορούν να υιοθετήσουν τα τελομερή (βρόχος T) και τέλος ο πιθανός ρόλος που μπορούν να διαδραματίσουν τα μικρά μόρια που σταθεροποιούν τα G4 σε αυτή την ισορροπία.

Από την άλλη πλευρά, κατά τη διάρκεια της φυσιολογικής κυτταρικής διαίρεσης, ~50-200 ζεύγη βάσεων χάνονται από το τελομερές σε κάθε κύκλο λόγω των αλληλεπιδράσεων των πρωτεϊνών που καταστρέφουν το DNA και του "προβλήματος της τελικής αντιγραφής". Όταν το μήκος του τελομερούς πλησιάζει ένα κρίσιμο επίπεδο (όριο Hayflick), τα κύτταρα παύουν να πολλαπλασιάζονται (αναπαραγωγική γήρανση) ή υφίστανται προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο (απόπτωση). Ωστόσο, στη συντριπτική πλειονότητα των καρκινικών κυττάρων (~85%), ένα σύμπλεγμα ριβοπρωτεϊνών που ονομάζεται τελομεράση εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό.^[74] Το σύμπλεγμα αυτό εξουδετερώνει την αποικοδόμηση του τελομερούς συνδέοντας *de novo* συντιθέμενες επαναλήψεις d(TTAGGG) στην προεξοχή 3' (Σχήμα 2.8), επιτρέποντας έτσι στα καρκινικά κύτταρα να πολλαπλασιάζονται επ' αόριστον. Κατά συνέπεια, οι μέθοδοι αναστολής της τελομεράσης έχουν διερευνηθεί ενεργά.

Αρχικές μελέτες *in vitro* διαπίστωσαν ότι τα oligονουκλεοτίδια που αναδιπλώνονται σε G-τετραπλές έλικες εξασθενούν την δέσμευση της τελομεράσης και κατά συνέπεια αναστέλλουν τη λειτουργία της.^[75] Ωστόσο, ο αυθόρμητος σχηματισμός G-τετραπλών ελίκων *in vivo* είναι απίθανος - το POT1, ένα συστατικό του τελοσώματος που δεσμεύει την προεξοχή 3', έχει αποδειχθεί ότι διακόπτει ενεργά το σχηματισμό G-τετραπλών ελίκων μέσω της παγίδευσης του μονόκλωνου DNA.^[76] Παρ' όλα αυτά, αυτές οι μελέτες υποδηλώνουν ότι οι σταθερές G-τετραπλές έλικες καθυστερούν τη λειτουργία του τελομερούς και διακόπτουν αυτή της τελομεράσης.

Για το σκοπό αυτό, οι *in vitro* μελέτες δείχνουν ότι οι ενώσεις που σταθεροποιούν τα G4 μπορούν επίσης να αναστέλλουν την τελομεράση μέσω αλληλεπιδράσεων με το DNA.^[77] Με τη σειρά της, η θεραπεία των κυττάρων με αυτές τις ενώσεις οδηγεί συνήθως σε μείωση του μήκους των τελομερών και σε επαγωγή γήρανσης (συνήθως >10 ημέρες).^[78] Ωστόσο, πολύ λίγες μελέτες τεκμηριώνουν αυτούς τους ισχυρισμούς για τα G4 με ορθογώνιες μεθόδους, δηλαδή διαφορετικές μέθοδοι για τη μέτρηση των ίδιων χαρακτηριστικών. Για τα τελομερικά G4, μια κοινή μέθοδος περιλαμβάνει την οπτικοποίηση της μετατόπισης του POT1. Αυτό έχει αποδειχθεί για λίγες επιλεγμένες ενώσεις (BRACO-19,^[79] RHPS4,^[80,81] πυριδοστατίνη^[82] και τελομεστατίνη,^[83] Σχήμα 2.9) και είναι πιο έντονο για την πυριδοστατίνη και την τελομεστατίνη, ενώσεις που αποτελούν σημεία αναφοράς για την εκλεκτικότητα του G4. Επιπλέον, οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι υπάρχει ταυτόχρονη αύξηση του δείκτη πρώιμης απόκρισης σε βλάβη του DNA γ H2AX, ο οποίος μπορεί να συσχετιστεί χαλαρά με τις εναπομείνουσες εστίες POT1 για την τελομεστατίνη. Παρόλο που αυτές οι ενώσεις δεν έχουν διερευνηθεί με το ίδιο βάθος, η δομική τους ποικιλομορφία υποδηλώνει ότι οι εκτός στόχου επιδράσεις είναι απίθανο να δημιουργήσουν παρόμοια συντονισμένη απόκριση, εκτός εάν αυτή σχετίζεται με τη G-τετραπλή έλικα. Όλες αυτές οι παρατηρήσεις, όταν συνδυάζονται, συνάδουν σε μεγάλο βαθμό με την υπόθεση ότι τα G4 υπάρχουν στην προεξοχή 3' των τελομερών και ότι η σταθεροποίησή τους διαταράσσει τη διατήρηση των τελομερών.



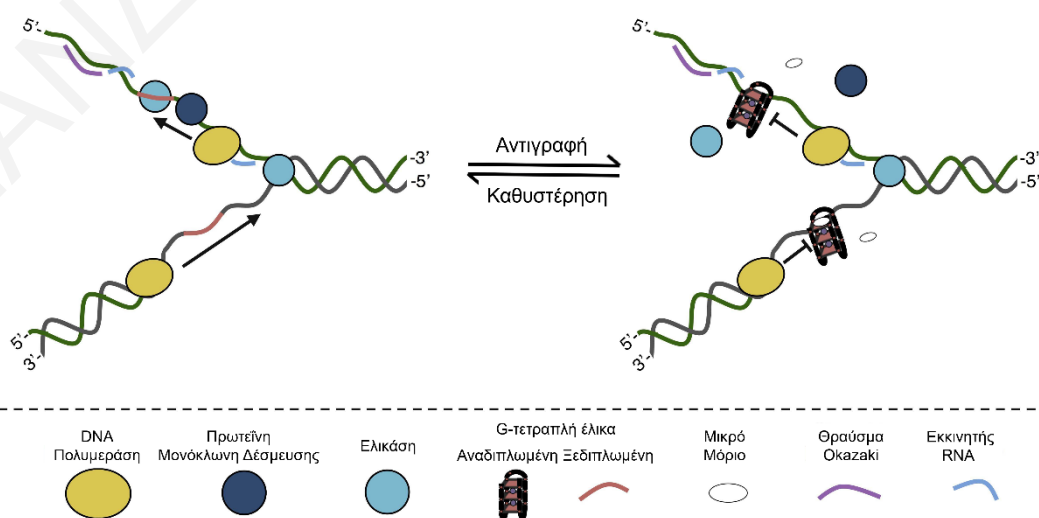
Σχήμα 2.9: Η μοριακή δομή των προσδετών G4 BRACO-19, RHPS4, πυριδοστατίνης και τελομεστατίνης.

Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι η τελομεστατίνη επάγει την απομάκρυνση της πρωτεΐνης TRF2 από τα τελομερή. Αυτό θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα της μετατόπισης του POT1

και της επακόλουθης αποσταθεροποίησης του συμπλόκου του τελομερούς στο σύνολό του - το πιο ενδιαφέρον είναι ότι αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στη σταθεροποίηση των G4 στις δίκλωνες περιοχές. Πράγματι, μελέτες της μη τελομερικής αντιγραφής του DNA υποστηρίζουν την ιδέα ότι τα G4 μπορούν να υπάρχουν σε περιοχές διπλού κλώνου.

2.2.2. Αντιγραφή DNA

Κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης, το DNA ξετυλίγεται παροδικά για να διευκολύνει την αντιγραφή. Δεδομένου ότι η DNA πολυμεράση δρα με κατεύθυνση 5' προς 3' και ότι οι δύο αλυσίδες του δίκλωνου DNA είναι προσανατολισμένες με ένα αντιπαράλληλο τρόπο, μόνο το ένα σκέλος αντιγράφεται συνεχώς. Η άλλη πρέπει να σχηματίζεται από μικρότερα θραύσματα "Okazaki" (~100-200 βάσεις) που εν συνεχεία ενώνονται μεταξύ τους. Και στις δύο περιπτώσεις, οι περιοχές του DNA είτε μπροστά από την πολυμεράση (μικρότερες) είτε κοντά στη θέση έναρξης του θραύσματος Okazaki (μεγαλύτερες), είναι μονόκλωνες. Όπως σημειώθηκε προηγουμένως, αυτή είναι μια δυσμενής κατάσταση για το DNA και ως εκ τούτου οι μεγαλύτερες περιοχές συνήθως περικλείονται από μονόκλωνες πρωτεΐνες δέσμευσης DNA. Ωστόσο, ο παροδικός χρόνος κατά τον οποίο το DNA είναι μονόκλωνο θα μπορούσε να προάγει το σχηματισμό G-τετραπλής έλικας (Σχήμα 2.10). Ωστόσο, μελέτες *in vitro* έχουν δείξει ότι οι δομές αυτές καθυστερούν τις πολυμεράσες του DNA,^[84] γεγονός που σημαίνει ότι η γενετική σταθερότητα θα επηρεαστεί αρνητικά.. Κατά συνέπεια, εάν υπήρχαν G4 *in vivo*, τα κύτταρα θα χρειαζόνταν έναν μηχανισμό για την καταπολέμηση του σχηματισμού τους. Ενθαρρυντικό είναι ότι έχουν εντοπιστεί πρωτεΐνες ελικάσης (π.χ. CHL1,^[85] BLM,^[86] FANCIJ^[87,88] και WRN^[89]) οι οποίες ξεδιπλώνουν τη δομή G-τετραπλής έλικας *in vitro*.



Σχήμα 2.10: Σχηματική αναπαράσταση της καθυστέρησης της αντιγραφής του DNA που προκαλείται από G4 και τους πιθανούς ρόλους που θα μπορούσαν να διαδραματίσουν οι ελικάσες και τα μικρά μόρια που σταθεροποιούν τα G4.

Από αυτές τις ελικάσες, η PIF1 είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική σε αυτή τη διαδικασία. Αποδείξεις για την κυτταρική της λειτουργία διερευνήθηκαν με ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (ChIP) στους *Saccharomyces cerevisiae*.^[90] Ένα μετάλλαγμα της PIF1 με καταργημένη δραστικότητα ελικάσης αλλά ταυτόσημη εξειδίκευση αλληλουχίας με τον άγριο τύπο αποδείχθηκε ότι συν-τοποθετείται με αλληλουχίες που σχηματίζουν G4. Αυτός ο εμπλουτισμός (~10%) ήταν στατιστικά σημαντικός και διασταυρώθηκε με τη συσσώρευση DNA πολυμεράσης σε μερικώς ανεπαρκή PIF1 κύτταρα (~50% επικάλυψη των περιοχών). Ωστόσο, η σχετικά μεγάλη διαφορά στο μέγεθος των αποτυπωμάτων ChIP (~500 bp) και του μήκους της αλληλουχίας G4 (~25 βάσεις) αποκλείει τον προσδιορισμό της ακριβούς αλληλουχίας που εμπλέκεται. Αντ' αυτού, εντοπίστηκε μια σειρά πιθανών επικαλυπτόμενων στόχων. Περαιτέρω μελέτες σε κύτταρα με ανεπαρκή PIF1 έδειξαν ότι σπασίματα της διπλής αλυσίδας συμβαίνουν κοντά σε θέσεις G4 και προκαλούν ανασυνδυασμό του DNA.^[91] Πρόσφατα αναφέρθηκε παρόμοια δραστηριότητα ελικάσης σε ανθρώπινα κύτταρα. Οι ελικάσες XPB και XPD αποδείχθηκε ότι ξετυλίγουν τα G4 *in vitro* και εντοπίζονται με ~40% των αλληλουχιών G4 σε κύτταρα (ChIP, ≤ 1000 bp). Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε ταυτόχρονη προκατάληψη GC στην ελικάση δέσμευσης. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η μελέτη αυτή επεκτείνει τη γενική αναδίπλωση των G4 της ακολουθίας με μέγεθος βρόχου σε δώδεκα, εισάγοντας έτσι μεγαλύτερη μεροληψία για τη σύνδεση G4-ελικάσης από τις μελέτες PIF1. Παρ' όλα αυτά, τα παρόμοια αποτελέσματα ενισχύουν το αξίωμα ότι τα G4 υπάρχουν και ότι μπορούν να προκαλέσουν γενετική αστάθεια.

Αντιφατικά, έχει επίσης υποτεθεί ότι τα G4 προάγουν την αντιγραφή του DNA. Η βάση αυτού του επιχειρήματος προέρχεται από μια έρευνα σχετικά με τη θέση των θέσεων προέλευσης αντιγραφής σε όλο το γονιδίωμα.^[92] Από τις ~250.000 θέσεις που αποκαλύφθηκαν, το ~67% βρέθηκε να βρίσκεται σε κοντινή απόσταση από αλληλουχίες αναδίπλωσης τετραπλών ελίκων (≤ 2000 bp). Σε γενικές γραμμές, οι περιοχές αυτές είναι πλούσιες σε GC και εμφανίζουν προτίμηση σε μοτίβα G4 έναντι άλλων γονιδιωματικών στοιχείων (π.χ. νησίδες CpG και περιοχές έναρξης μεταγραφής). Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η προτίμηση αυτή είναι μικρότερη από ό,τι προτείνεται όταν λαμβάνεται υπόψη η σχετική συχνότητα αυτών των στοιχείων. Ενώ η μεθοδολογία θα μπορούσε επίσης να αποτελέσει αντικείμενο σε αναστολή της αντιγραφής από τετραπλές έλικες G, αυτό δεν φαίνεται να συμβαίνει, καθώς η συχνότητα των G4 είναι μεγαλύτερη στο σημείο προέλευσης και μειώνεται σταδιακά με την αύξηση της απόστασης.

Προκειμένου να συμβιβαστούν τα δύο μοντέλα αντιγραφής του DNA, είναι ίσως καλύτερο να θεωρηθούν τα G4 ως ένα "αναγκαίο κακό" - παρά το γεγονός ότι προκαλούν

καθυστέρηση της αντιγραφής, μπορεί να είναι ενεργειακά πιο ευνοϊκό να ξετυλίγονται αυτές οι δομές όταν είναι απαραίτητο, παρά να ξετυλίγεται το σχετικό μοτίβο του δίκλωνου συμπλέγματος. Πράγματι, αυτή η επιχειρηματολογία υπονοεί ότι τα G4 μπορεί να σχηματίζονται αυθόρμητα κατά προτίμηση στην τοπολογία του δίκλωνου. Αυτό έχει παρατηρηθεί *in vitro*^[93] και θα μπορούσε να διευκολυνθεί από το σχηματισμό του i-motif στην συμπληρωματική αλυσίδα πλούσια σε C.^[31,32] Επιπλέον, αν αναλογιστεί κανείς τον τρόπο με τον οποίο πακετάρεται το DNA στα κύτταρα, μπορεί να βρεθεί περαιτέρω υποστήριξη για αυτό το αξίωμα.

Αν ένα απλό χρωμόσωμα ήταν τοποθετημένο ως ένα γραμμικό δίκλωνο, θα είχε μήκος ~4.3 cm. Δεδομένου ότι τα κύτταρά μας έχουν μήκος ~20 μm, είναι προφανές ότι το DNA υπάρχει σε πιο συμπυκνωμένη μορφή. Αυτό επιτυγχάνεται με το τύλιγμα του DNA γύρω από πρωτεΐνες που ονομάζονται ιστόνες. Ως αποτέλεσμα, αυτό θέτει τις περιοχές του δίκλωνου DNA μεταξύ των ιστονών υπό τάση. Προκειμένου να ανακουφιστεί αυτή η τάση και να διατηρηθεί ο ιδανικός αριθμός ζευγών βάσεων ανά ελικοειδή στροφή (~10.5), οι μακρές περιοχές της διπλής έλικας συστρέφονται η μία πάνω στην άλλη σχηματίζοντας μη γραμμικούς βρόχους ή υπερσπειρές (Σχήμα 2.11). Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε υπερτυλιγμένες θετικές υπερσπειρές ή υποτυλιγμένες αρνητικές υπερσπειρές. Η αρνητική υπερσπειρώση διευκολύνει τον διαχωρισμό των κλώνων και δημιουργείται ως γενική συνέπεια της περιτύλιξης του DNA γύρω από τις ιστόνες.^[94] Ενώ αυτή η καταπόνηση ανακουφίζεται στο σύνολό της από πρωτεΐνες (τοποϊσομεράσες), εστίες υπερσπειρωμένου DNA παραμένουν λόγω της ανομοιογενούς κατανομής των τοποϊσομερασών.^[95] Επομένως, αυτό θα μπορούσε να επιτρέψει τον αυθόρμητο σχηματισμό τετραπλών ελίκων G *in vivo*. Αποδείξεις για αυτό μπορούν να βρεθούν σε μελέτες που διερευνούν το ρόλο των G4 στη γονιδιακή έκφραση.

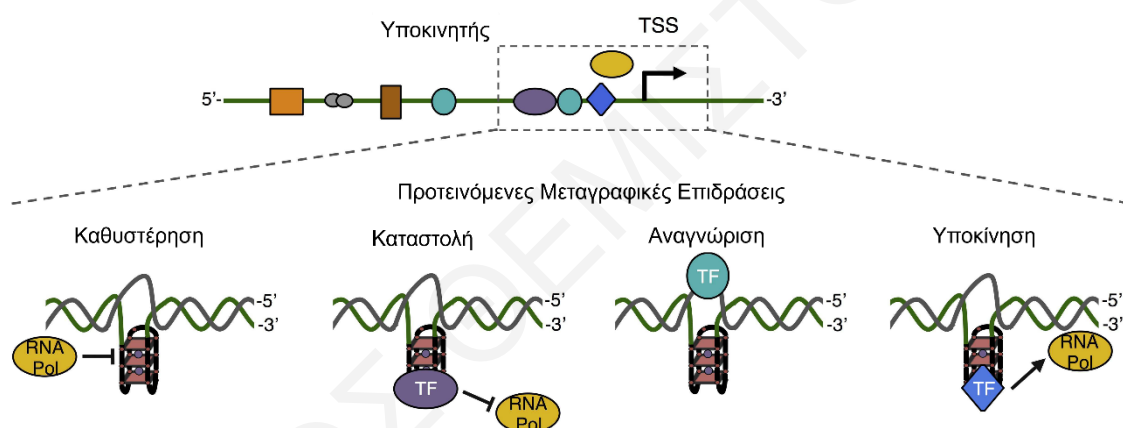


Σχήμα 2.11: Σχηματική αναπαράσταση της συστρώφης και του υπερσπειρώματος της διπλής έλικας του DNA.

2.2.3. Γονιδιακή έκφραση

Το πρώτο επίπεδο γονιδιακής έκφρασης - η μεταγραφή - ελέγχεται από γονιδιωματικά στοιχεία που ονομάζονται υποκινητές ή προαγωγοί. Αυτή η αλληλουχία των ~2000 bp που

βρίσκεται γενικά πριν από τη θέση έναρξης της μεταγραφής (και μερικές φορές επικαλύπτεται), περιέχει θέσεις πρόσδεσης για πολλές ρυθμιστικές πρωτεΐνες (παράγοντες μεταγραφής). Κατά τη διαδικασία της μεταγραφής, η RNA πολυμεράση συνδέεται με το DNA κοντά στην αρχή της μεταγραφικής περιοχής. Ωστόσο, λόγω του σχετικά μεγάλου μεγέθους της, δεν μπορεί να συστραφεί γύρω από την έλικα του DNA. Αντιθέτως, το DNA πρέπει να περάσει μέσα από αυτήν. Αυτό δημιουργεί τοπική αρνητική υπερσπείρωση πριν από την πολυμεράση δηλαδή στον υποκινητή.^[96] Κατά συνέπεια, η γονιδιακή έκφραση θα μπορούσε ενδεχομένως να ρυθμίζεται από μια πολύπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ υπερσπείρωσης του DNA, δέσμευσης μεταγραφικών παραγόντων/πρωτεϊνών και σχηματισμού G4/i-motif (Σχήμα 2.12). Καθοριστικό ρόλο στην υπόθεση αυτή παίζει ο σχηματισμός σταθερών G4, είτε μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών ή με υπερσπείρωση του DNA.



Σχήμα 2.12: Σχηματική αναπαράσταση των υποκινητών γονιδίων και των υποτιθέμενων ρόλων που παίζουν οι G τετραπλές έλικες στην καθοδηγούμενη από τον υποκινητή γονιδιακή έκφραση. TF = μεταγραφικοί παράγοντες. TSS = θέση έναρξης μεταγραφής.

Για να τεκμηριωθούν οι ισχυρισμοί για το τελευταίο, έχουν χρησιμοποιηθεί ενζυμικοί και χημικοί ανιχνευτές για τον εντοπισμό G4 σε αρνητικά υπερσπειρωμένο μικρό κυκλικό DNA (πλασμίδια).^[31,97] Αυτές οι μελέτες *in vitro* βασίζονται στο σχηματισμό G4 που αναστέλλει την ενζυμική διάσπαση του DNA από νουκλεάσες ή μειώνει την ευαισθησία της θέσης N7 της γουανίνης στη μεθυλίωση αντίστοιχα. Είναι ενδιαφέρον ότι αυτά τα «αποτυπώματα» αποκαλύπτουν ότι οι γουανίνες που εμπλέκονται στα πλασμιδιακά G4 δεν είναι οι ίδιες με εκείνες που εμπλέκονται στα ολιγονουκλεοτιδικά G4. Επομένως, αυτό σημαίνει ότι η υπερσπείρωση πρέπει να λαμβάνεται με ακρίβεια υπόψη *in vitro* για τον προσδιορισμό της δομής των G4 *in vivo*. Είναι ενδιαφέρον ότι για το c-myc,^[31] το i-motif στο συμπληρωματικό σκέλος πλούσιο σε C αξιολογήθηκε και παρατηρήθηκε επίσης - η σύζευξη βάσεων i-motif θα μπορούσε ενδεχομένως να αντισταθμίσει την ενεργειακά δυσμενή διαδικασία της διατάραξης της σύζευξης βάσεων Watson-Crick. Επιπλέον, για τον VEGF,

τα αποτυπώματα χρωμοσωμικού DNA σε ζωντανά κύτταρα της αλληλουχίας που σχηματίζει G4 είναι σχετικά συνεπή με εκείνα που παρατηρήθηκαν σε πλασμίδια, αν και με πολύ μικρότερη σαφήνεια.^[98] Ενώ αυτά τα αποτελέσματα είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά, τα αποτυπώματα G4 έχουν αποδειχθεί μόνο για δύο γονίδια (c-myc και VEGF). Συνεπώς, δεν είναι σαφές πόσο γενικό είναι αυτό το αποτέλεσμα σε σχέση με άλλα μοτίβα G4. Παρομοίως, ενώ μελέτες υψηλής ευαισθησίας για την απόσβεση φθορισμού ενός μορίου δείχνουν ότι η υπερσπείρωση μπορεί να μην είναι καν απαραίτητη για το σχηματισμό G4, αφού μόνο ένα παράδειγμα έχει διερευνηθεί μέχρι σήμερα (c-kit).^[99]

Από την άλλη πλευρά, η υποστήριξη για τις αλληλεπιδράσεις G4-πρωτεΐνης προαγωγού είναι ελαφρώς πιο ισχυρή αλλά εξίσου περιορισμένη όσον αφορά το πεδίο εφαρμογής. Διαφόρων ειδών μελέτες έχουν απομονώσει μια χούφτα πρωτεϊνών (CNBP,^[100] νουκλεολίνη,^[101] MAZ,^[102,103] Sp1,^[104] hPRAP1,^[105,106] hnRNPA^[107]) που αλληλεπιδρούν με μερικά επιλεγμένα G4 υποκινητών (ckit,^[104,105] c-myb,^[102] c-myc,^[100,101,105] HRAS^[103] και KRAS^[106-108]). Από αυτές τις πρωτεΐνες, οι τρεις πρώτες σταθεροποιούν τα G4, οι δύο δεύτερες αναγνωρίζουν δυνητικά τα G4 (με την hPRAP1 να ενεργοποιείται λειτουργικά κατά τη σύνδεσή της) και η τελευταία να διαταράσσει το σχηματισμό G4. Η ποικιλία των ρόλων που διαδραματίζουν αυτές οι πρωτεΐνες στον έλεγχο της δομής των G4 του υποκινητή προσθέτει βαρύτητα στον ισχυρισμό ότι αυτές οι δομές υπάρχουν *in vivo*. Επιπλέον, υποδηλώνει ότι τα G4 μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη λεπτομερή ρύθμιση των επίπεδων mRNA.

Με αυτό το σκεπτικό, μια ποικιλία γονιδίων έχει διερευνηθεί για τις επιδράσεις των G4 με τη χρήση αναμεταδόσεων.^[66,102,115-120,103,106,109-114] Ο στόχος αυτών των μελετών είναι συνήθως η αξιολόγηση του ρόλου ενός συγκεκριμένου μοτίβου G4 μέσω ελεγχόμενης τροποποίησης του υποκινητή άγριου τύπου. Ένα πλασμίδιο που φέρει αυτό το υποκινητή εισάγεται στη συνέχεια σε κύτταρα και παρακολουθείται η γονιδιακή έκφραση. Αυτό συνήθως διασταυρώνεται με αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση μετά από επεξεργασία με μια σταθεροποιητική ένωση G4 μέσω της μελέτης αναφοράς, της έκφρασης εγγενών πρωτεϊνών ή/και των εγγενών επιπέδων mRNA. Γενικά, οι μελέτες αυτές διαπίστωσαν ότι η διακοπή του μοτίβου G4 οδηγεί σε ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και ότι οι προσδέτες G4 προκαλούν μείωση της γονιδιακής έκφρασης (Πίνακας 2.1). Συνολικά, αυτό υποδηλώνει ότι τα G4 αναστέλλουν την έκφραση γονιδίων.

Δεδομένης της προσαρμοστικότητας των δοκιμασιών αναφοράς γονιδίων, έχουν επίσης αξιολογηθεί τα G4 RNA στις αμετάφραστες περιοχές 5' (UTR).^[121-130] Λειτουργικά, είναι

πιθανό να ρυθμίζουν την πρωτεϊνική έκφραση (μετάφραση) μέσω της μεταβολής της πρωτεϊνικής σύνδεσης ή της διαταραχής της πολυριβικής ένωσης.^[131] Επιπλέον, σε αντίθεση με τα G4 υποκινητή, είναι λιγότερο επιρρεπή στον ανταγωνισμό των δίκλωνων λόγω της έλλειψης συμπληρωματικού κλώνου. Οι μελέτες αυτές αποκαλύπτουν ότι η μετάλλαξη των αλληλουχιών G4 προκαλεί θετική ρύθμιση της συνολικής έκφρασης των πρωτεϊνών, ενώ οι προσδέτες που σταθεροποιούν τα G4 προκαλούν μείωση της έκφρασης.

Το πιο ενδιαφέρον είναι ότι, κατά περίπτωση, αυτές οι μελέτες έχουν χρησιμοποιηθεί για να διερευνήσουν την επεξεργασία του RNA μέσω του σχηματισμού G4 στο εσώνιο.^[132,133] Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι ενώ τα συνολικά επίπεδα του αγγελιοφόρου RNA (mRNA) δεν επηρεάζονται, συγκεκριμένες παραλλαγές σύνδεσης μπορούν να ρυθμίζονται προς τα πάνω ή προς τα κάτω. Επομένως, τα G4 μπορεί να είναι σε θέση να ελέγχουν τα συνολικά επίπεδα πρωτεΐνης (επίδραση με βάση το UTR) και επίσης να ρυθμίζουν συγκεκριμένες πρωτεϊνικές παραλλαγές (επίδραση με βάση το εσώνιο). Όταν συνδυάζεται με μελέτες αναφοράς με βάση τη μεταγραφή, είναι προφανές ότι τα G4 θα μπορούσαν να αποτελέσουν πολύ ελκυστικούς στόχους για το σχεδιασμό φαρμάκων.

Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχουν εγγενείς περιορισμοί σε αυτή τη μεθοδολογία. Πρώτον, η παροδική υπερέκφραση ενός εξωγενούς γονιδίου αναφοράς μπορεί να μεταβάλει τη φυσιολογική κυτταρική λειτουργία και τη γονιδιακή ρύθμιση - δεύτερον, για τη μεταγραφή, οι δοκιμασίες γονιδίων αναφοράς δεν μπορούν να αναπαράγουν με ακρίβεια την τοπική δομή του DNA του φυσικού υποκινητή- τρίτον, οι μεταλλάξεις που αφορούν συγκεκριμένες αλληλουχίες μπορεί να μην αναστέλλουν απαραίτητα τον κυτταρικό σχηματισμό G4 και, τέλος, πολλαπλές μελέτες βασίζονται σε ένα μόνο προσδέτη σταθεροποίησης G4 για διασταυρούμενη επικύρωση, αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα παρατήρησης επιδράσεων εκτός στόχου. Ανάλογα με τη μελέτη, ορισμένα από αυτά τα σημεία αντιμετωπίζονται ενώ άλλα όχι. Κατά συνέπεια, προκύπτουν ορισμένα γονίδια που είναι περισσότερο "επικυρωμένα" από άλλα.

Πίνακας 2.1: Περίληψη υποκινητών G4 και των λειτουργικών αναλύσεων που πραγματοποιήθηκαν για την επικύρωση του ρόλου τους. Τα ποσοστά των αναλύσεων αναφέρονται στη μεταβολή της έκφρασης μετά από μεταλλάξεις της αλληλουχίας ή επεξεργασία υπερέκφρασης του προσδέτη/πρωτεΐνης G4 σε σχέση με τον άγριο τύπο ή τον μη επεξεργασμένο έλεγχο. RGA = ανάλυση γονιδίου αναμεταδότη. RT-(q)PCR = αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφή (ποσοτική).

Γονίδιο	<i>c-kit</i> ^[113]
Αλληλουχία	5'-(G) ₃ A(G) ₃ CGCT(G) ₃ AGGA(G) ₄ -3' & 5'-(G) ₃ C(G) ₃ CGCGA(G) ₃ A(G) ₃ -3'
Αναλύσεις	Benzo[a]phenoxazine – RGA (40%), RT-qPCR (40%)
Γονίδιο	<i>c-myc</i> ^[102]
Αλληλουχία	5'-[(G) ₂ A] ₄ AG[A(G) ₂] ₄ CACT[(G) ₂ A] ₃ (G) ₂ -3'
Αναλύσεις	G4 _{Mut} – RGA (300–500%) MAZ – RGA (50%)
Γονίδιο	<i>c-myc</i> ^[109,112,120,134]
Αλληλουχία	5'-(G) ₄ A(G) ₃ T(G) ₄ A(G) ₃ T(G) ₄ -3'
Αναλύσεις	G4 _{Mut} – RGA (300%) TMPyP4 – RGA (50%) MM45 – RT-PCR (25%) Διάφορες άλλες ουσίες
Γονίδιο	<i>HIF-1α</i> ^[118]
Αλληλουχία	5'-(G) ₃ C(G) ₅ AGA(G) ₄ A(G) ₄ -3'
Αναλύσεις	G4 _{Mut} – RGA (70%)
Γονίδιο	<i>HRAS</i> ^[103]
Αλληλουχία	5'-(G) ₃ CAC(G) ₃ ACGC(G) ₃ CGTT(G) ₃ -3' & 5'-(G) ₅ C(G) ₅ C(G) ₄ C(G) ₄ -3'
Αναλύσεις	G4 _{Mut} – RGA (500%) ADPT-1 – RGA (50%)
Γονίδιο	<i>KRAS</i> ^[106,108,114]
Αλληλουχία	5'-(G) ₅ AGAA(G) ₃ AGAA(G) ₃ TGTGGC(G) ₃ -3'
Αναλύσεις	G4 _{Mut} – RGA (50–70%) Zn-DIGP/DIGP – RGA (200%) TMPyP4 – RGA (20%), RT-qPCR (80%) MAZ – RGA (120%)
Γονίδιο	<i>PDGF-A</i> ^[66]
Αλληλουχία	5'-(G) ₁₃ C(G) ₅ C(G) ₅ C(G) ₅ A(G) ₄ -3'
Αναλύσεις	TMPyP4 – RGA (40%)
Γονίδιο	<i>RET</i> ^[115]
Αλληλουχία	5'-(G) ₃ TA(G) ₄ C(G) ₄ C(G) ₄ C(G) ₅ -3'
Αναλύσεις	G4 _{Mut} – RGA (250%) NSC194598 – RGA (40%), RT-PCR (10%)
Γονίδιο	<i>TKI</i> ^[117]
Αλληλουχία	5'-(G) ₂ TC(G) ₂ CGC(G) ₃ AACCA(G) ₄ -3' & 5'-(G) ₂ CCCCAT(G) ₂ C(G) ₂ C(G) ₄ CC(G) ₂ -3'
Αναλύσεις	G4 _{Mut} – RGA (200%)

Ολοένα και περισσότερα στοιχεία δείχνουν ότι η θέση των G4 εντός ενός γονιδίου δεν είναι τόσο σημαντική όσο επιστεύετο αρχικά.^[134,135] Αντίθετα, ένα πιο σημαντικό

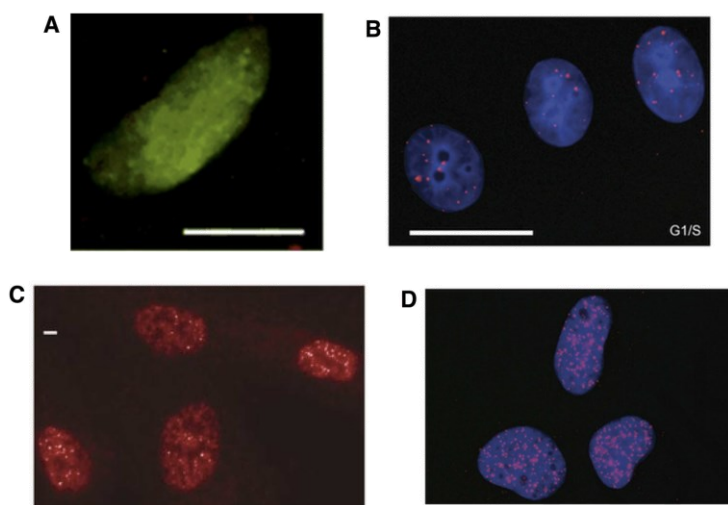
χαρακτηριστικό φαίνεται να είναι η πυκνότητα / ο συνολικός αριθμός των αλληλουχιών που σχηματίζουν G4 εντός ενός γονιδίου. Αυτό βασίζεται στην παραδοχή ότι η μεταγραφή / μετάφραση μπορεί να ανασταλεί από αυτές τις δομές με τρόπο ανάλογο με εκείνους που υπάρχουν κατά την αντιγραφή του DNA. Ένα κορυφαίο παράδειγμα αυτού περιλαμβάνει την επέκταση της αλληλουχίας που σχηματίζει G4 d(GGGGCC) στο γονίδιο C9orf72.^[135] Αυτό έχει ως αποτέλεσμα περισσότερα αποτυχημένα μεταγράμματα C9orf72 *in vitro* που μπορούν να ανιχνευθούν σε ασθενείς *in vivo*. Είναι ενδιαφέρον ότι η μελέτη αυτή καταδεικνύει επίσης ότι τα μεταγραφώματα RNA μπορεί να περιέχουν ορισμένες από τις επαναλήψεις. Αυτό υποδηλώνει ότι η RNA πολυμεράση ανακόπτεται από ένα συσσωρευμένο εμπόδιο που περνάει μέσα από πολλαπλές δομές G4. Επιπλέον, τα προκύπτοντα μοτίβα G4 του RNA αποδείχθηκε ότι αναγνωρίζονται από περισσότερες από 288 πρωτεΐνες. Δύο συγκεκριμένα - η νουκλεολίνη και η RPL7 - εμφάνισαν ισχυρές αλληλεπιδράσεις με αυτά τα G4. Όπως σημειώθηκε προηγουμένως, η νουκλεολίνη έχει αποδειχθεί ανεξάρτητα ότι αλληλεπιδρά με άλλα G-τετράπλευρα. Σε αυτό το πλαίσιο, ο λανθασμένος εντοπισμός της νουκλεολίνης συσχετίστηκε καλά με ασθενείς που περιείχαν πολλαπλά αντίγραφα της αλληλουχίας G4, υποδεικνύοντας έτσι ότι τα G4 διαδραματίζουν λειτουργικό ρόλο *in vivo*.

Μελέτες σταθεροποιητικών προσδετών G4 τεκμηριώνουν περαιτέρω το σημείο αυτό. Το μικρό μόριο πυριδοστατίνη έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί βλάβη στο δίκλωνο DNA.^[134] Τα σχετικά σήματα γH2AX συνδέονταν στενά με αλληλουχίες που σχηματίζουν G4 (ChIP, ≤300 bp), ενώ φθορίζοντα επισημασμένα ανάλογα της ένωσης συν-εντοπίστηκαν με την ελικάση PIF1 που ξεδιπλώνει το G4. Επιπλέον, τα επίπεδα mRNA του κατεστραμμένου γονιδίου ρυθμίστηκαν προς τα κάτω ανάλογα με την πυκνότητα των αλληλουχιών που σχηματίζουν G4 εντός του γονιδίου, κατά τρόπο ανάλογο με τις μελέτες για το C9orf72. Κατά συνέπεια, αυτές οι ορθογώνιες σειρές αποδείξεων υποστηρίζουν το προαναφερθέν αξίωμα και, σε συνδυασμό με τις προαναφερθείσες τελομερικές μελέτες, αποτελούν ένα πειστικό επιχείρημα για τις αλληλεπιδράσεις πυριδοστατίνης-G4.

2.3. Κυτταρική απεικόνιση

Παρά τις αυξανόμενες ενδείξεις για την ύπαρξη των G4, η πιο πειστική απόδειξη παραμένει η άμεση απεικόνιση αυτών των δομών. Για το σκοπό αυτό, έχουν αναπτυχθεί διάφορα αντισώματα (π.χ. Sty49^[136], 1H6^[137] και BG4^[138,139]) που εμφανίζουν εξαιρετική συγγένεια ($10^9 - 10^{12} M^{-1}$) και επιλεκτικότητα (>1000 φορές) για τις δομές αυτές έναντι άλλων τοπολογιών νουκλεϊκών οξέων (Σχήμα 2.13). Η εφαρμογή τους σε σταθερά κύτταρα

βλεφαρίδων ή ανθρώπινων κυττάρων και η απεικόνιση του επακόλουθου ανοσοφθορισμού επέτρεψε την απεικόνιση των G4 με βάση το DNA και το RNA.



Σχήμα 2.13: Σύγκριση των αντισωμάτων χρώσης G4 σε βλεφαρίδες (A, πράσινο) και ανθρώπινα κύτταρα (B-D, κόκκινο). Τα αντισώματα στα A-C^[136,137,139] είναι ειδικά για G4 DNA, ενώ ένα RNA G4 ειδικό αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε στο D^[138].

Οι μελέτες αυτές έχουν συνήθως επιβεβαιωθεί με τη χρήση ανάλυσης κυτταρικού κύκλου και προσδετών/πρωτεϊνών δέσμευσης G4 για να καταδειχθεί, η εξαρτώμενη από τη δομή, αντίθεση εικόνας. Είναι ενδιαφέρον ότι από τα τρία αντισώματα G4 DNA που αναφέρθηκαν, το καθένα εμφανίζει σαφώς διαφορετικά πρότυπα χρώσης. Αυτό δείχνει ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ συγγένειας, ευαισθησίας και τρόπου πρόσδεσης του αντισώματος είναι ζωτικής σημασίας στην απεικόνιση.

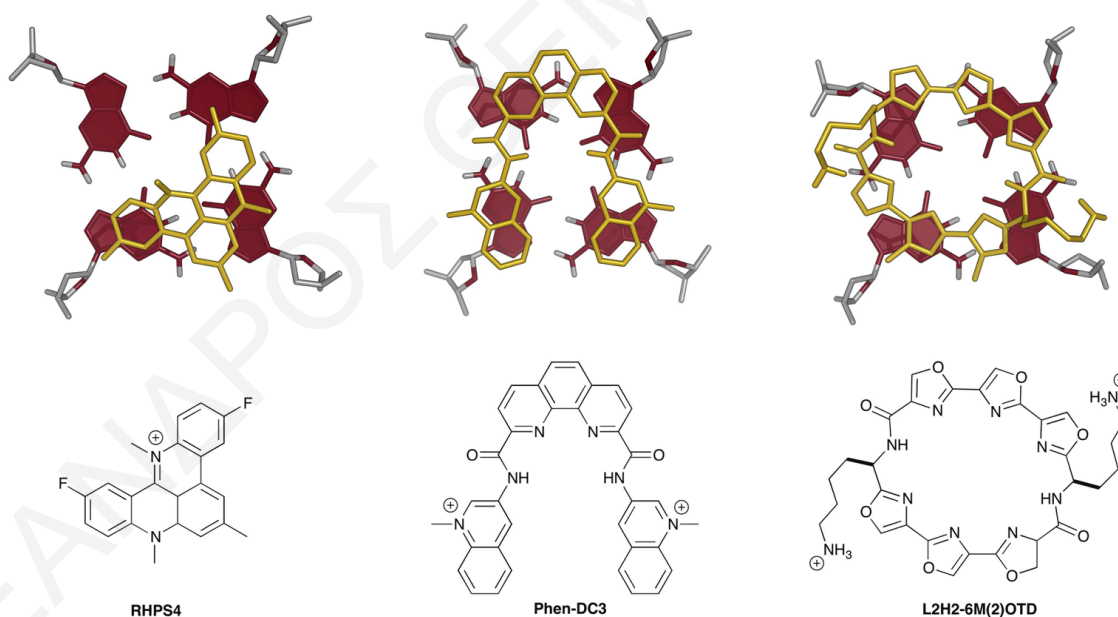
Ενώ οι μελέτες αυτές υποστηρίζουν την ιδέα ότι υπάρχουν G4 στα κύτταρα, παραμένουν αμφιβολίες σχετικά με το βαθμό στον οποίο τα αντισώματα προκαλούν το σχηματισμό G4, σε αντίθεση με την απλή παρατήρηση της παρουσίας τους. Για παράδειγμα, χρησιμοποιώντας ένα από τα αντισώματα, τα G4 θα μπορούσαν να απομονωθούν από εξαγόμενο γονιδιωματικό DNA απαλλαγμένο από τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις και τους κανονικούς κυτταρικούς περιορισμούς.^[140] Επιπλέον, παραμένουν ερωτήματα σχετικά με το βαθμό στον οποίο η στερέωση των κυττάρων επηρεάζει τη δομή του ζωντανού κυτταρικού DNA. Παρ' όλα αυτά, τα δεδομένα αυτά αντιπροσωπεύουν τα πιο πειστικά στοιχεία υπέρ των G4 που έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα.

2.4. Σχεδιασμός μικρών μορίων

Δεδομένου του ποικίλου φάσματος των βιολογικών λειτουργιών στις οποίες έχουν εμπλακεί τα G4, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι υπάρχει σημαντικό ενδιαφέρον για την

ανάπτυξη μικρών μορίων που στοχεύουν επιλεκτικά σε αυτά *in vivo*. Για το σκοπό αυτό, έχουν συντεθεί πολυάριθμες ενώσεις και έχει αξιολογηθεί *in vitro* η ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με G4.^[141-146] Από τις μελέτες αυτές, μπορούν να προσδιοριστούν διάφορα χαρακτηριστικά που χαρακτηρίζουν προσδέτες που σταθεροποιούν τα G4 και κατεπέκταση να τα απεικονίζουν.

Πρώτον, κατά το σχεδιασμό επιλεκτικών ενώσεων για G4, πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα για τη μείωση της σύνδεσης με άλλα νουκλεϊκά οξέα. Ως εκ τούτου, η συντριπτική πλειονότητα των ενώσεων στοχεύει στην G-τετράδα - αυτό το μοτίβο είναι ιδιαίτερα συντηρημένο μεταξύ των G4 και τα διακρίνει σαφώς από τα δίκλινα και μονόκλινα νουκλεϊκά οξέα. Η G-τετράδα παρέχει μια ιδανική θέση για την πρόσδεση μεγάλων ετεροαρωματικών ενώσεων μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και εξωτερικής στοίβαξης $\pi - \pi$ (Σχήμα 2.14). Για να ενισχυθεί περαιτέρω η εκλεκτικότητα, στο αρωματικό σύστημα προστίθενται συνήθως στερικά επιβλητικές "πλευρικές" ομάδες (Σχήμα 2.15) που εμποδίζουν την εισαγωγή της ένωσης μεταξύ των ζευγών βάσεων του δίκλινου συστήματος (παρεμβολή).

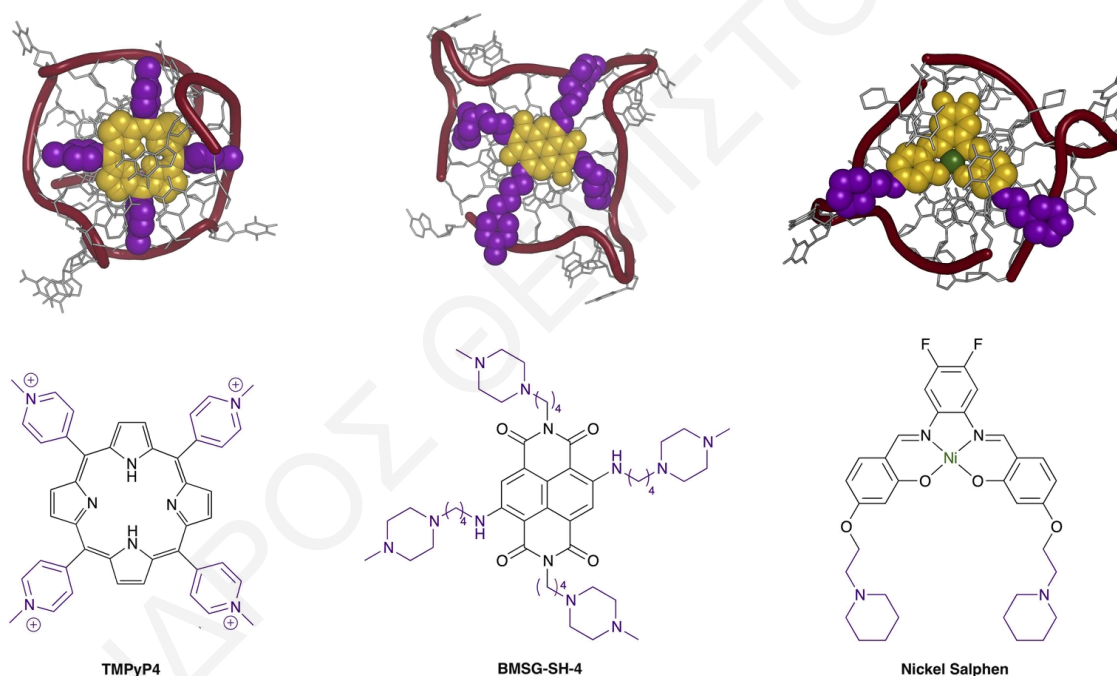


Σχήμα 2.14: Εξωτερικές αλληλεπιδράσεις $\pi - \pi$ στοίβαξης των G4 προσδετών RHPS4, Phen-DC-3 και το παράγωγο της τελομεστατίνης LH2H2-6M(2)OTD (όλα κίτρινα, η μοριακή δομή φαίνεται κάτω) με G-τετράδες (κόκκινο) βάσει δομικών μελετών NMR (1NZM,^[147] 2MGM^[148] και 2MB3^[149] αντίστοιχα). Σε γενικές γραμμές, αυτός είναι ο πιο συνηθισμένος τρόπος σύνδεσης που παρουσιάζουν οι προσδέτες G4.

Δεύτερον, προκειμένου να αυξηθεί η συγγένεια για G4, αυτές οι πλευρικές ομάδες είναι συνήθως βάσεις που μπορούν να πρωτονιωθούν σε φυσιολογικές συνθήκες ή μεθυλιώνονται κατά τη σύνθεση (Σχήμα 2.15). Το θετικό φορτίο που προκύπτει διευκολύνει τις ευνοϊκές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με την αρνητικά φορτισμένη φωσφορική ραχοκοκαλιά.

Ως πρόσθετο πλεονέκτημα, η τροποποίηση αυτή ενισχύει επίσης την υδατική διαλυτότητα του ετεροαρωματικού πυρήνα.

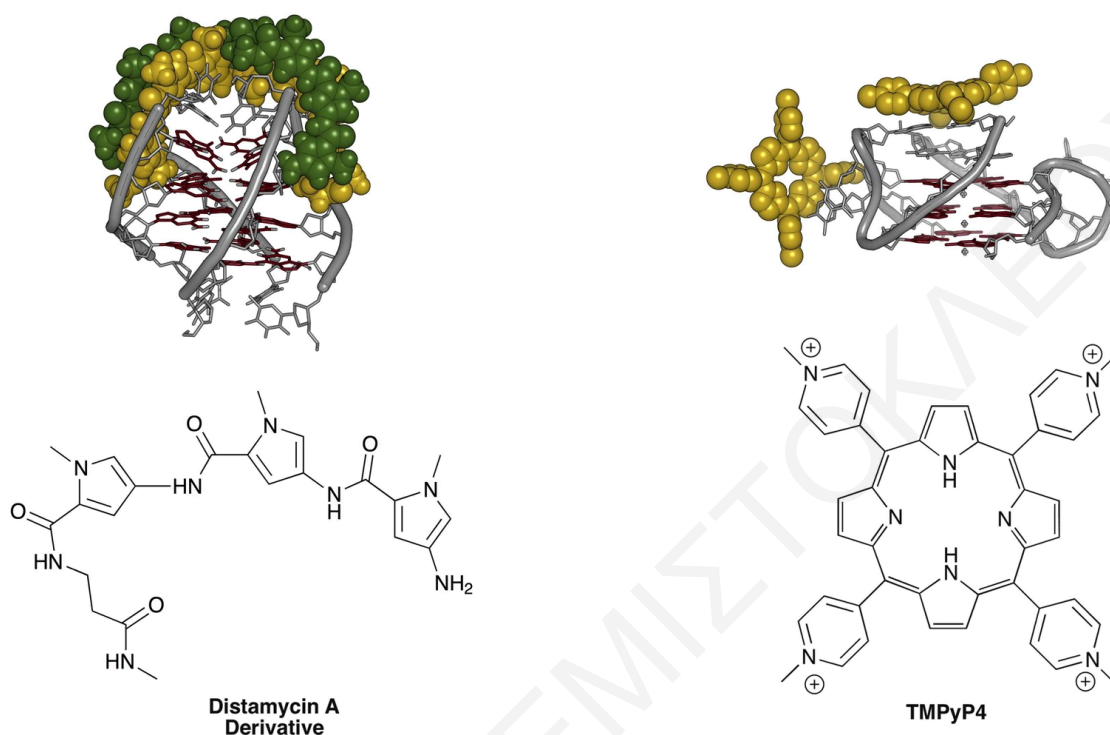
Τέλος, για να δημιουργηθεί επιλεκτικότητα για συγκεκριμένα G4, αυτές οι πλευρικές ομάδες θα πρέπει να στοχεύουν στους βρόχους διαφορετικής σύνθεσης μεγέθους και θέσης γύρω από την όψη του G4.^[150] Αυτό είναι το κύριο χαρακτηριστικό που διακρίνει ένα G4 από ένα άλλο. Ωστόσο, αυτό είναι επίσης το σημείο στο οποίο ο σχεδιασμός των προσδετών G4 έχει κολλήσει. Προς το παρόν, δεν υπάρχει καμία ορθολογική διαδικασία σχεδιασμού για τη στόχευση αυτών των βρόχων. Κατά συνέπεια, δεν υπάρχουν ενώσεις που να εμφανίζουν σαφώς μεγαλύτερη συγγένεια για μια διαμόρφωση G4 σε σχέση με μια άλλη. Ωστόσο, δεδομένης της σχετικής νηπιακής ηλικίας του πεδίου, θα πρέπει να αναμένεται μεγαλύτερη πρόοδος.



Σχήμα 2.15: Αλληλεπιδράσεις των προσδετών G4 TMPyP4, BMSG-SH-4 και νικελίου σαλφαίνης (κίτρινο αρωματικός πυρήνας, μοβ "πλευρικές" ομάδες, η μοριακή δομή φαίνεται από κάτω) με G4 (κόκκινη φωσφορική ραχοκοκαλιά) με βάση το NMR (2A5R)^[151] και την κρυσταλλογραφία ακτίνων X (3T5E^[152] και 3QSF^[153]) αντίστοιχα. Οι πλευρικές ομάδες δημιουργούν ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις με τη φωσφορική ραχοκοκαλιά.

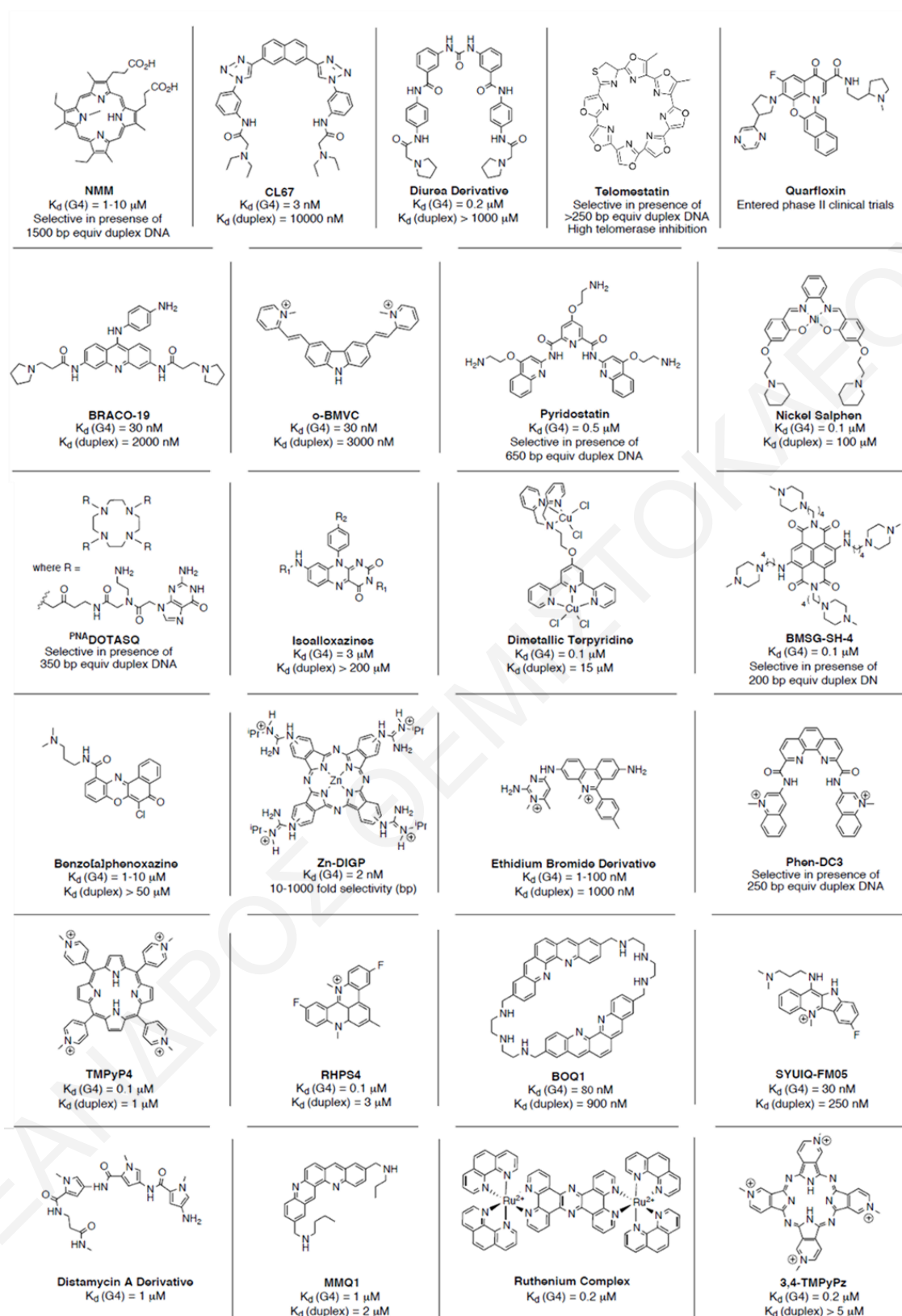
Φυσικά υπάρχουν ενώσεις που δεσμεύονται με άλλους τρόπους και ακολουθούν άλλες αρχές σχεδιασμού. Για παράδειγμα, έχουν αναφερθεί ενώσεις που δεσμεύουν άυλακες^[154-156] (π.χ. ένα παράγωγο της διαμυκίνης A,^[157] Σχήμα 2.16) και ενώσεις που παρουσιάζουν μοναδική αυτοσυναρμολόγηση εξαρτώμενη από το G4 (PNA-DOTASQ, Σχήμα 2.17).^[158,159] Επιπλέον, ακόμη και ενώσεις που έχουν σχεδιαστεί για να αλληλεπιδρούν μέσω εξωτερικής στοίβαξης π - π κατά καιρούς εμφανίζουν απροσδόκητους τρόπους πρόσδεσης. Για παράδειγμα, η TMPyP4 δεσμεύεται μέσω στοίβαξης π-π σε μελέτες NMR (Σχήμα 2.15),^[151]

ωστόσο στις κρυσταλλικές δομές ακτίνων-X αλληλεπιδρά με τα G4 μέσω των βρόχων τους (Σχήμα 2.16).^[160] Ωστόσο, αυτές οι ενώσεις αποτελούν σπανιότερες εξαιρέσεις και δεν προκαλούν μεγαλύτερη συγγένεια ή εκλεκτικότητα για τα G4.



Σχήμα 2.16: Εναλλακτικοί τρόποι πρόσδεσης του G-τετράπλευρου που παρουσιάζει ένα παράγωγο της διαμυκίνης A (κίτρινο και πράσινο, σύνδεση με αλάκα) και TMPyP4 (κίτρινο, αλληλεπιδράσεις βρόχου) με βάση μελέτες NMR (2KVY)^[157] και κρυσταλλογραφικές μελέτες ακτίνων X (2HRI)^[160] αντίστοιχα. Οι G-τετράδες επισημαίνονται με κόκκινο χρώμα οι μοριακές δομές των ενώσεων παρουσιάζονται παρακάτω.

Βάσει μελετών *in vitro*, μπορεί να διαπιστωθεί σημαντική επιλεκτικότητα για τα G4 έναντι του δίκλωνου DNA (Σχήμα 2.17). Ωστόσο, ο βαθμός στον οποίο αυτό μεταφράζεται σε αλληλεπιδράσεις G4 σε ένα κυτταρικό περιβάλλον είναι αμφισβητήσιμο. Από τις πολυάριθμες ενώσεις που παρασκευάστηκαν, πολύ λίγες έχουν μελετηθεί με επαρκή λεπτομέρεια (π.χ. η BRACO-19, η πυριδοστατίνη, η RHPS4 και η τελομεστατίνη, Σχήμα 2.9). Οι περισσότερες είτε δεν έχουν μελετηθεί καθόλου, είτε έχουν μελετηθεί για κυτταροτοξικότητα/επιδράσεις στο μήκος του τελομερούς είτε έχουν μελετηθεί έναντι ενός συγκεκριμένου γονιδίου που ενδεχομένως να περιέχει ένα G4.^[78] Αυτή η διάσπαρτη και επιφανειακή προσέγγιση αποτυγχάνει να παράσχει μια ισχυρή πλατφόρμα για τον μελλοντικό σχεδιασμό προσδέτων και εμποδίζει τη μεγαλύτερη κατανόηση του λειτουργικού ρόλου των G4 στα κύτταρα.



Σχήμα 2.17: Μια επιλογή από προσδέτες G4 και η κατά προσέγγιση σταθερά διάσπασης (K_d) για G4 και δίκλωνο DNA (ή/και της επιλεκτικότητας έναντι του δίκλωνου DNA). Τα δεδομένα κατά βασίζονται σε βιβλιογραφικές αναφορές για την τελομεστατίνη,^[161] το παράγωγο διουρίας,^[162] CL67,^[163] NMM,^[164-166] νικελλοσαλφαίνη,^[153] πυριδοστατίνη,^[82,167] o-BMVC,^[168] BRACO-19,^[169] BMSG-SH-4,^[170,171] διμεταλλική τερπυριδίνη,^[172] ισοαλλοζαΐνες,^[173] PNA-DOTASQ,^[158] Phen-DC3,^[161] παράγωγο βρωμιούχου αιθιδίου,^[174] Zn-DIGP,^[175] βενζο[α]φαινοζαΐνη,^[113] SYUIQ-FM05,^[119] BOQ1,^[176] RHPS4,¹⁷⁶ TMPyP4,^[177,178] 3,4-TMPyPz,^[179] σύμπλοκο ρουθηνίου,^[180] MMQ,^[176] και ένα παράγωγο της διασταμυκίνης A.^[157]

2.5. Φασματοσκοπικές Τεχνικές στην Βιοανάλυση

2.5.1. Φασματοσκοπία Φωτοφωταύγειας

Η φασματοσκοπία Φωτοφωταύγειας (Photoluminescence, PL) ή φθορισμού είναι μακράν η μέθοδος που εφαρμόζεται συχνότερα και είναι η κυρίαρχη αναλυτική προσέγγιση σε μια μεγάλη ποικιλία συστημάτων στους τομείς των ιατρικών αναλύσεων, της βιοτεχνολογίας και της ανακάλυψης φαρμάκων. Στις πολυάριθμες παραλλαγές της, έχει γίνει το πιο ισχυρό βιοαναλυτικό και διαγνωστικό εργαλείο και, από άποψη ευελιξίας, φαίνεται να είναι δεύτερη μόνο μετά τη φασματοσκοπία NMR, αλλά σε ένα εντελώς διαφορετικό πεδίο εφαρμογής. Αυτή η εξέλιξη αντικατοπτρίζει τη μετάβαση της φασματοσκοπίας φθορισμού από μια απλώς ακαδημαϊκή περιοχή έρευνας σε ένα εξαιρετικά πρακτικό εργαλείο και παράλληλα με μια σταδιακή μετακίνηση της φασματοσκοπίας φθορισμού από τη φυσική στη χημεία και τη βιολογία. Ένας από τους λόγους για την τεράστια αύξηση της δημοτικότητας της φασματοσκοπίας φθορισμού είναι πιθανώς το γεγονός ότι έγιναν διαθέσιμοι κατά τη δεκαετία του 1980 οι πρώτοι χημικά συντεθειμένοι ανιχνευτές φθορισμού για συγκεκριμένους αναλύτες. Μερικά από αυτά τα φθοροφόρα ανίχνευσης είναι σχετικά απλά, όπως για παράδειγμα ανιχνευτές κινολίνης που αποσβένονται κατά την σύγκρουση από χλωρίδιο. Ωστόσο, η πολυπλοκότητα των αισθητήρων αυξάνεται γρήγορα εάν κάποιος απαιτεί σύνδεση αναλύτη για να προκαλέσει φασματική αλλαγή. Η ανάπτυξη, μέσω χημικής σύνθεσης, ειδικών αισθητήρων για βιοχημικά σχετικούς αναλύτες είναι ακόμη πιο δύσκολη.

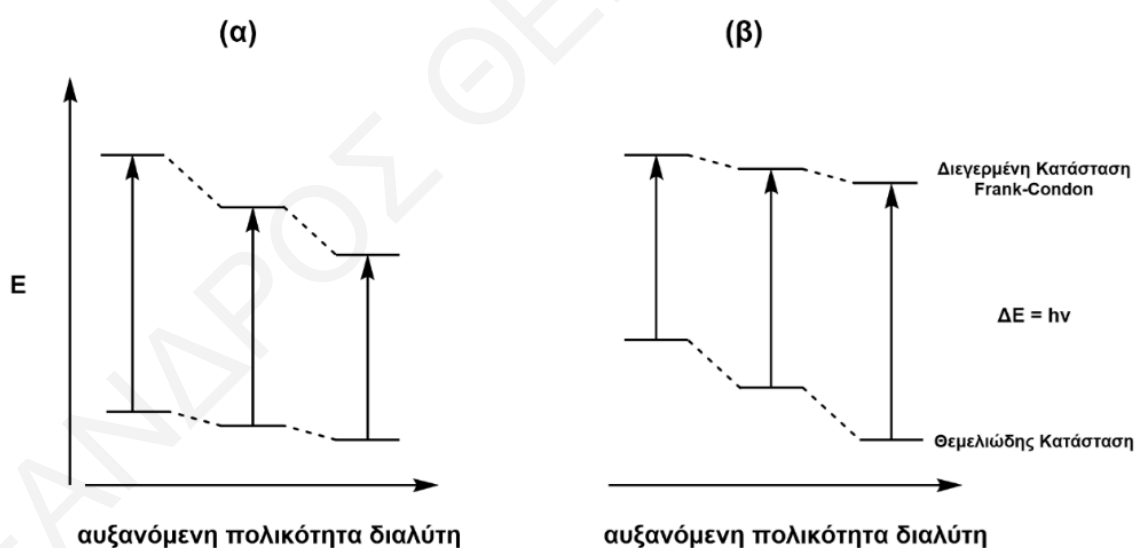
Για να παρακάμψει ορισμένους από τους περιορισμούς που συνδέονται με τη χρήση ανιχνευτών φθορισμού, η σύγχρονη βιοτεχνολογία κατέφυγε στην ιδέα της χρήσης πρωτεϊνών, ενζύμων ακόμη και πολυμερών εκτενούς συζυγιακού συστήματος ως συστατικών των αισθητήρων για βιοχημικές αναλύσεις.

2.5.2. Φασματοσκοπία UV-Vis

Η φασματοσκοπία UV-Vis χρησιμοποιείται παράλληλα με άλλες φασματοσκοπικές τεχνικές για την εξακρίβωση των άριστων συνθηκών διεξαγωγής πειραμάτων. Μέσω αυτής της φασματοσκοπίας μπορεί να ελεγχθεί η επίδραση του περιβάλλοντος σε διάφορα μόρια και συστήματα. Επιπρόσθετα, μπορούν να υπολογιστούν οι συγκεντρώσεις των συστατικών ενός διαλύματος εάν γνωρίζουμε της σταθερές μοριακής απορροφητικότητας (ϵ) του κάθε συστατικού. Για παράδειγμα, η εύρεση του καταλληλότερου διαλύτη, εύρος θερμοκρασιών και συγκεντρώσεων εξάγονται από την πιο πάνω τεχνική.

2.5.2.1. Σολβατοχρωτισμός

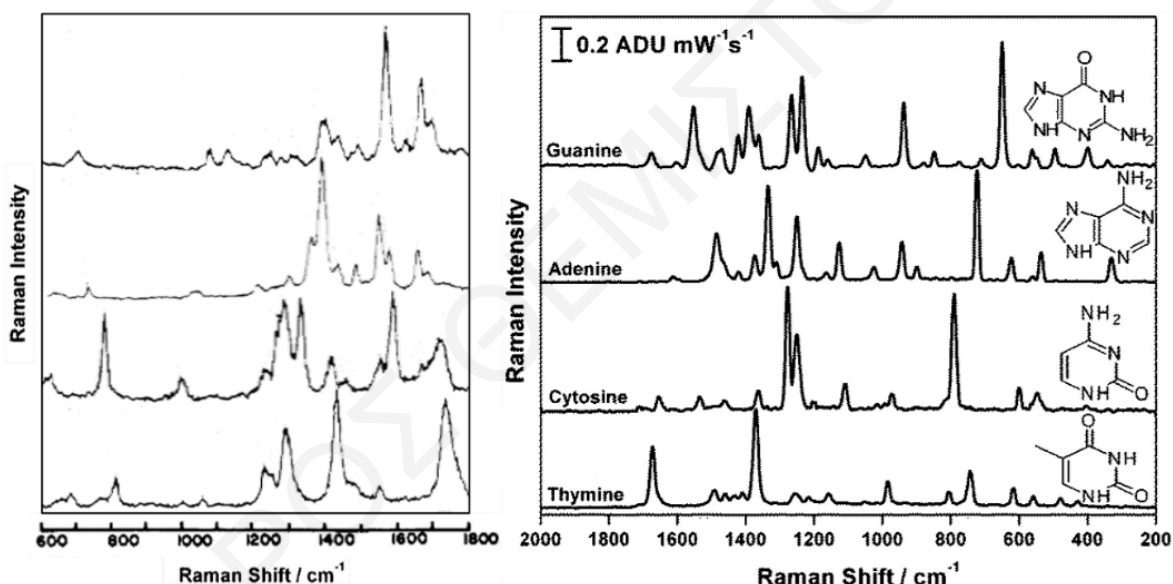
Οι γενικές αλληλεπιδράσεις διαλύτη - διαλυμένης ουσίας περιλαμβάνουν ηλεκτροστατικές δυνάμεις και είναι τριών τύπων: διπόλου - διπόλου, διπόλου - επαγόμενου διπόλου και επαγόμενου διπόλου - επαγόμενου διπόλου. Εάν η διπολική ροπή του μορίου αυξάνεται κατά την διέγερση, όπως συμβαίνει για τις μεταβάσεις $\pi \rightarrow \pi^*$, τότε ένας περισσότερο διπολικός ή πολωμένος διαλύτης σταθεροποιεί περισσότερο τη διεγερμένη κατάσταση από την θεμελιώδη κατάσταση (Σχήμα 2.18.α). Σε αυτήν την περίπτωση, ο διαχωρισμός των ενεργειών μεταξύ της θεμελιώδους και της διεγερμένης κατάστασης μειώνεται και το φάσμα απορρόφησης υφίσταται ερυθρή μετατόπιση. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται θετικός σολβατοχρωτισμός ή μια βαθυχρωμική μετατόπιση, και το μέγεθος αυτής της μετατόπισης εξαρτάται από την αλλαγή της διπολικής ροπής του μορίου κατά τη διέγερση. Από την άλλη πλευρά, μια υψιχρωματική (μπλε) μετατόπιση λαμβάνει χώρα για μόρια των οποίων η διπολική ροπή μειώνεται στην διεγερμένη κατάσταση σε σύγκριση με την θεμελιώδη κατάσταση, σταθεροποιώντας την ενέργεια της θεμελιώδους κατάστασης σε πολικούς διαλύτες (Σχήμα 2.18.β). Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται αρνητικός σολβατοχρωτισμός και παρατηρείται συχνά σε μόρια με μεταπτώσεις $n \rightarrow \pi^*$.^[197]



Σχήμα 2.18: Σχηματική ποιοτική αναπαράσταση των επιδράσεων του διαλύτη στην ηλεκτρονική ενέργεια μετάβασης αυξανόμενης πολικότητας διαλύτη. (α) Θετικός σολβατοχρωτισμός: η ενέργεια μετάπτωσης μετατοπίζεται σε χαμηλότερη ενέργεια (μεγαλύτερο μήκος κύματος) καθώς η πολικότητα του διαλύτη αυξάνεται επειδή η διπολική ροπή στην θεμελιώδη κατάσταση είναι μικρότερη από τη διπολική ροπή στη διεγερμένη κατάσταση. (β) Αρνητικός σολβατοχρωτισμός: η ενέργεια μετάπτωσης μετατοπίζεται σε υψηλότερη ενέργεια (μικρότερο μήκος κύματος) καθώς η πολικότητα του διαλύτη αυξάνεται επειδή η διπολική ροπή στην θεμελιώδη κατάσταση είναι μεγαλύτερη από τη διπολική ροπή στην διεγερμένη κατάσταση.

2.5.3. Φασματοσκοπία Raman Συντονισμού (Resonance Raman Spectroscopy-RRS)

Η φασματοσκοπία UV Raman Συντονισμού χρησιμοποιείται εκτεταμένα στη μελέτη βιολογικών συστημάτων. Το φάσμα Raman ενός νουκλεϊκού οξέος αποτελείται από πολλές διακριτές ζώνες που αντιπροσωπεύουν συνήθεις μοριακούς τρόπους δόνησης και χρησιμεύει ως ευαίσθητο και επιλεκτικό αποτύπωμα τρισδιάστατης δομής, διαμοριακών αλληλεπιδράσεων και δυναμικής. Συγκεκριμένα, η μελέτη της δομής του DNA επιτυγχάνεται με διέγερση σε μήκη κύματος κάτω των 280 nm, ενέργεια που συμπίπτει με την ενέργεια για την ηλεκτρονιακή μετάπτωση $\pi \rightarrow \pi^*$ (~278 nm) των βάσεων των νουκλεϊκών οξέων. Στο Σχήμα 2.19 απεικονίζονται τα φάσματα Raman των βάσεων των νουκλεϊκών οξέων.



Σχήμα 2.19: Φάσματα Raman των βάσεων νουκλεϊκών οξέων με διέγερση στα 266 nm (αριστερά)^[198] και 785 nm (δεξιά).^[199]

Οι πιο χαρακτηριστικές ζώνες DNA και RNA είναι τρόποι διάτασης δακτυλίου στους περίπου 680 cm^{-1} (G), 730 cm^{-1} (A), 740-785 cm^{-1} (C, T, U), 1087-1100 cm^{-1} (PO_2^- συμμετρική τάση). Αρκετές έντονες ζώνες βρίσκονται σε υψηλότερες συχνότητες: 1230-1250 cm^{-1} (C, T, U), 1290-1380 cm^{-1} (A, C, T), 1530-1590 cm^{-1} (A, C, G) και 1655 cm^{-1} (T).^[200,201] Η φασματοσκοπία Raman μπορεί να παρέχει πληροφορίες σχετικά με τις διαμορφώσεις της ραχοκοκαλιάς σακχάρου-φωσφορικών των νουκλεϊκών οξέων, καθώς και πληροφορίες για τους νουκλεοζίτες, όπως οι δεσμοί υδρογόνου ή αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βάσεων (στοίβαξη βάσεων) και των βάσεων με άλλα μόρια, όπως πρωτεΐνες, φάρμακα και ιόντα μετάλλων.^[200] Η συχνότητα των δονήσεων αυτών είναι ευαίσθητη σε δομικές

αλλαγές και μπορεί να μετατοπιστεί όταν το τοπικό περιβάλλον γύρω από την νουκλεϊκή αλυσίδα μεταβάλλεται.

Παρομοίως, μικρά μόρια που δεσμεύονται στο DNA μπορούν να διερευνηθούν με τη χρήση φασματοσκοπίας Raman συντονισμού. Θέτοντας το μήκος κύματος διέγερσης σε συντονισμό με συγκεκριμένες ηλεκτρονικές μεταβάσεις του μικρού μορίου, οι ερευνητές μπορούν να ενισχύσουν τα σήματα Raman που σχετίζονται με το μικρό μόριο, επιτρέποντας τη λεπτομερή ανάλυση των δομικών αλλαγών και των αλληλεπιδράσεων του εντός του συμπλόκου DNA.

Όταν το μήκος κύματος διέγερσης συντονίζεται με τις ηλεκτρονικές μεταβάσεις του μικρού μορίου, η σκέδαση Raman από το μικρό μόριο γίνεται πιο έντονη, παρέχοντας πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τους τρόπους δόνησης και τις αλλαγές διαμόρφωσης κατά τη σύνδεση με το DNA. Αυτή η ενίσχυση του συντονισμού επιτρέπει τον προσδιορισμό συγκεκριμένων δονητικών υπογραφών που σχετίζονται με το μικρό μόριο, ρίχνοντας φως στους τρόπους πρόσδεσης, τον προσανατολισμό και τις αλληλεπιδράσεις του με τις βάσεις του DNA και τη φωσφορική αλυσίδα των σακχάρων.

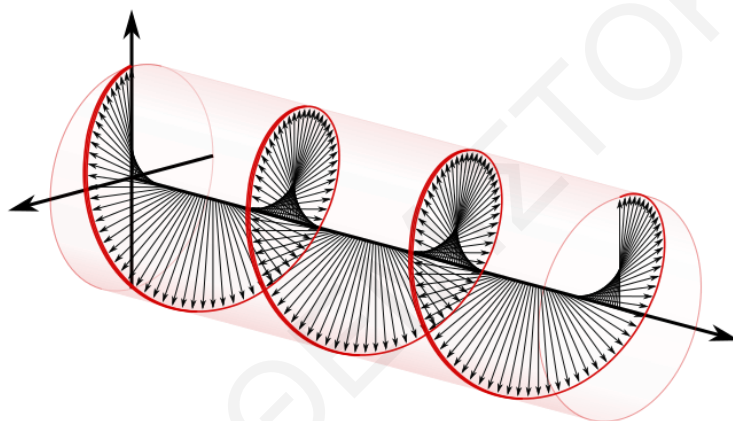
Επιπλέον, η φασματοσκοπία UV Raman σε συντονισμό με το μικρό μόριο επιτρέπει τη διερεύνηση του τρόπου με τον οποίο το γεγονός της πρόσδεσης επηρεάζει την ηλεκτρονική δομή και τη δονητική δυναμική του μικρού μορίου. Οι αλλαγές στο φάσμα Raman, όπως μετατοπίσεις στις θέσεις των κορυφών, μεταβολές στις εντάσεις των κορυφών ή η εμφάνιση νέων δονητικών ζωνών, μπορούν να παράσχουν πληροφορίες για τις διαταραχές που προκαλεί η πρόσδεση του DNA στις ηλεκτρονικές και δομικές ιδιότητες του μικρού μορίου.

Επιπλέον, η φασματοσκοπία UV Raman προσφέρει το πλεονέκτημα της διερεύνησης αυτών των αλληλεπιδράσεων υπό φυσιολογικές συνθήκες, παρέχοντας πολύτιμες πληροφορίες για την κατανόηση των μηχανισμών των αλληλεπιδράσεων DNA - μικρού μορίου και των επιπτώσεών τους σε διάφορες βιολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της ανάπτυξης φαρμάκων και της μοριακής αναγνώρισης.

2.5.4. Κυκλικός Διχρωϊσμός (Circular Dichroism-CD)

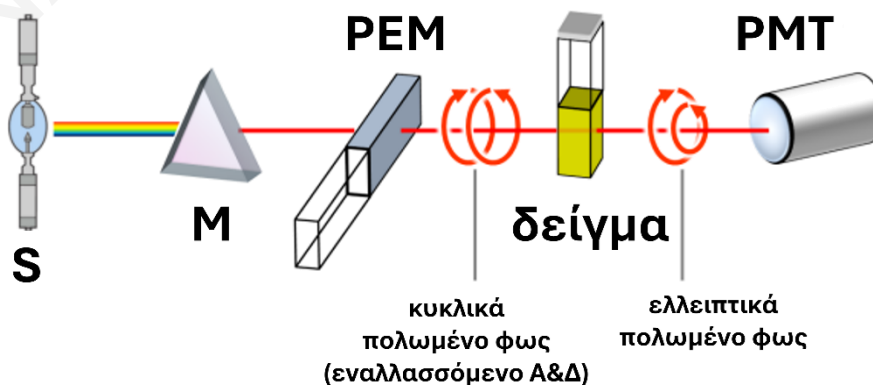
Οι χειρικές ουσίες διακρίνονται από τις αλληλεπιδράσεις τους με κυκλικά πολωμένο φως σε μήκη κύματος κοντά και μακριά από τις ενέργειες απορρόφησης. Ο κυκλικός διχρωϊσμός (CD) είναι η διαφορά στην απορρόφηση από μια ουσία κυκλικά δεξιόστροφου και αριστερόστροφου πολωμένου φωτός (Σχήμα 2.20). Το CD είναι ένα ισχυρό εργαλείο για τη μελέτη των δευτεροταγών δομών και διαμορφώσεων που υιοθετούνται από νουκλεϊκά οξέα

και πρωτεΐνες. Στην περίπτωση των νουκλεϊκών οξέων, παρακολουθείται συνήθως το σήμα CD ηλεκτρονικών μεταπτώσεων των βάσεων. Το CD μετρά την ασυμμετρία στα συστήματα νουκλεϊκών οξέων που προκύπτει από ένα επαγόμενο CD στις συμμετρικές βάσεις. Το CD προκύπτει από τα ασύμμετρα σάκχαρα της σπονδυλικής στήλης και από τις ελικοειδείς δομές που συχνά υιοθετούνται από νουκλεϊκά οξέα. Η φασματοσκοπία CD είναι εξαιρετικά ευαίσθητη στη διαμόρφωση νουκλεϊκού οξέος, ειδικά εντός της περιοχής μήκους κύματος 180 έως 320 nm. Το CD νουκλεϊκών οξέων χρησιμοποιείται συνήθως με εμπειρικό τρόπο για να παρέχει μια υπογραφή για μια δεδομένη δευτεροταγή δομή. Το CD είναι ιδιαίτερα ισχυρό για την παρακολούθηση δομικών αλλαγών που προκύπτουν από αλλαγές σε περιβαλλοντικές συνθήκες όπως θερμοκρασία, ιοντική ισχύ και pH.



Σχήμα 2.20: Απεικόνιση κυκλικά δεξιόστροφου πολωμένου φωτός

Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.21 η δέσμη φωτός με την οποία ακτινοβολείται το δείγμα αποτελείται από 50% δεξιόστροφα και 50% αριστερόστροφα πολωμένο φως. Όταν το κυκλικά πολωμένο φως περάσει διαμέσου της οπτικά ενεργής ένωσης διαφέρει η ταχύτητα των δύο κυμάτων ($c_L \neq c_R$), όπως επίσης και ο βαθμός απορρόφησης τους ($\epsilon_L \neq \epsilon_R$).

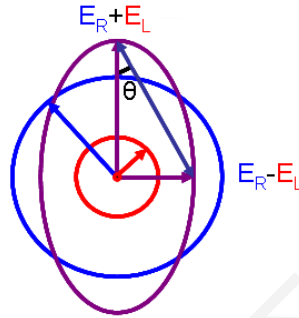


Σχήμα 2.21: Σχηματική αναπαράσταση ενός φασματοπολομέτρου CD. S: πηγή φωτός, M: μονοχρωμάτορας, PEM: Φωτοελαστικός Διαμορφωτής, PMT: Φωτοπολλαπλασιαστής.

Η προβολή της συνισταμένης των δύο αντίθετα κυκλικά πολωμένων φώτων σχηματίζει έλλειψη (Σχήμα 2.22). Η ελλειπτικότητα θ ορίζεται από την Εξίσωση 2.5.1.

$$\tan\theta = \frac{E_l - E_r}{E_l + E_r} \quad \text{Εξίσωση 2.5.1}$$

όπου E_l και E_r είναι τα μεγέθη διανύσματος ηλεκτρικού πεδίου του δεξιόστροφα και αριστερόστροφα πολωμένου φωτός αντίστοιχα.



Σχήμα 2.22: Το ελλειπτικό πολωμένο φως (βιολετι) αποτελείται από άνιση συνεισφορά δεξιού (μπλε) και αριστερού (κόκκινου) κυκλικού πολωμένου φωτός.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

Ένας κλασικός αναλώσιμος βιοαισθητήρας αποτελείται από μια μονάδα βιολογικής αναγνώρισης που αναγνωρίζει συγκεκριμένα τον χημικό στόχο και τον μορφοτροπέα που μετατρέπει τη βιολογική αλληλεπίδραση σε φυσικά σήματα. Οι βιοαισθητήρες διαθέτουν αρκετά πλεονεκτήματά, όπως ισχυρή εξειδίκευση στους στόχους τους, υψηλή ευαισθησία, απλή λειτουργία, είναι φορητοί και ικανοί να εκτελέσουν ανίχνευση σε πραγματικό χρόνο σε σύγκριση με παραδοσιακές αναλυτικές προσεγγίσεις όπως η μέθοδος ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) και η χρωματογραφία.^[181]

Η μονάδα βιολογικής αναγνώρισης είναι ένα υλικό βιολογικής προέλευσης ή ένα βιομιμητικό συστατικό, που αλληλεπιδρά, συνδέεται ή αναγνωρίζει τον υπό ανάλυση αναλύτη. Στα υλικά βιολογικής προέλευσης ανήκουν οι ιστοί, μικροοργανισμοί, οργανίδια, κυτταρικοί υποδοχείς, ένζυμα, αντισώματα, νουκλεϊκά οξέα και λοιπά, ενώ τα βιομιμητικά συστατικά είναι ουσίες που συντέθηκαν με σκοπό να προσομοιώνουν βιολογικές δράσεις ή συστατικά. Ο μορφοτροπέας ή μετρητής, ο οποίος μετατρέπει ένα σήμα σε άλλο, λειτουργεί με φυσικοχημικό τρόπο που προκύπτει από την αλληλεπίδραση του αναλύτη με το βιολογικό στοιχείο, για εύκολη μέτρηση και ποσοτικοποίηση.

Οι αναλώσιμοι βιοαισθητήρες χρησιμοποιούν συνήθως μία ή περισσότερες από τις ακόλουθες έξι μεθόδους για μεταγωγή σήματος: οπτική, ηλεκτροχημική, μηχανική, μαγνητική, θερμομετρική και μικροβαρυσμετρική. Μεταξύ αυτών, οι οπτικοί και ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες είναι οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι και πιο ευαίσθητοι τύποι στον τομέα της ανίχνευσης βιοδεικτών όγκου και καρκίνου.^[182]

3.1. Οπτικοί Βιοαισθητήρες

Στους οπτικούς αισθητήρες, ο μετρητής παράγει είτε άμεσα είτε μέσω μιας διαδικασίας αναγνώρισης (για παράδειγμα, το σχηματισμό ενός συμπλόκου αντισώματος-αντιγόνου), ένα οπτικό σήμα (χρώμα, φθορισμός ή χημειοφωταύγεια) ή προκαλεί αλλαγή στις οπτικές ιδιότητες του περιβάλλοντος. Το οπτικό σήμα που παράγεται μπορεί να παρατηρηθεί με γυμνό μάτι ή να μετρηθεί από έναν φωτοανιχνευτή. Οι φωτοανιχνευτές, συσκευές που μετατρέπουν οπτικά σήματα σε μετρήσιμα ηλεκτρικά σήματα, κατηγοριοποιούνται σε θερμικούς και ανιχνευτές φωτονίων.

Οι οπτικές μέθοδοι έχουν δύο κύρια μειονεκτήματα:

- i. ευαισθησία σε περιβαλλοντικές παρεμβολές, συμπεριλαμβανομένης της υποβάθμισης των φωτοδραστικών μορίων λόγω φωτοδιάσπασης και
- ii. χρήση εύθραυστων και μερικές φορές δαπανηρών οπτικών που απαιτούν προσεκτικό χειρισμό.

Ωστόσο, τα πλεονεκτήματα των οπτικών τεχνικών υπερτερούν των μειονεκτημάτων. Είναι γρήγορες, ευαίσθητες, αξιόπιστες, κυρίως μη καταστροφικές και επιτρέπουν την πολυπλοκότητα του αναλύτη. Επομένως, οι οπτικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο για αισθητήρες μίας χρήσης. Επιπλέον, τεχνικές για την οπτική ανίχνευση, όπως ο συντονισμός επιφανειακού πλασμονίου (Surface Plasmon Resonance, SPR) ή ο εντοπισμένος SPR (LSPR) και η φασματοσκοπία επιφανειακής ενίσχυσης Raman (Surface Enhanced Raman Spectroscopy, SERS) παρέχουν επίσης μια label-free μέθοδο για χημική και βιολογική ανίχνευση. Στα πιο σημαντικά λειτουργικά υλικά για οπτική ανίχνευση περιλαμβάνονται οι χρωστικές, τα νανοσωματίδια χρυσού και αργύρου, οι κβαντικές κουκίδες, οι φωτονικοί κρύσταλλοι και τα νανοϋλικά γραφενίου.^[182]

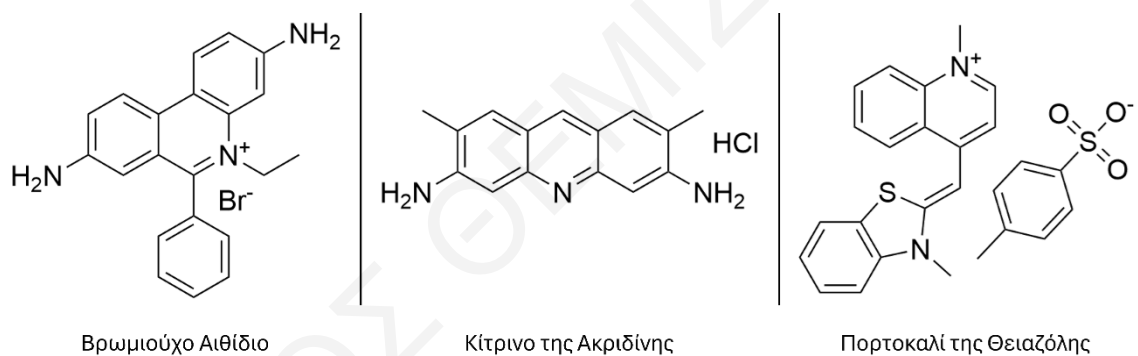
Τα νανοσωματίδια χρυσού (Au) και αργύρου (Ag), εμφανίζουν μοναδικές και ρυθμιζόμενες πλασματικές ιδιότητες. Ο έλεγχος του μεγέθους και σχήματος αυτών των μεταλλικών νανοδομών επιτρέπει την χειραγώγηση του εντοπισμένου SPR (Localised SPR, LSPR) και την απόκρισή τους στο τοπικό περιβάλλον.^[183,184] Οι κβαντικές κουκίδες (Quantum Dots, QD) είναι νανοκρυστάλλοι ημιαγωγών φωτοφωταύγειας που αποτελούνται από μερικές εκατοντάδες έως μερικές χιλιάδες άτομα. Οι QD έχουν υψηλή κβαντική απόδοση, φωτοσταθερότητα, ευρεία απορρόφηση με μεγάλες διατομές απορρόφησης ενός και δύο φωτονίων, στενή και συμμετρική φωτοφωταύγεια από την υπεριώδη ακτινοβολία (Ultraviolet, UV) ως την εγγύς υπέρυθρη ακτινοβολία (Near Infrared, NIR) και μεγάλη αποτελεσματική μετατόπιση Stokes, που τις καθιστούν εξαιρετικούς ανιχνευτές φθορισμού.^[185]

Οι δομές φωτονικών κρυστάλλων (Photonic Crystals, PC) αποτελούνται από χωρικά διατεταγμένα περιοδικά διηλεκτρικά υλικά που αλληλεπιδρούν με το φως, παρέχοντας αντανάκλαση υψηλής απόδοσης σε συγκεκριμένα μήκη κύματος εμφανίζοντας αποτελεσματικούς οπτικούς συντονισμούς. Εν συντομία, μια βιοχημική αλληλεπίδραση (π.χ. δέσμευση) επί της επιφάνειας του PC προκαλεί μια αλλαγή στον αποτελεσματικό δείκτη διάθλασης, η οποία οδηγεί σε μία μετατόπιση της κορυφής μήκους κύματος συντονισμού, η οποία είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση του βιολογικού στόχου.^[186]

Τέλος, τα νανοϋλικά γραφενίου έχουν χρησιμοποιηθεί στο σχεδιασμό διαφόρων βιοαισθητήρων λόγω της μεγάλης επιφάνειας, της ηλεκτρικής αγωγιμότητας, του υψηλού ρυθμού μεταφοράς ηλεκτρονίων και της ικανότητας ακινητοποίησης διαφορετικών μορίων πάνω στην επιφάνεια τους.^[187] Ωστόσο, οι χρωστικές αποτελούν τα πιο προσβάσιμα και οικονομικά αποδοτικά λειτουργικά υλικά.

3.2. Χρωστικές και DNA

Το DNA αναπτύσσει δεσμούς υδρογόνου, van der Waals και ηλεκτροστατικές δυνάμεις κατά τη σύνδεση με μικρά μόρια όπως φθορίζουσες χρωστικές. Μέχρι σήμερα, υπάρχει μια πληθώρα φθοροφόρων που συνδέονται με το DNA με τρόπο ανεξάρτητο από την αλληλουχία. Οι περισσότερες χρωστικές μοιράζονται ένα παρόμοιο δομικό μοτίβο ετεροαρωματικού πυρήνα που παρεμβάλλεται στο DNA και επιπλέον «βραχιόνες» που σχηματίζουν σταθεροποιητικούς δεσμούς υδρογόνου με τις αλυσίδες. Παραδείγματα αυτού του τύπου περιλαμβάνουν τα βρωμιούχο αιθίδιο, πορτοκαλί της θειαζόλης και κίτρινο της ακριδίνης (Σχήμα 3.1).



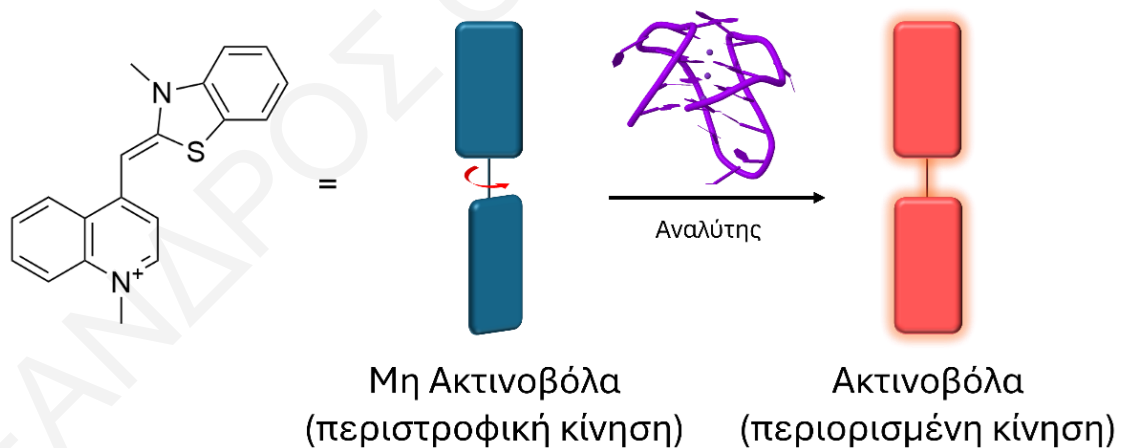
Σχήμα 3.1: Χημικές δομές χρωστικών που χρησιμοποιούνται για χρώση DNA.

Πολλές από αυτές τις χρωστικές έχουν αμελητέο φθορισμό στο διάλυμα και επιδεικνύουν έντονο φθορισμό όταν συνδέονται με νουκλεϊκά οξέα. Η αύξηση του φθορισμού συμβαίνει λόγω της εξάλειψης των αλληλεπιδράσεων απόσβεσης των αρωματικών φθοροφόρων με υδατικά μέσα όταν η χρωστική τοποθετείται μεταξύ των βάσεων (παρεμβολή) ή /και των υδρόφοβων αλυσίδων του DNA,^[188] κάτι που ίσως προκύπτει όταν η περιστροφή γύρω από τον δεσμό μεταξύ των αρωματικών συστημάτων είναι περιορισμένη (Σχήμα 3.2). Η κβαντική απόδοση φθορισμού του TO έχει αναφερθεί ότι αυξάνει 18.900 φορές κατά τη δέσμευση του στο DNA. Αυτές οι χρωστικές ουσίες με εξαιρετικά υψηλή φωταύγεια μπορούν να ανιχνευθούν με μεγάλη ευαισθησία και αναμένεται να αντικαταστήσουν, στο εγγύς μέλλον, τα ραδιοϊσότοπα ως σημαντές για τα νουκλεϊκά οξέα.^[189]

3.2.1. Thiazole Orange

Το πορτοκάλι της θειαζόλης (Thiazole Orange, TO) είναι μέλος μιας οικογένειας ασύμμετρων κυανινών (μόρια τα οποία αποτελούνται από δύο διαφορετικές ετεροκυκλικές υπομονάδες που συνδέονται με έναν ή περισσότερους γεφυρωτικούς δεσμούς μεθίνης, =CH-) και αποτελεί προϊόν μιας ορθολογικής προσπάθειας σχεδιασμού για την ανάπτυξη μιας αποτελεσματικής χρωστικής για ανάλυση δικτυοερυθροκυττάρων.^[190] Το TO χρησιμοποιείται συνήθως στην ανάλυση για τη χρώση του υπολειπόμενου RNA των κυττάρων του αίματος, όπως επίσης και για τη χρώση του DNA σε πηκτές αгарόζης και στην τριχοειδή ηλεκτροφόρηση.^[189]

Οι Lee et al. το 1985, στην προσπάθειά τους για εύρεση μιας νέας φθορίζουσας χρωστικής με μήκος κύματος διέγερσης (λ_{ex}) στα 488nm για χρήση στην ανάλυση δικτυοερυθροκυττάρων συνέθεσαν και το TO. Η χημική δομή της θειοφλαβίνης T, μιας χρωστικής που χρησιμοποιήθηκε για ανάλυση δικτυοερυθροκυττάρων, χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο. Από όλες τις χρωστικές, το TO είχε τα πιο πολλά υποσχόμενα χαρακτηριστικά για ανάλυση δικτυοερυθροκυττάρων: είχε έναν καλό συντελεστή απόσβεσης στα 488 nm, καλή κβαντική απόδοση, ενίσχυση του φθορισμού με RNA/DNA και μπορούσε να διαπεράσει τη μεμβράνη.



Σχήμα 3.2: Η απόκριση φθορισμού κατά την ενεργοποίηση της χρωστικής πορτοκαλί της θειαζόλης (TO). Η χημική δομή του TO, μαζί με μια αναπαράσταση της εσωτερικής στροφικής κίνησής του (οι αρωματικές υπομονάδες απεικονίζονται με περιστρεφόμενες πλάκες), η οποία κατά τον περιορισμό αποδίδει φθορισμό.

Το TO ανήκει σε μια οικογένεια φθορίζουσών χρωστικών που μοιράζεται έναν μοναδικό μηχανισμό απόκρισης ενεργοποίησης, δηλαδή η εκπομπή τους ενισχύεται μόλις περιοριστούν οι στροφικές κινήσεις γύρω από τους δεσμούς που συνδέουν τα διάφορα τμήματά τους (Σχήμα 3.2). Σε υδατικά διαλύματα, οι χρωστικές αυτές παρουσιάζουν γενικά αμελητέο φθορισμό λόγω ενδομοριακών κινήσεων συστροφής γύρω από τους δεσμούς

μεθίνης, οι οποίες οδηγούν σε ταχεία μη ακτινοβόλο αποδιέγερση της διεγερμένης κατάστασης μέσω μιας κατάστασης μεταφοράς φορτίου. Ωστόσο, παρεμποδίζοντας αυτή την κίνηση λόγω αυξημένου ιξώδους, συσσωμάτωσης ή περιοριστικών γεγονότων σύνδεσης, επιτυγχάνεται απόσβεση της μετάπτωσης προς την κατάσταση μεταφοράς φορτίου, το οποίο οδηγεί σε αισθητά αυξημένο φθορισμό.

Το ΤΟ εμφανίζει κορεσμό θέσεων σύνδεσης με τα νουκλεϊκά οξέα, τυπικό φαινόμενο με έντονα δεσμευμένες χρωστικές παρεμβολής. Ο κορεσμός του RNA με ΤΟ επιτεύχθηκε με αναλογία ενός μορίου χρωστικής προς δέκα ζεύγη βάσεων και ο κορεσμός του DNA επιτεύχθηκε με αναλογία ενός μορίου χρωστικής προς δύο ζεύγη βάσεων.^[190]

Επιπρόσθετα, το ΤΟ έχει αναφερθεί ότι έχει μεγαλύτερη συγγένεια δέσμευσης όταν νουκλεϊκά οξέα είναι σε τετραπλές και τριπλές έλικες παρά όταν είναι σε διπλή έλικα. Το μικρό μέγεθος του ΤΟ επιτρέπει την εύκολη παρεμβολή σε διαφορετικές θέσεις δομών νουκλεϊκών οξέων, όπως οι περιοχές βρόχων, αυλακώσεων και τελικών G-κουαρτέτων ή μεταξύ ζευγών βάσεων και G-τετράδων.^[191]

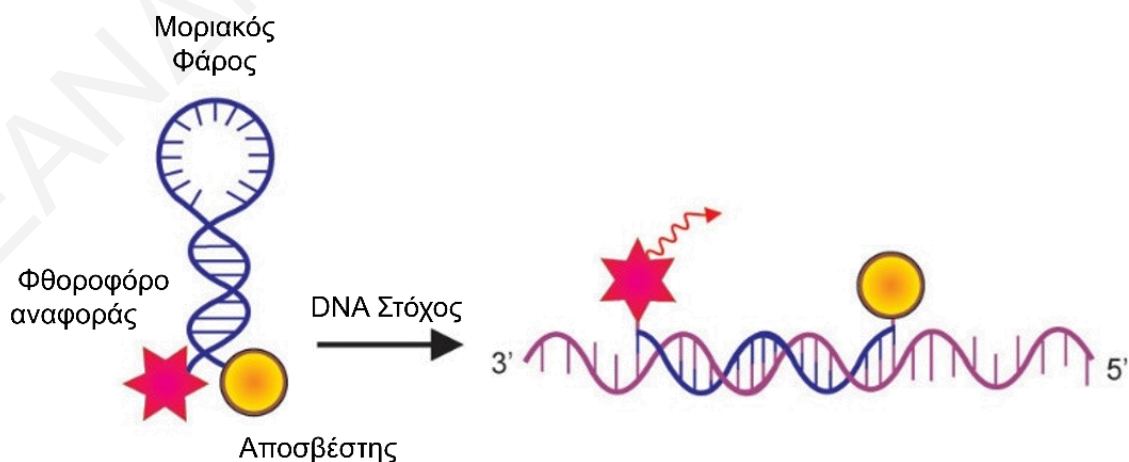
3.3. Διακόπτες Φθορισμού

Οι μοριακοί διακόπτες φθορισμού προσελκύουν ολοένα και περισσότερη προσοχή πρόσφατα λόγω των «έξυπνων» χαρακτηριστικών εναλλαγής φθορισμού που ανταποκρίνονται σε εξωτερικά ερεθίσματα. Η διαφορά στα χρώματα εκπομπής του διακόπτη μπορεί να προκληθεί από διάφορα ερεθίσματα, όπως μηχανική δύναμη, ακτινοβολία UV-Vis, θερμότητα, αλλαγές στο pH και μοριακές αλληλεπιδράσεις, διευρύνοντας τις εφαρμογές τους στην καταγραφή οπτικών δεδομένων σε χημικούς αισθητήρες, οθόνες, και βιοαπεικόνιση. Οι μοριακές αλληλεπιδράσεις είτε αυτές είναι πιο γενικού τύπου, όπως οι διπόλου - διπόλου, είτε πιο ειδικές, όπως οι δεσμοί υδρογόνου, έλκουν τα μόρια σε πιο κοντινές αποστάσεις. Ως αποτέλεσμα των μοριακών αλληλεπιδράσεων, μπορούν να πραγματοποιηθούν φυσικοχημικές αλλαγές μέσω της μεταφοράς ενέργειας συντονισμού Förster (Förster Resonance Energy Transfer, FRET), της μεταφοράς ηλεκτρονίων με φωτοδιέγερση (Photoinduced Electron Transfer, PET), της συσσωμάτωσης, της ενόχλησης μοριακών κινήσεων (π.χ. περιστροφή), ή μέσω διαφόρων φωτοχημικών διεργασιών (π.χ. μεταφορά πρωτονίων). Οι διακόπτες φθορισμού έχουν αναφερθεί ότι πραγματοποιούν καταστάσεις πολλαπλών χρωμάτων και καταστάσεις on/off.

Χρήσιμοι διακόπτες είναι εκείνοι των οποίων τα σήματα φθορισμού ελέγχονται επιλεκτικά από τα βασικά χημικά συστατικά του βιολογικού μηχανήματος. Έτσι, το μόριο διακόπτης πρέπει να πληροί τρεις απαιτήσεις:

- 1) την παρουσία ενός υποδοχέα για την αντιστρεπτή δέσμευση των χημικών ειδών
- 2) τη διαθεσιμότητα ενός φθοροφόρου για λήψη ή/και μετάδοση φωτεινών σημάτων και
- 3) κάποια μέσα επικοινωνίας της δέσμευσης του χημικού στόχου στο φθοροφόρο έτσι ώστε το σήμα του τελευταίου να αλλάζει δραστικά, ούτως ώστε η αλλαγή έντασης του φωτός μεταξύ των καταστάσεων «on» και «off» να διακρίνεται εύκολα.

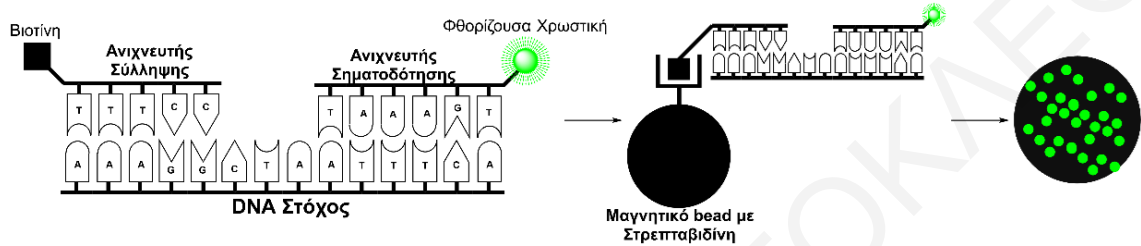
Οι βιοαισθητήρες φθορισμού διαμορφώνονται σε τέσσερις βασικές μορφές: άμεσης σύνδεσης, σάντουιτς, ανταγωνισμού και μετατόπισης. Η μορφή άμεσης δέσμευσης είναι μακράν η απλούστερη για εφαρμογή καθώς περιλαμβάνει μόνο το μόριο σύλληψης και τον στόχο. Ωστόσο, λειτουργεί μόνο εάν είτε ο στόχος είναι εγγενώς φθορίζον ή εάν έχει κατά κάποιο τρόπο προσημανθεί, όπως συμβαίνει σε πολλές μελέτες υβριδισμού DNA. Οι προσδιορισμοί άμεσης δέσμευσης χρησιμοποιούνται συχνά με προσημασμένα πρότυπα στόχους για διάφορους λόγους: για την επιλογή των καλύτερων μορίων δέσμευσης για μια συγκεκριμένη εφαρμογή χαρακτηρίζοντας τη συνάφεια και την ειδικότητα της λειτουργίας σύνδεσης για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών ανάλυσης για ευαισθησία, ταχύτητα και αναπαραγωγιμότητα και για να παρέχει θετικούς ελέγχους για την παρακολούθηση της απόδοσης της ανάλυσης. Μια παραλλαγή του προσδιορισμού άμεσης δέσμευσης χρησιμοποίησε μοριακούς φάρους όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.3.^[192] Σε αυτούς τους προσδιορισμούς, ένας δότης μεταφοράς ενέργειας φθορισμού ακινητοποιείται σε μία περιοχή ενός μορίου δέσμευσης, ενώ ένας δέκτης ακινητοποιείται σε μια περιοχή που είναι γειτονική μόνο όταν δεν υπάρχει δεσμευμένος στόχος. Όταν ο στόχος είναι δεσμευμένος, τα δύο φθοροφόρα διαχωρίζονται και δημιουργείται ένα θετικό σήμα.



Σχήμα 3.3: Αναπαράσταση βιοαισθητήρα άμεσης δέσμευσης με μοριακό φάρο.

Η χημική ανάλυση της μορφής σάντουιτς χρησιμοποιείται για την ανίχνευση στόχων με τουλάχιστον δύο θέσεις δέσμευσης, συμπεριλαμβανομένων μεγάλων μορίων όπως

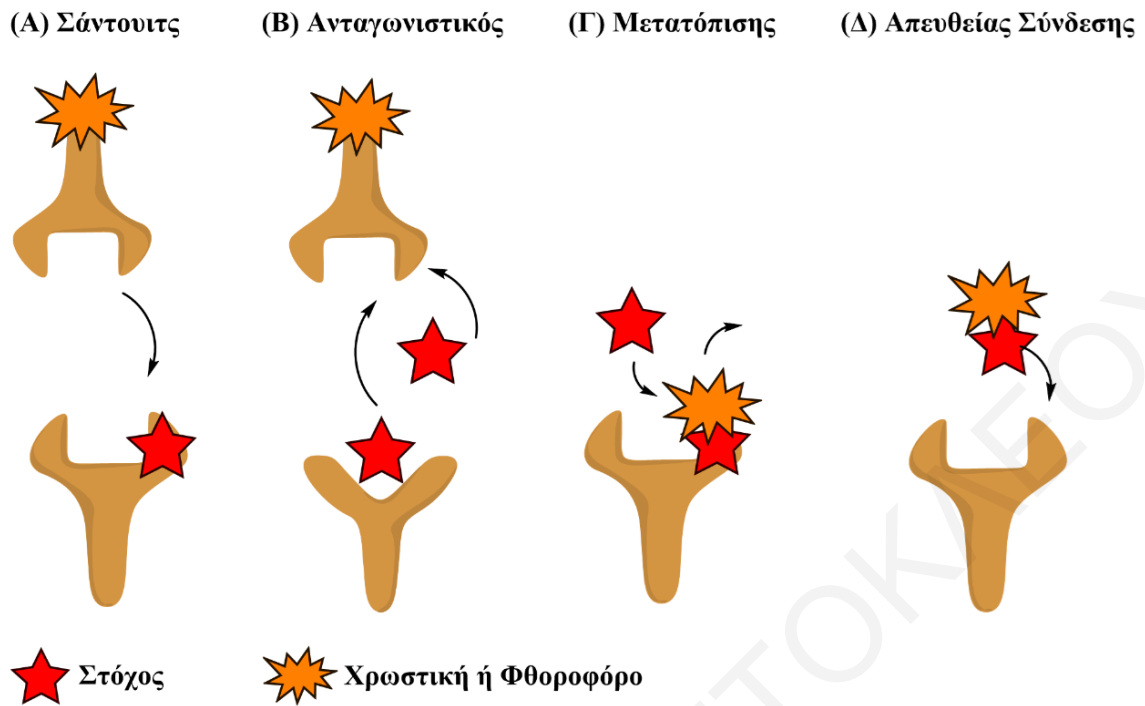
πρωτεϊνών, ολιγονουκλεοτιδίων, βακτηρίων και ιών. Στην ανάλυση σάντουιτς, ο στόχος δεσμεύει το μόριο σύλληψης (συνήθως ακινητοποιημένο) και ένα μόριο ιχνηθέτη φθορισμού. Μετρείται ο σχηματισμός του προκύπτοντος φθορίζοντος συμπλόκου, ενώ τα ελεύθερα μόρια ιχνηθέτη φθορισμού αφαιρούνται ή εξαιρούνται οπτικά από τη περιοχή ανίχνευσης. Μια σχηματική απεικόνιση ανίχνευσης συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.4. Οι μελέτες σάντουιτς περιγράφονται στις περισσότερες δημοσιεύσεις για οπτικούς βιοαισθητήρες.^[193]



Σχήμα 3.4: Απεικόνιση της ανάλυσης σάντουιτς

Για μικρά μόρια με μία μόνο θέση δέσμευσης, ο σχηματισμός ενός τέτοιου σάντουιτς δεν είναι δυνατός και πρέπει να χρησιμοποιηθεί είτε ένας ανταγωνιστικός μηχανισμός είτε ένας προσδιορισμός μετατόπισης (Σχήμα 3.5). Χρησιμοποιούνται ευρέως δύο εκδοχές του ανταγωνιστικού προσδιορισμού. Σε μία εκδοχή, τα μόρια δέσμευσης ακινητοποιούνται, προστίθεται ο επισημασμένος στόχος στο διάλυμα δείγματος και τα επισημασμένα και μη επισημασμένα μόρια στόχοι ανταγωνίζονται για τις θέσεις σύνδεσης στο ακινητοποιημένο μόριο σύλληψης. Στη δεύτερη εκδοχή, ένα μόριο στόχος ακινητοποιείται, προστίθεται επισημασμένο αντίσωμα στο διάλυμα δείγματος και οποιοσδήποτε στόχος χωρίς σήμανση στο διάλυμα αποτρέπει τη σύνδεση του επισημασμένου αντισώματος στον ακινητοποιημένο στόχο. Και στις δύο αυτές εκδοχές, το σήμα φθορισμού στην επιφάνεια μειώνεται με την αύξηση του στόχου στο διάλυμα δείγματος. Αν και μπορεί επίσης να μετρηθεί ο φθορισμός στο διάλυμα, το φθορίζον συστατικό στο διάλυμα είναι γενικά σε αρκετά υψηλή συγκέντρωση ώστε οι πολύ μικρές μειώσεις που προκαλούνται από χαμηλές συγκεντρώσεις του στόχου είναι δύσκολο να μετρηθούν.

Ένας τρόπος για αποφυγή αυτού του προβλήματος είναι να χρησιμοποιηθεί μια ανάλυση μετατόπισης. Σε αυτήν τη μορφή, οι δραστικές θέσεις είναι κορεσμένες με ένα ανάλογο φθορισμού του μορίου στόχου. Οι παλμοί του δείγματος εισάγονται πάνω από την επιφάνεια με τη βοήθεια ενός συστήματος μεταφοράς υγρών σε ένα συνεχώς ρέον ρεύμα. Όταν το ρεύμα περιέχει τον στόχο, το ανάλογο φθορισμού μετατοπίζεται από το ακινητοποιημένο μόριο σύλληψης και μετριέται. Έτσι δημιουργείται ένα σήμα το οποίο αυξάνει ανάλογα με την ποσότητα του στόχου που υπάρχει.^[194]



Σχήμα 3.5: Διαμορφώσεις ανάλυσης.

Τέσσερις διαφορετικοί τύποι προσδιορισμών είναι δυνατοί χρησιμοποιώντας βιοαισθητήρες φθορισμού, με παραλλαγές όπως η δέσμευση αντισωμάτων στην επιφάνεια και η επισήμανση του αντιγόνου σε ανταγωνιστικές μελέτες σε παραλλαγή της μορφής που φαίνεται στο (B) ή η χρήση μοριακών φάρων για την παροχή σήματος κατά την άμεση σύνδεση του αντιγόνου σε μια παραλλαγή της μορφής που φαίνεται στο (Δ).

Από τα πιο συχνά περιγραφόμενα μόρια αναγνώρισης, τα ολιγονουκλεοτίδια παρέχουν τη μεγαλύτερη ευαισθησία. Ο βασικός λόγος είναι ότι τα γονίδια-στόχοι μπορούν να ενισχυθούν πριν από την αντίδραση ανίχνευσης χρησιμοποιώντας την πολυμεράση και εκλεκτικούς εκκινητές. Αυτό το στάδιο ενίσχυσης όχι μόνο παράγει περισσότερα μόρια για την αντίδραση ανίχνευσης, αλλά επίσης αυξάνει την αναλογία στόχων προς μόρια υποβάθρου σε σύνθετα δείγματα. Έχουν αναπτυχθεί βιοαισθητήρες φθορισμού που απλά μετρούν τη διαδικασία ενίσχυσης χρησιμοποιώντας χρωστικές που δεσμεύονται σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις δίκλωνου DNA, υποθέτοντας ότι αναπαράγονται μόνο ολιγονουκλεοτίδια στόχοι. Για πιο επιλεκτική ανάλυση, τα προϊόντα της ενίσχυσης έχουν μετρηθεί χρησιμοποιώντας τριχοειδή ηλεκτροφόρηση ή με υβριδοποίηση σε εκλεκτικούς ανιχνευτές σε διάλυμα ή σε μια επιφάνεια.

3.3.1. Ανάλυση Stern - Volmer και Μηχανισμοί Απόσβεσης

Μια διαδικασία απόσβεσης φθορισμού Stern-Volmer ορίζεται ως μια διαδικασία που ανταγωνίζεται με τη διαδικασία αυθόρμητης εκπομπής και έτσι συντομεύει τη διάρκεια ζωής του φθοροφόρου. Οι αντιδράσεις απόσβεσης είναι η μεταφορά ενέργειας, η μεταφορά πρωτονίων ή οι διεργασίες μεταφοράς ηλεκτρονίων. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να

εμπλέκεται παροδικό διμερές ή σύνθετος σχηματισμός στη διεγερμένη κατάσταση (σχηματισμός excimer ή exciplex). Αυτά τα διεγερμένα διμερή ή σύμπλοκα μπορεί ή όχι να εκπέμπουν τη δική τους χαρακτηριστική εκπομπή που είναι πιθανό να είναι διαφορετική από εκείνη του αρχικού μορίου.

Σε διάλυμα, υπάρχει η πιθανότητα σχηματισμού ασθενούς συμπλόκου στη θεμελιώδη κατάσταση. Αυτό μπορεί να προκαλέσει άμεση απώλεια ηλεκτρονικής ενέργειας και ονομάζεται στατική απόσβεση. Δεδομένου ότι δεν υπάρχει ανταγωνισμός με τη διαδικασία εκπομπής, η διάρκεια ζωής δεν επηρεάζεται. Ο σχηματισμός συμπλόκου στην θεμελιώδη κατάσταση μειώνει την ένταση φθορισμού ανταγωνιζόμενος τα μη συμπλοκοποιημένα μόρια για την απορρόφηση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Αυτό ονομάζεται φαινόμενο εσωτερικού φίλτρου, παρόμοιο με την παρουσία άλλων προστιθέμενων απορροφητικών μορίων.

Υπό σταθερό φωτισμό, ο ρυθμός σχηματισμού διεγερμένου μορίου A^* είναι ίσος με τον ρυθμό απενεργοποίησης και η συγκέντρωση $[A^*]$ παραμένει σταθερή (σταθερή κατάσταση):

$$\frac{d[A^*]}{dt} = 0 \quad \text{Εξίσωση 3.3.1}$$

Η συγκέντρωση του A^* απουσία διμοριακού σταδίου απόσβεσης δίνεται από:

$$[A^*]^0 = \frac{I_a}{k_f + k_{ic} + k_{isc}} = \frac{I_a}{k_f + k_{nr}} \quad \text{Εξίσωση 3.3.2}$$

όπου I_a , είναι ο ρυθμός απορρόφησης φωτός ή ο ρυθμός σχηματισμού του διεγερμένου μορίου, k_f είναι η σταθερά ρυθμού για τον φθορισμό και k_{nr} , το άθροισμα των σταθερών ρυθμού για όλα τα μονομοριακά μη ακτινοβόλα στάδια απενεργοποίησης, όπως η εσωτερική μετατροπή k_{ic} και διασυστηματική διασταύρωση k_{isc} , τα οποία προέρχονται από αυτήν τη διεγερμένη κατάσταση.

Εάν προστεθεί ένα άλλο μόριο Q στο διάλυμα που αποσβένει τον φθορισμό με ένα διμοριακό στάδιο απόσβεσης, τότε



Η συγκέντρωση του μορίου εκπομπής φωτός $[A^*]$ παρουσία του αποσβέστη δίνεται ως

$$[A^*] = \frac{I_a}{k_f + k_{nr} + k_q[Q]} \quad \text{Εξίσωση 3.3.4}$$

Εάν τα $[A^*]^0$ και $[A^*]$ είναι συγκεντρώσεις μορίων που εκπέμπουν φως απουσία και παρουσία του αποσβέστη, οι αντίστοιχες κβαντικές αποδόσεις είναι:

$$\varphi_f^0 = \frac{k_f[A^*]^0}{I_a} = \frac{k_f}{k_f + k_{nr}} \quad \text{Εξίσωση 3.3.5}$$

και

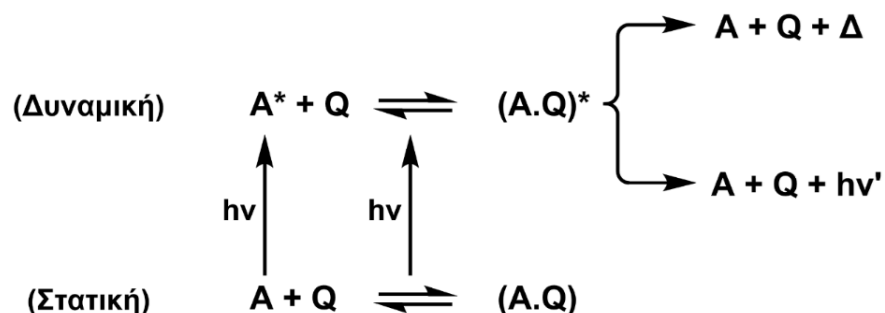
$$\varphi_f = \frac{k_f[A^*]}{I_a} = \frac{k_f}{k_f + k_{nr} + k_q[Q]} \quad \text{Εξίσωση 3.3.6}$$

Ο λόγος των δύο αποδόσεων είναι

$$\frac{\varphi_f^0}{\varphi_f} = \frac{k_f + k_{nr} + k_q[Q]}{k_f + k_{nr}} = 1 + \frac{k_q[Q]}{k_f + k_{nr}} = 1 + k_q\tau[Q] = 1 + K_{SV}[Q] \quad \text{Εξίσωση 3.3.7}$$

Αυτή η έκφραση είναι γνωστή ως η εξίσωση Stern-Volmer και η K_{SV} ως η σταθερά απόσβεσης Stern-Volmer. Η K_{SV} είναι ο λόγος της διμοριακής σταθεράς απόσβεσης προς τη μονομοριακή σταθερά αποδιέγερσης και έχει μονάδες μέτρησης M^{-1} . Αυτό συνεπάγεται ανταγωνισμό μεταξύ των δύο οδών αποδιέγερσης και έχει τον χαρακτήρα μιας σταθεράς ισορροπίας. Η έκφραση Stern-Volmer είναι γραμμική στην συγκέντρωση αποσβέστη και η K_{SV} λαμβάνεται ως η κλίση της γραφικής παράστασης του φ_f^0/φ_f έναντι του $[Q]$. Εδώ, τ είναι η πραγματική διάρκεια ζωής του φθορίζοντος μορίου απουσία διμοριακής απόσβεσης και μετριέται ανεξάρτητα. Στη συνέχεια, από τη γνώση του K_{SV} , μπορεί να προσδιοριστεί η σταθερά ρυθμού k_q , για το στάδιο διμοριακής απόσβεσης.

Μπορεί να προκύψουν αποκλίσεις από τη σχέση Stern-Volmer εάν υπάρχει στατική απόσβεση. Η ταυτόχρονη παρουσία δυναμικής και στατικής απόσβεσης μπορεί να συνοψιστεί στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 3.6):



Σχήμα 3.6: Αναπαράσταση Στατικής και Δυναμικής Απόσβεσης.

Εάν το K_0 είναι η σταθερά μοριακής ισορροπίας για το σχηματισμό του συμπλόκου στην θεμελιώδη κατάσταση

$$K_0 = \frac{[AQ]}{[A][Q]} \quad \text{Εξίσωση 3.3.8}$$

τότε το κλάσμα a , του προσπίπτοντος φωτός που απορροφάται από το σύμπλοκο (AQ) δίνεται από

$$a = \frac{\varepsilon' K_0 [Q]}{\varepsilon + \varepsilon' K_0 [Q]} \quad \text{Εξίσωση 3.3.9}$$

όπου ε και ε' είναι οι μοριακοί συντελεστές απόσβεσης των A και AQ, αντίστοιχα στο μήκος κύματος διέγερσης.

Εάν το σύμπλοκο δεν φθορίζει, μόνο το κλάσμα $(1 - a)$ χρησιμοποιείται αποτελεσματικά για εκπομπές φθορισμού και για μικρά a , και $\varepsilon = \varepsilon'$,

$$\frac{F_0 - F}{F} = (K_{SV} + K_0)[Q] + K_{SV}K_0[Q]^2 \quad \text{Εξίσωση 3.3.10}$$

όπου F_0 και F είναι εντάσεις φθορισμού απουσία και παρουσία αποσβέστη, αντίστοιχα. Ένας άλλος τρόπος για να απεικονιστεί η εξάρτηση από το $[Q]$ είναι:

$$\frac{\left(\frac{F_0 - F}{F}\right)}{[Q]} = (K_{SV} + K_0) + K_{SV}K_0[Q] \quad \text{Εξίσωση 3.3.11}$$

Σε αυτήν την έκφραση, η ποσότητα στα αριστερά είναι η φαινόμενη σταθερά απόσβεσης και ποικίλλει γραμμικά με το $[Q]$, με μια κλίση που δίνεται από το προϊόν των δυναμικών (K_{SV}) και στατικών (K_0) σταθερών απόσβεσης, η οποία είναι ίδια με τη σταθερά ισορροπίας. Η αποτέμνουσα αντιστοιχεί στο άθροισμα των δύο. Η έκφραση γίνεται πιο περίπλοκη εάν το σύμπλοκο της θεμελιώδους κατάστασης εκπέμπει και αυτό μετά από διέγερση ή εάν σχηματίζονται φθορίζοντα σύμπλοκα στην διεγερμένη κατάσταση (σχηματισμός και εκπομπή exciplex).^[195]

3.3.2. Φαινόμενο FRET

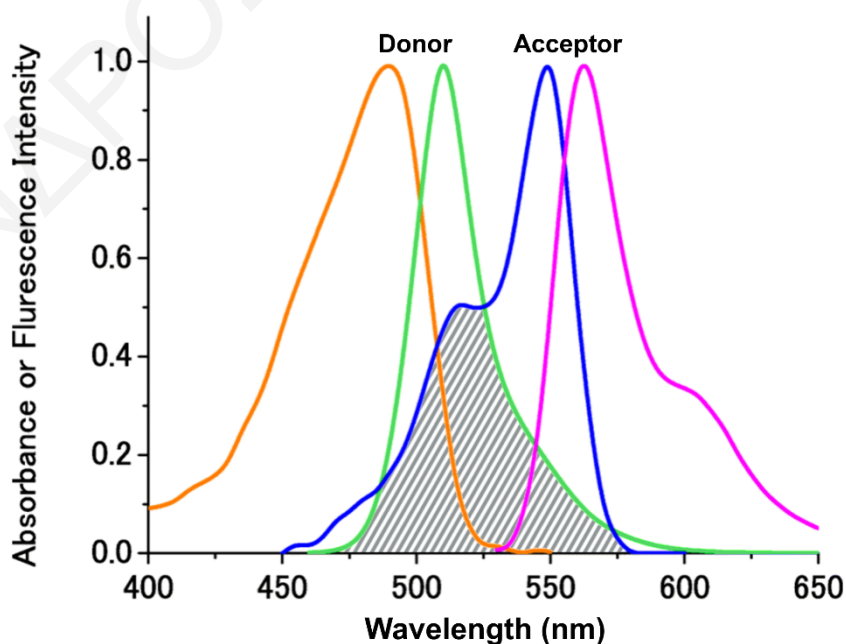
Το φαινόμενο FRET είναι μια μη ακτινοβόλα μεταφορά ενέργειας μεταξύ των διεγερμένων καταστάσεων ενός φθορίζοντος δότη (D) και ενός δέκτη (A) μέσω σύζευξη διπόλου – διπόλου μεγάλης εμβέλειας. Αυτή η διαδικασία μεταφοράς ενέργειας ακολουθείται από εκπομπή φωτονίων των μορίων δέκτη. Το φαινόμενο FRET περιεγράφηκε για πρώτη φορά

από τον Förster το 1946. Το κύριο εύρημα του Förster ήταν ότι το FRET μεταξύ ενός ζεύγους δότη-δέκτη θα μπορούσε να συμβεί σε αποστάσεις έως και 100 Å. Για αποτελεσματικό FRET μεταξύ ενός μορίου δότη και δέκτη, ο δότης και ο δέκτης πρέπει να χωρίζονται χωρικά για να αποτρέπονται αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ηλεκτρονιακών νεφών τους που θα μπορούσαν να αλλάζουν τα ηλεκτρονικά τους φάσματα. Ωστόσο, όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.7, για να συμβεί το FRET, πρέπει να υπάρχει μια φασματική επικάλυψη μεταξύ της εκπομπής δότη και της απορρόφησης του δέκτη.

Το φαινόμενο μεταφοράς ενέργειας συντονισμού μεταξύ μορίων δότη και δέκτη μπορεί να περιγραφεί ως συντονισμός μεταξύ δύο μηχανικών εκκρεμών. Λαμβάνοντας υπόψη τη κυματοσυνάρτηση και το κανονικοποιημένο φάσμα του δότη, η σταθερά ρυθμού FRET, k_t , εκφράζεται ως εξής:

$$k_t = \frac{9000(\ln 10)Q_D\kappa^2}{128\pi^5 N_A n^4 \tau_D R^6} \int_0^\infty F_D(\nu)\epsilon_a(\nu) \frac{d\nu}{\nu^4} \quad \text{Εξίσωση 3.3.12}$$

όπου το κ^2 είναι ένας παράγοντας προσανατολισμού, το $F_D(\nu)$ είναι η φασματική κατανομή του φθορισμού του δότη (κανονικοποιημένη στη συχνότητα), το $\epsilon_a(\nu)$ είναι ο μοριακός συντελεστής απόσβεσης του δέκτη, το N είναι ο αριθμός του Avogadro, το n είναι ο δείκτης διάθλασης του διαλύτη, το τ_D είναι η εγγενής διάρκεια ζωής του δότη απουσία αποσβέστη, το Q_D είναι η κβαντική απόδοση του δότη παρουσία του δέκτη και το R είναι η απόσταση μεταξύ των μορίων δότη και δέκτη.



Σχήμα 3.7: Φασματική επικάλυψη (σημειώνονται με διαγώνιες γραμμές) μεταξύ της εκπομπής του δότη και την απορρόφηση δέκτη απαιτείται για FRET σε ένα ζεύγος δότη-δέκτη.

Για να απλοποιήσει την περιγραφή του FRET, ο Förster έγραψε την Εξίσωση 3.3.12. με την ακόλουθη ανηγμένη μορφή:

$$k_t = \tau_D^{-1} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6 \quad \text{Εξίσωση 3.3.13}$$

όπου τ_D είναι η μετρούμενη διάρκεια ζωής του δότη απουσία του δέκτη, και το R_0 είναι η κρίσιμη ακτίνα της μεταφοράς, ή η απόσταση Förster, η οποία είναι η απόσταση στην οποία η απόδοση μεταφοράς ενέργειας είναι 50%. Η απόσταση Förster, R_0 , εξαρτάται από τα φασματικά χαρακτηριστικά του ζεύγους δότη-δέκτη και εκφράζεται σε Angstroms (Å).

Όπως φαίνεται στην Εξίσωση 3.3.13, ο ρυθμός μεταφοράς ενέργειας εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την απόσταση μεταξύ των μορίων δότη και δέκτη. Για ένα ζεύγος δότη-δέκτη που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο μεταξύ τους, η απόδοση μεταφοράς ενέργειας, E , εκφράζεται ως:

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6} \quad \text{Εξίσωση 3.3.14}$$

Από την άλλη πλευρά, για τυχαία κατανομημένα μόρια δότη και δέκτη σε διάλυμα, το R_0 εξαρτάται από τη συγκέντρωση του δέκτη και εκφράζεται ως:

$$R_0 = \left(\frac{3000}{4\pi N |A|_{1/2}} \right)^{1/3} \quad \text{Εξίσωση 3.3.15}$$

όπου N είναι ο αριθμός του Avogadro και $|A|_{1/2}$ είναι η συγκέντρωση του δέκτη στην οποία η απόδοση μεταφοράς ενέργειας E είναι 50%. Η Εξίσωση 3.3.15 αποκαλύπτει το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό της μεταφοράς ενέργειας μεταξύ μορίων δότη και δέκτη που κατανέμονται τυχαία σε διάλυμα. Δηλαδή, η συγκέντρωση του δέκτη πρέπει να είναι αρκετά υψηλή, συχνά στο χιλιοστογραμμικό επίπεδο (mM), για την παραγωγή μετρήσιμων σημάτων FRET.

Η μείωση του φθορισμού δότη λόγω του FRET εξαρτάται από τη διάσταση της κατανομής του δέκτη. Τα μόρια δέκτη μπορούν να κατανέμονται τυχαία σε διάλυμα (τριδιάστατα), σε επίπεδο (δισδιάστατα), ή ακόμη και γραμμικά (μονοδιάστατα). Για παράδειγμα, μια επίπεδη κατανομή συμβαίνει όταν τα μόρια δότη και δέκτη ενσωματώνονται σε επίπεδες διπλοστιβάδες φωσφολιπιδίων. Μια γραμμική κατανομή συμβαίνει όταν τα μόρια δότη και δέκτη συνδέονται με μια έλικα DNA ή επιμήκη πρωτεΐνη, όπως το κολλαγόνο. Για τυχαία κατανομή δοτών και αποδεκτών σε διάλυμα, με την προϋπόθεση ότι δεν υπάρχει διάχυση

και χωρίς αποκλεισμένο όγκο, η ένταση φθορισμού των μορίων δότη παρουσία αποδεκτών εκφράζεται ως:

$$I_{DA} = I_D^0 \exp \left[-\frac{t}{\tau_D} - 2\gamma \left(\frac{t}{\tau_D} \right)^{d/6} \right] \quad \text{Εξίσωση 3.3.16}$$

όπου d είναι 3, 2 ή 1, για τρις, δις ή μονοδιάστατες κατανομές, αντίστοιχα, τ_D είναι ο χρόνος αποδιέγερσης του δότη απουσία μορίων δέκτη, και γ είναι μια συνάρτηση που σχετίζεται με τη συγκέντρωση του δέκτη και τη διάσταση του συστήματος.^[196]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1. Γενικές Διαδικασίες

Όλες οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση αγοράστηκαν από εμπορικές πηγές (Merck και TCI), εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά. Τα φάσματα ^1H και ^{13}C NMR καταγράφηκαν με φασματογράφο NMR Bruker Avance Ultrashield 500 MHz σε 296.3 K και οι χημικές μετατοπίσεις αναφέρονται στον υπολειπόμενο δευτεριωμένο διαλύτη. Οι μετρήσεις απορρόφησης πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis Shimadzu 1900. Τα φάσματα εκπομπής λήφθηκαν σε φασματοφωτόμετρο φθορισμού Jasco FP-1300. Οι μετρήσεις κυκλικού διχρωϊσμού πραγματοποιήθηκαν σε φασματοπολαρίμετρο Jasco J-815. Για τη διεξαγωγή πειραμάτων Raman συντονισμού χρησιμοποιήθηκαν κυλινδρικές κυψελίδες χαλαζία διαμέτρου 1mm και μια πηγή μονοχρωματικής ακτινοβολίας 405 nm (Ondax, 40 mW LM Series 405 – Ισχύς: 2.7 mW), 408 nm (rgb photonics, 50 mW Lambda Mini Evo 405 – Ισχύς: 2.7 mW) και 473 nm (Ultralasers, 50 mW OEM DPSS Laser – Ισχύς: 2.7 mW). Η σκεδαζόμενη ακτινοβολία, αφού πρώτα περάσει από ανάλογο φίλτρο για αφαίρεση της έντονης κορυφής Rayleigh, συλλέχθηκε και εστιάστηκε σε φασματογράφο Czerny - Turner με μήκος 750 mm (Acton Research, SP2750i) και κατέληξε στον ανιχνευτή (UV-enhanced LN₂-cooled CCD camera, Spec10:2KBUV, Princeton Instruments). Τα φάσματα υπερύθρου λήφθηκαν από φασματοφωτόμετρο Jasco FT/IR 460. Τα ολιγονουκλεοτίδια DNA που χρησιμοποιήθηκαν αγοράστηκαν καθαρισμένα με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης από την Eurogentec. Το pH μετρήθηκε με pH-μετρητή Eutech EcoScan pH 6 και ηλεκτρόδιο Hamilton MiniTrode.

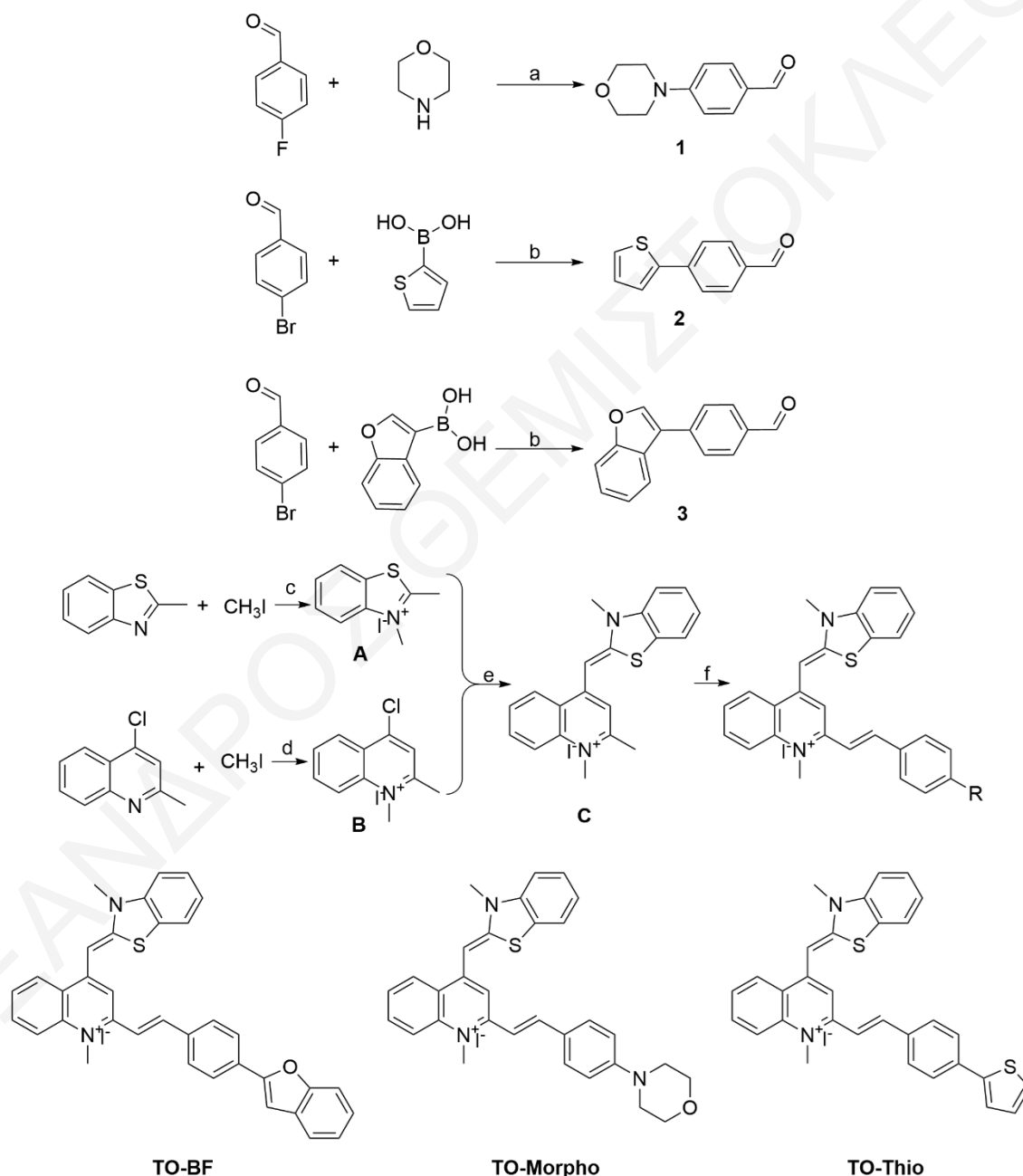
4.2. Σύνθεση Μικρών Μορίων

Η γενική συνθετική πορεία (Σχήμα 4.1) βασίστηκε σε βιβλιογραφικές αντιδράσεις που με την σειρά τους ήταν βασισμένες σε δίπλωμα ευρεσιτεχνίας.^[191,202–206]

4.2.1. Σύνθεση της 4-μορφολινοβενζαλδεΐδης (1)

Σε σφαιρική φιάλη προστέθηκε K₂CO₃ (1.1057 g, 8.0 mmol, 2.0 ισοδ.). Τοποθετήθηκε ψυκτήρας, σφραγίστηκε και στη συνέχεια τέθηκε υπό αδρανή ατμόσφαιρα. Στη συνέχεια, η 4-φθοροβενζαλδεΐδη (0.5 g, 4.0 mmol, 1.0 ισοδ.) και η μορφολίνη (0.42 mL, 4.8 mmol, 1.2

ισοδ.) αραιώθηκαν σε άνυδρο DMF (8 mL) και προστέθηκαν στο μείγμα. Η αντίδραση θερμάνθηκε στους 130 °C και αναβράστηκε για 24 ώρες. Το μείγμα αφέθηκε να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου και διαλύθηκε με οξικό αιθυλεστέρα, εκπλύθηκε με νερό, άλμη και εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική στιβάδα ξηράνθηκε πάνω από Na₂SO₄ για 1 ώρα και στη συνέχεια το μέσο ξήρανσης διηθήθηκε. Το ακατέργαστο προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και χρήση μείγματος εξανίου-οξικού αιθυλεστέρα (3:1 έως 1:1) για να ληφθεί η ένωση **1** 0.6956 g (3.6 mmol, 91% απόδοση).



Σχήμα 4.1: Συνθετική Πορεία των μικρών μορίων. (a) K₂CO₃, DMF, 130 °C, 12 h, (b) Na₂CO₃, Pd(PPh₃)₄, τολουόλιο, μεθανόλη, νερό, 80 °C, 0.25 h, (c) DCM, 45 °C, 12 h, (d) DMSO, 75 °C, 9 h, (e) NaHCO₃, μεθανόλη, θ.δ., 1 h, (f) αρωματικές αλδεϋδες, βοτανόλη, 135 °C, 3 h.

4.2.2. Σύνθεση της 4-(θειοφαιν-2-υλ)βενζαλδεΐδης (2)

Σε σφαιρική φιάλη προστέθηκαν 4-Βρώμοβενζαλδεΐδη (0.15 g, 0.82 mmol, 1.0 ισοδ.) και αναμίχθηκε με θειοφαιν-2-υλοβορονικό οξύ (0.23 g, 1.77 mmol) και καταλύτης Pd(PPh₃)₄ (0.0474 g, 0.041 mmol, 0.05 ισοδ.). Τοποθετήθηκε ψυκτήρας, σφραγίστηκε και στη συνέχεια τέθηκε υπό αδρανή ατμόσφαιρα. Προστέθηκε μίγμα τολουολίου:μεθανόλης (3mL:0.8mL) και στη συνέχεια μίγμα νερού:Na₂CO₃ (1.2mL:0.14 g, 5.3 mmol, 6.5 ισοδ.) στην αντίδραση. Η αντίδραση θερμάνθηκε στους 100 °C και αναβράστηκε για 24 ώρες. Το μείγμα αφέθηκε να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια διαλύθηκε με οξικό αιθυλεστέρα, εκπλύθηκε με Na₂CO₃ και εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική στιβάδα ξηράνθηκε με Na₂SO₄ για 1 ώρα και στη συνέχεια το μέσο ξήρανσης διηθήθηκε. Το ακατέργαστο προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και χρήση μείγματος εξανίου-οξικού αιθυλεστέρα (10:1 έως 7:1) για να ληφθεί η ένωση **2** 0.131 g (0.7 mmol, 85% απόδοση).

4.2.3. Σύνθεση της 4-(βενζοφουραν-2-υλ)βενζαλδεΐδης (3)

Σε σφαιρική φιάλη προστέθηκαν 4-Βρώμοβενζαλδεΐδη (0.10 g, 0.54 mmol, 1.0 ισοδ.), βενζοφουραν-2-υλοβορονικό οξύ (0.1312 g, 0.81 mmol, 1.5 ισοδ.) και καταλύτης Pd(PPh₃)₄ (0.0312 g, 0.027 mmol, 0.05 ισοδ.). Τοποθετήθηκε ψυκτήρας, σφραγίστηκε και στη συνέχεια τέθηκε υπό αδρανή ατμόσφαιρα. Προστέθηκε μίγμα τολουολίου:μεθανόλης (3ml:0.8ml) και στη συνέχεια μίγμα νερού:Na₂CO₃ (1.2 mL:0.14 g, 5.3 mmol, 6.5 ισοδ.) στην αντίδραση. Η αντίδραση θερμάνθηκε στους 100 °C και αναβράστηκε για 24 ώρες. Το μείγμα αφέθηκε να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια διαλύθηκε με οξικό αιθυλεστέρα, εκπλύθηκε με Na₂CO₃ και εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα. Η οργανική στιβάδα ξηράνθηκε με Na₂SO₄ για 1 ώρα και στη συνέχεια το μέσο ξήρανσης διηθήθηκε. Το ακατέργαστο προϊόν καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης και χρήση μείγματος εξανίου-οξικού αιθυλεστέρα (10:1 έως 7:1) για να ληφθεί η ένωση **3** 0.1067 g (0.48 mmol, 89% απόδοση).

4.2.4. Σύνθεση του ιωδιούχου 1,2-διμεθυλοβενζοθειαζολ-1-ίου (A)

Σε σφαιρική φιάλη προστέθηκε 2-Μεθυλοβενζοθειαζόλη (1.00 g, 6.7 mmol, 1.0 ισοδ.) Τοποθετήθηκε ψυκτήρας, σφραγίστηκε και στη συνέχεια τέθηκε υπό αδρανή ατμόσφαιρα. Προστέθηκαν 10 mL αιθανόλης και στη συνέχεια ιωδομεθάνιο (2.5 mL, 40.2 mmol, 6.0 ισοδ.). Η αντίδραση θερμάνθηκε στους 60 °C και αναδεύτηκε για 24 ώρες. Το μείγμα αφέθηκε να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου και η αιθανόλη εξατμίστηκε. Στη συνέχεια

προστέθηκε μικρή ποσότητα αιθανόλης έως ότου διαλυθεί το στερεό και στη συνέχεια προστέθηκε διαιθυλαιθέρας για να καταβυθιστεί το προϊόν. Το μείγμα διηθήθηκε, πλύθηκε με διαιθυλαιθέρα, ξηράνθηκε υπό κενό και το στερεό συλλέχθηκε. Το στερεό διαλύθηκε με ακετόνη και στη συνέχεια προστέθηκε διαιθυλαιθέρας για την καταβύθιση του προϊόντος. Το στερεό διηθήθηκε και ξηράνθηκε υπό κενό για να ληφθεί η ένωση **A** 1.5 g (5.2 mmol, 77% απόδοση). Χαρακτηρισμός: ^1H και ^{13}C NMR.

4.2.5. Σύνθεση του ιωδιούχου 4-χλώρο-1,2-διμεθυλοκινολιν-1-ίου (**B**)

Σε σφαιρική φιάλη προστέθηκε 4-χλωρο-2-μεθυλοκινολίνης (0.20 g, 1.13 mmol, 1.0 ισοδ.), Τοποθετήθηκε ψυκτήρας, σφραγίστηκε και στη συνέχεια τέθηκε υπό αδρανή ατμόσφαιρα. Προστέθηκαν 5 ml σουλφολανίου και στη συνέχεια ιωδομεθάνιο (0.42 mL, 6.8 mmol, 6.0 ισοδ.). Η αντίδραση θερμάνθηκε στους 60 °C και αναδεύτηκε για 24 ώρες. Το μείγμα αφέθηκε να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου και προστέθηκε διαιθυλαιθέρας για να καταβυθιστεί το προϊόν. Το μείγμα διηθήθηκε και το στερεό συλλέχθηκε. Το στερεό διαλύθηκε με ακετόνη και στη συνέχεια προστέθηκε διαιθυλαιθέρας για την καταβύθιση του προϊόντος. Το στερεό διηθήθηκε, πλύθηκε με διαιθυλαιθέρα και ξηράνθηκε υπό κενό για να ληφθεί η ένωση **B** 0.2931 g (0.92 mmol, 81% απόδοση). Χαρακτηρισμός: ^1H και ^{13}C NMR.

4.2.6. Σύνθεση του (**Z**) 1,2-διμεθυλο-4-((3-μεθυλοβενζο[d]θειαζολ-2(3H)-υλιδένιο)μεθυλο)κινολιν-1-ίου (**C**)

Σε σφαιρική φιάλη προστέθηκαν η ένωση **A** (1.0 g, 3.4 mmol, 1.1 ισοδ.) και η ένωση **B** (1.0 g, 3.1 mmol, 1.1 ισοδ.). Προστέθηκαν 7 mL μεθανόλης και υδατικό διάλυμα 5% NaHCO_3 . Το μείγμα αναδεύτηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστέθηκαν 6.0 mL κορεσμένου διαλύματος KI στο μείγμα αντίδρασης και συνεχίστηκε η ανάδευση για 15 λεπτά. Το ίζημα συλλέχθηκε μέσω διήθησης υπό κενό, εκπλύθηκε με μείγμα νερού-ακετόνης και ξηράθηκε υπό κενό για να προκύψει η ένωση **C** 1.12 g (2.5 mmol, 81% απόδοση).

4.2.7. Σύνθεση του TO-BF (**4**)

Σε σφαιρική φιάλη προστέθηκαν η ένωση **C** (0.21 g, 0.47 mmol, 1.0 ισοδ.) και η αρωματική αλδεΐδη **3** (0.21 g, 0.94 mmol, 2.0 ισοδ.). Τοποθετήθηκε ψυκτήρας, σφραγίστηκε και στη συνέχεια τέθηκε υπό αδρανή ατμόσφαιρα. Στη συνέχεια, 0.7 mL πιπεριδίνης διαλύθηκαν σε 7 mL 1-βουτανόλης και προστέθηκαν στο μείγμα. Η αντίδραση θερμάνθηκε στους 100 °C και αναβράστηκε για 24 ώρες. Το μείγμα αφέθηκε να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου.

Το στερεό διηθήθηκε, εκπλύθηκε με 1-βουτανόλη και αφέθηκε να στεγνώσει υπό κενό, για να παραχθεί η ένωση **6** 0.27 g (0.42 mmol, 89% απόδοση). Χαρακτηρισμός: ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC NMR και IR.

4.2.8. Σύνθεση του TO-Morpho (5)

Σε σφαιρική φιάλη προστέθηκαν η ένωση **C** (0.20 g, 0.44 mmol, 1.0 ισοδ.) και η αρωματική αλδεΐδη **1** (0.0857 g, 0.9 mmol, 2.0 ισοδ.). Τοποθετήθηκε ψυκτήρας, σφραγίστηκε και στη συνέχεια τέθηκε υπό αδρανή ατμόσφαιρα. Στη συνέχεια, 0.7 mL πιπεριδίνης διαλύθηκαν σε 7 mL 1-βουτανόλης και προστέθηκαν στο μείγμα. Η αντίδραση θερμάνθηκε στους 100 °C και αναβράστηκε για 24 ώρες. Το μείγμα αφέθηκε να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου. Το στερεό διηθήθηκε, εκπλύθηκε με 1-βουτανόλη και αφέθηκε να στεγνώσει υπό κενό, για να παραχθεί η ένωση **4** 0.2359 g (0.38 mmol, 85% απόδοση). Χαρακτηρισμός: ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC NMR και IR.

4.2.9. Σύνθεση του TO-Thio (6)

Σε σφαιρική φιάλη προστέθηκαν η ένωση **C** (0.18 g, 0.43 mmol, 1.0 ισοδ.) και η αρωματική αλδεΐδη **2** (0.160 g, 0.85 mmol, 2.0 ισοδ.). Τοποθετήθηκε ψυκτήρας, σφραγίστηκε και στη συνέχεια τέθηκε υπό αδρανή ατμόσφαιρα. Στη συνέχεια, 0.7 mL πιπεριδίνης διαλύθηκαν σε 7 mL 1-βουτανόλης και προστέθηκαν στο μείγμα. Η αντίδραση θερμάνθηκε στους 100 °C και αναβράστηκε για 24 ώρες. Το μείγμα αφέθηκε να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου. Το στερεό διηθήθηκε, εκπλύθηκε με 1-βουτανόλη και αφέθηκε να στεγνώσει υπό κενό, για να παραχθεί η ένωση **5** 0.23 g (0.37 mmol, 88% απόδοση). Χαρακτηρισμός: ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC NMR και IR.

4.3. Επιδράσεις Διαλύτη

Για σκοπό της μελέτης της επίδρασης του διαλύτη στα φάσματα απορρόφησης παράχθηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 1 mg/mL των TO-BF, TO-Morpho και TO-Thio σε διάφορους διαλύτες (ακετόνη, ακετονιτρίλιο, διμέθυλοσουλφοξείδιο, διχλωρομεθάνιο, κυκλοεξάνιο και νερό) μετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis Shimadzu 1900. Οι απορροφήσεις μετρήθηκαν σε εύρος 250 – 750 nm.

4.4. Υπολογιστική Μοντελοποίηση και Μοριακή Προσομοίωση

Οι γεωμετρίες της βασικής κατάστασης βελτιστοποιήθηκαν στην αέρια φάση χρησιμοποιώντας τη θεωρία επίπεδου DFT/RB3LYP και το σύνολο βάσης 6-311+G(d,p), το οποίο είναι το σύνολο βάσης 6-311 συμπληρωμένο από συναρτήσεις διάχυσης, 1 σύνολο

συναρτήσεων d στα βαρέα άτομα, και l σύνολο συναρτήσεων p στα υδρογόνα. Στη συνέχεια υπολογίστηκαν οι σταθερές δυνάμεων, οι εντάσεις και οι προκύπτουσες δονητικές συχνότητες IR και Raman χρησιμοποιώντας και πάλι τη θεωρία επίπεδου DFT/RB3LYP και το σύνολο βάσης 6-311+G(d,p).

Η μελέτη μοριακής πρόσδεσης των μορίων με τις τετραπλές έλικες γουανίνης της τελομερικής αλληλουχίας (αντιπαράλληλη (143D)^[43] και υβριδική μορφή (2JPZ)^[48]), και της παράλληλης μορφής της αλληλουχίας του προαγωγέα *c-myc* (1XAV)^[34], έγινε με την χρήση του λογισμικού Autodock Vina και χρήση των δομών των G4 από την Protein Data Bank (PDB) και των βέλτιστων γεωμετριών των μικρών μορίων από τους προηγούμενους υπολογισμούς.^[207] Με τη χρήση του λογισμικού AutoDock Tools, προστέθηκαν άτομα υδρογόνου και συγχωνεύθηκαν μη πολικά υδρογόνα στα αντίστοιχα βαριά άτομα στις δομές των υποδοχέων, ενώ για τους προσδέτες προστέθηκαν τα ατομικά φορτία Gasteiger–Marsili και καθορίστηκαν δεσμοί που μπορούν να περιστραφούν. Για τη μελέτη μοριακής πρόσδεσης των μορίων σε διπλή έλικα σχεδιάστηκε στο πρόγραμμα μοντελοποίησης Avogadro η αλληλουχία του ds26 (Ενότητα 4.5) και στη συνέχεια ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως αναφέρθηκε προηγουμένως.

4.5. Ολιγονουκλεοτίδια για *in vitro* Μελέτες

Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν για τις μελέτες *in vitro*, οι αντίστοιχοι κωδικοί τους και οι συντελεστές μοριακής απορρόφησης που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσής τους παρατίθενται στη συνέχεια. Οι συνθήκες ανόπτησης περιγράφονται λεπτομερώς στις αντίστοιχες ενότητες.

Πίνακας 4.1: Οι αλληλουχίες και ϵ των μοντέλων G4 και DNA

Μοντέλα Τετραπλής Έλικας Γουανίνης		
Κωδικός	Αλληλουχία (5'-3')	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
ap22AG	AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG	228,500
h22AG		
<i>c-myc</i>	TGAGGGTGGGTAGGGTGGGTAA	228,700
Μοντέλο DNA		
ds26	CAATCGGATCGAATTCGATCCGATTG	253,200

4.6. Μετρήσεις Κυκλικού Διχρωϊσμού DNA

Τα δείγματα DNA ανοπτήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα κακοδυλικού λιθίου (10 mM, pH 7.3) στις συγκεντρώσεις ολιγονουκλεοτιδίων, στις συνθήκες άλατος και στη θερμοκρασία που καθορίζονται στο κείμενο. Φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού καταγράφηκαν με τη χρήση φασματοπολαρίμετρου Jasco J-715. Τα φάσματα αθροίστηκαν 2 φορές και υπολογίστηκαν κατά μέσο όρο. Η ελλειπτικότητα καταγράφηκε από τα 200 - 350 nm, αφαιρέθηκε για το σήμα υποβάθρου και μηδενίστηκε στα 350 nm. Κατά την διάρκεια των τιτλοδοτήσεων της επόμενης υποενότητας μετρήθηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις του προστιθέμενου ολιγονουκλεοτιδίου τα φάσματα κυκλικού διχρωϊσμού για να μελετηθεί η επίδραση των μικρών μορίων στην τρισδιάστατη δομή του ολιγονουκλεοτιδίου.

4.7. Τιτλοδοτήσεις απορρόφησης και εκπομπής μικρών μορίων

Το ρυθμιστικό διάλυμα κακοδυλικού λιθίου (10 mM, pH 7.3) χρησιμοποιήθηκε για όλες τις μελέτες τιτλοδότησης. Τα ολιγονουκλεοτίδια διαλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 100 mM χλωριούχο κάλιο (h22AG, c-myc και ds26) ή νάτριο (ap22AG) και ανυψώθηκαν στους 95 °C για 5 λεπτά πριν αφεθούν να κρυώσουν σε θερμοκρασία δωματίου κατά τη διάρκεια της νύχτας. Το c-myc χρειάστηκε να τοποθετηθεί σε πάγο για να καταστεί δυνατή η ορθή ενδομοριακή αναδίπλωση. Οι συγκεντρώσεις ανόπτησης ήταν ~100 μM για όλα τα ολιγονουκλεοτίδια.

Λόγω της μικρής διαλυτότητας των μικρών μορίων στο νερό, παράχθηκαν μητρικά διαλύματα συγκέντρωσης ~20 mM μέσα σε DMSO και στη συνέχεια αραιώθηκαν αναλόγως με το ρυθμιστικό διάλυμα κακοδυλικού λιθίου. Η συγκέντρωση των ενώσεων διατηρήθηκε σταθερή ~20 μM για τις μετρήσεις απορρόφησης και εκπομπής σε ρυθμιστικό διάλυμα. Στη συνέχεια, το DNA τιτλοδοτήθηκε στο διάλυμα της ένωσης έως ότου οι μεταβολές στην απορρόφηση/εκπομπή γίνουν αισθητά αδιάφορες. Τα διαλύματα μετά το τέλος των τιτλοδοτήσεων χρησιμοποιήθηκαν για μετρήσεις με την φασματοσκοπία Raman Συντονισμού και παρασκευάστηκαν διαλύματα των μορίων στις συγκεντρώσεις (14-16 μM) που βρίσκονταν με το πέρας των τιτλοδοτήσεων για να χρησιμοποιηθούν ως διαλύματα αναφοράς.

Η ενίσχυση της εκπομπής προσδιορίστηκε από την ένταση του φθορισμού στο τέλος της τιτλοδότησης διαιρούμενο με την αρχική ένταση φθορισμού του φάσματος της ένωσης μόνο. Τα δείγματα διεγείρονταν στα 501 nm, όπου κατά την τιτλοδότηση του DNA, οι μεταβολές της απορρόφησης ήταν αμελητέες (< 0.005), όπως προσδιορίστηκε με

τιλοδοτήσεις απορρόφησης. Η εκπομπή καταγράφηκε από τα 514 έως τα 750 nm. Πραγματοποιήθηκαν τρεις ανεξάρτητες επαναλήψεις.

ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΘΕΜΙΣΤΟΚΛΕΟΥΣ

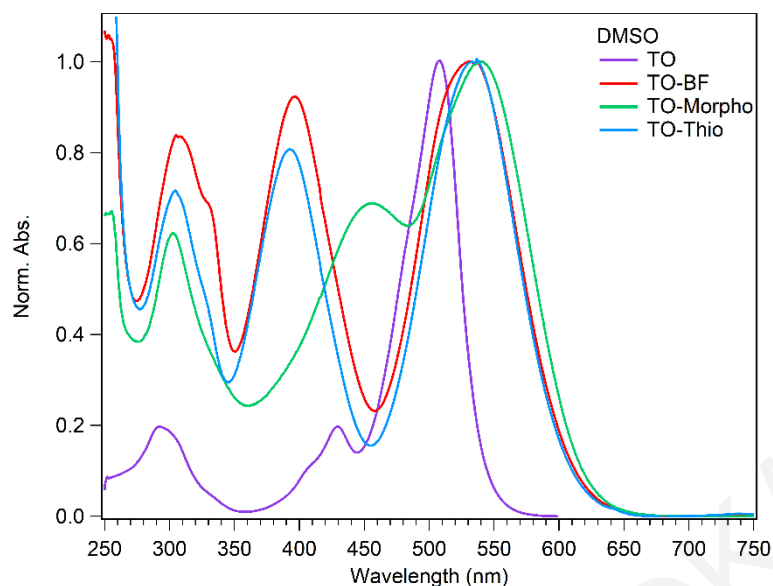
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΟΠΤΙΚΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ ΓΙΑ ΤΕΤΡΑΠΛΕΣ ΕΛΙΚΕΣ ΓΟΥΑΝΙΝΗΣ

Κύριοι άξονες του συγκεκριμένου κεφαλαίου είναι αρχικά ο χαρακτηρισμός των μικρών μορίων και μοντέλων DNA, οι μεταξύ αυτών αλληλεπιδράσεις, όπως επίσης και οι αλλαγές στις φυσικοχημικές ιδιότητες τους αναλόγως του περιβάλλοντος.

5.1. Φασματοσκοπικός Χαρακτηρισμός Μικρών Μορίων

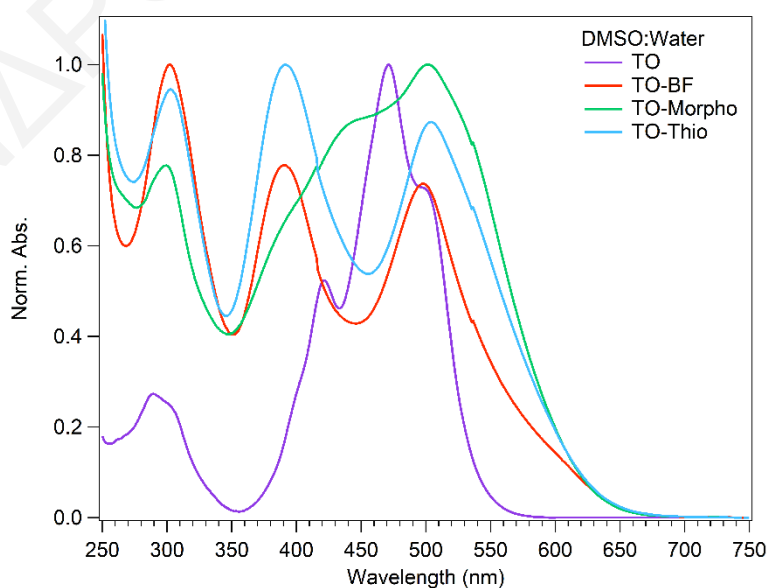
Τα φάσματα απορρόφησης των τριών μικρών μορίων (Σχήμα 5.1), τα οποία όλα μοιράζονται τον ίδιο πυρήνα της χρωστικής TO, αλλά διακρίνονται από διαφορετικές πλευρικές ομάδες, εμφανίζουν χαρακτηριστικές κορυφές απορρόφησης σε διακριτά μήκη κύματος. Τα μόρια παρουσιάζουν τρεις ζώνες απορρόφησης σε παρόμοιες ενέργειες, με τις διαφορές που παρουσιάζουν μεταξύ τους αλλά και σε σχέση με την χρωστική TO να αντανακλούν την επίδραση της πλευρικής ομάδας. Αυτές εμφανίζονται στα 300, ~ 400 και ~530 nm. Σημαντικό να σημειωθεί ότι η κορυφή υψηλότερης ενέργειας βρίσκεται και στα τρία μόρια στα 300 nm, ενώ η δεύτερη κορυφή τους στα ~400 nm φαίνεται να υπόκειται τη μεγαλύτερη διαφοροποίηση μεταξύ των μορίων αυτών. Συγκεκριμένα, στο TO-BF οι δύο κορυφές μικρότερης ενέργειας εμφανίζονται στα 400 και 529 nm, στο TO-Morpho στα 450 και 532 nm, και στο TO-Thio στα 390 και 530 nm. Αυτές οι διαφοροποιήσεις υπογραμμίζουν τη σημαντική επίδραση των υποκείμενων δομικών τροποποιήσεων στις οπτικές ιδιότητες των μορίων που έχουν κοινό πυρήνα.

Όταν τα μικρά μόρια διαλυμένα σε DMSO αραιωθούν κατόπιν σε νερό (εφόσον δεν επιτυγχάνεται απευθείας διαλυτοποίηση στο νερό, διαλύτη όπου θα γίνουν στη συνέχεια τα πειράματα αλληλεπίδρασης με το DNA) παρατηρούνται αλλαγές στα φάσματα απορρόφησης τους, όπως και στην περίπτωση του TO (Σχήμα 5.2).



Σχήμα 5.1: Κανονικοποιημένα Φάσματα Απορρόφησης των τριών μορίων και του TO διαλυμένα σε DMSO.

Συγκεκριμένα, η ένταση της κορυφής στα 300 nm αυξάνεται σε σχέση με την κορυφή στα ~400 nm στα TO-BF και TO-Thio και ο ώμος που παρουσιάζουν στα 330 nm εξαφανίζεται. Επίσης, η κορυφή χαμηλότερης ενέργειας μετατοπίζεται σε μικρότερα μήκη κύματος (από ~530 στα 501). Στις περιπτώσεις των TO-BF και TO-Thio φαίνεται ότι η κορυφή στα ~500 nm στενεύει κάτι που υποδηλώνει ότι έχουμε λιγότερα διαφορετικά είδη των δομών στο διάλυμα, ενώ στην περίπτωση του TO-Morpho παρατηρείται διαπλάτυνση της κορυφής με αποτέλεσμα να σμίγει με την κορυφή στα 450 nm και να δημιουργείται όμως στην κορυφή στα 450 nm.



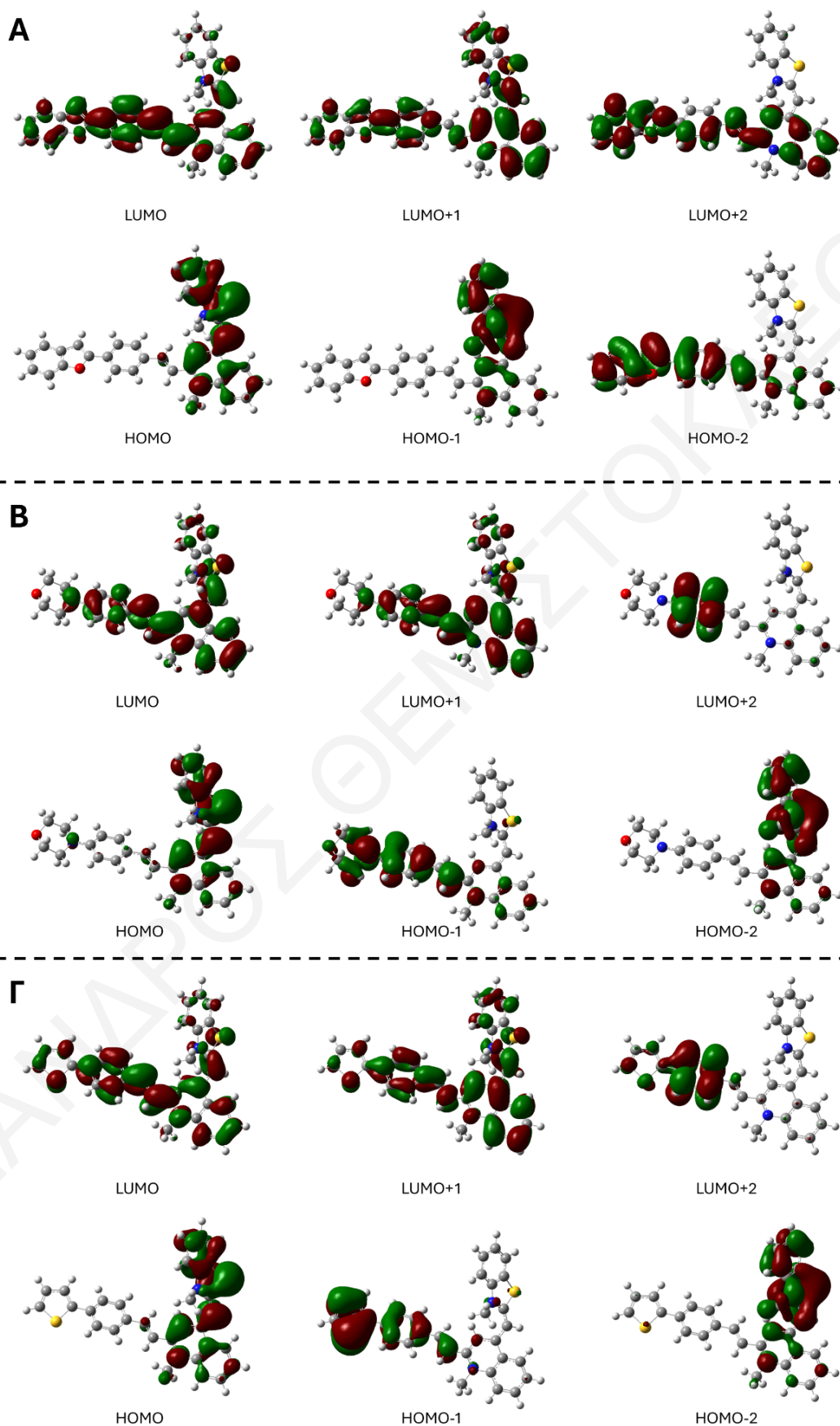
Σχήμα 5.2: Κανονικοποιημένα Φάσματα Απορρόφησης των τριών μορίων και του TO διαλυμένα σε DMSO:H₂O 1:10.

5.1.1. Υπολογιστική προσομοίωση ηλεκτρονιακών μεταπτώσεων

Με ένα απλό υπολογισμό των ηλεκτρονικών μεταπτώσεων χρησιμοποιώντας το επίπεδο θεωρίας ZINDO-CI^[208–210] με χρήση του προγράμματος ArgusLab^[211], έγινε και μια δεύτερη προσέγγιση στην φύση αυτών των αλλαγών που παρατηρούνται με αλλαγή της πολικότητας του διαλύτη. Ο παρακάτω πίνακας συνοψίζει τις κύριες μεταπτώσεις, τις ενέργειες κάθετης μετάπτωσης (σε nm) που υπολογίστηκαν με τη μέθοδο ZINDO-CI στις βελτιστοποιημένες δομές B3LYP/6-311+G(d,p), τις αντίστοιχες ενέργειες μετάπτωσης από τα πειραματικά φάσματα απορρόφησης και τις εντάσεις ταλάντωσης (oscillator strength, *f*) και για τις τρεις ενώσεις, ενώ στο Σχήμα 5.3 φαίνονται οι αναπαραστάσεις των μοριακών τροχιακών.

Πίνακας 5.1: Υπολογισμένες ηλεκτρονικές μεταπτώσεις, ενέργειες κάθετης διέγερσης και οι αναθέσεις τους για τα τρία μόρια με τη χρήση του ZINDO-CI σε βελτιστοποιημένες δομές B3LYP/6-311+G(d,p). H: HOMO, L: LUMO

Ένωση	Μεταπτώσεις	ΔΕ (nm)	ΔΕ _{πειρ.} (nm)	<i>f</i>
TO-BF				
1A	136 → 138 (0.43) (H-1 → L)	504.9	526	0.8758
	137 → 138 (0.40) (H → L)			
	137 → 139 (0.05) (H → L+1)			
2A	136 → 138 (0.46) (H-1 → L)	418.4	395	1.1111
	137 → 138 (0.30) (H → L)			
3A	137 → 139 (0.56) (H → L+1)	337.5		0.4953
	137 → 140 (0.12) (H → L+2)			
4A	136 → 139 (0.43) (H-1 → L+1)	289.4	308	0.07
TO-Morpho				
1A	130 → 131 (0.66) (H → L)	503.8	538.5	0.7571
	129 → 131 (0.21) (H-1 → L)			
2A	129 → 131 (0.66) (H-1 → L)	403.1	451.5	1.1241
	130 → 131 (0.18) (H → L)			
3A	130 → 132 (0.75) (H → L+1)	300.5	302	0.2346
4A	129 → 132 (0.66) (H-1 → L+1)	279.3		
TO-Thio				
1A	127 → 129 (0.43) (H-1 → L)	499.6	526	0.8147
	128 → 129 (0.41) (H → L)			
2A	127 → 129 (0.46) (H-1 → L)	410.9	395	1.1240
	128 → 129 (0.30) (H → L)			
3A	126 → 129 (0.25) (H-2 → L)	316.7	307	0.3164
	128 → 129 (0.19) (H → L)			
4A	127 → 130 (0.43) (H-1 → L+1)	287.8		0.1053
	126 → 129 (0.19) (H-2 → L)			



Σχήμα 5.3: Μοριακά Τροχιακά για τα τρία μόρια που υπολογίστηκαν σε επίπεδο θεωρίας B3LYP/6-311+G(d,p). (A) TO-BF (B) TO-Morpho (Γ) TO-Thio.

Από τα δεδομένα του υπολογισμού μπορούμε να δημιουργήσουμε ένα θεωρητικό φάσμα. Συμβατικά, η περιοχή των φασμάτων υπεριώδους-ορατού απεικονίζεται ως ε έναντι λ (μήκος κύματος διέγερσης σε nm) και οι κορυφές λαμβάνουν σχήμα γκαουσιανής καμπύλης. Η εξίσωση της γκαουσιανής καμπύλης είναι η εξής:

$$\varepsilon_i(\tilde{\nu}) = \varepsilon_i^{\max} e^{-\left(\frac{\tilde{\nu}-\tilde{\nu}_i}{\sigma}\right)^2} \quad \text{Εξίσωση 5.1.1}$$

όπου ο δείκτης i αναφέρεται στην ηλεκτρονική διέγερση που μας ενδιαφέρει, $\tilde{\nu}_i$ είναι η ενέργεια διέγερσης (σε κυματαριθμούς) που αντιστοιχεί στην ηλεκτρονική διέγερση που μας ενδιαφέρει, ε_i^{\max} είναι η τιμή του ε_i στο μέγιστο της ζώνης: όταν η ενέργεια της προσπίπτουσας ακτινοβολίας $\tilde{\nu}$ είναι ίση με $\tilde{\nu}_i$ και σ είναι η τυπική απόκλιση σε κυματαριθμούς, η οποία σχετίζεται με το πλάτος της προσομοιωμένης ζώνης. Συγκεκριμένα, είναι το μισό πλάτος της γκαουσιανής ζώνης στο $\varepsilon = \varepsilon^{\max}/e$. Η σχέση μεταξύ του ε_i^{\max} και της διπολικής ισχύος (D) μπορεί να καθοριστεί από την έκφραση που συνδέει το D με το ε και το $\tilde{\nu}$:

$$D_{cgs} = 4 \left[\frac{3 \cdot 1000 \cdot \ln(10) \cdot h \cdot c}{32 \cdot \pi^3 \cdot N} \right] \int \frac{\varepsilon(\tilde{\nu})}{\tilde{\nu}} d\tilde{\nu} \quad \text{Εξίσωση 5.1.2}$$

Στο μέγιστο της ζώνης, αυτό γίνεται:

$$D_i = 4 \left[\frac{3 \cdot 1000 \cdot \ln(10) \cdot h \cdot c}{32 \cdot \pi^3 \cdot N} \right] \varepsilon_i^{\max} \sqrt{\pi} \frac{\sigma}{\tilde{\nu}_i} \quad \text{Εξίσωση 5.1.3}$$

Όπου σ η τυπική απόκλιση, N ο αριθμός Avogadro, c η ταχύτητα του φωτός και h η σταθερά του Planck. Τα δεδομένα μας δεν περιέχουν τις διπολικές δυνάμεις, D_i , αλλά αναφέρουν τις δυνάμεις ταλάντωσης, f_i , για κάθε ηλεκτρονική μετάβαση. Η σχέση μεταξύ αυτών των δύο μεγεθών δίνεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$f_i = \frac{8\pi^2 m_e c}{3he^2} D_i \quad \text{Εξίσωση 5.1.4}$$

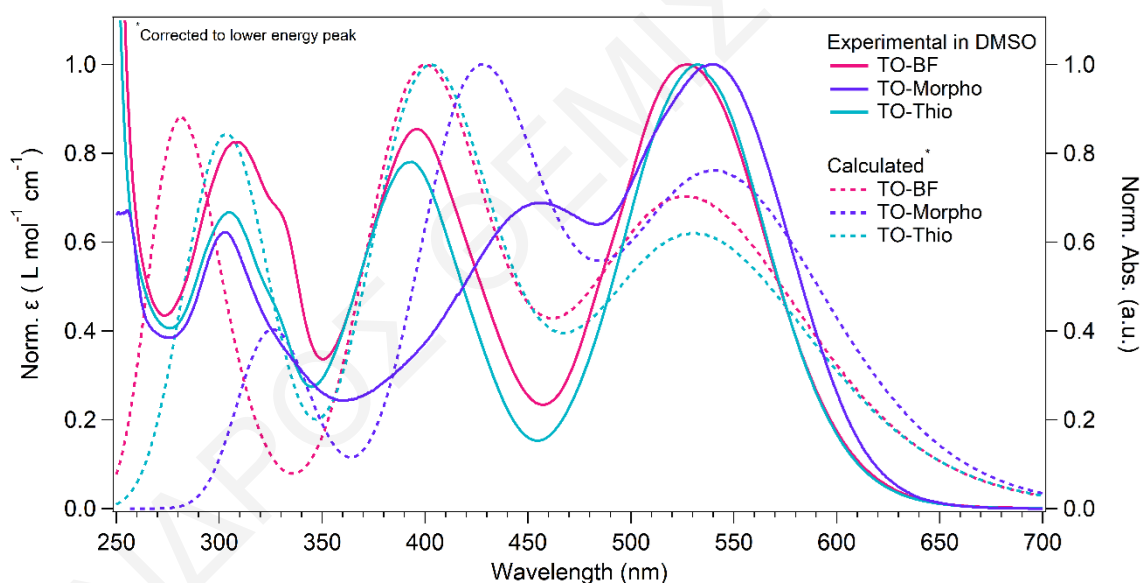
όπου f_i είναι η ("αδιάστατη") δύναμη ταλάντωσης που αντιστοιχεί στην ηλεκτρονική διέγερση που μας ενδιαφέρει και D_i είναι η αντίστοιχη διπολική ισχύς σε esu^2cm^2 , $\tilde{\nu}$ είναι η αντίστοιχη ενέργεια διέγερσης σε κυματαριθμούς, e το φορτίο του ηλεκτρονίου σε esu και m_e η μάζα του ηλεκτρονίου. Χρησιμοποιώντας τις εξισώσεις 5.1.3 και 5.1.4, η εξίσωση 5.1.1 γίνεται:

$$\varepsilon_i(\tilde{\nu}) = 1.3062974 \times 10^8 \cdot \frac{f_i}{\sigma} e^{-\left(\frac{\tilde{\nu}-\tilde{\nu}_i}{\sigma}\right)^2} \quad \text{Εξίσωση 5.1.5}$$

Το συνολικό φάσμα θα προκύψει τότε από το άθροισμα όλων των επιμέρους ζωνών:

$$\varepsilon(\tilde{\nu}) = \sum_{i=1}^n \varepsilon_i(\tilde{\nu}) = \sum_{i=1}^n \left[1.3062974 \times 10^8 \cdot \frac{f_i}{\sigma} e^{-\left(\frac{\tilde{\nu}-\tilde{\nu}_i}{\sigma}\right)^2} \right] \quad \text{Εξίσωση 5.1.6}$$

όπου το i εκτείνεται από την πρώτη έως τη νιοστή ηλεκτρονιακή διέγερση. Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας φαίνεται στο Σχήμα 5.4. Τα θεωρητικά φάσματα διορθώθηκαν σε σχέση με την κορυφή χαμηλότερης ενέργειας. Από τα θεωρητικά φάσματα μπορούμε να δούμε παρόμοια συμπεριφορά με αυτή των πειραματικών, ιδιαίτερα για την κορυφή στα ~400 nm, με τα θεωρητικά φάσματα να δείχνουν μεγαλύτερη διαφορά σε σχέση με τα πειραματικά δεδομένα στην περίπτωση του TO-Morpho κάτι που πιθανόν να οφείλεται σε συσσωμάτωση στο διάλυμα, όπως παρατηρείται στην περίπτωση του TO όπου εμφανίζονται οι κορυφές των συσσωματωμάτων (421 nm) στο φάσμα απορρόφησης (Σχήμα 5.1 και Σχήμα 5.2).

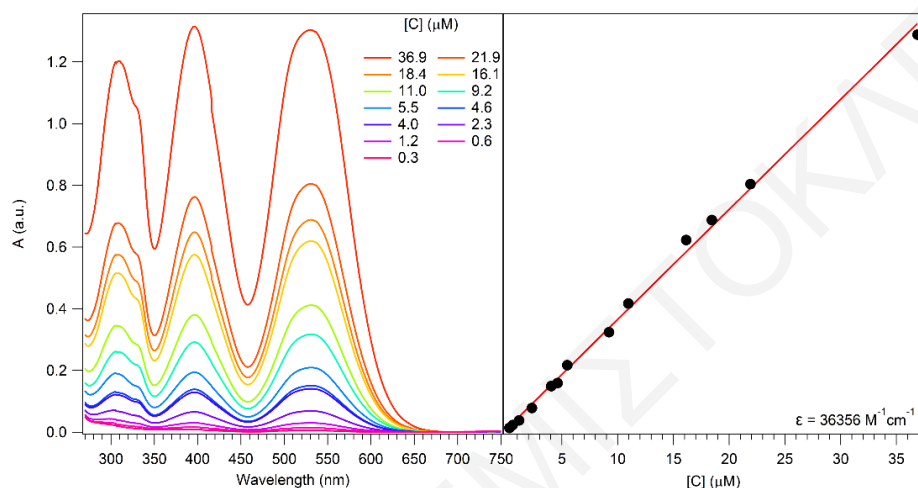


Σχήμα 5.4: Σύγκριση των θεωρητικών φασμάτων που υπολογίστηκαν σε σχέση με τα πειραματικά φάσματα των διαλυμάτων των μικρών μορίων σε DMSO.

Από τον υπολογισμό μπορούμε επίσης να εξάγουμε τα μοριακά τροχιακά που λαμβάνουν μέρος και κατ' επέκταση το είδος των μεταπτώσεων. Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται ότι οι μεταπτώσεις των κορυφών στα ~400 και ~530 nm έχουν περισσότερο χαρακτήρα μεταφοράς φορτίου μεταξύ της βενζοθειαζόλης και της πλευρικής ομάδας παρά $\pi \rightarrow \pi^*$. Το γεγονός αυτό καθιστά αυτές τις μεταπτώσεις πολύ ευαίσθητες στο διαλύτη.

5.1.2. Εύρεση Συντελεστή Μοριακής Απορροφητικότητας

Στο Σχήμα 5.5 παρουσιάζεται το φάσμα UV-Vis διαλύματος του μορίου TO-BF σε DMSO σε διάφορες συγκεντρώσεις από 0.3 μM μέχρι 36.9 μM σε θερμοκρασία δωματίου. Τα διαλύματα τοποθετήθηκαν σε κυψελίδα πλάτους 1 cm. Με αύξηση της συγκέντρωσης παρατηρείται γραμμική αύξηση της κορυφής στα 529.5 nm κάτι που συνάδει με την γραμμική σχέση της απορρόφησης με τη συγκέντρωση.



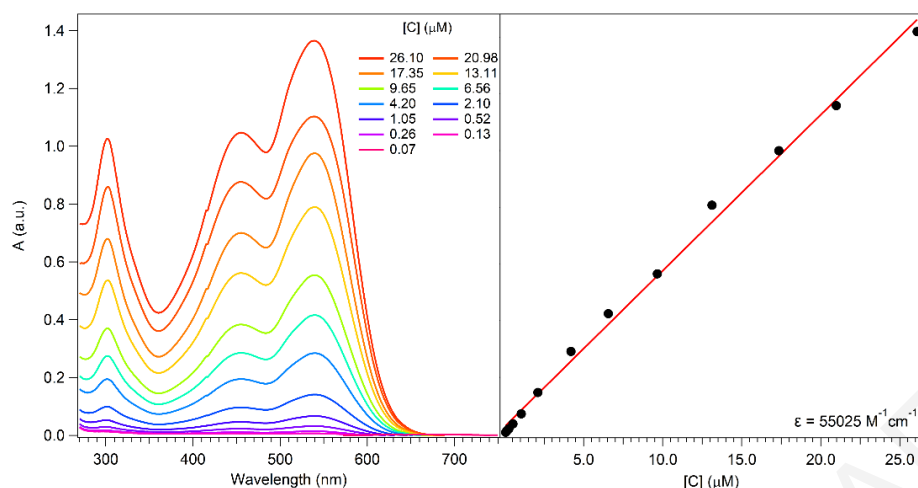
Σχήμα 5.5: Φάσματα UV-Vis του TO-BF σε DMSO σε διάφορες συγκεντρώσεις. (αριστερά) Γραφική Beer – Lambert για τη κορυφή στα 529.5 nm και η τιμή συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας. (δεξιά)

Παίρνοντας την τιμή της απορρόφησης στα 529.5 nm και κατασκευάζοντας την γραφική απορρόφησης προς συγκέντρωση όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.5, μπορεί να υπολογιστεί ο συντελεστής απορροφητικότητας από την σχέση Beer-Lambert (Εξίσωση 5.1.7).

$$A = \epsilon bC$$

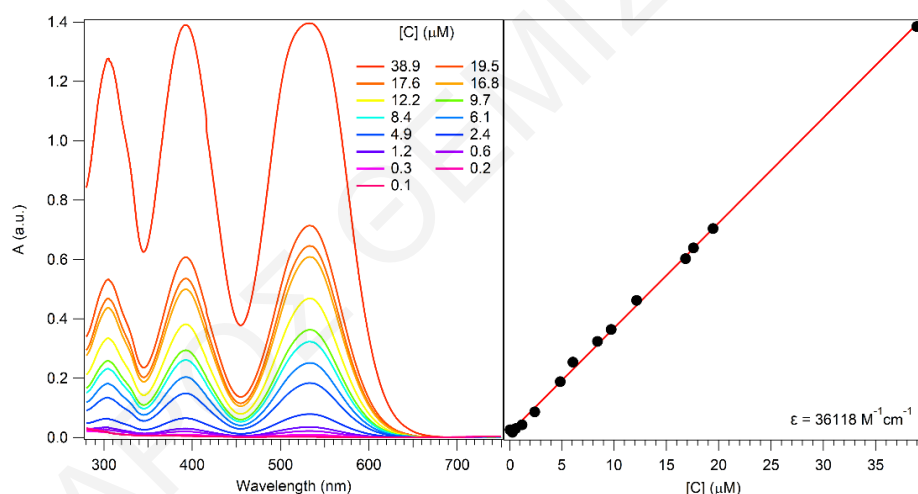
Εξίσωση 5.1.7

όπου A η απορρόφηση, ϵ ο συντελεστής απορροφητικότητας σε $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, b το μήκος διαδρομής ακτινοβολίας σε cm και C η συγκέντρωση. Από την κλίση της γραφικής απορρόφησης προς συγκέντρωση υπολογίζεται ο συντελεστής απορροφητικότητας αφού το b στην παρούσα μελέτη ισούται με 1 cm. Από την γραφική στο Σχήμα 5.5 για το TO-BF, ο συντελεστής ϵ της κορυφής στα 532 nm υπολογίστηκε να ισούται με $36356 \pm 563 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.



Σχήμα 5.6: Φάσματα UV-Vis του TO-Morpho σε DMSO σε διάφορες συγκεντρώσεις από 0.07 μM μέχρι 26.1 μM σε θερμοκρασία δωματίου. (αριστερά) Γραφική Beer – Lambert για τη κορυφή στα 539 nm και η τιμή συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας. (δεξιά)

Στο Σχήμα 5.6 εμφανίζεται η ίδια διαδικασία όπως πιο πάνω για το TO-Morpho, όπου ο συντελεστής ϵ της κορυφής στα 539 nm υπολογίστηκε να ισούται με $55025 \pm 125 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.



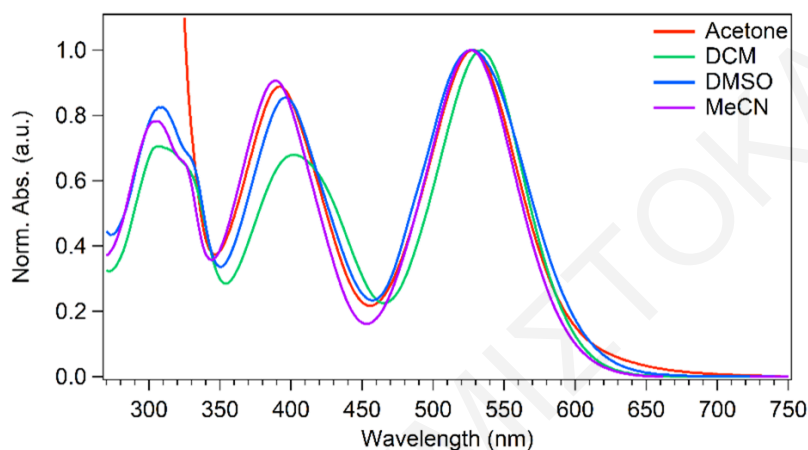
Σχήμα 5.7: Φάσματα UV-Vis του TO-Thio σε DMSO σε διάφορες συγκεντρώσεις από 0.1 μM μέχρι 38.9 μM σε θερμοκρασία δωματίου. (αριστερά) Γραφική Beer – Lambert για τη κορυφή στα 532 nm και η τιμή συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας. (δεξιά)

Τέλος, στην περίπτωση του TO-Thio, ο συντελεστής ϵ της κορυφής στα 532 nm υπολογίστηκε να ισούται με $35661 \pm 125 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Σχήμα 5.7).

5.1.3. Εξάρτηση Φάσματος Απορρόφησης Παραγώγων του TO από το διαλύτη

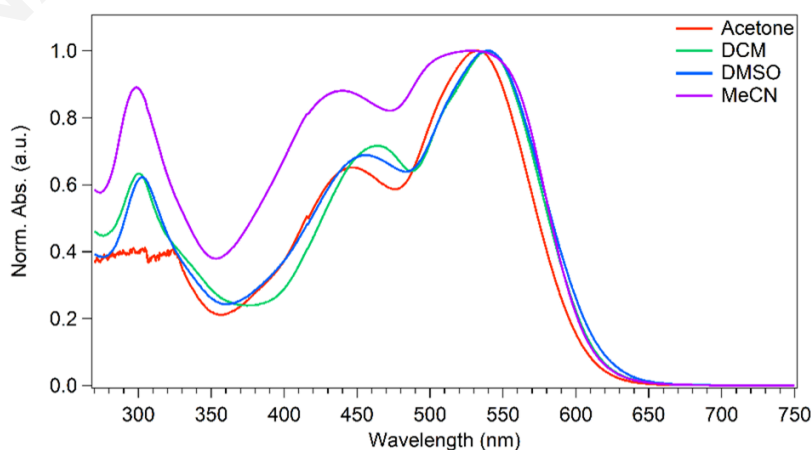
Στο Σχήμα 5.8 παρουσιάζεται το φάσμα UV-Vis του TO-BF διαλυμένο σε διάφορους διαλύτες σε συγκέντρωση $\sim 0.21 \text{ mM}$. Τα φάσματα UV-Vis των διαλυμάτων TO-BF σε νερό και κυκλοεξάνιο δεν μπόρεσαν να δώσουν κάλο σήμα λόγω της πολύ μικρής διαλυτότητας του μικρού μορίου σε αυτούς τους διαλύτες. Παρατηρείται υψιχρωμική μετατόπιση ή αρνητικός σολβατοχρωμισμός και αλλαγή της σχετικής έντασης των κορυφών στα 396 nm

και 527 nm με την αύξηση της πολικότητας του διαλύτη (σύμφωνα με την κλίμακα $E_T(30)$), εκτός στην περίπτωση του DMSO που ίσως να υπάρχουν επιπλέον αλληλεπιδράσεις με τον διαλύτη), κάτι που υποδεικνύει σταθεροποίηση της βασικής (θεμελιώδους) κατάστασης, λόγω μεγαλύτερης διπολικής ροπής σε αυτή την κατάσταση ($\mu_g > \mu_e$). Οι μεταβολές είναι πιο έντονες στην περίπτωση της κορυφής στα 396 nm, εφόσον αυτή η μετάπτωση οφείλεται κυρίως σε μεταφορά φορτίου από τον άξονα βενζοθειαζόλης – κινολίνης στον άξονα κινολίνης – βενζολίου – πλευρικής ομάδας.



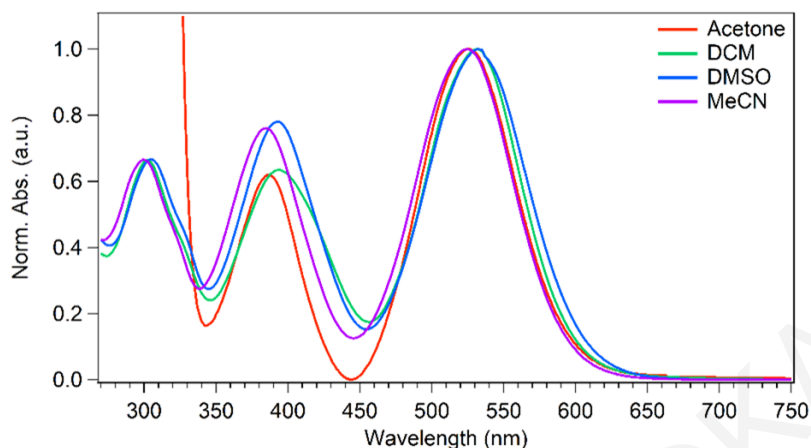
Σχήμα 5.8: Εξάρτηση Φάσματος UV-Vis του TO-BF από το διαλύτη (Κανονικοποιημένα Φάσματα).

Στο Σχήμα 5.9 παρουσιάζεται το φάσμα UV-Vis του TO-Morpho διαλυμένο σε διάφορους διαλύτες σε συγκέντρωση 0.21 mM. Παρατηρείται υψιχρωμική μετατόπιση των κορυφών στα 539 nm και 455 nm με την αύξηση της πολικότητας του διαλύτη, κάτι που υποδεικνύει σταθεροποίηση της βασικής (θεμελιώδους) κατάστασης. Η διαπλάτυνση των κορυφών στην περίπτωση της διαλυτοποίησης σε ακετονιτρίλιο πιθανώς να οφείλεται στην παρουσία νερού μέσα στον διαλύτη (παρόμοιο φαινόμενο με Σχήμα 5.2).



Σχήμα 5.9: Εξάρτηση Φάσματος UV-Vis του TO-Morpho αναλόγως από το διαλύτη (Κανονικοποιημένα Φάσματα).

Το φάσμα UV-Vis του TO-Thio διαλυμένο σε διάφορους διαλύτες σε συγκέντρωση ~0.21 mM (Σχήμα 5.10) συμπεριφέρεται παρόμοια με την περίπτωση του TO-BF.



Σχήμα 5.10: Εξάρτηση Φάσματος UV-Vis του TO-Thio αναλόγως από το διαλύτη (Κανονικοποιημένα Φάσματα).

Σε όλες τις περιπτώσεις, τα μικρά μόρια έχουν μικρή διαλυτότητα στο νερό και έτσι για την παρασκευή των διαλυμάτων για τις υπόλοιπες πειραματικές διαδικασίες αρχικά παρασκευάστηκαν μητρικά διαλύματα των μορίων διαλυμένα σε DMSO και στη συνέχεια ποσότητα από αυτά αραιωνόταν με το ρυθμιστικό διάλυμα.

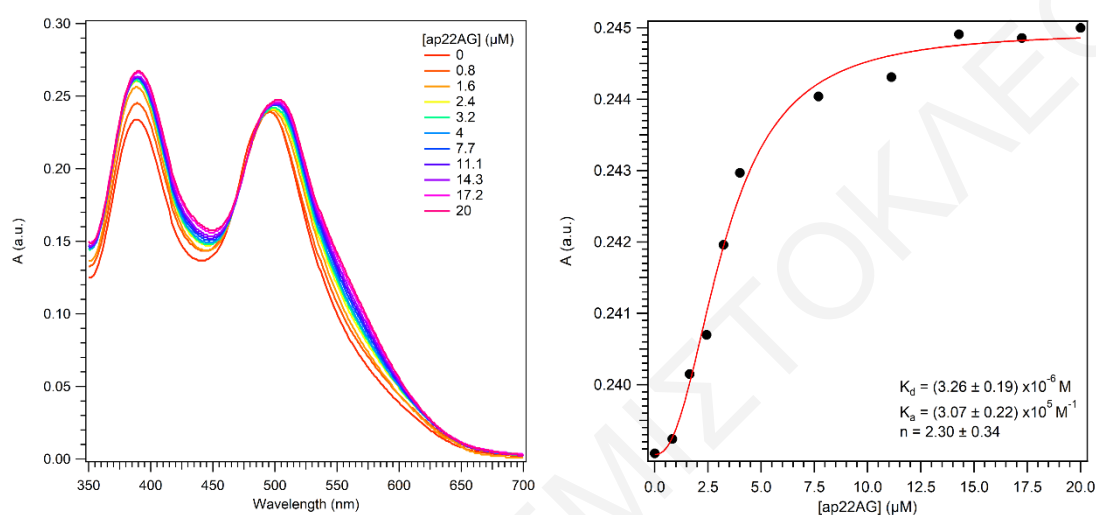
5.2. Οπτικές Μελέτες Αλληλεπίδρασης Μικρών Μορίων με Μοντέλα DNA

5.2.1. Τιτλοδοτήσεις UV-Vis μοντέλων DNA με τα μικρά μόρια

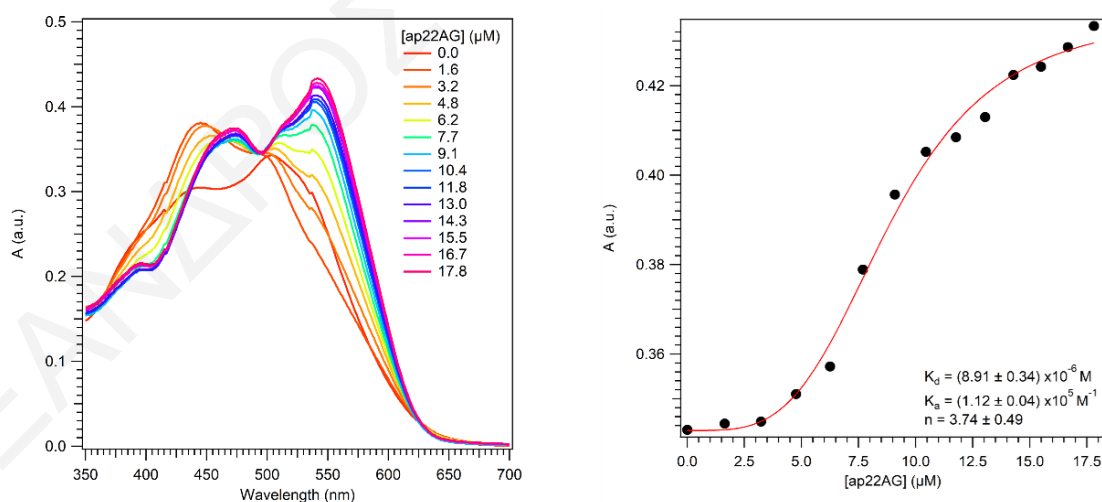
Προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα οι ενώσεις αυτές να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως κυτταρικοί ανιχνευτές για τοπολογίες DNA, αξιολογήθηκε αρχικά η συγγενεία τους με διάφορα μοντέλα DNA. Οι θεματικές μορφές που εξετάστηκαν περιλαμβάνουν το δίκλωνο DNA (ds26) και G4 DNA με παράλληλη, αντιπαράλληλη και υβριδική διαμόρφωση (δηλ. c-myc, ap22AG και h22AG, αντίστοιχα). Για να μπορέσει να εξαχθεί αυτή η συγγενεία με το DNA, πραγματοποιήθηκαν τιτλοδοτήσεις διαλύματος των μικρών μορίων μαζί με μητρικά διαλύματα 100 μ M των μοντέλων DNA, όπως αναφέρονται στην υποενότητα 4.7. Τα σχήματα που ακολουθούν (Σχήμα 5.11, Σχήμα 5.12 και Σχήμα 5.13) παρουσιάζουν μια αντιπροσωπευτική τιτλοδότηση από κάθε μόριο (για όλες τις τιτλοδοτήσεις ανατρέξτε στο Παραρτήμα - Τιτλοδοτήσεις UV-Vis). Σε κάθε περίπτωση επιλέχθηκε για παρακολούθηση το μέγιστο της απορρόφησης της κορυφής στα ~500 nm, και έγινε γραφική της απορρόφησης ως προς την συγκέντρωση του ολιγονουκλεοτιδίου. Τα σημεία προσαρμόστηκαν με μη γραμμική παλινδρόμηση στην εξίσωση Hill:

$$y = y_0 - (y_{max} - y_0) \frac{x^n}{K_d^n + x^n} \quad \text{Εξίσωση 5.2.1}$$

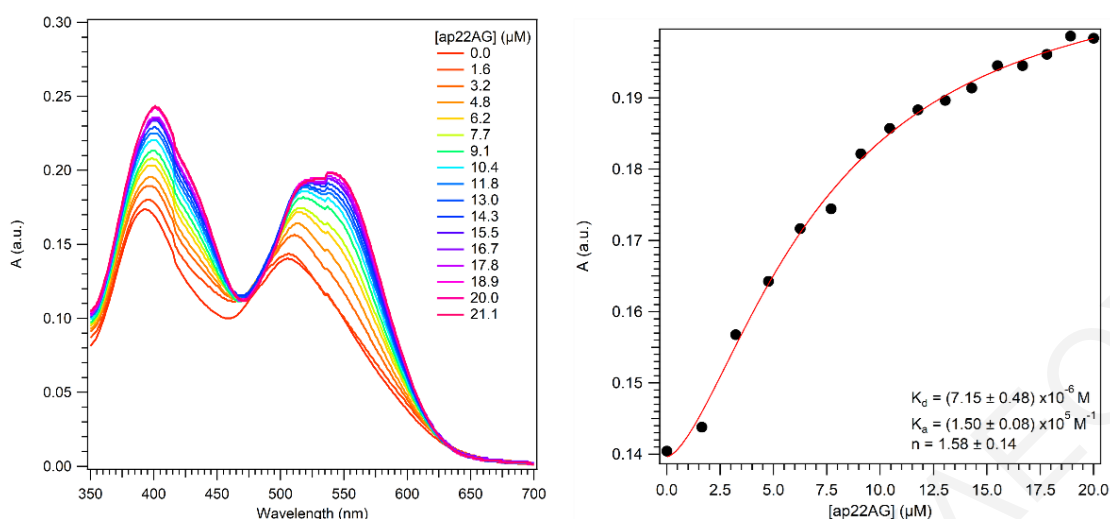
όπου y_0 η αρχική τιμή πριν την προσθήκη DNA, y_{max} η μέγιστη τιμή της ιδιότητας που αλλάζει, n ο συντελεστής Hill και K_d η σταθερά διάσπασης. Ο συντελεστής Hill παρέχει έναν τρόπο ποσοτικοποίησης του βαθμού αλληλεπίδρασης μεταξύ των θέσεων πρόσδεσης και του προσδέτη.



Σχήμα 5.11: Αριστερά: Αντιπροσωπευτική τιτλοδότηση απορρόφησης για το TO-BF (~20 μM , 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με την αντιπαράλληλη διαμόρφωση G4 της τελομερικής αλληλουχίας DNA (ap22AG). Δεξιά: Προσαρμογή εξίσωσης Hill στα δεδομένα A προς [ap22AG].



Σχήμα 5.12: Αριστερά: Αντιπροσωπευτική τιτλοδότηση απορρόφησης για το TO-Morpho (~20 μM , 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με ap22AG. Δεξιά: Προσαρμογή εξίσωσης Hill στα δεδομένα A προς [ap22AG].

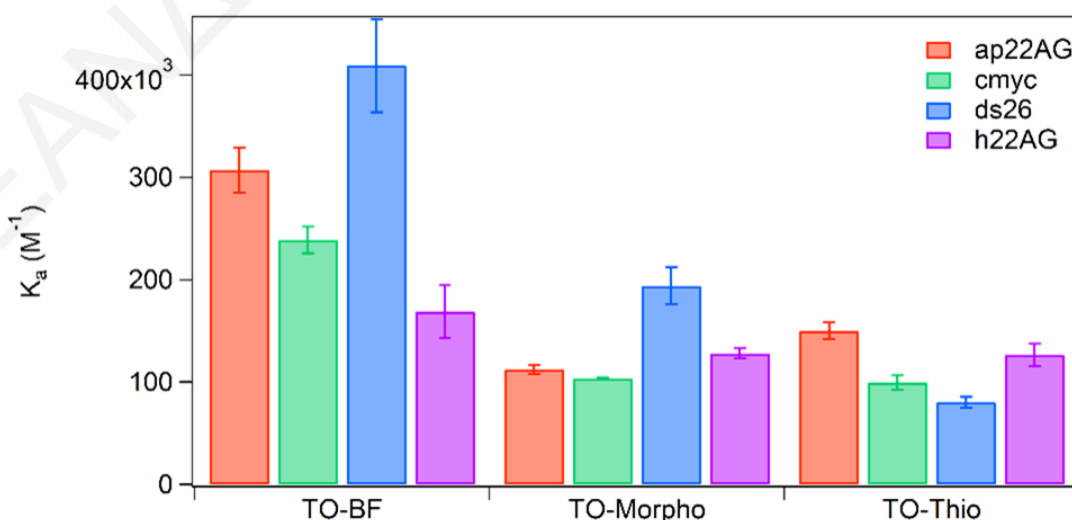


Σχήμα 5.13: Αριστερά: Αντιπροσωπευτική τιτλοδότηση απορρόφησης για το TO-Thio (~20 μM , 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με ap22AG. Δεξιά: Προσαρμογή εξίσωσης Hill στα δεδομένα A προς [ap22AG].

Η σταθερά συγγένειας υπολογίζεται από την αντιστρόφως ανάλογη σχέση που έχει με την σταθερά διάσπασης:

$$K_a = \frac{1}{K_d} \quad \text{Εξίσωση 5.2.2}$$

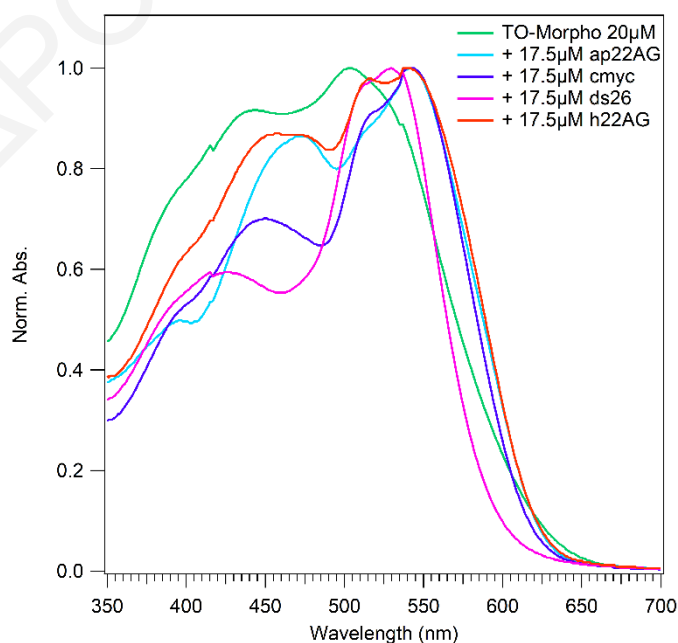
Τα αποτελέσματα που συνοψίζονται στο Σχήμα 5.14 δείχνουν ότι ενώ οι ενώσεις έχουν αρκετά υψηλή συγγένεια για το DNA ($\sim 10^5 \text{ M}^{-1}$), καμία από τις ενώσεις δεν εμφανίζει ισχυρή επιλεκτικότητα για μια συγκεκριμένη τοπολογία, εκτός από την μικρή εκλεκτικότητα του TO-Thio στην τελομερική αλληλουχία. Το TO-BF παρουσιάζει τις υψηλότερες τιμές συγγένειας για όλα τα μοντέλα DNA σε σχέση με τα άλλα δύο μόρια, με ισχυρότερη συγγένεια για το δίκλωνο.



Σχήμα 5.14: Σταθερές συγγένειας ($K_a \pm \sigma$) που προσδιορίστηκαν με τιτλοδοτήσεις απορρόφησης για τα μικρά μόρια με διαφορετικές τοπολογίες DNA.

Ενδιαφέρον αποτελεί το σχήμα του φάσματος απορρόφησης του TO-Morpho στην παρουσία διαφορετικών DNA, όπως φαίνεται στο σχήμα παρακάτω. Συγκεκριμένα για τα μοντέλα G4 DNA παρατηρείται μεγαλύτερη μετατόπιση σε χαμηλότερες ενέργειες σε σχέση με το αρχικό φάσμα του TO-Morpho μόνο του. Ακόμη, κάτι που παρατηρείται μόνο στην περίπτωση του TO-Morpho είναι η ελάττωση του πλάτους της κορυφής χαμηλότερης ενέργειας κάτι που μπορεί να οφείλεται σε μια πιο άκαμπτη δομή με τη δέσμευση και άρα λιγότερο αριθμό διαφορετικών διαμορφώσεων (Σχήμα 5.15). Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί ότι η καμπύλες των τιτλοδοτήσεων είναι σιγμοειδής κάτι που μπορεί να αποδοθεί σε κάποια διαφορετική συμπεριφορά από αυτή που συνήθως αναμένεται για αναλογία συμπλόκων προσδέτη:DNA 1:1. Λόγω αυτού έγινε μια πρώτη μελέτη με άλλο μοντέλο που δείχνει άλλη στοιχειομετρία και έτσι θα χρειαστεί μελλοντικά να πραγματοποιηθεί τιτλοδότηση με χαμηλότερη συγκέντρωση του TO-Morpho για να εξακριβωθεί αν αυτή η συμπεριφορά οφείλεται σε συσσωματώματα του μορίου ή σε συνεργεστική συμπεριφορά πρόσδεσης. Τα αποτελέσματα της μελέτης βρίσκονται στο Παράρτημα - Ανάλυση με το πρόγραμμα SpecFit.

Παρόμοιο φαινόμενο παρατηρείται και στα άλλα δύο μόρια με λιγότερο αισθητές διαφορές. Σε γενικές γραμμές αυτή η βαθυχρωμική συμπεριφορά αποτελεί και μια ένδειξη της αλληλεπίδρασης και πρόσδεσης των μικρών μορίων στα μοντέλα DNA, εφόσον αλλάζει η πολικότητα του περιβάλλοντος τους (από πολικό υδατικό περιβάλλον σε «άπολο» / υδρόφοβο περιβάλλον των DNA).

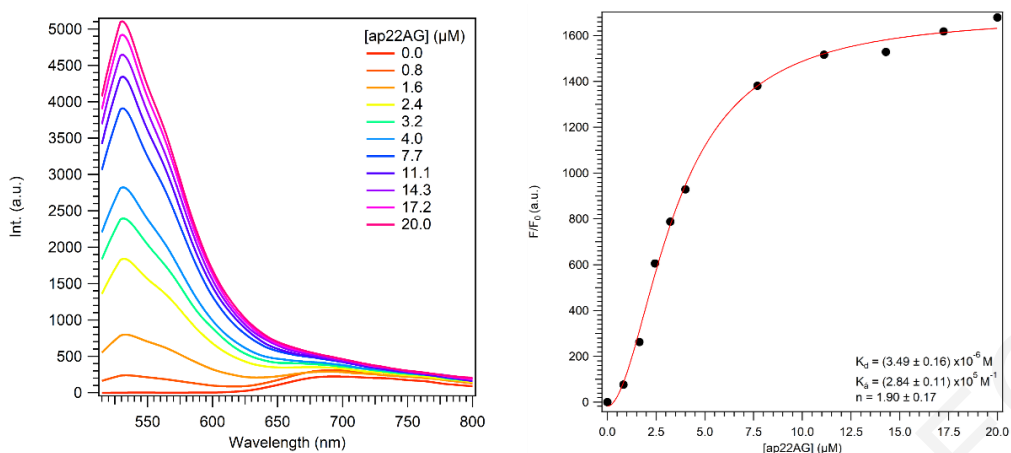


Σχήμα 5.15: Φάσματα UV-Vis διαλύματος ~20 μM TO-Morpho πριν και μετά την προσθήκη 17.5 μM διαφορετικών DNA.

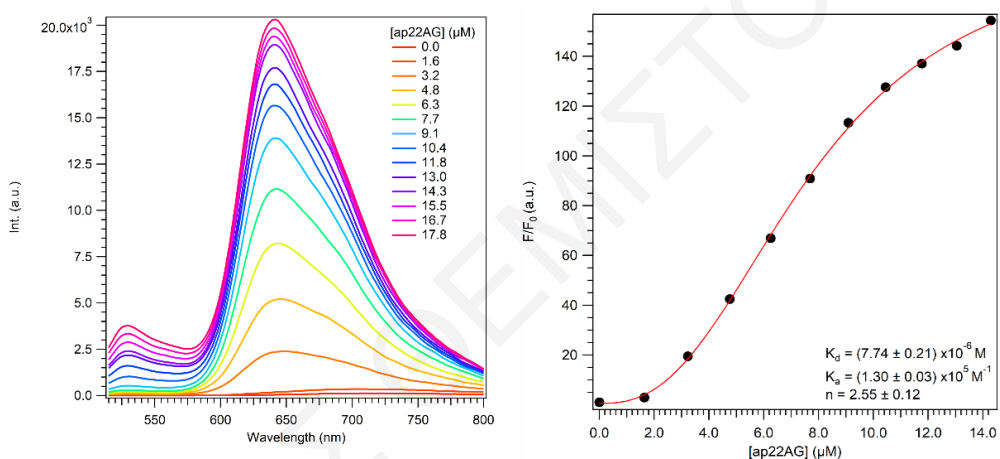
5.2.2. Τιτλοδοτήσεις Φωτοφωταύγειας μοντέλων DNA με τα μικρά μόρια

Για να διερευνηθεί η απόκριση "ενεργοποίησης" των μικρών μορίων στο DNA, όπως επίσης και να επιβεβαιωθεί η συγγενεία τους με το DNA, πραγματοποιήθηκαν τιτλοδοτήσεις φωτοφωταύγειας. Οι θεματικές μορφές DNA που εξετάστηκαν περιλαμβάνουν το ds26, c-myc, ap22AG και h22AG, όπως και προηγουμένως. Για να μπορέσει να εξαχθεί αυτή η συγγενεία με το DNA, πραγματοποιήθηκαν τιτλοδοτήσεις διαλύματος των μικρών μορίων μαζί με μητρικά διαλύματα 100 μM των μοντέλων DNA, όπως αναφέρονται στην υποενότητα 4.7. Το μήκος κύματος διέγερσης σε όλες τις περιπτώσεις ήταν στα 501 nm που εμπίπτει στη ζώνης απορρόφησης χαμηλότερης ενέργειας. Τα σχήματα που ακολουθούν (Σχήμα 5.16, Σχήμα 5.17 και Σχήμα 5.18) παρουσιάζουν μια αντιπροσωπευτική τιτλοδότηση από κάθε μόριο (για όλες τις τιτλοδοτήσεις ανατρέξτε στο Παράρτημα - Τιτλοδοτήσεις Φθορισμού). Σε κάθε περίπτωση επιλέχθηκε το μέγιστο της έντασης του φθορισμού (στις περιπτώσεις των TO-BF και TO-Thio στα 532 nm, ενώ στην περίπτωση του TO-Morpho στα 650 nm) και κανονικοποιήθηκε με βάση την ένταση του φθορισμού πριν την προσθήκη ολιγονουκλεοτιδίου. Στη συνέχεια, έγινε γραφική της κανονικοποιημένης έντασης ως προς την συγκέντρωση του ολιγονουκλεοτιδίου. Τα σημεία προσαρμόστηκαν με μη γραμμική παλινδρόμηση στην εξίσωση Hill (Εξίσωση 5.2.1) και η σταθερά συγγενείας υπολογίστηκε από την Εξίσωση 5.2.2.

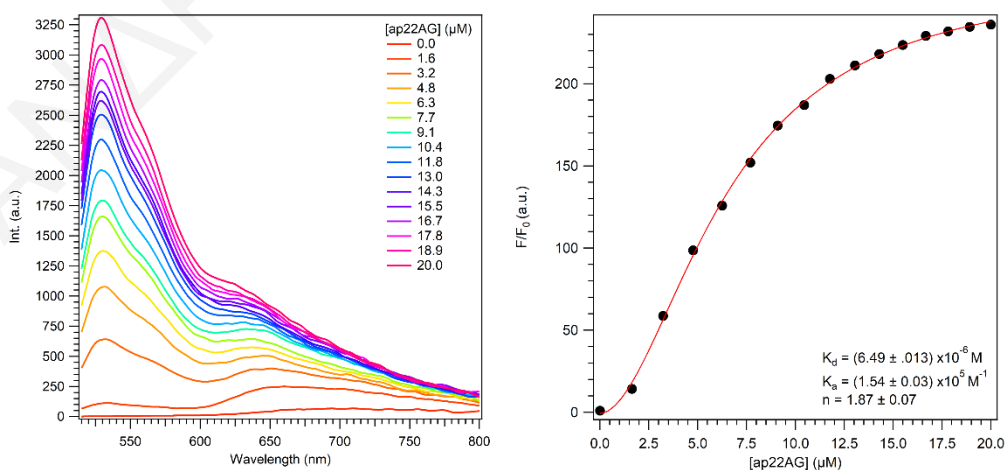
Είναι αξιοσημείωτο να περιγράψουν τα χαρακτηριστικά που διακρίνουν πάλι το φάσμα του TO-Morpho σε αντίθεση με τα φάσματα των άλλων δύο μορίων που εξετάζονται. Ειδικότερα, η εμφανής κορυφή που παρατηρείται σε σημαντικά υψηλότερα μήκη κύματος στο TO-Morpho αποδίδεται πιθανότατα στο σχηματισμό συσσωματωμάτων των μορίων της χρωστικής. Η παρατήρηση αυτή ενδεχομένως να εξηγεί τη διαφορά στη συμπεριφορά που παρατηρείται κατά τις τιτλοδοτήσεις απορρόφησης και φωτοφωταύγειας. Επιπλέον, η σημαντική αύξηση της έντασης του φθορισμού στο TO-Morpho υποδηλώνει έντονα την παρουσία συσσωματωμάτων τύπου J, ενδεικτικό της ενισχυμένης ηλεκτρονικής σύζευξης μεταξύ γειτονικών μορίων χρωστικής. Επιπλέον, η παρουσία συσσωματωμάτων δεν αφορά αποκλειστικά το TO-Morpho και παρόμοιες τάσεις διακρίνονται και στα φάσματα των άλλων δύο μορίων. Ωστόσο, κατά την προσθήκη νουκλεϊκών οξέων, τα συσσωματώματα αυτά φαίνεται να υφίστανται διάσπαση σε μονομερείς μορφές των χρωστικών.



Σχήμα 5.16: Αριστερά: Αντιπροσωπευτική τιτλοδότηση φθορισμού για το TO-BF (~20 μM, 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με την αντιπαράλληλη διαμόρφωση G4 της τελομερικής αλληλουχίας DNA (ap22AG). Δεξιά: Προσαρμογή εξίσωσης Hill στα δεδομένα F/F_0 προς [ap22AG].

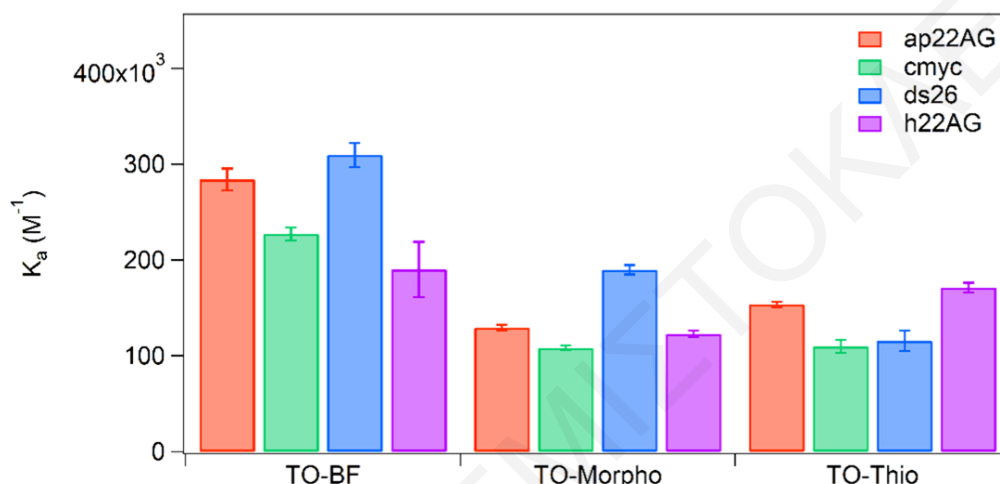


Σχήμα 5.17: Αριστερά: Αντιπροσωπευτική τιτλοδότηση φθορισμού για το TO-Morpha (~20 μM, 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με ap22AG. Δεξιά: Προσαρμογή εξίσωσης Hill στα δεδομένα F/F_0 προς [ap22AG].



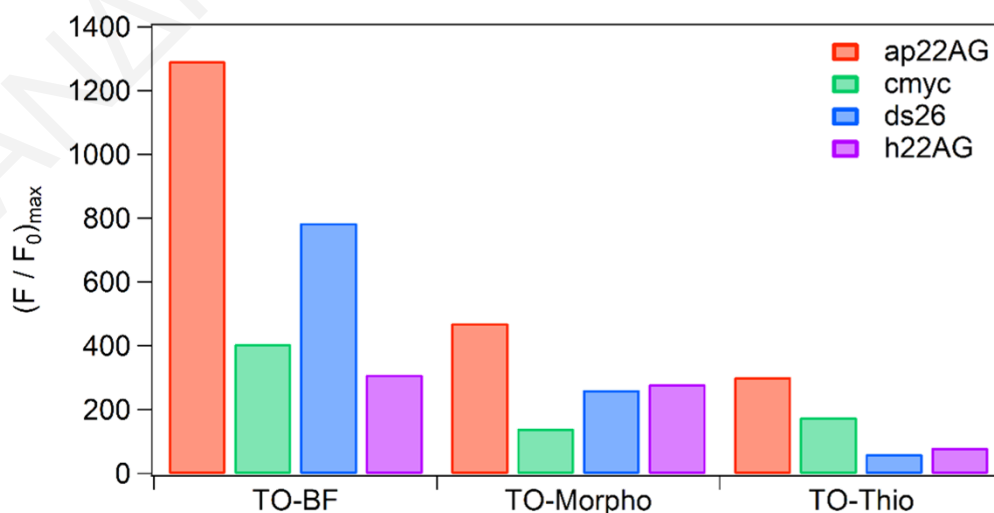
Σχήμα 5.18: Αριστερά: Αντιπροσωπευτική τιτλοδότηση φθορισμού για το TO-Thio (~20 μM, 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με ap22AG. Δεξιά: Προσαρμογή εξίσωσης Hill στα δεδομένα F/F_0 προς [ap22AG].

Τα αποτελέσματα που συνοψίζονται στο Σχήμα 5.19 δείχνουν ότι ενώ οι ενώσεις έχουν αρκετά υψηλή συγγένεια για το DNA ($\sim 10^5 \text{ M}^{-1}$), καμία από τις ενώσεις δεν εμφανίζει ισχυρή επιλεκτικότητα για μια συγκεκριμένη τοπολογία, εκτός από την μικρή εκλεκτικότητα του TO-Thio στην τελομερική αλληλουχία. Το TO-BF παρουσιάζει τις υψηλότερες τιμές συγγένειας για όλα τα μοντέλα DNA σε σχέση με τα άλλα δύο μόρια, με ισχυρότερη συγγένεια για το δίκλωνο, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα από τις τιτλοδοτήσεις απορρόφησης.



Σχήμα 5.19: Σταθερές συγγένειας ($K_a \pm \sigma$) που προσδιορίστηκαν με τιτλοδοτήσεις φθορισμού για τα μικρά μόρια με διαφορετικές τοπολογίες DNA.

Μια ένωση για να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ανιχνευτής πρέπει να έχει ισχυρή απόκριση, δηλαδή η ένταση της φωταύγειας να αυξάνεται αρκετά με την πρόσδεση στον αναλύτη. Από τις τιτλοδοτήσεις φωτοφωταύγειας μπορεί να υπολογιστεί αυτή απόκριση, υπολογίζοντας το λόγο της μέγιστης έντασης ως προς την αρχική.

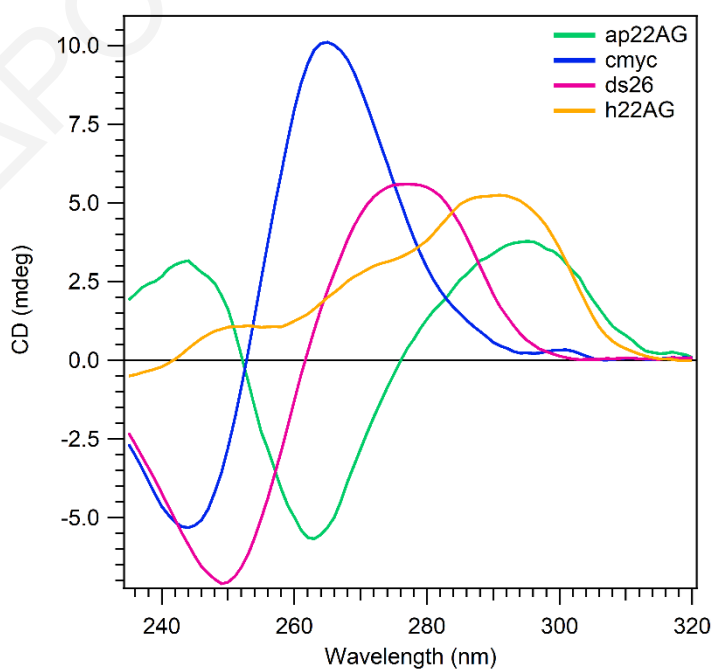


Σχήμα 5.20: Αποκρίσεις Φθορισμού που προσδιορίστηκαν με τιτλοδοτήσεις φθορισμού για τα μικρά μόρια με διαφορετικές τοπολογίες DNA.

Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 5.20 το TO-BF έχει πολύ μεγάλη απόκριση στην παρουσία της αντιπαράλληλης τελομερικής αλληλουχίας όπου η ένταση φθορισμού του μορίου αυξάνεται 1300 φορές. Τα TO-Morpho και TO-Thio παρουσιάζουν μικρότερες αποκρίσεις της τάξης των μερικών εκατοντάδων, με την μεγαλύτερη απόκριση και των δύο μορίων στην παρουσία και πάλι της αντιπαράλληλης τελομερικής αλληλουχίας. Σημαντικό να σημειωθεί η διαφορά στο χρώμα του εκπεμπόμενου φωτός στην περίπτωση του TO-Morpho που είναι κόκκινο αντί πράσινο, όπως στα TO-BF και TO-Thio. Αυτή η διαφορά θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί και για καλύτερη ανίχνευση σε δύο «κανάλια» με χρήση ενός μείγματος TO-BF και TO-Morpho για καλύτερη ανίχνευση της αντιπαράλληλης τετραπλής έλικας της τελομερικής αλληλουχίας σε κύτταρα (Σχήμα Π- 30).

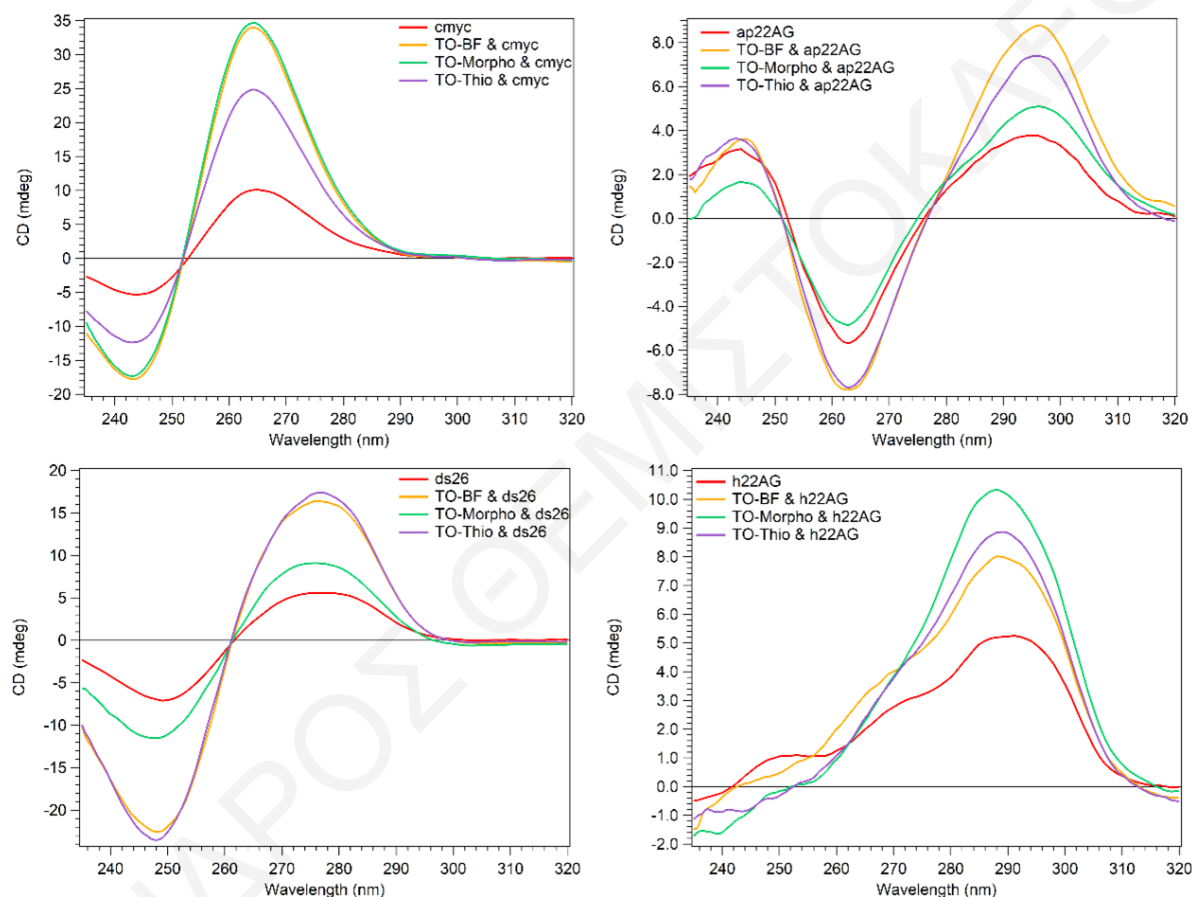
5.2.3. Φασματοσκοπία CD

Στο Σχήμα 5.21 παρουσιάζονται τα φάσματα CD των τεσσάρων μοντέλων DNA. Τα μοτίβα των κορυφών που εμφανίζονται είναι χαρακτηριστικά για το κάθε είδος τετραπλής έλικας, αλλά και της δίκλωνης διαμόρφωσης. Συγκεκριμένα στην υβριδική διαμόρφωση υπάρχουν δύο θετικές ζώνες στα 295 nm και 270 nm, και μια αρνητική ζώνη στα ~225 nm. Στην αντιπαράλληλη διαμόρφωση υπάρχουν δύο θετικές ζώνες στα 295 nm και ~240 nm, όπως επίσης και μια αρνητική ζώνη στα ~260 nm. Η παράλληλη διαμόρφωση ταυτοποιείται από μια θετική ζώνη στα 264 nm και μια αρνητική στα 245 nm, ενώ η δίκλωνη από μια θετική στα ~275 nm και μια αρνητική στα ~250 nm.



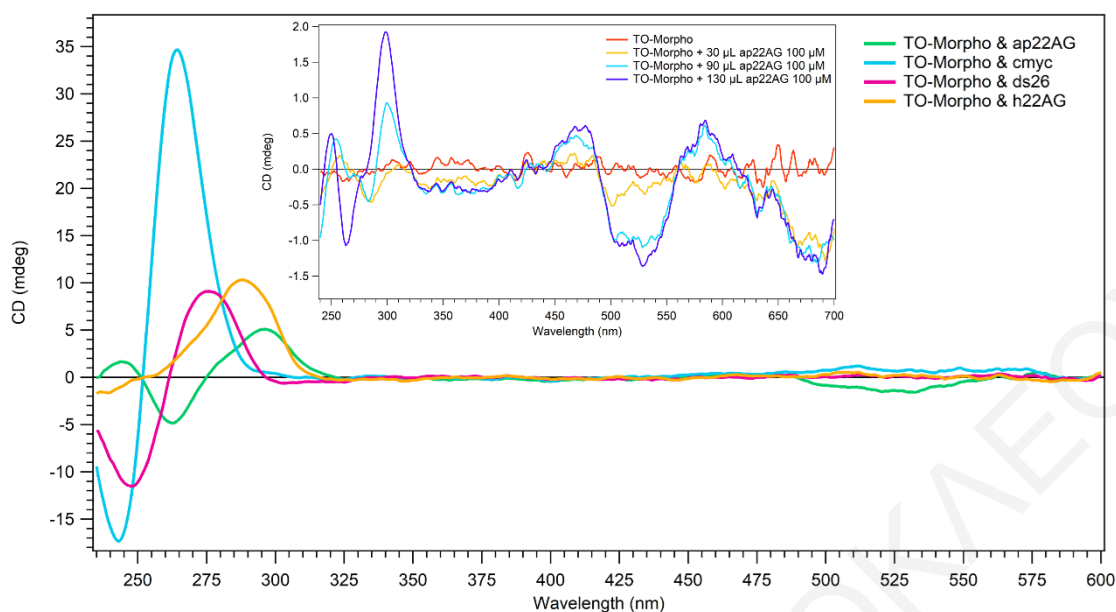
Σχήμα 5.21: Φάσματα CD των μοντέλων DNA.

Οι κορυφές - μοτίβα σε όλες τις περιπτώσεις ενισχύονται (δομή γίνεται πιο χειρόμορφη) από την παρουσία και την αλληλεπίδραση με τα μικρά μόρια, αλλά σε διαφορετική ένταση με το καθένα. Αυτό μπορεί να υποδεικνύει την σταθεροποίηση της δομής, αλλά για επιβεβαίωση θα χρειαστούν πειράματα τήξης των συμπλόκων. Το ποσοστό ενίσχυσης των κορυφών συνάδει σε γενικές γραμμές με τα αποτελέσματα από τις τιτλοδοτήσεις φθορισμού και απορρόφησης, αλλά αυτή η παρατήρηση πρέπει να ληφθεί με δόση σκεπτικισμού εφόσον και τα μικρά μόρια απορροφούν στην ίδια περιοχή.



Σχήμα 5.22: Φάσματα CD των μοντέλων DNA πριν (πράσινο) και μετά (μπλε, ροζ και κίτρινο) το τέλος των τιλοδοτήσεων με τα μικρά μόρια.

Κατά την διάρκεια των τιτλοδοτήσεων απορρόφησης και φωτοφωταύγειας μετρήθηκαν παράλληλα και τα φάσματα CD των διαλυμάτων. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έδειξαν τα φάσματα αυτά στην περίπτωση του TO-Morpho με την αντιπαράλληλη τετραπλή έλικα, ap22AG. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.23, κατά την αλληλεπίδραση του TO-Morpho με το ap22AG, και μόνο, παρατηρείται επαγόμενη χειρικήτητα στο μόριο της χρωστικής με την αύξηση της συγκέντρωσης του νουκλειικού οξέος στο διάλυμα (ένθετο του σχήματος). Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις των συμπλόκων του TO-Morpho με τα άλλα μοντέλα DNA, καθώς επίσης και τα σύμπλοκα των TO-BF και TO-Thio με όλα τα μοντέλα δεν έδειξαν να διαφοροποιούνται ιδιαίτερα στην περιοχή μετά τα 320 nm με την προσθήκη DNA στο διάλυμα.



Σχήμα 5.23: Φάσματα CD των μοντέλων DNA με το TO-Morpho. Ένθετο: Φάσμα CD του TO-Morpho κατά την τιτλοδότηση με ap22AG.

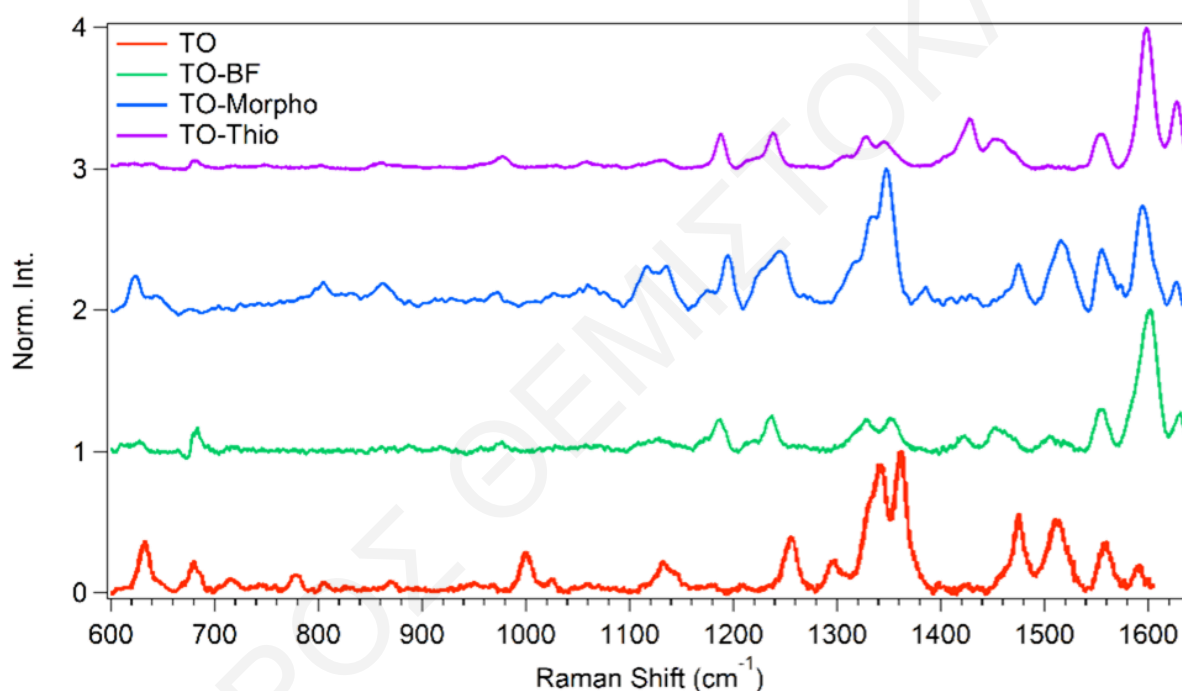
5.3. Μελέτες Δομής και Αλληλεπιδράσεων Μορίων/DNA

Η ύπαρξη μιας μοριακής εικόνας για τις αλληλεπιδράσεις είναι σημαντική σε τέτοιου είδους μελέτες. Με την φασματοσκοπία Raman συντονισμού μπορεί να γίνει επιλεκτική διέγερση των συστατικών και άρα μπορούμε να παρακολουθήσουμε πως αλλάζει ξεχωριστά η δομή του καθενός από τα συστατικά με την αλληλεπίδραση.

5.3.1. Φάσματα Vis-RR μικρών μορίων με διέγερση στα 473 nm

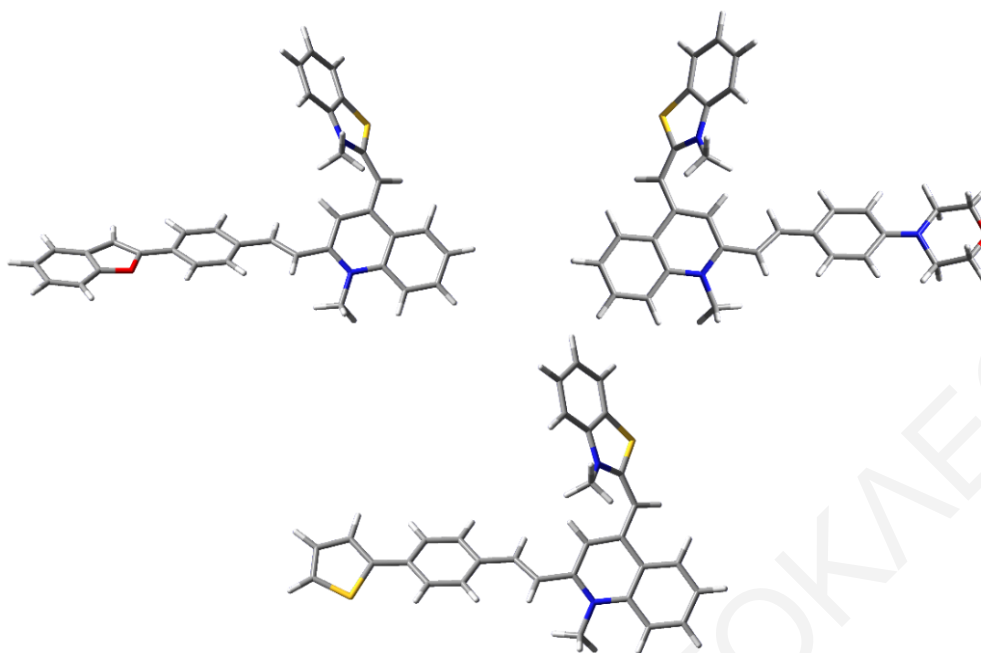
Στο Σχήμα 5.24 παρουσιάζεται το φάσμα Raman συντονισμού (Resonance Raman, RR) μετά από διέγερση στα 473 nm του διαλύματος DMSO:νερό (1:10) των μικρών μορίων σε σύγκριση με το κοινό σκελετό του TO. Η μεγαλύτερη δονητική ενεργότητα φαίνεται να συμβαίνει σε κυματάρθμους άνω των 1000 cm^{-1} . Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα και το φάσμα που παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα για την χρωστική TO που είναι και ο βασικός σκελετός των νέων μορίων, αναμένονται τέσσερις έντονες κορυφές στους 1471 , 1515 , 1560 και 1590 cm^{-1} που οφείλονται σε τάσεις των δακτυλίων της κινολίνης και βενζοθειαζόλης, όπως και δύο έντονες κορυφές στους 1331 και 1361 cm^{-1} που οφείλονται σε κάμψεις CH του δακτυλίου της κινολίνης και της βενζοθειαζόλης, αντίστοιχα.^[212] Επιπρόσθετα, αναμένονται οι κορυφές στους 1133 και 1253 cm^{-1} που οφείλονται στην εντός επιπέδου κάμψη του δακτυλίου της βενζοθειαζόλης και της κινολίνης, αντίστοιχα.^[213] Στα φάσματα των μικρών μορίων εμφανίζονται όλες οι πιο πάνω κορυφές με μικρές μετατοπίσεις που οφείλονται στις πλευρικές ομάδες φαινυλενίου, βενζοφουρανίου, θειοφαινείου και μορφολίνου, που επηρεάζουν το συζυγιακό σύστημα του

σκελετού, όπως και νέες κορυφές που οφείλονται στις συγκεκριμένες λειτουργικές ομάδες (π.χ. η κορυφή στους 1429 cm^{-1} που οφείλεται σε δονήσεις του θειοφαινίου στο TO-Thio) και στη κοινή πλευρική αλυσίδα (π.χ. οι κορυφές στους 1200 και 1250 cm^{-1} που οφείλονται σε κάμψεις CH του βενζολίου και του διπλού δεσμού). Ακόμη, παρατηρείται ότι το μοτίβο εντάσεων των κορυφών είναι παρόμοιο στην περίπτωση των TO-BF και TO-Thio με την πιο έντονη κορυφή να εμφανίζεται στους 1600 cm^{-1} που οφείλεται στη συμμετρική διάταξη C=C της κινολίνης, ενώ στην περίπτωση του TO-Morpho οι εντάσεις είναι παρόμοιες με το TO, με την πιο έντονη κορυφή να εμφανίζεται στους 1347 cm^{-1} και οφείλεται στην ασύμμετρη διάταξη C=C της κινολίνης.



Σχήμα 5.24: Φάσμα RR μικρών μορίων και της χρωστικής TO με διέγερση στα 473 nm .

Για την ταυτοποίηση όλων των κορυφών των μικρών μορίων πραγματοποιήθηκε θεωρητικός υπολογισμός DFT όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Οι χημικές δομές των μικρών μορίων μετά τη βελτιστοποίηση της γεωμετρίας τους φαίνονται στο Σχήμα 5.25.



Σχήμα 5.25: Χημικές δομές των μικρών μορίων μετά τη βελτιστοποίηση της γεωμετρίας τους. Με δεξιόστροφη σειρά: TO-BF, TO-Morpho και TO-Thio (Γκριζο: C, Μπλε: N, Κίτρινο: S, Κόκκινο: O).

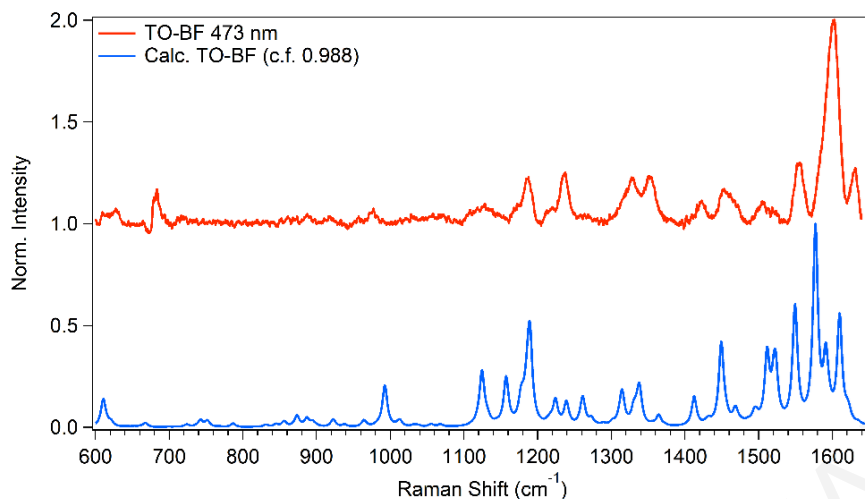
Οι υπολογιζόμενες ενεργότητες Raman (S_i) μετατράπηκαν σε σχετικές εντάσεις (I_i) χρησιμοποιώντας την Εξίσωση 5.3.1 από τη θεωρία σκεδασμού Raman.

$$I_i = \frac{A(v_0 - v_i)^4 S_i}{v_i [1 - \exp(-\frac{hc v_i}{kT})]} \quad \text{Εξίσωση 5.3.1}$$

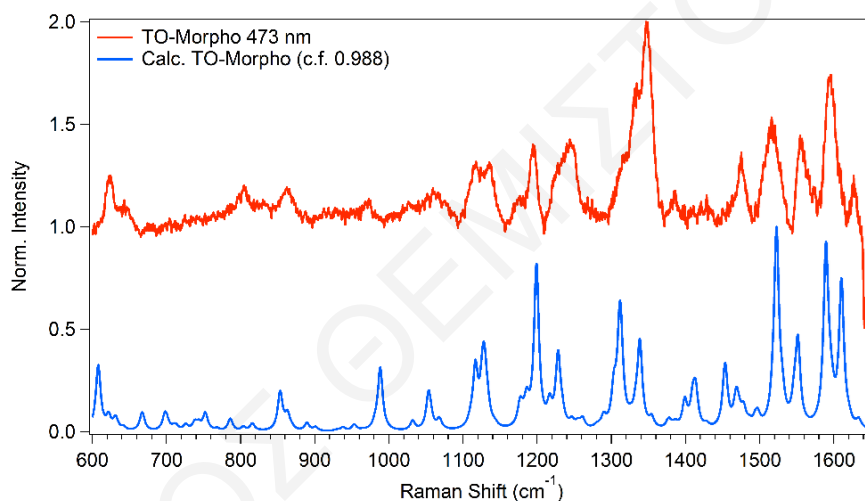
Όπου v_0 είναι η συχνότητα διέγερσης (σε cm^{-1}), v_i είναι ο κυματάριθμος της $i^{\text{ης}}$ κανονικής δόνησης, h είναι η σταθερά του Planck, c είναι η ταχύτητα του φωτός, k είναι η σταθερά Boltzmann και A είναι ένας συντελεστής κανονικοποίησης.^[214]

Αναπροσαρμόζοντας τον άξονα χ του θεωρητικού φάσματος με ένα διορθωτικό συντελεστή 0.988* μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε τις βαθμονομημένες συχνότητες για τον προσδιορισμό / ταυτοποίηση των τρόπων δόνησης του μικρού μορίου στα πειραματικά φάσματα. Στα παρακάτω σχήματα (Σχήμα 5.26, Σχήμα 5.27 και Σχήμα 5.28) παρουσιάζεται η σύγκριση του θεωρητικού και του πειραματικού φάσματος RR, και η ταυτοποίηση των κορυφών των TO-BF, TO-Morpho και TO-Thio από αυτή τη σύγκριση, αντίστοιχα, φαίνεται στους πίνακες που ακολουθούν (Πίνακας 5.2, Πίνακας 5.3 και Πίνακας 5.4). Η ταυτοποίηση των κορυφών όλου του φάσματος για όλα τα μόρια βρίσκεται στο Παράρτημα - Φάσματα Raman.

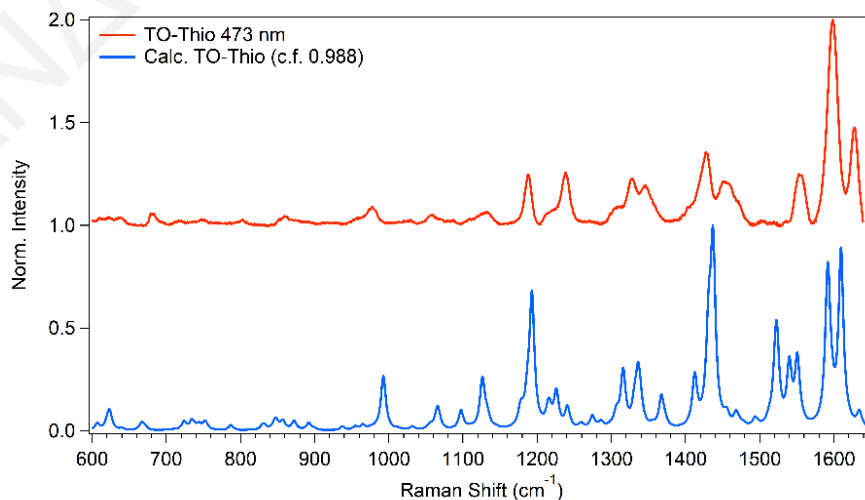
* Ο διορθωτικός παράγοντας είναι ένας μέσος όρος των τιμών των τριών περιοχών (low, mid και high-frequency) του άρθρου των Trujillo και McKemmish βάσει του επιπέδου θεωρίας και του σετ βάσης που χρησιμοποιήθηκε στον υπολογισμό των θεωρητικών φασμάτων.^[222]



Σχήμα 5.26: Σύγκριση θεωρητικού (μπλε) και πειραματικού (κόκκινο) φάσματος RR του TO-BF με διέγερση στα 473 nm.



Σχήμα 5.27: Σύγκριση θεωρητικού (μπλε) και πειραματικού (κόκκινο) φάσματος RR του TO-Morpho με διέγερση στα 473 nm.



Σχήμα 5.28: Σύγκριση θεωρητικού (μπλε) και πειραματικού (κόκκινο) φάσματος RR του TO-Morpho με διέγερση στα 473 nm.

ΟΠΤΙΚΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ ΓΙΑ ΤΕΤΡΑΠΛΕΣ ΕΛΙΚΕΣ ΓΟΥΑΝΙΝΗΣ

Πίνακας 5.2: Ταυτοποίηση Κορυφών Φάσματος TO-BF βάσει του θεωρητικού υπολογισμού DFT/B3LYP)

<i>Μετατόπιση Raman (cm⁻¹)</i>		<i>Ανάθεση^{b, c}</i>
<i>Πειρ.</i>	<i>Θεωρ.^a</i>	
609	611	τ (V)
976	994	τ (BT)
1123	1124	τ_{methyl} (Q) + δ_{as} (B)
	1157	δ_{s} (BF)
1185	1190	δ_{s} (B)
1238	1224	δ_{as} (B) + ρ (DB) + δ (Q)
	1240	ρ (DB) + δ (Q)
1327	1315	δ (DB)
1350	1338	ρ (B)
1451	1449	δ_{s} (BF)
1554	1549	$\nu_{\text{as, C=C}}$ (B) + $\nu_{\text{as, C=C}}$ (DB)
1603	1577	$\nu_{\text{s, C=C}}$ (BF) + $\nu_{\text{as, C=C}}$ (B)
	1591	$\nu_{\text{as, C=C}}$ (Q) + $\nu_{\text{s, C=C}}$ (DB) + $\nu_{\text{s, C=C}}$ (BF)
1631	1610	$\nu_{\text{s, C=C}}$ (B) + $\nu_{\text{as, C=C}}$ (DB) + $\nu_{\text{as, C=C}}$ (Q)

^a Οι υπολογισμένοι κυματάρηθμοι πολλαπλασιάστηκαν με έναν εμπειρικό συντελεστή 0.9878 για να προσαρμοστούν στις πειραματικές τιμές.

^b Q = κινολίνη, BT = βενζοθειαζόλη, B = βενζόλιο, V = διπλός δεσμός (δ.δ.) μεταξύ Q & BT, DB = δ.δ. μεταξύ Q & B, BF = βενζοφουράνιο. Ο έντονος χαρακτήρας υποδηλώνει την ομάδα που συνεισφέρει περισσότερο.

^c ν = τάση (ν_{s} = συμμετρική, ν_{as} = ασύμμετρη), δ = κάμψη (δ_{s} = συμμετρική, δ_{as} = ασύμμετρη), ρ = κλυδωνισμός, π = πτερωτή, τ = συστροφή

Από το Σχήμα 5.26 φαίνεται καλή ταύτιση των θέσεων των κορυφών του πειραματικού και θεωρητικού φάσματος. Οι σχετικές εντάσεις, όπως επίσης, και ευκρίνεια του φάσματος εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από το μήκος κύματος και τα όργανα που χρησιμοποιούνται. Στην δική μας περίπτωση βρισκόμαστε σε συντονισμό με τη μετάπτωση χαμηλότερης ενέργειας του μικρού μορίου κάτι που έχει ως συνέπεια να αλλάζει η ένταση των κορυφών βάσει του κανόνα επιλογής για τη φασματοσκοπία Raman συντονισμού, κατά τον οποίο η ένταση των κορυφών είναι μεγαλύτερη για τις δονήσεις που αφορούν τις μεγαλύτερες

μετατοπίσεις (αλλαγές γεωμετρίας) στη διεγερμένη κατάσταση σε σχέση με την βασική. Όσο για την ευκρίνεια του φάσματος έχει να κάνει με την φασματική διασπορά κυματάρθιμου ($d\tilde{\nu}/dl$) που στην περίπτωση μας είναι ελαφρώς μεγαλύτερη από αυτή που χρειάζεται για να ξεχωρίζουν καλύτερα δύο κορυφές μεταξύ τους. Συγκεκριμένα για την περίπτωση με διέγερση στα 408 nm η διακριτική ικανότητα είναι 7 cm^{-1} , ενώ με διέγερση στα 473 nm η διακριτική ικανότητα είναι 5 cm^{-1} .

Πίνακας 5.3: Ταυτοποίηση Κορυφών Φάσματος TO-Morpha βάσει του θεωρητικού υπολογισμού DFT/B3LYP).

Μετατόπιση Raman (cm^{-1})		Ανάθεση ^c
Πειρ.	Θεωρ. ^a	
624	608	τ (V) + τ (M)
861	853	π (DB) + τ (Q)
1117	1116	ρ (M)
1134	1129	τ_{methyl} (Q) + τ_{methyl} (BT)
1194	1199	δ_{as} (B)
1346	1311	δ_{s} (DB)
	1338	$\nu_{\text{as, C=C}}$ (Q)
1475	1469	δ_{methyl} (Q) + δ_{methyl} (BT)
1516	1523	$\delta_{\text{as, methyl}}$ (BT) + $\delta_{\text{as, methyl}}$ (Q)
1555	1552	ν_{as} (Q)
1594	1590	$\nu_{\text{as, C=C}}$ (DB) + $\nu_{\text{as, C=C}}$ (Q)
	1610	$\nu_{\text{as, C=C}}$ (Q) + $\nu_{\text{as, C=C}}$ (DB)
1627	1634	$\nu_{\text{s, C=C}}$ (DB) + $\nu_{\text{as, C=C}}$ (B)

^a Οι υπολογισμένοι κυματάρθιμοι πολλαπλασιάστηκαν με έναν εμπειρικό συντελεστή 0.9878 για να προσαρμοστούν στις πειραματικές τιμές.

^b Q = κινολίνη, BT = βενζοθειαζόλη, B = βενζόλιο, V = δ.δ. μεταξύ Q & BT, DB = δ.δ. μεταξύ Q & B, M = μορφολίνη. Ο έντονος χαρακτήρας υποδηλώνει την ομάδα που συνεισφέρει περισσότερο.

^c ν = τάση (ν_{s} = συμμετρική, ν_{as} = ασύμμετρη), δ = κάμψη (δ_{s} = συμμετρική, δ_{as} = ασύμμετρη), ρ = κλυδωνισμός, π = πτερωτή, τ = συστροφή.

Πίνακας 5.4: Ταυτοποίηση Κορυφών Φάσματος TO-Thio βάσει του θεωρητικού υπολογισμού DFT/B3LYP).

Μετατόπιση Raman (cm^{-1})		Ανάθεση ^c
Πειρ.	Θεωρ. ^a	
681	621	τ (V)
977	989	π (DB) + τ (B)
1187	1062	δ_s (B)
1238	1122	τ_{methyl} (Q) + δ_s (B)
1327	1316	ρ (DB)
1357	1367	$\nu_{s, C=C}$ (T)
1428	1432	π_{methyl} (BT) + $\nu_{as, C=N}$ (BT)
	1437	$\nu_{as, C=C}$ (T) + δ_s (B)
1452	1468	ρ (Q) + π_{methyl} (Q) + τ_{methyl} (BT) + ρ (BT)
1553	1540	$\nu_{as, C=C}$ (T) + δ_s (B)
	1551	$\nu_{as, C=C}$ (Q) + τ (Q) + π_{methyl} (BT)
1599	1592	$\nu_{as, C=C}$ (Q) + $\nu_{as, C=C}$ (DB)
	1610	$\nu_{as, C=C}$ (B) + $\nu_{as, C=C}$ (DB) + $\nu_{as, C=C}$ (Q)
1628	1634	$\nu_{as, C=C}$ (DB) + $\nu_{as, C=C}$ (B)

^a Οι υπολογισμένοι κυματάριθμοι πολλαπλασιάστηκαν με έναν εμπειρικό συντελεστή 0.9878 για να προσαρμοστούν στις πειραματικές τιμές.

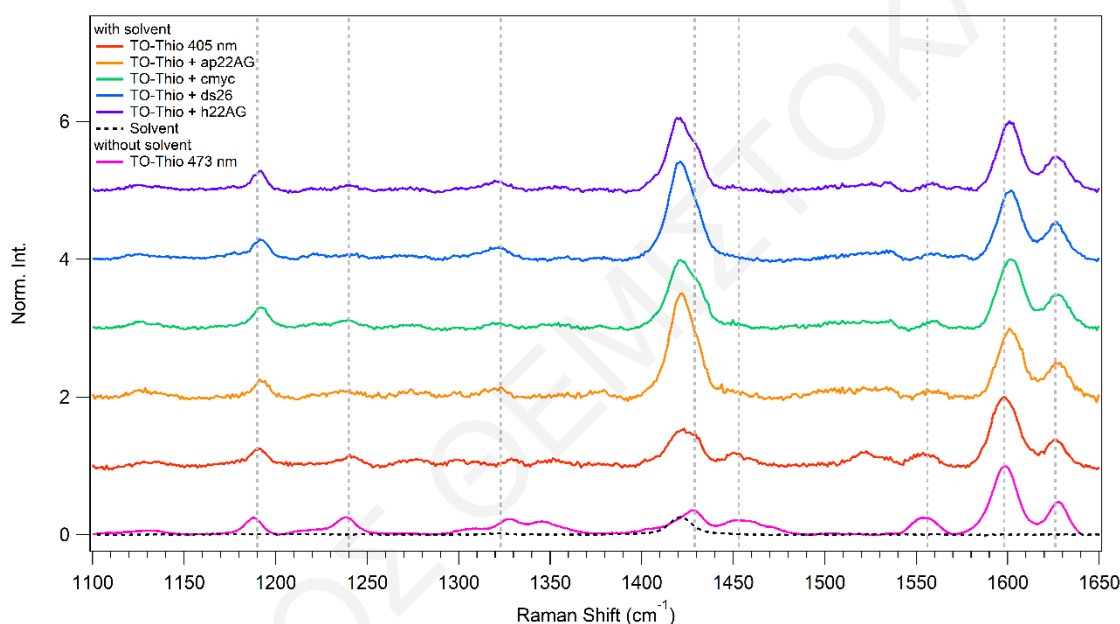
^b Q = κινολίνη, BT = βενζοθειαζόλη, B = βενζόλιο, V = δ.δ. μεταξύ Q & BT, DB = δ.δ. μεταξύ Q & B, T = θειοφαίνιο. Ο έντονος χαρακτήρας υποδηλώνει την ομάδα που συνεισφέρει περισσότερο.

^c ν = τάση (ν_s = συμμετρική, ν_{as} = ασύμμετρη), δ = κάμψη (δ_s = συμμετρική, δ_{as} = ασύμμετρη), ρ = κλυδονισμός, π = πτερωτή, τ = συστροφή.

5.3.2. Φάσματα Vis-RR μικρών μορίων και συμπλόκων με DNA με διέγερση στα 408 nm

Λόγω της αύξησης της έντασης του φθορισμού κατά την πρόσδεση των μικρών μορίων με τα νουκλεϊκά οξέα ήταν αδύνατη η λήψη καλών φασμάτων Raman συντονισμού με διέγερση στα 473 nm, όποτε για την μελέτη των αλληλεπιδράσεων με τα νουκλεϊκά οξέα έγινε διέγερση στα 405 nm (TO-Thio) και στα 408 nm (TO-BF και TO-Morpho).

Στο Σχήμα 5.29 παρουσιάζονται τα φάσματα Raman συντονισμού του TO-Thio και του συμπλόκου του με τα διάφορα DNA με διέγερση στα 405 nm. Για σύγκριση παρατίθεται επίσης και το φάσμα Raman συντονισμού του μορίου με διέγερση στα 473 nm, το οποίο φαίνεται σχεδόν πανομοιότυπο με αυτό στα 405 nm. Μπορούν να παρατηρηθούν σημαντικές αλλαγές στα φάσματα των συμπλόκων που οφείλονται στην αλληλεπίδραση του μορίου με τα ολιγονουκλεοτιδία. Στο Σχήμα 5.29 παρατηρούνται διάφορες μετατοπίσεις και αλλαγές στις σχετικές εντάσεις των κορυφών στους 1429 cm^{-1} (επικάλυψη από κορυφή του διαλύτη) που οφείλεται στη διάταξη C=C του θειοφαινίου και 1600 cm^{-1} (κάμψεις C-H του διπλού δεσμού και των δακτυλίων της κινολίνης και του βενζολίου).



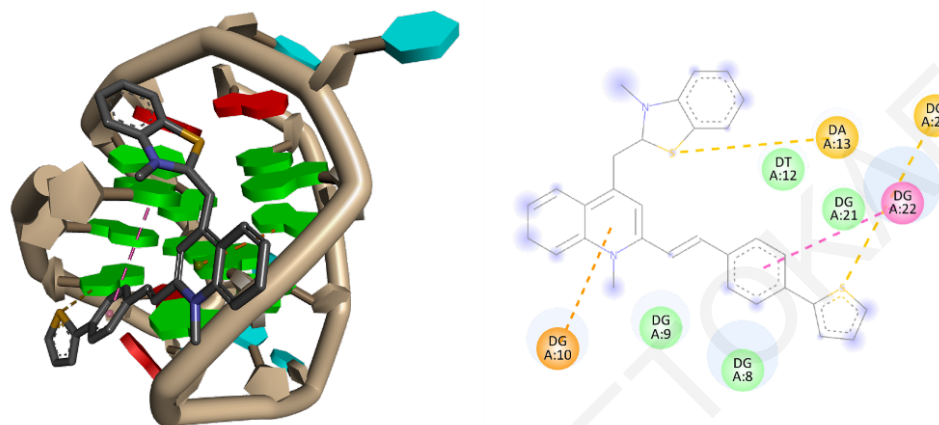
Σχήμα 5.29: Φάσματα Vis-RR του TO-Thio με διέγερση στα 473 nm (ροζ) και 405 nm και του συμπλόκου με τα DNA. Οι κάθετες γκριζές γραμμές δείχνουν τις κορυφές που υφίστανται αλλαγές με την παρουσία των DNA. Η κορυφή στους $\sim 1429\text{ cm}^{-1}$ είναι κορυφή του διαλύτη που επικαλύπτει την κορυφή του θειοφαινίου.

Αυτές οι αλλαγές οφείλονται κυρίως σε αλλαγές στην διαμόρφωση του μικρού μορίου λόγω των διαφόρων αλληλεπιδράσεων με τα νουκλεϊκά οξέα. Για να μελετηθεί με λεπτομέρεια η δέσμευση των μικρών μορίων στα διάφορα μοντέλα DNA και η διαμόρφωση που παίρνουν τα μόρια στην κάθε περίπτωση, πραγματοποιήθηκε υπολογιστική προσομοίωση μοριακής πρόσδεσης.

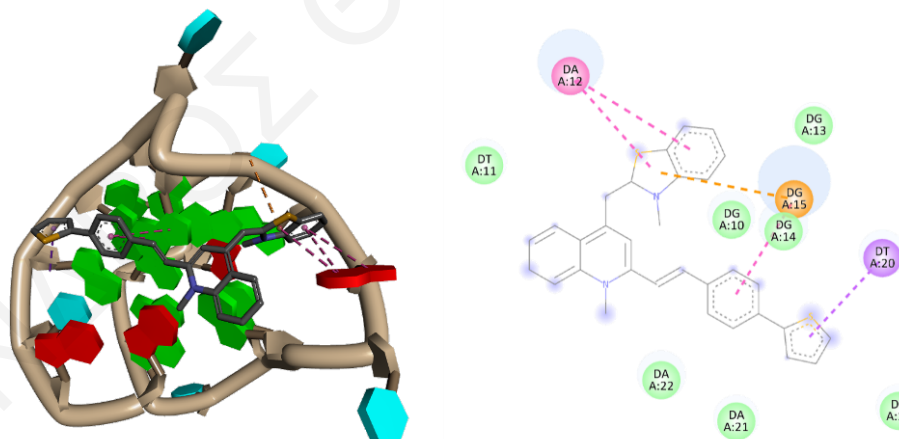
5.3.3. Μοριακή Προσομοίωση Πρόσδεσης

Η υπολογιστική προσομοίωση της μοριακής πρόσδεσης διεξάχθηκε με τη χρήση του προγράμματος Autodock Vina (βλ. υποενότητα 4.4). Για την έναρξη του υπολογισμού, ως αρχική δομή των μικρών μορίων χρησιμοποιήθηκε η βέλτιστη γεωμετρία από τον

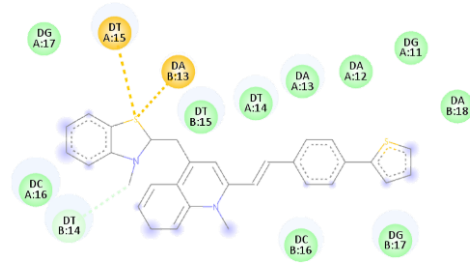
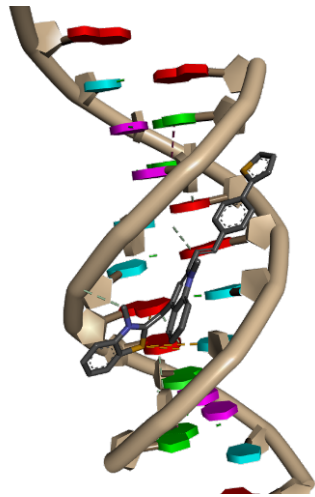
προηγούμενο υπολογισμό DFT, οι δομές των μοντέλων G4 DNA λήφθηκαν από την βάση δεδομένων Protein Data Bank (PDB), ενώ για το ds26 δημιουργήθηκε το μοντέλο στο πρόγραμμα Avogadro. Τα αποτελέσματα της προσομοίωσης φαίνονται στο Παράρτημα – Μοριακή Πρόσδεση, αλλά εδώ παραθέτουμε κάποια ενδεικτικά παραδείγματα για την περίπτωση του TO-Thio.



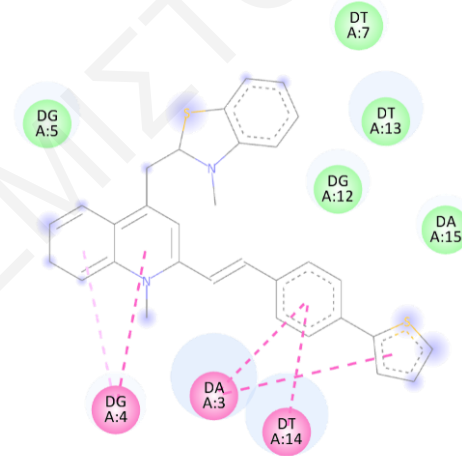
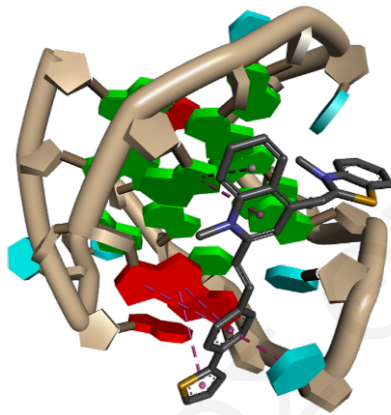
Σχήμα 5.30: Αριστερά: Αποτέλεσμα της μοριακής πρόσδεσης του TO-Thio στην αντιπαράλληλη τετραπλή έλικα που σχηματίζεται από την τελομερική αλληλουχία (ap22AG). Δεξιά: Δυσδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ του TO-Thio και του ap22AG (ροζ: αλληλεπιδράσεις π-π, ανοικτό πράσινο: αλληλεπιδράσεις van der Waals,, πορτοκαλί: αλληλεπιδράσεις π-ανιόν).



Σχήμα 5.31: Αριστερά: Αποτέλεσμα της μοριακής πρόσδεσης του TO-Thio στην παράλληλη τετραπλή έλικα που σχηματίζεται από τον προαγωγέα του ογκογονιδίου c-myc. Δεξιά: Δυσδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ του TO-Thio και του c-myc (ροζ: αλληλεπιδράσεις π-π, ανοικτό πράσινο: αλληλεπιδράσεις van der Waals, πορτοκαλί: αλληλεπιδράσεις π-ανιόν, μωβ: αλληλεπιδράσεις π-σ).



Σχήμα 5.32: Αριστερά: Αποτέλεσμα της μοριακής πρόσδεσης του TO-Thio στο μοντέλο δίκλωνης έλικας (ds26). Δεξιά: Δυσδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ του TO-Thio και του ds26 (ανοικτό πράσινο: αλληλεπιδράσεις van der Waals, κίτρινο: αλληλεπιδράσεις π-S).

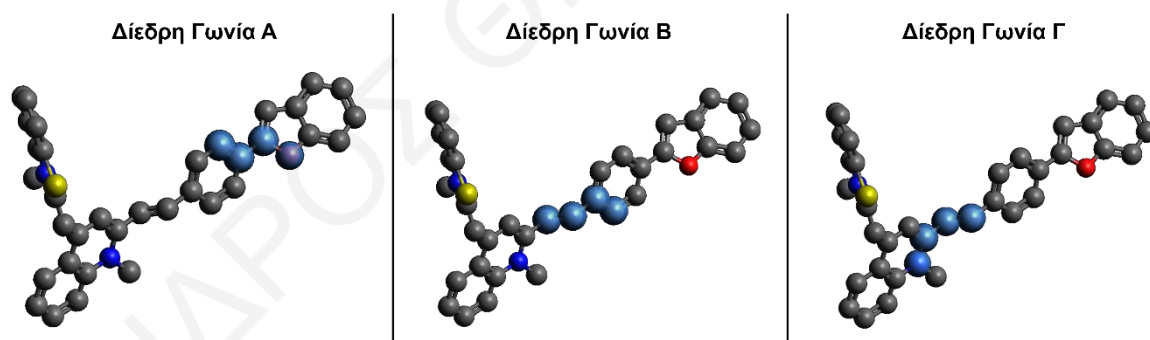


Σχήμα 5.33: Αριστερά: Αποτέλεσμα της μοριακής πρόσδεσης του TO-Thio στην υβριδική τετραπλή έλικα που σχηματίζεται από την τελομερική αλληλουχία (h22AG). Δεξιά: Δυσδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ του TO-Thio και του h22AG (ροζ: αλληλεπιδράσεις π-π, ανοικτό πράσινο: αλληλεπιδράσεις van der Waals).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μοριακής πρόσδεσης τα κύρια είδη μοριακών αλληλεπιδράσεων που παρατηρούνται είναι δυνάμεις van der Waals (vdW), δεσμοί υδρογόνου (συμβατικοί και μοντέρνοι) και π-π αλληλεπιδράσεις (τύπου T και στοιβαξης). Γενικά για όλα τα μόρια, στις περιπτώσεις με τα μοντέλα ap22AG και ds26 παρατηρείται δέσμευση στις αύλακες των δομών και επιπρόσθετη στοιβαξη με τις τετράδες στην περίπτωση του ap22AG, ενώ στις άλλες δύο περιπτώσεις (c-myc, h22AG) παρατηρείται ένας συνδυασμός δέσμευσης με μέρος των μορίων να δεσμεύεται στις αύλακες και στους βρόγχους αλλά ταυτόχρονα να γίνεται και στοιβαξη με τις τετράδες. Επιπρόσθετα, η κατεύθυνση όλων των μορίων φαίνεται να είναι παρόμοια, δηλαδή σε όλες τις περιπτώσεις οι ομάδες κατευθύνονται σε παρόμοιο χημικό περιβάλλον στις αύλακες των DNA με απώτερο σκοπό την ελαχιστοποίηση της έκθεσης των υδρόφοβων κομματιών των μορίων

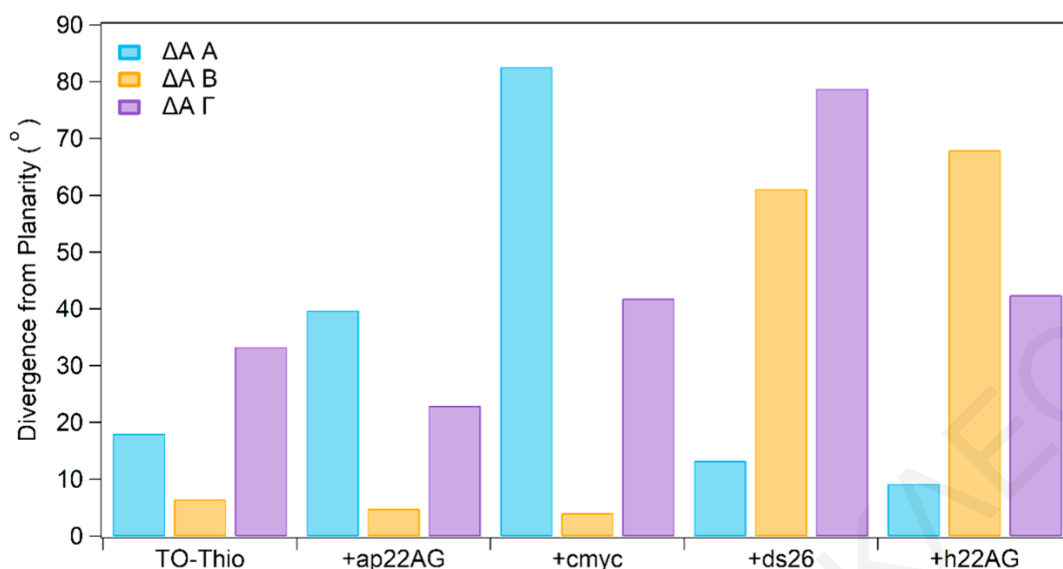
σε μόρια νερού. Οι τιμές συγγένειας των συμπλόκων (σε μονάδες ενέργειας) βάσει τις μοριακές προσομοιώσεις κυμαίνονται από -10 μέχρι -7 kcal/mol (Σχήμα Π- 51) με χαμηλότερες ενέργειες στις περιπτώσεις πρόσδεσης στο h22AG.

Οι τελικές δομές που λαμβάνουν τα μόρια μετά την μοριακή προσομοίωση της δέσμευσης παρουσιάζουν διαφορές σε σχέση με τα απομονωμένα μόρια, με διαφορετικές διέδρες γωνίες μεταξύ των διάφορων λειτουργικών ομάδων αναλόγως του νουκλεϊκού οξέος με το οποίο αλληλεπιδρούν, πιθανόν λόγω της διαφορετικής τοπολογίας στην κάθε περίπτωση. Οι διαφορές αυτές ποσοτικοποιήθηκαν και συγκρίθηκαν μεταξύ τους για εξαγωγή συμπερασμάτων δομής και τρόπου αλληλεπίδρασης. Σημαντικό να σημειωθεί ότι στις περισσότερες περιπτώσεις τα μικρά μόρια έχασαν την αρχική τους επιπεδότητα στον άξονα κινολίνης – βενζολίου – πλευρικής ομάδας και αφού ταυτοποιήθηκαν τα μέρη του μορίου (οι διέδρες γωνίες μεταξύ πλευρικής ομάδας και βενζολίου, βενζολίου και διπλού δεσμού, και κινολίνης και διπλού δεσμού) για τα οποία παρατηρούνται έντονες αλλαγές έγινε συσχέτιση αυτών των αλλαγών με το μέγεθος του συζυγιακού συστήματος (Σχήμα 5.37). Στον πίνακα (Πίνακας 5.5) που ακολουθεί παρουσιάζονται οι τιμές των διέδρων γωνιών (ΔΑ) (Σχήμα 5.34) των τελικών δομών που εξάχθηκαν από την μοριακή πρόσδεση για όλες τις περιπτώσεις, όπως επίσης και η διαφορά της κάθε διέδρης γωνίας από την επιπεδότητα.



Σχήμα 5.34: Με μπλε σκίαση φαίνονται τα άτομα που ορίζουν τις διέδρες γωνίες. Διέδρη Γωνία Α της ομάδας θειοφαινίου/μορφολίνης/βενζοφουράνιου και της βενζυλικής ομάδας, Διέδρη Γωνία Β της βενζυλικής ομάδας με τον διπλό δεσμό, Διέδρη Γωνία Γ του διπλού δεσμού με τη ομάδα της κινολίνης.

Στο Σχήμα 5.35 παρουσιάζονται γραφικά οι αποκλίσεις των τριών διέδρων γωνιών από την επιπεδότητα στην περίπτωση του TO-Thio, όπως φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Αντίστοιχες γραφικές παρουσιάζονται στο Παράρτημα – Διέδρες Γωνίες και Συζυγιακό Σύστημα για τα άλλα δύο μόρια.



Σχήμα 5.35: Αποκλίσεις των διέδρων γωνιών (ΔΑ) του TO-Thio από την επιπεδότητα πριν και μετά την αλληλεπίδραση με τα μοντέλα DNA.

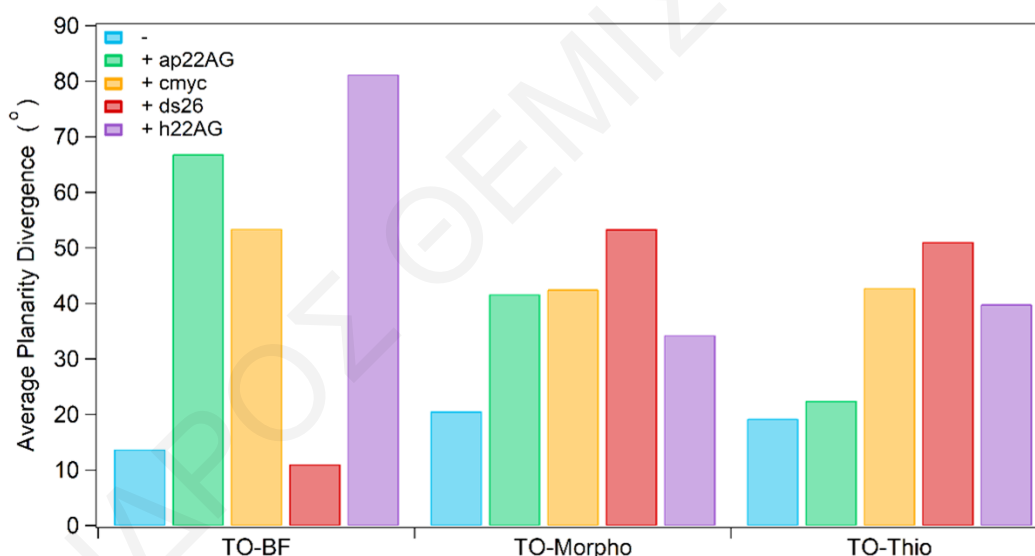
Πίνακας 5.5: Διέδρες Γωνίες της πλευρικής ομάδας και διαφορά από την επιπεδότητα.

Μικρά Μόρια / DNA		Διέδρες Γωνίες (°)			Διαφορά από Επιπεδότητα (°)		
		A	B	Γ	A	B	Γ
TO-Thio	-	161.95	-173.53	-146.69	18.05	6.47	33.31
	+ ap22AG	-39.73	-175.21	-157.05	39.73	4.79	22.95
	+ c-myc	82.58	4.02	138.16	82.58	4.02	41.84
	+ ds26	166.73	118.87	101.23	13.27	61.14	78.78
	+ h22AG	9.21	-67.96	-137.58	9.21	67.96	42.43
TO-Morpho	-	151.63	-175.32	-151.29	28.37	4.68	28.71
	+ ap22AG	0.46	-108.43	127.11	0.46	71.57	52.90
	+ c-myc	96.21	-6.32	142.51	83.79	6.32	37.49
	+ ds26	-23.24	-48.63	88.30	23.24	48.63	88.30
	+ h22AG	173.33	-51.28	-135.07	6.67	51.28	44.93
TO-BF	-	-179.19	-172.86	-146.66	0.81	7.14	33.34
	+ ap22AG	-40.03	-85.68	-105.05	40.03	85.68	74.95
	+ c-myc	117.74	-48.30	-130.13	62.26	48.30	49.87
	+ ds26	21.80	5.20	-173.89	21.80	5.20	6.11
	+ h22AG	88.81	-107.39	-97.70	88.81	72.61	82.30

Παρατηρούμε ότι στην περίπτωση που το TO-Thio αλληλεπιδρά με την αντιπαράλληλη τετραπλή έλικα της τελομερικής αλληλουχίας και με την παράλληλη τετραπλή έλικα της αλληλουχίας του προαγωγέα ογκογονιδίου c-myc αλλάζει αισθητά η διέδρη γωνία μεταξύ του θειοφαινίου και του βενζολίου, ενώ παραμένουν σχετικά ίδιες οι άλλες διέδρες γωνίες.

Αντιθέτως, στην περίπτωση που το TO-Thio αλληλεπιδρά με την υβριδική τετραπλή έλικα της τελομερικής αλληλουχίας και με το μοντέλο διπλής έλικας αλλάζουν αισθητά οι διεδρες γωνίες μεταξύ του βενζολίου, διπλού δεσμού και κινολίνης, ενώ γίνεται λίγο πιο επίπεδη η πρώτη διεδρη γωνία.

Σε γενικές γραμμές, φαίνεται ότι όλα τα μόρια αλλάζουν αρκετά την δομή τους κατά την δέσμευση με τα νουκλεϊκά οξέα, όπως φαίνεται και από το Σχήμα 5.36. Εδώ παρουσιάζεται ο μέσος όρος της απόκλισης των διεδρων γωνιών (για τις γωνίες A, B και Γ) από την επιπεδότητα. Στην περίπτωση των TO-Morpho και TO-Thio, το απομονωμένο μόριο εμφανίζει μια πιο επίπεδη γεωμετρία (με λιγότερη απόκλιση από την επιπεδότητα) σε σχέση με το μόριο στα σύμπλοκα, με τις πιο έντονες αλλαγές να υπάρχουν στην περίπτωση της αλληλεπίδρασης τους με το δίκλωνο DNA. Σε αντίθεση στην περίπτωση του TO-BF η πιο επίπεδη γεωμετρία παρουσιάζεται μετά την αλληλεπίδραση με το μοντέλο της δίκλωνης αλυσίδας DNA και η λιγότερο επίπεδη στην περίπτωση της αλληλεπίδρασης με το h22AG.



Σχήμα 5.36: Μέσος όρος της απόκλισης από την επιπεδότητα των μικρών μορίων πριν και μετά την αλληλεπίδραση με τα μοντέλα DNA.

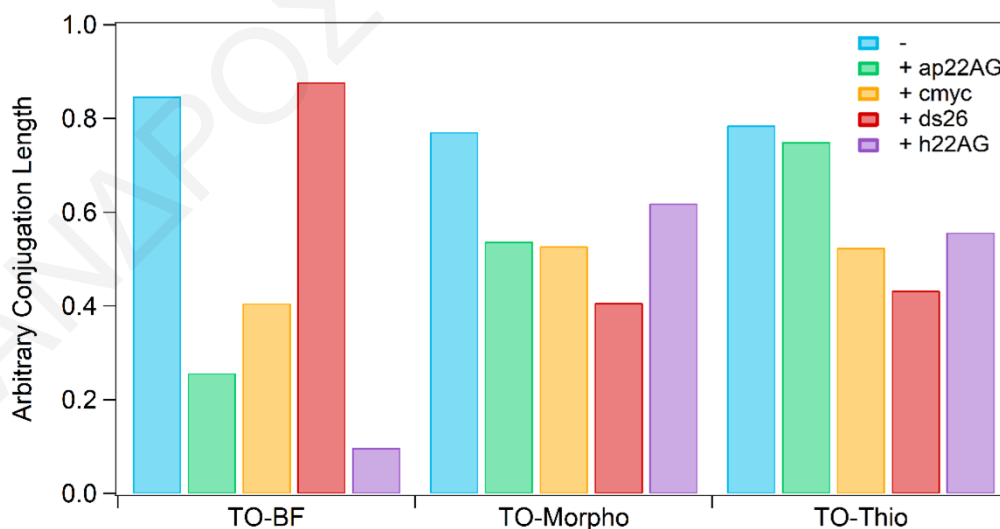
Αξιοσημείωτη παρατήρηση είναι η σύγκριση αυτού του μέσου όρου με τις σταθερές δέσμευσης, K_a , των μορίων στα νουκλεϊκά οξέα. Το TO-BF που τυγχάνει και των μεγαλύτερων δομικών αλλαγών παρουσιάζει και τις μεγαλύτερες σταθερές δέσμευσης, όμως αυτή η τιμή της απόκλισης δεν ταιριάζει πάντα με το τι βλέπουμε από τις K_a . Για παράδειγμα στην περίπτωση του TO-Thio βλέποντας απλώς την διαφορά από την επιπεδότητα θα ανέμενε κανείς ψηλότερες τιμές K_a στις περιπτώσεις με το c-myc και το ds26, όμως στην πραγματικότητα ψηλότερες τιμές έχουμε στα G4 της τελομερικής αλληλουχίας. Ωστόσο, κατά την προσεκτικότερη εξέταση των ακριβών γωνιών, καθίσταται προφανές ότι η απόκλιση μόνο από την επιπεδότητα δεν παρέχει μια ολοκληρωμένη

κατανόηση. Υπάρχουν περιπτώσεις όπου οι γωνίες βρίσκονται σε διαφορετικά τεταρτημόρια, αλλά η απόκλιση φαίνεται παρόμοια. Ως εκ τούτου, είναι ζωτικής σημασίας να τονιστεί ότι η απόκλιση από την επιπεδότητα δεν αποτελεί τη μοναδική μέθοδο ποσοτικοποίησης των αλλαγών, αλλά προσφέρει μάλλον μια γενική απεικόνιση του τρόπου με τον οποίο οι κορυφές μπορούν να μετατοπιστούν στο φάσμα.

Το μέγεθος του συζυγιακού συστήματος μπορεί να εκτιμηθεί εμπειρικά γνωρίζοντας ότι οι άξονες των π τροχιακών πρέπει να είναι παράλληλοι μεταξύ τους ($\varphi = 0^\circ$) για βέλτιστη συζυγία C_{max} , ενώ αν οι άξονες είναι σε ορθή γωνία μεταξύ τους ($\varphi = 90^\circ$) δεν υπάρχει συζυγία. Εάν υπάρχει κάποια άλλη γωνία, το πλάτος κύματος που αποκλίνει είναι $C_{max} \cdot \cos\varphi$. Ένας άλλος πρόχειρος τρόπος είναι να γίνει κανονικοποίηση του μέσου όρου των διεδρων γωνιών ως προς το κάθετο επίπεδο και να πάρουμε την διαφορά από την μονάδα:

$$L = 1 - \left| \frac{DA}{90} \right| \quad \text{Εξίσωση 5.3.2}$$

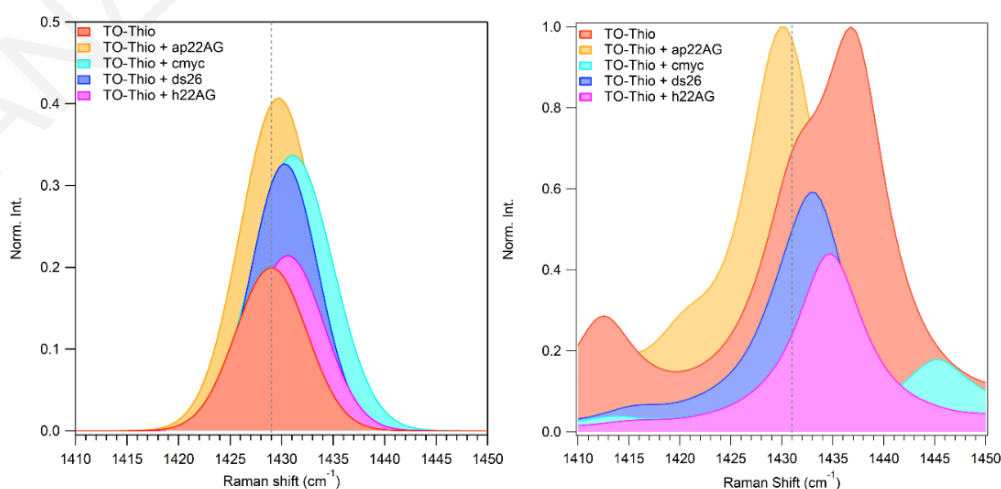
όπου L το αυθαίρετο μήκος συζυγίας και DA ο μέσος όρος των διεδρων γωνιών. Στο Σχήμα 5.37 παρουσιάζεται αυτό το αυθαίρετο μήκος της συζυγίας όπου και πάλι φαίνεται το TO-BF να έχει τις πιο μεγάλες αλλαγές κάτι το οποίο πιθανώς να δείχνει ότι το μόριο προτιμάει να χαλάσει τη συζυγία διότι κερδίζει σε ενέργεια με τις επιπλέον αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσει με τα διαφορετικά DNA.



Σχήμα 5.37: Υπολογισμός του μεγέθους του συζυγιακού συστήματος βάσει του μέσου όρου της απόκλισης από την επιπεδότητα. Όσο πιο κοντά στην μονάδα τόσο πιο μεγάλο το συζυγιακό σύστημα.

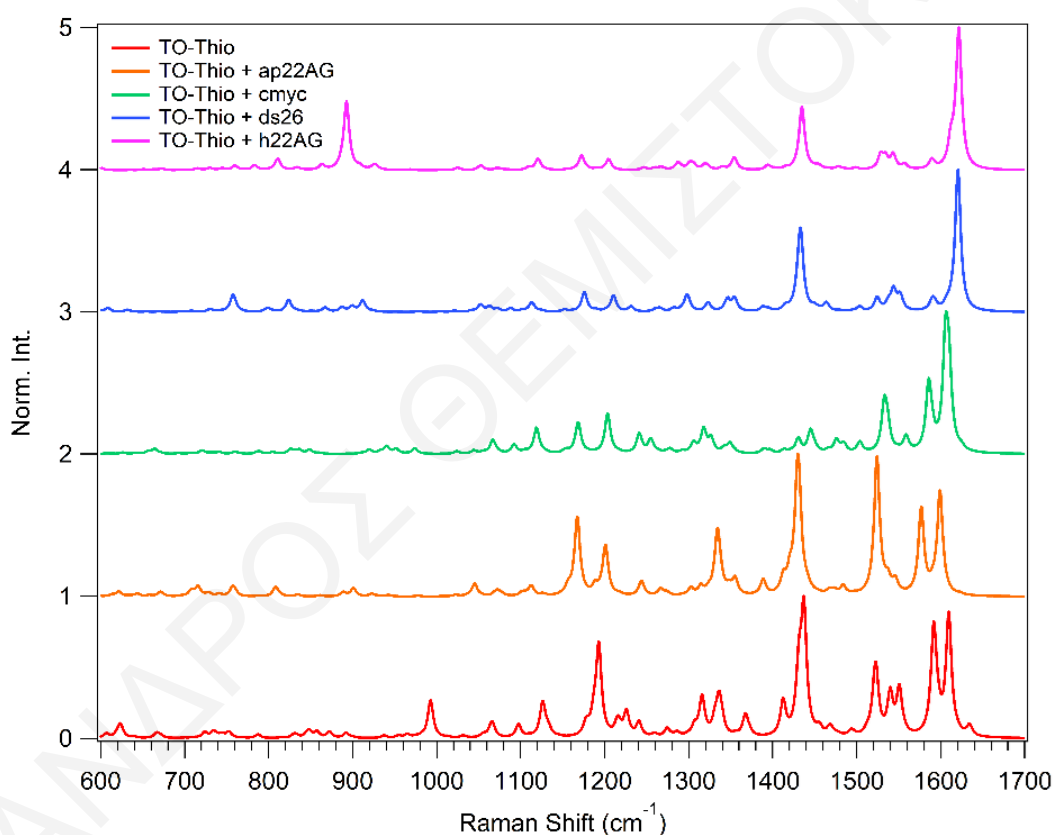
Αυτή η υπολογιστική προσομοίωση της δέσμευσης βοήθησε να κατανοήσουμε πως πιθανόν να μεταβάλλεται η δομή των τριών μορίων κατά τη δέσμευση τους. Παρατηρώντας τα πειραματικά φάσματα Raman συντονισμού των συμπλόκων μπορούμε να επιβεβαιώσουμε

τις θεωρητικές προβλέψεις, αλλά και να κατανοήσουμε τις αλλαγές που παρατηρούμε. Εστίασαμε την προσοχή μας σε ένα από τα μικρά μόρια, το TO-Thio, για περαιτέρω ανάλυση (τα φάσματα Raman συντονισμού για τα υπόλοιπα μόρια με τα σύμπλοκά τους εμφανίζονται στο Παράρτημα – Φάσματα συντονισμού Raman). Στα φάσματα Raman συντονισμού που εμφανίζονται στο Σχήμα 4.26, παρατηρούμε ότι οι μεγαλύτερες μετατοπίσεις των κορυφών αφορούν τις ομάδες κινολίνης (1598 cm^{-1}) και θειοφαινίου (1357 και 1429 cm^{-1}). Λόγω της επικάλυψης της κορυφής του θειοφαινίου στους 1429 cm^{-1} από αυτή του DMSO πραγματοποιήθηκε αποσυνέλιξη της κορυφής, τα αποτελέσματα της οποίας φαίνονται στο Σχήμα 5.38 (αριστερά). Παρατηρούμε ότι η κορυφή που αντιστοιχεί στη συμμετρική διάταση C=C του θειοφαινίου μετατοπίζεται σε μεγαλύτερους κυματάρθιμους όσο το συζυγιακό σύστημα «μικραίνει» στην περίπτωση των c-myc, ds26 και h22AG το οποίο συμφωνεί με το Σχήμα 5.37, με τις διεδρες γωνίες να αποκλίνουν περισσότερο από την επιπεδότητα με αποτέλεσμα χειρότερη επικάλυψη των π-τροχιακών και με την ηλεκτρονιακή πυκνότητα να παραμένει στον διπλό δεσμό μεταξύ του φαινυλομάδας και της κινολίνης. Στην περίπτωση με το c-myc βλέπουμε και την μεγαλύτερη μετατόπιση εφόσον σε αυτήν την περίπτωση η διεδρη γωνία A είναι σχεδόν 90° (Σχήμα 5.35). Θεωρητικοί υπολογισμοί DFT στις τελικές διαμορφώσεις που πήρε το μόριο TO-Thio μετά από την υπολογιστική μοντελοποίηση με τα διαφορετικά DNA (Σχήμα 5.38 (δεξιά)), δείχνουν ότι η κορυφή αυτή μετατοπίζεται αναλόγως της δομής. Σε γενικές γραμμές φαίνεται να ακολουθείται παρόμοια τάση στις μετατοπίσεις της κορυφής του θειοφαινίου εκτός στην περίπτωση με την αλληλεπίδραση με το αντιπαράλληλο G4. Αυτή η διαφορά πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι ο υπολογισμός DFT έδειξε ότι δεν έχουμε μια σταθερή δομή αλλά βρισκόμαστε σε μια μεταβατική κατάσταση.



Σχήμα 5.38: Η κορυφή του θειοφαινίου μετά την αποσυνέλιξη της κορυφής στους 1429 cm^{-1} (αριστερά). Η κορυφή του θειοφαινίου (γκρίζα γραμμή) σύμφωνα με τον υπολογισμό (δεξιά).

Παρατηρώντας και τις υπόλοιπες κορυφές στα θεωρητικά φάσματα του TO-Thio (Σχήμα 5.39) φαίνεται να επιβεβαιώνονται οι αλλαγές και μετατοπίσεις που παρατηρούνται στα πειραματικά (Πίνακας 5.6). Πιο συγκεκριμένα, η ένταση των κορυφών στους 1357 και 1557 cm^{-1} που οφείλονται στις συμμετρικές και ασύμμετρες τάσεις C=C του θειοφαινίου, αντίστοιχα, μειώνεται, ενώ η κορυφή στους 1327 cm^{-1} που οφείλεται στον κλυδωνισμό του διπλού δεσμού μεταξύ βενζολίου και κινολίνης μετατοπίζεται σε μικρότερους κυματάριθμους και μειώνεται ελαφρώς η ένταση της καθώς η διεδρες γωνίες μεταξύ του βενζολίου – διπλού δεσμού και της κινολίνης - διπλού δεσμού αποκλίνουν από την επιπεδότητα. Μεγάλες αποκλίσεις και στις δυο διεδρες γωνίες έχουμε στις περιπτώσεις με ds26 και h22AG, $\sim 70^\circ$ και $\sim 55^\circ$, αντίστοιχα.



Σχήμα 5.39: Θεωρητικά Φάσματα Raman του TO-Thio στις διάφορες δομές που παίρνει όταν προσδεθεί σε DNA. Το πλάτος των γκαουσιανών κορυφών καθορίστηκε σε 4 cm^{-1} . Ο άξονας χ των φασμάτων είναι πολλαπλασιασμένος με διορθωτικό όρο 0.988.

Σύμφωνα με τα θεωρητικά φάσματα (Σχήμα 5.39), η κορυφή στους 1590 cm^{-1} που οφείλεται στις τάσεις C=C του δακτυλίου της κινολίνης, μετατοπίζεται σε μεγαλύτερους κυματάριθμους καθώς η διεδρη γωνία μεταξύ του διπλού δεσμού και της κινολίνης αποκλίνει από την επιπεδότητα (TO – Thio: $\sim 33^\circ$, + c–myc: $\sim 42^\circ$, + ds26: $\sim 80^\circ$ και +h22AG: $\sim 42^\circ$), ενώ όταν η διεδρη γωνία συγκλίνει στην επιπεδότητα οι κορυφές μετατοπίζονται σε μικρότερους κυματάριθμους (TO – Thio: $\sim 33^\circ$, + ap22AG: $\sim 23^\circ$). Επιπρόσθετα, η κορυφή

στους 1610 cm^{-1} που οφείλεται στις τάσεις $\text{C}=\text{C}$ του δακτυλίου του βενζολίου, μετατοπίζεται σε μεγαλύτερους κυματάριθμους καθώς η δίεδρη γωνία μεταξύ του διπλού δεσμού και του βενζολίου αποκλίνει από την επιπεδότητα ($\text{TO} - \text{Thio}$: $\sim 7^\circ$, $+ \text{ds26}$: $\sim 61^\circ$ και $+ \text{h22AG}$: $\sim 68^\circ$), ενώ όταν η δίεδρη γωνία συγκλίνει στην επιπεδότητα οι κορυφές μετατοπίζονται σε μικρότερους κυματάριθμους ($\text{TO} - \text{Thio}$: $\sim 7^\circ$, $+ \text{ap22AG}$: $\sim 5^\circ$ και $+ \text{c-myc}$: $\sim 4^\circ$). Αυτές οι παρατηρήσεις δεν φαίνονται τόσο ξεκάθαρα στα πειραματικά φάσματα (Πίνακας 5.6), αλλά η μόνη διαφοροποίηση είναι η μετατόπιση της κορυφής στους 1598 cm^{-1} (τάσεις $\text{C}=\text{C}$ του δακτυλίου του βενζολίου) σε μεγαλύτερους κυματάριθμους με την αλληλεπίδραση με τα νουκλεϊκά οξέα σε σχέση με το απομονωμένο μόριο σε όλες τις περιπτώσεις. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην επικάλυψη αυτών των δύο κορυφών στα πειραματικά φάσματα, αλλά και στο διαφορετικό μοτίβο εντάσεων. Να υπενθυμίσουμε ότι τα υπολογιστικά φάσματα δεν είναι σε συντονισμό, άρα ακολουθούν τον κανόνα επιλογής που θέλει τις κορυφές που αντιστοιχούν στις μεγαλύτερες αλλαγές της πολωσιμότητας κατά τη δόνηση να έχουν την μεγαλύτερη ένταση, ενώ σε συντονισμό μεγαλύτερη ένταση έχουν οι κορυφές που αντιστοιχούν στις μεγαλύτερες γεωμετρικές αλλαγές κατά την ηλεκτρονιακή μετάπτωση. Εδώ έχουμε μια μετάπτωση μεταφοράς φορτίου, όπου βάσει και των τροχιακών (Σχήμα 5.3) θα ενισχύονται κορυφές που αντιστοιχούν σε δονήσεις του θειοφαινίου, βενζολίου και διπλού δεσμού, λόγω της αλλαγής της ηλεκτρονιακής πυκνότητας σε αυτή την περιοχή. Στην περιοχή της κινολίνης οι αλλαγές σε ηλεκτρονιακή πυκνότητα εμφανίζονται λιγότερες. Για αυτό το λόγο και η κορυφή του βενζολίου που μετατοπίζεται σε ψηλότερους κυματάριθμους μπορεί να σχετίζεται με μια γενική μείωση του συζυγιακού μήκους με την αλληλεπίδραση με τα DNA με αύξηση των διεδρων γωνιών Β και Γ κάτι που αντανακλάται και στη μετατόπιση της κορυφής στους 1626 cm^{-1} που οφείλεται στη δόνηση τάσης του διπλού δεσμού $\text{C}=\text{C}$ ανάμεσα στο βενζόλιο και την κινολίνη.

Πίνακας 5.6: Κορυφές του φάσματος *Vis-RR* του *TO-Thio* που μετατοπίζονται με την αλληλεπίδραση με τα μοντέλα DNA. Η σκιασμένη κορυφή περιλαμβάνει τα αποτελέσματα της αποσυνέλιξης της κορυφής στους 1429 cm^{-1} .

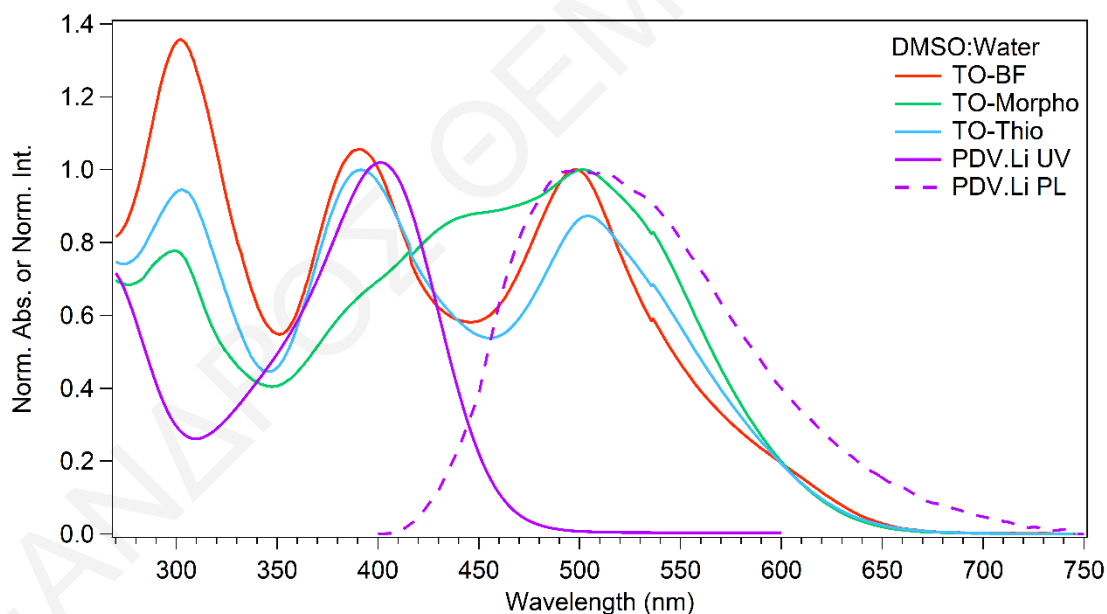
Κορυφή (cm^{-1})	+ap22AG	+c-myc	+ds26	+h22AG
1191	1192	1192	1192	1192
1330	1322	1321	1322	1321
1429	1429.7	1431.1	1430.3	1430.6
1554	1557	1559	1558	1559
1598	1601	1601	1601	1601
1626	1628	1628	1627	1626

Συμπερασματικά, οι εκτενείς μελέτες που εκπονήθηκαν σε αυτό το κεφάλαιο ρίχνουν φως στην περίπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ μικρών μορίων και τετραπλών ελίκων γουανίνης. Μέσω φασματοσκοπικού χαρακτηρισμού και υπολογιστικών προσομοιώσεων, εμβαθύνουμε

στις οπτικές και φυσικές ιδιότητες των μικρών μορίων και πως αυτές επηρεάζονται από το περιβάλλον που βρίσκονται. Οι οπτικές μελέτες διευκρίνισαν περαιτέρω τη δυναμική φύση των αλληλεπιδράσεων των μικρών μορίων με τα μοντέλα DNA, όπως αποδεικνύεται από τις τιτλοδοτήσεις UV-Vis και φωτοφωταύγειας, καθώς και από τη φασματοσκοπία CD. Επιπλέον, η εξέταση των δομών και των αλληλεπιδράσεων συμπλόκων μορίων/DNA, διερευνήθηκε με τη χρήση της φασματοσκοπίας συντονισμού Raman, ενώ οι προσομοιώσεις μοριακής πρόσδεσης, παρείχαν ανεκτίμητες πληροφορίες για το πολύπλοκο μοριακό τοπίο. Αυτή η πολύπλευρη προσέγγιση όχι μόνο εμβαθύνει την κατανόηση αυτών των αλληλεπιδράσεων αλλά και ανοίγει το δρόμο για μελλοντικές εξελίξεις στον τομέα της μοριακής αναγνώρισης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΒΑΣΙΣΜΕΝΟΣ ΣΕ ΑΝΙΟΝΙΚΟ ΠΟΛΥΜΕΡΕΣ

Ο βιοαισθητήρας που μελετήθηκε στην παρούσα διατριβή αποτελείται από δύο μέρη, το πολυμερές PDV.Li* και το μικρό μόριο, και λειτουργεί σαν διακόπτης on/off, όπου μεταβάλλεται η ένταση του φθορισμού πριν και μετά την ανάμιξη με τον προς μελέτη αναλύτη. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, αυτό συμβαίνει λόγω του ότι στο αρχικό διάλυμα του πολυμερούς με τα μικρά μόρια πραγματοποιείται μεταφορά ενέργειας από το πολυμερές στο μικρό μόριο αποσβένοντας την εκπομπή φθορισμού (Σχήμα 6.1), η οποία ανακτάται με την προσθήκη διαλύματος που περιέχει G4 DNA που δεσμεύει ποσότητα των μικρών μορίων.



Σχήμα 6.1: Κανονικοποιημένα φάσματα απορρόφησης των μικρών μορίων μαζί με τα φάσματα απορρόφησης και φθορισμού του πολυμερούς.

Στο υποκεφάλαιο 3.3.2 έγινε αναφορά στις προϋποθέσεις που χρειάζονται για να παρατηρηθεί το συγκεκριμένο φαινόμενο: δηλαδή χρειαζόμαστε δύο τουλάχιστον μόρια τα οποία πρέπει να αλληλεπιδρούν αλλά και να έχουν αλληλοεπικάλυψη της κορυφής

* Το πολυμερές PDV.Li παραχωρήθηκε από την ομάδα του Δρ Shane O. McDonnell από το Πανεπιστήμιό της Οξφόρδης σε μια προηγούμενη συνεργασία με το Ερευνητικό Εργαστήριο Μοριακής Φασματοσκοπίας.

εκπομπής του ενός με την κορυφή απορρόφησης του άλλου, κάτι που πληρείται από τα φάσματα στο Σχήμα 6.1.

6.1. Απόσταση Förster μεταξύ πολυμερούς και μικρών μορίων

Ο υπολογισμός της απόστασης Förster, R_0 , έγινε με τη χρήση του λογισμικού Förster Distance Calculator το οποίο χρησιμοποιεί την εξίσωση:

$$R_0 = \left\{ \frac{9000(\ln 10)\kappa^2 Q_d J}{128\pi^5 n^4 N} \right\}^{\frac{1}{6}} = 9.78 \times 10^3 \left\{ \frac{Q_d \kappa^2 J}{n^4} \right\}^{\frac{1}{6}} \text{ \AA} \quad \text{Εξίσωση 6.1.1}$$

όπου Q_d είναι κβαντική απόδοση του δότη, κ^2 είναι παράγοντας προσανατολισμού διπόλου n είναι ο δείκτης διάθλασης και J ολοκλήρωμα φασματικής επικάλυψης. Η κβαντική απόδοση του πολυμερούς σύμφωνα με την βιβλιογραφία ισούται με 0.1,^[215] το κ^2 μπορούμε να το προσεγγίσουμε στο 0.667 και το n ισούται με 1.33 εφόσον μιλάμε για υδατικά διαλύματα. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον πίνακα.

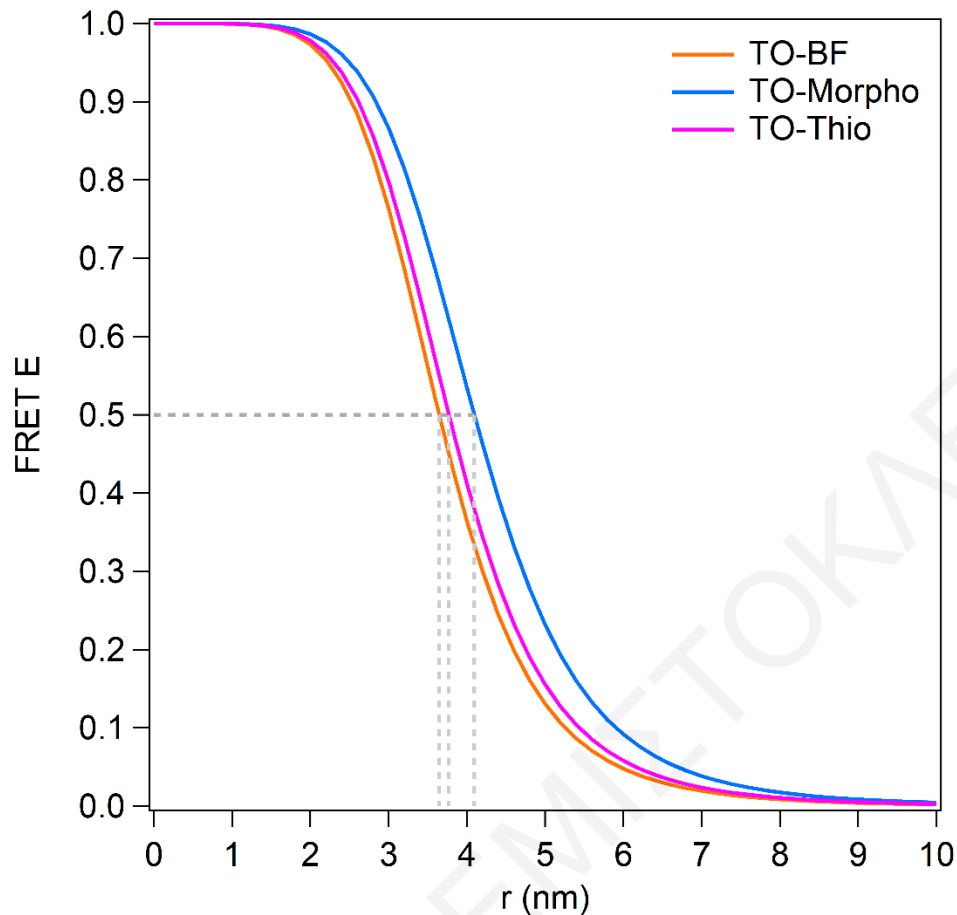
Πίνακας 6.1: Αποστάσεις Förster μικρών μορίων με το PDV.Li

Μικρό Μόριο	R_0 (Å)
TO-BF	36.46
TO-Morpho	40.95
TO-Thio	37.71

Γνωρίζοντας τώρα αυτή την απόσταση μπορούμε να συγκρίνουμε την απόδοση του φαινομένου FRET χρησιμοποιώντας την τροποποιημένη Εξίσωση 3.3.14:

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \quad \text{Εξίσωση 6.1.2}$$

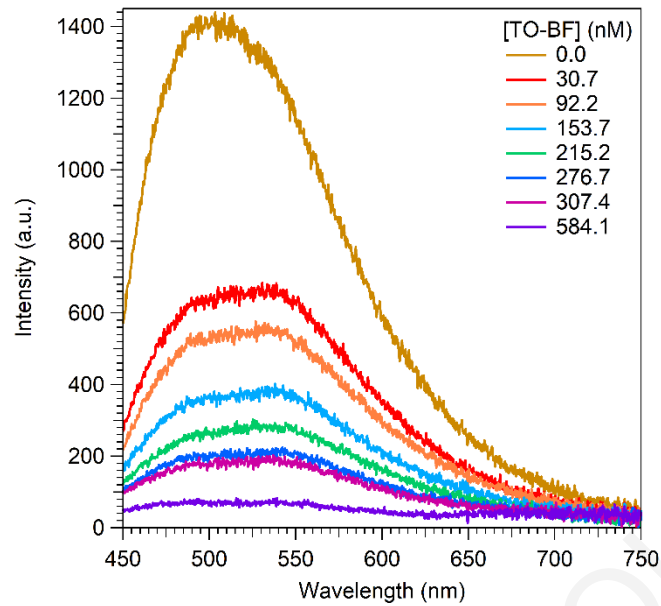
όπου E είναι η αποδοτικότητα του FRET και r είναι η απόσταση μεταξύ των διπόλων δότη και αποδέκτη. Δεδομένου ότι το FRET είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στην απόσταση μεταξύ των διπόλων δότη και δέκτη εντός του εύρους 1-10 nm μπορούμε να κατασκευάσουμε μια γραφική (Σχήμα 6.2), για να συγκρίνουμε τις αποδόσεις του ζεύγους πολυμερές – μικρό μόριο. Γενικά, καλύτερη απόδοση έχει το TO-Morpho που σε όλες τις αποστάσεις των διπόλων r η αποδοτικότητα είναι υψηλότερη από τα άλλα δύο μόρια, με το TO-BF να έχει τις χειρότερες αποδόσεις μεταξύ τους.



Σχήμα 6.2: Απόδοση φαινομένου FRET ως προς την απόσταση των διπόλων δότη και δέκτη. Με γκριζες γραμμές σημειώνονται οι τιμές R_0 των τριών μορίων.

6.2. Προσδιορισμός των Σταθερών Απόσβεσης Stern-Volmer

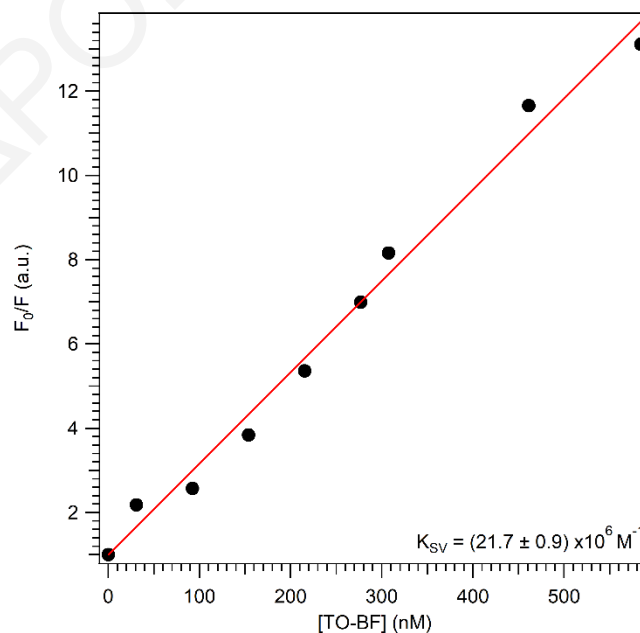
Στο Σχήμα 6.3 παρουσιάζεται το φάσμα φθορισμού διαλύματος του πολυμερούς PDV.Li πριν και μετά την προσθήκη ποσότητας διαλύματος της ένωσης TO-BF. Τα τελικά διαλύματα περιείχαν TO-BF σε συγκεντρώσεις μέχρι ~ 590 nM και PDV.Li σε σταθερή συγκέντρωση 16.5 nM. Τα διαλύματα τοποθετήθηκαν σε κυψελίδα χαλαζία πλάτους 1 cm. Με διέγερση του πολυμερούς στην περιοχή 380 – 410 nm (μέγιστη απορρόφηση) επιτυγχάνεται μέγιστη ένταση εκπεμπόμενου φωτός στην περιοχή 475 – 525 nm (Σχήμα 6.1 και Σχήμα Π- 29). Με αυτό το δεδομένο, η διέγερση θα πραγματοποιούνταν στο μέγιστο της απορρόφησης του πολυμερούς στα 400 nm, όμως, λόγω του υδατικού ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιείται παρατηρήθηκε το πρόβλημα του σκεδασμού Raman από το νερό και έτσι η διέγερση πραγματοποιήθηκε στα 370 nm, όπου η κορυφή αυτή μετατοπίζεται εκτός του εύρους μήκους κύματος της υπόλοιπης μελέτης.



Σχήμα 6.3: Τιτλοδότηση PDV.Li με TO-BF.

Με αύξηση της συγκέντρωσης της χρωστικής παρατηρείται σταθερή μείωση της έντασης φθορισμού της κορυφής του πολυμερούς κάτι που υποδεικνύει την αλληλεπίδραση των δύο μορίων και την μεταφορά ενέργειας μεταξύ τους. Αυτή η μεταφορά ενέργειας οφείλεται στο γεγονός ότι η ένωση απορροφά εκεί όπου φθορίζει το πολυμερές.

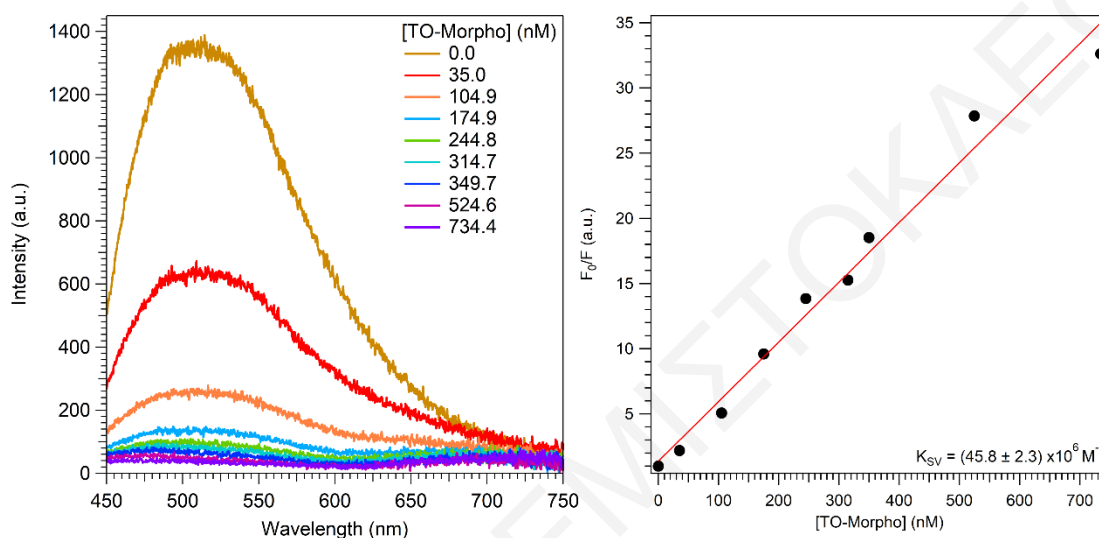
Η γραμμικότητα αυτής της μείωσης φαίνεται στην γραφική στο Σχήμα 6.4. Αυτή η γραμμικότητα οδηγεί στο συμπέρασμα της ύπαρξης κυρίως δυναμικής απόσβεσης όπως φαίνεται και στην Εξίσωση 3.3.7.



Σχήμα 6.4: Γραφική Stern-Volmer τιτλοδότησης PDV.Li με το TO-BF.

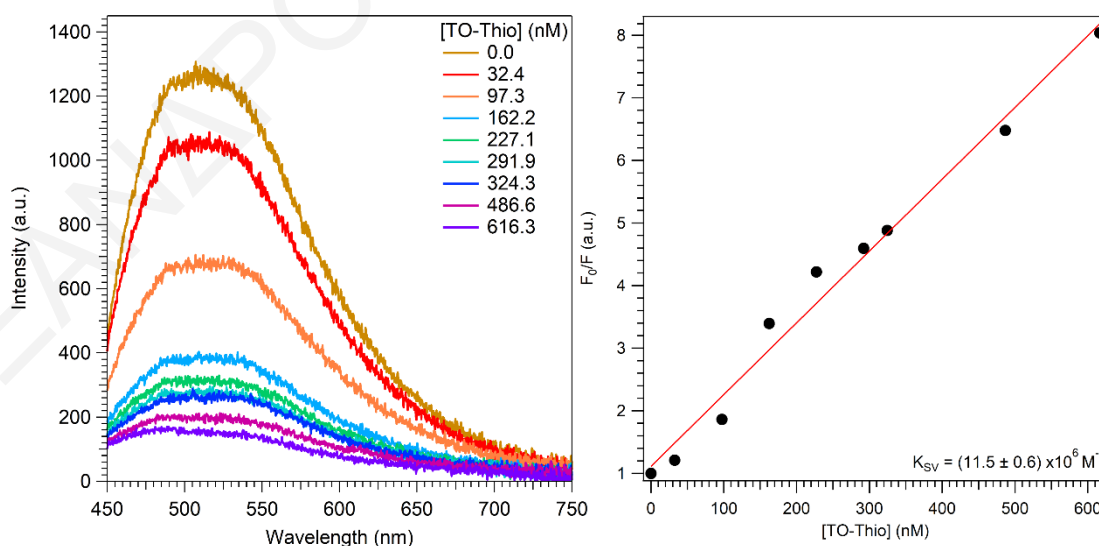
Χρήσει της εξίσωσης Stern-Volmer (Εξίσωση 3.3.7) μπορεί να υπολογιστεί η δυναμική σταθερά απόσβεσης, K_{sv} . Η κλίση της γραφικής στο Σχήμα 6.4 ισούται με αυτή την σταθερά και υπολογίστηκε ίση με $(21.7 \pm 0.9) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.

Με τον ίδιο τρόπο πραγματοποιήθηκαν και τιτλοδοτήσεις με τις ενώσεις TO-Morpho και TO-Thio. Τα φάσματα των τιτλοδοτήσεων και οι γραφικές Stern – Volmer φαίνονται στα παρακάτω σχήματα (Σχήμα 6.5 και Σχήμα 6.6).



Σχήμα 6.5: Τιτλοδότηση PDV.Li με TO-Morpho (αριστερά) και γραφική Stern-Volmer (δεξιά).

Σε αυτές τις περιπτώσεις, η σταθερά υπολογίστηκε να ισούται με $(45.8 \pm 2.3) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ και $(11.5 \pm 0.6) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ για το TO-Morpho και TO-Thio, αντίστοιχα.



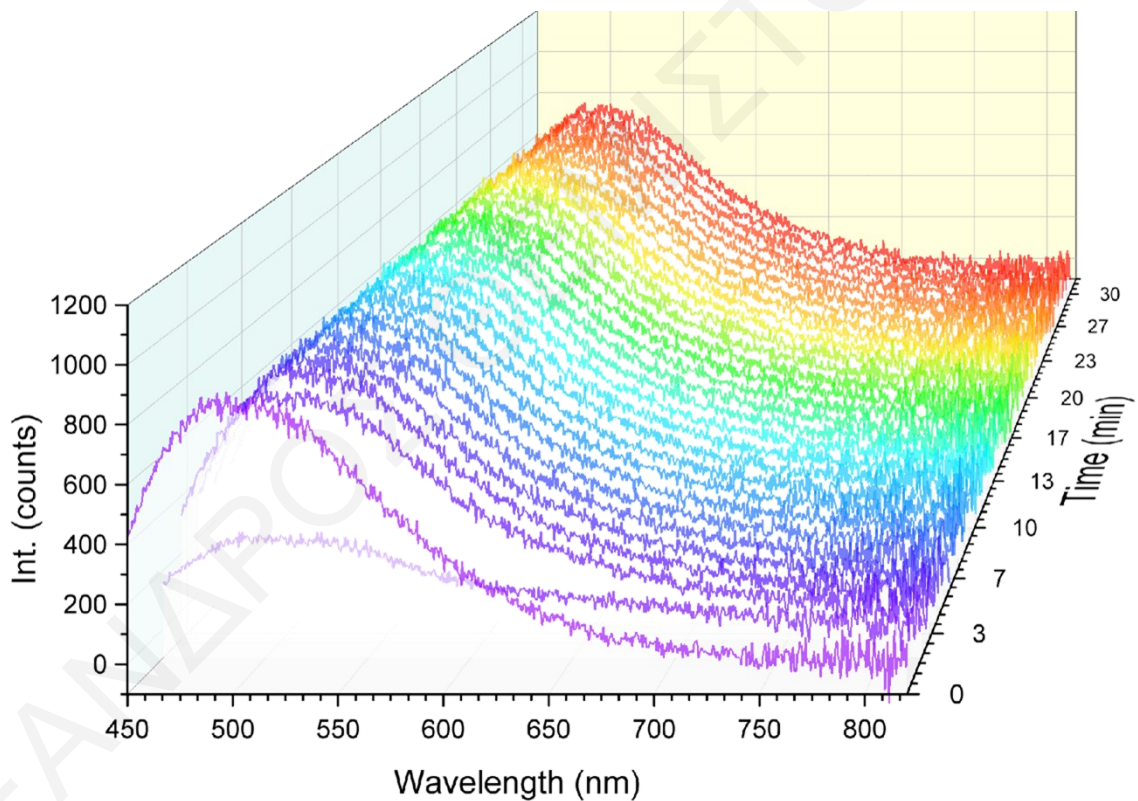
Σχήμα 6.6: Τιτλοδότηση PDV.Li με TO-Thio (αριστερά) και γραφική Stern-Volmer (δεξιά).

Οι διαφορές στις τιμές των σταθερών απόσβεσης μπορούν να δικαιολογηθούν εύκολα από τα ολοκληρώματα επικάλυψης του φάσματος εκπομπής του πολυμερούς με τα φάσματα

απορρόφησης των μικρών μορίων όπως φαίνεται στο Σχήμα 6.1, όπου μεγαλύτερη επικάλυψη με το φάσμα εκπομπής του πολυμερούς έχει το TO-Morpho με τα άλλα δύο μόρια να έχουν παρόμοια επικάλυψη. Οι τιμές αυτές των σταθερών απόσβεσης μπορούν να δικαιολογηθούν και από τις αποστάσεις Förster, όπου και πάλι το TO-Morpho έχει τη μεγαλύτερη τιμή με αποτέλεσμα την καλύτερη μεταφορά ενέργειας σε πιο μεγάλες αποστάσεις και ως εκ τούτου καλύτερη απόσβεση.

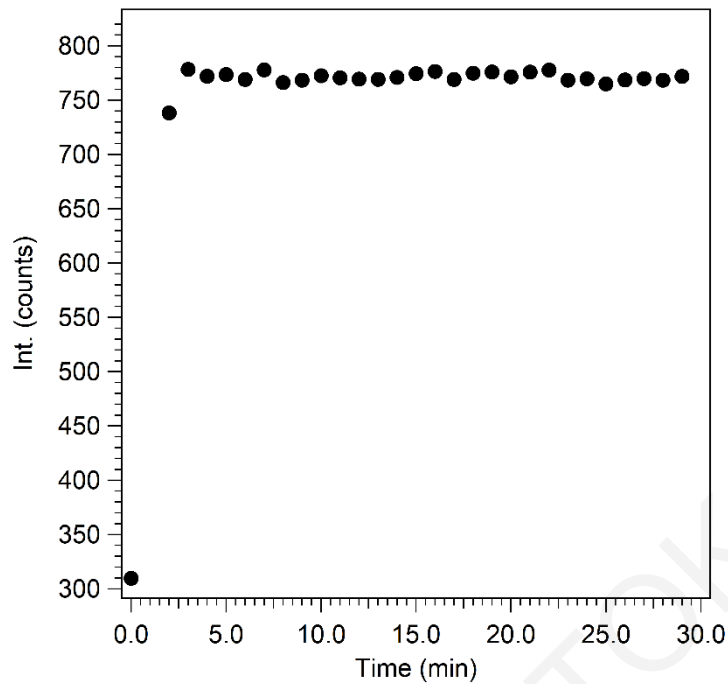
6.3. Έλεγχος Λειτουργίας Βιοαισθητήρα

Έχοντας ήδη προηγηθεί ο προσδιορισμός των συνθήκων εργασίας και ο χαρακτηρισμός της οπτικής συμπεριφορά των επιμέρους στοιχείων του βιοαισθητήρα, η επόμενη μελέτη αποτελεί τον συνδυασμό τους με σκοπό την επιβεβαίωση λειτουργίας και καθορισμό των προδιαγραφών λειτουργίας του.



Σχήμα 6.7: Χρονικό Φάσμα Φθορισμού Αλληλεπίδρασης Διαλύματος 49 nM TO-Morpho και 16.5 nM PDV.Li μετά την προσθήκη c-myc με διέγερση στα 370 nm. Η απόσταση μεταξύ των μετρήσεων ήταν 1 λεπτό.

Στο Σχήμα 6.7 παρουσιάζεται η χρονική αλλαγή ανά λεπτό στο φάσμα φθορισμού διαλύματος που περιείχε αρχικά μόνο πολυμερές και που στη συνέχεια προστέθηκε TO-Morpho, σε τελικές συγκεντρώσεις 16.5 nM και 49 nM, αντίστοιχα, με τελευταία την προσθήκη c-myc σε τελική συγκέντρωση 150 nM.

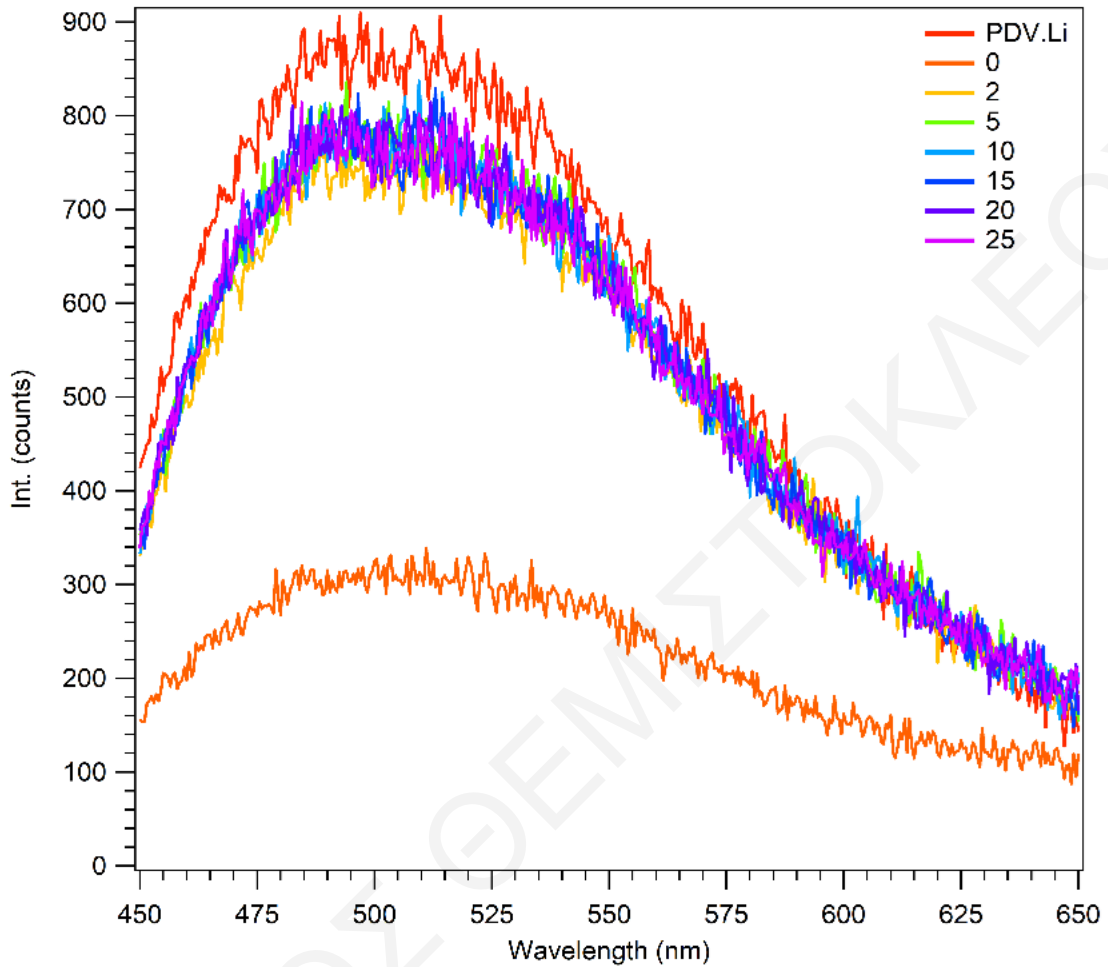


Σχήμα 6.8: Διατομή Φάσματος στην κορυφή του PDV.Li (475 nm). Δεδομένα από Σχήμα 6.7.

Στο Σχήμα 6.8 παρουσιάζεται η χρονική μεταβολή στην ένταση της κορυφής του PDV.Li στα 475 nm. Σε χρόνο 0 (μετά την προσθήκη του TO-Morpho), η αρχική ένταση φθορισμού του πολυμερούς ισούται με 309 counts (~35% της έντασης του φθορισμού διαλύματος μόνο πολυμερούς σε αυτή τη συγκέντρωση), λόγω της απόσβεσης του φθορισμού από την παρουσία του μικρού μορίου στο διάλυμα. Με την προσθήκη του ολιγονουκλεοτιδίου παρατηρείται αύξηση της έντασης εφόσον η χρωστική δεσμεύεται από το ολιγονουκλεοτίδιο απομακρύνοντας την από το πολυμερές με αποτέλεσμα να καθίσταται αδύνατη η μεταφορά ενέργειας μεταξύ των δύο. Ο χρόνος που χρειάζεται για να δεσμευτεί ισχυρά η χρωστική βρίσκεται στο εύρος 4-5 λεπτών κάτι που επιβεβαιώνεται και σε αυτό το πείραμα αφού για να σταθεροποιηθεί η ένταση του πολυμερούς χρειάζονται περίπου 10 λεπτά. Όμως, η ανίχνευση μπορεί να γίνει επιτυχώς και στα πρώτα 5 λεπτά, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 6.9 όπου ήδη ο φθορισμός από το πολυμερές αυξάνεται στα ~90% της αρχικής έντασης.

Στο Σχήμα 6.9 εμφανίζονται το φάσμα φθορισμού του αρχικού διαλύματος, φάσματα φθορισμού σε διάφορες χρονικές στιγμές μετά την προσθήκη του ολιγονουκλεοτιδίου, όπως επίσης και το φάσμα φθορισμού διαλύματος του πολυμερούς συγκέντρωσης 16.5 nM. Με την δέσμευση του μικρού μορίου από το DNA δεν παρατηρείται η παρουσία φθορισμού από το μικρό μόριο, εφόσον το μικρό μόριο βρίσκεται σε πολύ μικρή συγκέντρωση. Η διαφορά που παρατηρείται από τα πρώτα μόλις λεπτά είναι αρκετή για να γίνει ξεκάθαρος διαχωρισμός της «off» και «on» κατάστασης. Η διάκριση των δύο αυτών καταστάσεων του μοριακού διακόπτη σταθεροποιείται σε χρόνους 10 λεπτών και άνω από την στιγμή που

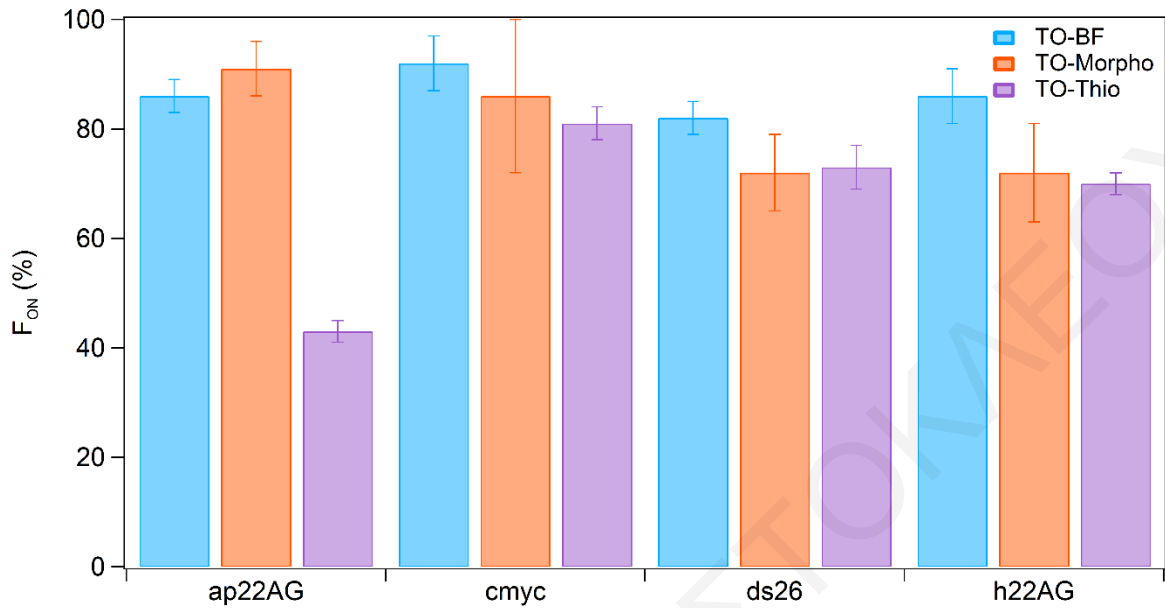
προστίθεται ο βιολογικός αναλύτης – χημικός στόχος, το ολιγονουκλεοτίδιο, στο διάλυμα του μορφοτροπέα, δηλαδή διάλυμα που περιέχει το πολυμερές και το μικρό μόριο.



Σχήμα 6.9: Χρονικό Φάσμα Φθορισμού Αλληλεπίδρασης Διαλύματος 49 nM TO-Morpho και 16.5 nM PDV.Li μετά την προσθήκη 1.5 μM c-myc και σύγκριση με φάσμα εκπομπής διαλύματος μόνο πολυμερούς στην ίδια συγκέντρωση.

Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρούνται και στην περίπτωση των υπόλοιπων μικρών μορίων με τα διάφορα μοντέλα DNA (όλα τα χρονικά φάσματα βρίσκονται στο Παράρτημα - Χρονικά Φάσματα Βιοαισθητήρα). Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 6.10 το σύστημα πολυμερούς – μικρό μόριο φαίνεται να μπορεί με πολύ μικρές ποσότητες και συγκεντρώσεις (σε 600 μL διαλύματος 1.5 μM DNA χρειάζονται 13.5 μL διαλύματος του βιοαισθητήρα 16.5 nM πολυμερούς & 49 nM μικρού μορίου) να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση τετραπλών ελίκων με σχετικά μεγαλύτερη απόκριση των μικρών μορίων (ποσοστό επιστροφής της έντασης του φθορισμού του πολυμερούς) στην παράλληλη τετραπλή έλικα του προαγωγέα c-myc. Σημαντικό να τονιστεί ότι σε όλες τις περιπτώσεις το TO-Morpho έχει παρόμοια η μεγαλύτερη απόκριση από το TO-BF κάτι που δεν αναμένεται εφόσον το

ΤΟ-BF έχει καλύτερη δέσμευση (κάτι που μπορεί να σχετίζεται με το πόσο εισχωρούν τα μικρά μόρια στο εσωτερικό του DNA παρά το πόσο ισχυρά δεσμεύονται).



Σχήμα 6.10: Το ποσοστό επιστροφής της έντασης φθορισμού του πολυμερούς μετά την προσθήκη του μοντέλου DNA.

Όπως είχαμε δει και στην παραπάνω ενότητα τα μικρά μόρια έχουν αρκετά μεγάλη ενίσχυση της έντασης του φθορισμού τους κατά την πρόσδεση με τα νουκλεϊκά οξέα. Όμως, εδώ τα μικρά μόρια βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις σε σχέση με τις τιτλοδοτήσεις για να μπορούν να παράγουν αρκετά ισχυρό σήμα για ανίχνευση. Έτσι, στο τέλος της ημέρας καταφέραμε να δημιουργήσουμε έναν απλό και γρήγορο μοριακό διακόπτη, ο οποίος εκμεταλλεύεται την καλή αλληλεπίδραση και όχι κατά ανάγκη την καλύτερη πρόσδεση των μικρών μορίων με τις τετραπλές έλικες νουκλεϊκών οξέων, αφού όλη η ιδέα είναι η απομάκρυνση των μικρών μορίων από το διάλυμα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Από την ανακάλυψη των δομών G4 που σχηματίζονται από ανθρώπινα τελομερικά ολιγονουκλεοτίδια σε διάλυμα,^[49] έχει βρεθεί ότι αυτή η δομή του DNA συνδέεται με ποικίλες βιολογικές διεργασίες, όπως η ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων,^[112] η διαμεσολάβηση για την ωρίμανση του mRNA,^[132,133] η διατήρηση της σταθερότητας του γονιδιώματος^[91] και η παρέμβαση στη διατήρηση του τελομερούς (Ενότητα 2.2). Επιπλέον, έρευνες βιοπληροφορικής έχουν δείξει ότι αυτές οι αλληλουχίες που σχηματίζουν G4 είναι ιδιαίτερα εμπλουτισμένες στην περιοχή των τελομερών των ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων και εντός των περιοχών υποκινητή και 5'UTR των ανθρώπινων γονιδίων,^[68,69] ιδίως εκείνων που εμπλέκονται στη διατήρηση της αθανασίας των καρκινικών κυττάρων.^[144] Έτσι, ο σχετιζόμενος με τον καρκίνο εμπλουτισμός και οι χαρακτηριστικές δομές των G4 ενέπνευσαν το ερευνητικό ενδιαφέρον για τη χρήση του G4 DNA ως νέων θεραπευτικών στόχων στη θεραπεία του καρκίνου, για παράδειγμα, την επιλεκτική αναστολή της μεταγραφής ενός συγκεκριμένου ογκογονιδίου με τη χρήση σχεδιασμένων μικρών μορίων για τη σταθεροποίηση ενός συγκεκριμένου G4. Παρόλο που υπάρχουν ορισμένα επιτυχημένα παραδείγματα σχεδιασμού προσδέτων που δεσμεύουν G4 για τη στόχευση ενός συγκεκριμένου G4 *in vitro* και *in vivo*,^[216-219] η ειδική διάκριση και στόχευση των G4 μέσω μικρών συνθετικών προσδέτων που δεσμεύουν G4 παραμένει προς το παρόν πολύ δύσκολη λόγω διαφόρων εγγενών εμποδίων όπως αυτών που αναφέρονται στην Ενότητα 2.4. Φαίνεται αναπόφευκτο ότι όταν εφαρμόζονται *in vivo*, οι προσδέτες που δεσμεύουν G4 θα αλληλεπιδρούν με πολλαπλά G4 εκτός από τους αρχικούς, ειδικούς στόχους τους.

Στο Κεφάλαιο 5, επινοήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν 3 νέοι οπτικοί ανίχνευτές (TO-BF, TO-Morpho[‡] και TO-Thio) με βάση τον πυρήνα της χρωστικής πορτοκαλί της θειαζόλης. Μέσω της ενσωμάτωσης πλευρικών αλυσίδων που περιείχαν ομάδες που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αλληλεπιδρούν καλύτερα με τις δομές G4, οι ενώσεις επέδειξαν μερική ικανότητα διάκρισης μεταξύ διαφορετικών τοπολογιών νουκλεϊκών οξέων σύμφωνα με τις σταθερές πρόσδεσης τους, όμως λόγω του ότι η ανίχνευση έχει να κάνει με την παρατήρηση

[‡] Το TO-Morpho είχε συντεθεί και δημοσιευτεί κατά την διάρκεια της εκπόνησης αυτής της διατριβής.^[223]

(ένταση φθορισμού), όλα τα μόρια παρουσιάζουν ισχυρή απόκριση για την αντιπαράλληλη αλληλουχία σε σχέση με όλες τις άλλες δομές. Δεδομένου ότι η συγγένεια πρόσδεσής τους για τα G4 είναι συγκρίσιμη με άλλους σταθεροποιητικούς προσδέτες G4, τα αποτελέσματα αυτά είναι πολλά υποσχόμενα για το πεδίο στο σύνολό του. Σε αυτό το σημείο καλό είναι να τονιστεί ότι οι περισσότερες μελέτες διερεύνησης των αλληλεπιδράσεων G4-προσδέτων G4 χρησιμοποιούν κυρίως τις φασματοσκοπικές τεχνικές UV-Vis, φθορισμού και κυκλικού διχρωϊσμού με την διεξαγωγή τιτλοδοτήσεων. Σπανιότερα γίνεται και χρήση των φασματοσκοπιών NMR και sXRD, όπου όμως απαιτούνται μεγάλες ποσότητες καθαρών δειγμάτων σε διάλυμα και λεπτούς κρυστάλλους, αντίστοιχα, πριν από τον δομικό προσδιορισμό. Στο πλαίσιο αυτό, η φασματοσκοπία (συντονισμού) Raman που χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα διατριβή λύνει αρκετούς από αυτούς τους περιορισμούς. Σε πολύ μικρότερο βαθμό χρησιμοποιούνται και υπολογιστικές μέθοδοι που εδώ μας έδωσαν σημαντικές πληροφορίες για τον τρόπο πρόσδεσης και αλληλεπίδρασης των μικρών μορίων με τα μοντέλα DNA, αλλά επίσης μας βοήθησαν στην κατανόηση και επιβεβαίωση των πειραματικών αποτελεσμάτων.

Περαιτέρω μελέτες με τη χρήση της φασματοσκοπίας Raman Συντονισμού με διέγερση στα 266 nm, θα δώσουν μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα της αλληλεπίδρασης αυτών των μορίων με τις δομές DNA, εφόσον θα μπορούν να μελετηθούν τα σύμπλοκα από πλευράς των νουκλεϊκών οξέων. Ακόμη, χρειάζεται να πραγματοποιηθούν επαναλήψεις των πειραμάτων Raman στα 405 nm για τα άλλα δύο μόρια και υπολογισμοί DFT για τη συσχέτιση των αλλαγών που παρατηρούμε και για τα δύο αυτά μόρια, όπως είχε γίνει και για την περίπτωση του TO-Thio κατά την εκπόνηση αυτής της διατριβής. Προσπάθειες για λήψη καθαρών κρυστάλλων, τόσο των μικρών μορίων όσο και των συμπλόκων τους με τα διάφορα DNA, και μετέπειτα χαρακτηρισμός τους με κρυσταλλογραφία ακτινών X θα επιτρέψει την επιβεβαίωση των θεωρητικών δομών, αλλά και την εξαγωγή συμπερασμάτων για τις αλληλεπιδράσεις των μορίων μεταξύ τους αλλά και με τα DNA. Επιπρόσθετα, μελέτες θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry, ITC) μπορούν να επιβεβαιώσουν τις τιμές των σταθερών δέσμευσης από μια θερμοδυναμική οπτική των αλληλεπιδράσεων, ενώ μια απλή μελέτη θερμικής τήξης (Thermal Melting Study, TMS) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να καταδειχθεί η σταθεροποίηση μιας δεδομένης δομής G4 από τα μικρά μόρια. Τέλος, μελέτες *in vivo* σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα μπορούν να αποδώσουν πληροφορίες για την κυτταροτοξικότητα, αλλά και για την ευκολία διείσδυσης και ανίχνευσης στο εσωτερικό των κυττάρων.

Στο Κεφάλαιο 6, αναπτύχθηκε ένας μοριακός διακόπτης για ανίχνευση των τετραπλών ελίκων σε διάλυμα με χρήση ενός διαλύματος ανιονικού πολυμερούς με τα μικρά μόρια. Αν και η απόκριση φθορισμού των μικρών μορίων με την πρόσδεση στα νουκλεϊκά οξέα είναι μεγάλη, δεν είναι αρκετή για να χρησιμοποιηθεί με πολύ μικρές συγκεντρώσεις των μικρών μορίων. Έτσι, με τη χρήση του πολυμερούς μπορεί να επιτευχθούν δύο καταστάσεις on/off με διαφορά στην ένταση φθορισμού αναλόγως της παρουσίας ή όχι του βιοδείκτη στο διάλυμα. Περαιτέρω μελέτες για την εξακρίβωση των ορίων ανίχνευσης του βιοαισθητήρα πρέπει να πραγματοποιηθούν. Ενδιαφέρον θα είναι να διεκπεραιωθούν, επίσης, μελέτες με χρήση κύτταρων για να μπορεί να διαπιστωθεί αν ο μοριακός διακόπτης μπορεί να λειτουργήσει υπό το συνωστισμένο περιβάλλον τους. Η διερεύνηση ενός εναλλακτικού πολυμερούς με ανάλογα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά για την ενίσχυση της ευαισθησίας του βιοαισθητήρα χρήζει επιστημονικής σκέψης.

Σε γενικές γραμμές, οι μελέτες αυτές δείχνουν ότι μικρά μόρια μπορούν να αλληλοεπιδράσουν με τετραπλές έλικες γουανίνης. Ωστόσο, το κατά πόσον η ισχύς αυτών των αλληλεπιδράσεων είναι επαρκής για τη αναγνώριση τέτοιων δομών σε κύτταρα με τον απώτερο στόχο τη ανίχνευση τους ή για τη δημιουργία θεραπευτικού αποτελέσματος παραμένει ανοικτό ερώτημα. Για το σκοπό αυτό, πρέπει να γίνουν μελέτες σε διάφορες σειρές από φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα και να δοκιμαστούν έναντι ενός ακόμη ευρύτερου φάσματος προσδετών G4. Μια προσέγγιση μεγάλης κλίμακας φαίνεται πιθανό να δώσει τις περισσότερες απαντήσεις. Παρ' όλα αυτά, ο τομέας των τετραπλών ελίκων γουανίνης φαίνεται να εισέρχεται στην πιο συναρπαστική φάση των μελετών.

V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Zhou, G.; Liu, X.; Li, Y.; Xu, S.; Ma, C.; Wu, X.; Cheng, Y.; Yu, Z.; Zhao, G.; Chen, Y. Telomere Targeting with a Novel G-Quadruplex-Interactive Ligand BRACO-19 Induces T-Loop Disassembly and Telomerase Displacement in Human Glioblastoma Cells. *Oncotarget* **2016**, *7* (12), 14925–14939.
- [2] Han, F. X.; Wheelhouse, R. T.; Hurley, L. H. Interactions of TMPyP4 and TMPyP2 with Quadruplex DNA. Structural Basis for the Differential Effects on Telomerase Inhibition. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (15), 3561–3570.
- [3] Watson, J. D.; Crick, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **1953**, *171* (4356), 737–738.
- [4] Drew, H. R.; Wing, R. M.; Takano, T.; Broka, C.; Tanaka, S.; Itakura, K.; Dickerson, R. E. Structure of a B-DNA Dodecamer: Conformation and Dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1981**, *78* (4), 2179–2183.
- [5] Staple, D. W.; Butcher, S. E. Pseudoknots: RNA Structures with Diverse Functions. *PLoS Biol.* **2005**, *3* (6), e213.
- [6] SHI, H.; MOORE, P. B. The Crystal Structure of Yeast Phenylalanine TRNA at 1.93 Å Resolution: A Classic Structure Revisited. *RNA* **2000**, *6* (8), S1355838200000364.
- [7] Berg, J. Tymoczko, J. L. Stryer, L. Chapter 27.1. In *Biochemistry*; 2002.
- [8] Vargason, J. M.; Henderson, K.; Ho, P. S. A Crystallographic Map of the Transition from B-DNA to A-DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98* (13), 7265–7270.
- [9] Dickerson, R. E.; Ng, H.-L. DNA Structure from A to B. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98* (13), 6986–6988.
- [10] Feig, M.; Pettitt, B. M. A Molecular Simulation Picture of DNA Hydration around A- and B-DNA. *Biopolymers* **1998**, *48* (4), 199.
- [11] Flatters, D.; Young, M.; Beveridge, D. L.; Lavery, R. Conformational Properties of the TATA-Box Binding Sequence of DNA. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1997**, *14* (6), 757–765.
- [12] Guzikevich-Guerstein, G.; Shakked, Z. A Novel Form of the DNA Double Helix Imposed on the TATA-Box by the TATA-Binding Protein. *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3* (1), 32–37.
- [13] Schwartz, T.; Rould, M. A.; Lowenhaupt, K.; Herbert, A.; Rich, A. Crystal Structure of the $Z\alpha$ Domain of the Human Editing Enzyme ADAR1 Bound to Left-Handed Z-DNA. *Science* (80-.). **1999**, *284* (5421), 1841–1845.
- [14] Ha, S. C.; Lowenhaupt, K.; Rich, A.; Kim, Y.-G.; Kim, K. K. Crystal Structure of a Junction between B-DNA and Z-DNA Reveals Two Extruded Bases. *Nature* **2005**, *437* (7062), 1183–1186.

- [15] Left-Handed Z-DNA: Structure and Function.
- [16] Gao, Y.; Robinson, H.; Wang, A. H. -J. High-resolution A-DNA Crystal Structures of d(AGGGGCCCT). *Eur. J. Biochem.* **1999**, *261* (2), 413–420.
- [17] Luo, Z.; Dauter, M.; Dauter, Z. Phosphates in the Z-DNA Dodecamer Are Flexible, but Their P-SAD Signal Is Sufficient for Structure Solution. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2014**, *70* (7), 1790–1800.
- [18] Gowers, D. Towards Mixed Sequence Recognition by Triple Helix Formation. *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27* (7), 1569–1577.
- [19] James, P. L.; Brown, T.; Fox, K. R. Thermodynamic and Kinetic Stability of Intermolecular Triple Helices Containing Different Proportions of C⁺·GC and T·AT Triplets. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31* (19), 5598–5606.
- [20] Asensio, J. L.; Lane, A. N.; Dhesi, J.; Bergqvist, S.; Brown, T. The Contribution of Cytosine Protonation to the Stability of Parallel DNA Triple Helices 1 Edited by D. E. Draper. *J. Mol. Biol.* **1998**, *275* (5), 811–822.
- [21] Qiao, F.; Cech, T. R. Triple-Helix Structure in Telomerase RNA Contributes to Catalysis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15* (6), 634–640.
- [22] Su, L.; Chen, L.; Egli, M.; Berger, J. M.; Rich, A. Minor Groove RNA Triplex in the Crystal Structure of a Ribosomal Frameshifting Viral Pseudoknot. *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6* (3), 285–292.
- [23] Tarköy, M.; Phipps, A. K.; Schultze, P.; Feigon, J. Solution Structure of an Intramolecular DNA Triplex Linked by Hexakis(Ethylene Glycol) Units: D(AGAGAGAA-(EG)₆-TTCTCTCT-(EG)₆-TCTCTCTT). *Biochemistry* **1998**, *37* (17), 5810–5819.
- [24] Lacroix, L.; Mergny, J.-L.; Leroy, J.-L.; Hélène, C. Inability of RNA To Form the I-Motif: Implications for Triplex Formation. *Biochemistry* **1996**, *35* (26), 8715–8722.
- [25] Robidoux, S.; Damha, M. J. D-2-Deoxyribose and D-Arabinose, but Not D-Ribose, Stabilize the Cytosine Tetrad (i-DNA) Structure. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1997**, *15* (3), 529–535.
- [26] Day, H. A.; Pavlou, P.; Waller, Z. A. E. I-Motif DNA: Structure, Stability and Targeting with Ligands. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22* (16), 4407–4418.
- [27] Han, X.; Leroy, J.-L.; Guéron, M. An Intramolecular I-Motif: The Solution Structure and Base-Pair Opening Kinetics of d(5mCCT 3 CCT 3 ACCT 3 CC) 1 Edited by I. Tinoco. *J. Mol. Biol.* **1998**, *278* (5), 949–965.
- [28] Rich, A.; Zhang, S. Z-DNA: The Long Road to Biological Function. *Nat. Rev. Genet.* **2003**, *4* (7), 566–572.
- [29] Jain, A.; Wang, G.; Vasquez, K. M. DNA Triple Helices: Biological Consequences and Therapeutic Potential. *Biochimie* **2008**, *90* (8), 1117–1130.
- [30] Buske, F. A.; Mattick, J. S.; Bailey, T. L. Potential in Vivo Roles of Nucleic Acid Triple-Helices. *RNA Biol.* **2011**, *8* (3), 427–439.
- [31] Sun, D.; Hurley, L. H. The Importance of Negative Superhelicity in Inducing the Formation of G-Quadruplex and i-Motif Structures in the c-myc Promoter: Implications for Drug Targeting and Control of Gene Expression. *J. Med. Chem.*

- 2009, 52 (9), 2863–2874.
- [32] Miyoshi, D.; Matsumura, S.; Nakano, S.; Sugimoto, N. Duplex Dissociation of Telomere DNAs Induced by Molecular Crowding. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126 (1), 165–169.
- [33] Gellert, M.; Lipsett, M. N.; Davies, D. R. HELIX FORMATION BY GUANYLIC ACID. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1962**, 48 (12), 2013–2018.
- [34] Ambrus, A.; Chen, D.; Dai, J.; Jones, R. A.; Yang, D. Solution Structure of the Biologically Relevant G-Quadruplex Element in the Human c-myc Promoter. Implications for G-Quadruplex Stabilization. *Biochemistry* **2005**, 44 (6), 2048–2058.
- [35] Risitano, A. Influence of Loop Size on the Stability of Intramolecular DNA Quadruplexes. *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32 (8), 2598–2606.
- [36] Hud, N. V.; Plavec, J. The Role of Cations in Determining Quadruplex Structure and Stability. In *Quadruplex Nucleic Acids*; Neidle, S., Balasubramanian, S., Eds.; The Royal Society of Chemistry, 2006; pp 100–130.
- [37] Webba da Silva, M. Geometric Formalism for DNA Quadruplex Folding. *Chem. – A Eur. J.* **2007**, 13 (35), 9738–9745.
- [38] Burge, S.; Parkinson, G. N.; Hazel, P.; Todd, A. K.; Neidle, S. Quadruplex DNA: Sequence, Topology and Structure. *Nucleic Acids Res.* **2006**, 34 (19), 5402–5415.
- [39] Esposito, V.; Galeone, A.; Mayol, L.; Oliviero, G.; Virgilio, A.; Randazzo, L. A Topological Classification of G-Quadruplex Structures. *Nucleosides. Nucleotides Nucleic Acids* **2007**, 26 (8–9), 1155–1159.
- [40] Parkinson, G. N.; Lee, M. P. H. H.; Neidle, S. Crystal Structure of Parallel Quadruplexes from Human Telomeric DNA. *Nature* **2002**, 417 (6891), 876–880.
- [41] Phan, A. T.; Kuryavyi, V.; Luu, K. N.; Patel, D. J. Structure of Two Intramolecular G-Quadruplexes Formed by Natural Human Telomere Sequences in K⁺ Solution †. *Nucleic Acids Res.* **2007**, 35 (19), 6517–6525.
- [42] Lim, K. W.; Amrane, S.; Bouaziz, S.; Xu, W.; Mu, Y.; Patel, D. J.; Luu, K. N.; Phan, A. T. Structure of the Human Telomere in K⁺ Solution: A Stable Basket-Type G-Quadruplex with Only Two G-Tetrad Layers. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131 (12), 4301–4309.
- [43] Wang, Y.; Patel, D. J. Solution Structure of the Human Telomeric Repeat d[AG3(T2AG3)3] G-Tetraplex. *Structure* **1993**, 1 (4), 263–282.
- [44] Lim, K. W.; Ng, V. C. M.; Martín-Pintado, N.; Heddi, B.; Phan, A. T. Structure of the Human Telomere in Na⁺ Solution: An Antiparallel (2+2) G-Quadruplex Scaffold Reveals Additional Diversity. *Nucleic Acids Res.* **2013**, 41 (22), 10556–10562.
- [45] Hazel, P.; Huppert, J.; Balasubramanian, S.; Neidle, S. Loop-Length-Dependent Folding of G-Quadruplexes. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126 (50), 16405–16415.
- [46] Lane, A. N.; Chaires, J. B.; Gray, R. D.; Trent, J. O. Stability and Kinetics of G-Quadruplex Structures. *Nucleic Acids Res.* **2008**, 36 (17), 5482–5515.
- [53] Zhang, A. Y. Q.; Balasubramanian, S. The Kinetics and Folding Pathways of Intramolecular G-Quadruplex Nucleic Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134 (46), 19297–19308.

- [54] Mashimo, T.; Yagi, H.; Sannohe, Y.; Rajendran, A.; Sugiyama, H. Folding Pathways of Human Telomeric Type-1 and Type-2 G-Quadruplex Structures. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (42), 14910–14918.
- [55] Xue, Y.; Liu, J.; Zheng, K.; Kan, Z.; Hao, Y.; Tan, Z. Kinetic and Thermodynamic Control of G-Quadruplex Folding. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2011**, *50* (35), 8046–8050.
- [56] Gray, R. D.; Trent, J. O.; Chaires, J. B. Folding and Unfolding Pathways of the Human Telomeric G-Quadruplex. *J. Mol. Biol.* **2014**, *426* (8), 1629–1650.
- [57] Miller, M. C.; Buscaglia, R.; Chaires, J. B.; Lane, A. N.; Trent, J. O. Hydration Is a Major Determinant of the G-Quadruplex Stability and Conformation of the Human Telomere 3' Sequence of d(AG₃(TTAG₃)₃). *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (48), 17105–17107.
- [58] Heddi, B.; Phan, A. T. Structure of Human Telomeric DNA in Crowded Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (25), 9824–9833.
- [59] Buscaglia, R.; Miller, M. C.; Dean, W. L.; Gray, R. D.; Lane, A. N.; Trent, J. O.; Chaires, J. B. Polyethylene Glycol Binding Alters Human Telomere G-Quadruplex Structure by Conformational Selection. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41* (16), 7934–7946.
- [60] Petraccone, L.; Pagano, B.; Giancola, C. Studying the Effect of Crowding and Dehydration on DNA G-Quadruplexes. *Methods* **2012**, *57* (1), 76–83.
- [61] Collie, G. W.; Parkinson, G. N. The Application of DNA and RNA G-Quadruplexes to Therapeutic Medicines. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (12), 5867.
- [62] Guédin, A.; Gros, J.; Alberti, P.; Mergny, J.-L. How Long Is Too Long? Effects of Loop Size on G-Quadruplex Stability. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38* (21), 7858–7868.
- [63] Bugaut, A.; Balasubramanian, S. A Sequence-Independent Study of the Influence of Short Loop Lengths on the Stability and Topology of Intramolecular DNA G-Quadruplexes. *Biochemistry* **2008**, *47* (2), 689–697.
- [64] Huppert, J. L. Prevalence of Quadruplexes in the Human Genome. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33* (9), 2908–2916.
- [65] Todd, A. K. Highly Prevalent Putative Quadruplex Sequence Motifs in Human DNA. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33* (9), 2901–2907.
- [66] Qin, Y.; Rezler, E. M.; Gokhale, V.; Sun, D.; Hurley, L. H. Characterization of the G-Quadruplexes in the Duplex Nuclease Hypersensitive Element of the PDGF-A Promoter and Modulation of PDGF-A Promoter Activity by TMPyP4. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35* (22), 7698–7713.
- [67] Phan, A. T.; Kuryavyi, V.; Burge, S.; Neidle, S.; Patel, D. J. Structure of an Unprecedented G-Quadruplex Scaffold in the Human c-Kit Promoter. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (14), 4386–4392.
- [68] Huppert, J. L.; Balasubramanian, S. G-Quadruplexes in Promoters throughout the Human Genome. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35* (2), 406–413.
- [69] Huppert, J. L.; Bugaut, A.; Kumari, S.; Balasubramanian, S. G-Quadruplexes: The Beginning and End of UTRs. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36* (19), 6260–6268.
- [70] Artandi, S. E.; DePinho, R. A. Telomeres and Telomerase in Cancer. *Carcinogenesis* **2010**, *31* (1), 9–18.

- [71] O'Sullivan, R. J.; Karlseder, J. Telomeres: Protecting Chromosomes against Genome Instability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11* (3), 171–181.
- [72] de Lange, T. Shelterin: The Protein Complex That Shapes and Safeguards Human Telomeres. *Genes Dev.* **2005**, *19* (18), 2100–2110.
- [73] Griffith, J. D.; Comeau, L.; Rosenfield, S.; Stansel, R. M.; Bianchi, A.; Moss, H.; de Lange, T. Mammalian Telomeres End in a Large Duplex Loop. *Cell* **1999**, *97* (4), 503–514.
- [74] Shay, J. W.; Bacchetti, S. A Survey of Telomerase Activity in Human Cancer. *Eur. J. Cancer* **1997**, *33* (5), 787–791.
- [75] Zahler, A. M.; Williamson, J. R.; Cech, T. R.; Prescott, D. M. Inhibition of Telomerase by G-Quartet DMA Structures. *Nature* **1991**, *350* (6320), 718–720.
- [76] Zaug, A. J.; Podell, E. R.; Cech, T. R. Human POT1 Disrupts Telomeric G-Quadruplexes Allowing Telomerase Extension in Vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102* (31), 10864–10869.
- [77] Reed, J.; Gunaratnam, M.; Beltran, M.; Reszka, A. P.; Vilar, R.; Neidle, S. TRAP-LIG, a Modified Telomere Repeat Amplification Protocol Assay to Quantitate Telomerase Inhibition by Small Molecules. *Anal. Biochem.* **2008**, *380* (1), 99–105.
- [78] Neidle, S. Human Telomeric G-quadruplex: The Current Status of Telomeric G-quadruplexes as Therapeutic Targets in Human Cancer. *FEBS J.* **2010**, *277* (5), 1118–1125.
- [79] Gunaratnam, M.; Greciano, O.; Martins, C.; Reszka, A. P.; Schultes, C. M.; Morjani, H.; Riou, J.-F.; Neidle, S. Mechanism of Acridine-Based Telomerase Inhibition and Telomere Shortening. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, *74* (5), 679–689.
- [80] Salvati, E.; Leonetti, C.; Rizzo, A.; Scarsella, M.; Mottolese, M.; Galati, R.; Sperduti, I.; Stevens, M. F. G.; D'Incalci, M.; Blasco, M.; Chiorino, G.; Bauwens, S.; Horard, B.; Gilson, E.; Stoppacciaro, A.; Zupi, G.; Biroccio, A. Telomere Damage Induced by the G-Quadruplex Ligand RHPS4 Has an Antitumor Effect. *J. Clin. Invest.* **2007**, *117* (11), 3236–3247.
- [81] Phatak, P.; Cookson, J. C.; Dai, F.; Smith, V.; Gartenhaus, R. B.; Stevens, M. F. G.; Burger, A. M. Telomere Uncapping by the G-Quadruplex Ligand RHPS4 Inhibits Clonogenic Tumour Cell Growth in Vitro and in Vivo Consistent with a Cancer Stem Cell Targeting Mechanism. *Br. J. Cancer* **2007**, *96* (8), 1223–1233.
- [82] Müller, S.; Sanders, D. A.; Di Antonio, M.; Matsis, S.; Riou, J.-F.; Rodriguez, R.; Balasubramanian, S. Pyridostatin Analogues Promote Telomere Dysfunction and Long-Term Growth Inhibition in Human Cancer Cells. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (32), 6537.
- [83] Gomez, D.; Wenner, T.; Brassart, B.; Douarre, C.; O'Donohue, M.-F.; El Khoury, V.; Shin-ya, K.; Morjani, H.; Trentesaux, C.; Riou, J.-F. Telomestatin-Induced Telomere Uncapping Is Modulated by POT1 through G-Overhang Extension in HT1080 Human Tumor Cells. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (50), 38721–38729.
- [84] Han, H.; Hurley, L. H.; Salazar, M. A DNA Polymerase Stop Assay for G-Quadruplex-Interactive Compounds. *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27* (2), 537–542.
- [85] Wu, Y.; Sommers, J. A.; Khan, I.; de Winter, J. P.; Brosh, R. M. Biochemical Characterization of Warsaw Breakage Syndrome Helicase. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*

- (2), 1007–1021.
- [86] Sun, H.; Karow, J. K.; Hickson, I. D.; Maizels, N. The Bloom's Syndrome Helicase Unwinds G4 DNA. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (42), 27587–27592.
- [87] Wu, Y.; Shin-ya, K.; Brosh, R. M. FANCI Helicase Defective in Fanconi Anemia and Breast Cancer Unwinds G-Quadruplex DNA To Defend Genomic Stability. *Mol. Cell. Biol.* **2008**, *28* (12), 4116–4128.
- [88] London, T. B. C.; Barber, L. J.; Mosedale, G.; Kelly, G. P.; Balasubramanian, S.; Hickson, I. D.; Boulton, S. J.; Hiom, K. FANCI Is a Structure-Specific DNA Helicase Associated with the Maintenance of Genomic G/C Tracts. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (52), 36132–36139.
- [89] Fry, M.; Loeb, L. A. Human Werner Syndrome DNA Helicase Unwinds Tetrahelical Structures of the Fragile X Syndrome Repeat Sequence d(CG_nG). *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (18), 12797–12802.
- [90] Paeschke, K.; Capra, J. A.; Zakian, V. A. DNA Replication through G-Quadruplex Motifs Is Promoted by the *Saccharomyces Cerevisiae* Pif1 DNA Helicase. *Cell* **2011**, *145* (5), 678–691.
- [91] Paeschke, K.; Bochman, M. L.; Garcia, P. D.; Cejka, P.; Friedman, K. L.; Kowalczykowski, S. C.; Zakian, V. A. Pif1 Family Helicases Suppress Genome Instability at G-Quadruplex Motifs. *Nature* **2013**, *497* (7450), 458–462.
- [92] Besnard, E.; Babled, A.; Lapasset, L.; Milhavet, O.; Parrinello, H.; Dantec, C.; Marin, J.-M.; Lemaître, J.-M. Unraveling Cell Type-Specific and Reprogrammable Human Replication Origin Signatures Associated with G-Quadruplex Consensus Motifs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2012**, *19* (8), 837–844.
- [93] Merkina, E. E.; Fox, K. R. Kinetic Stability of Intermolecular DNA Quadruplexes. *Biophys. J.* **2005**, *89* (1), 365–373.
- [94] Kouzine, F. Supercoil-Driven DNA Structures Regulate Genetic Transactions. *Front. Biosci.* **2007**, *12* (8–12), 4409.
- [95] Champoux, J. J. DNA Topoisomerases: Structure, Function, and Mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70* (1), 369–413.
- [96] Kouzine, F.; Gupta, A.; Baranello, L.; Wojtowicz, D.; Ben-Aissa, K.; Liu, J.; Przytycka, T. M.; Levens, D. Transcription-Dependent Dynamic Supercoiling Is a Short-Range Genomic Force. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2013**, *20* (3), 396–403.
- [97] Sun, D. Facilitation of a Structural Transition in the Polypurine/Polypyrimidine Tract within the Proximal Promoter Region of the Human VEGF Gene by the Presence of Potassium and G-Quadruplex-Interactive Agents. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33* (18), 6070–6080.
- [98] Sun, D.; Guo, K.; Shin, Y.-J. Evidence of the Formation of G-Quadruplex Structures in the Promoter Region of the Human Vascular Endothelial Growth Factor Gene. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39* (4), 1256–1265.
- [99] Shirude, P. S.; Okumus, B.; Ying, L.; Ha, T.; Balasubramanian, S. Single-Molecule Conformational Analysis of G-Quadruplex Formation in the Promoter DNA Duplex of the Proto-Oncogene C-Kit. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (24), 7484–7485.
- [100] Borgognone, M.; Armas, P.; Calcaterra, N. B. Cellular Nucleic-Acid-Binding Protein,

- a Transcriptional Enhancer of c- Myc , Promotes the Formation of Parallel G-Quadruplexes. *Biochem. J.* **2010**, 428 (3), 491–498.
- [101] González, V.; Guo, K.; Hurley, L.; Sun, D. Identification and Characterization of Nucleolin as a C-myc G-Quadruplex-Binding Protein. *J. Biol. Chem.* **2009**, 284 (35), 23622–23635.
- [102] Palumbo, S. L.; Memmott, R. M.; Uribe, D. J.; Krotova-Khan, Y.; Hurley, L. H.; Ebbinghaus, S. W. A Novel G-Quadruplex-Forming GGA Repeat Region in the c-Myb Promoter Is a Critical Regulator of Promoter Activity. *Nucleic Acids Res.* **2008**, 36 (6), 1755–1769.
- [103] Cogoi, S.; Shchekotikhin, A. E.; Xodo, L. E. HRAS Is Silenced by Two Neighboring G-Quadruplexes and Activated by MAZ, a Zinc-Finger Transcription Factor with DNA Unfolding Property. *Nucleic Acids Res.* **2014**, 42 (13), 8379–8388.
- [104] Raiber, E.-A.; Kranaster, R.; Lam, E.; Nikan, M.; Balasubramanian, S. A Non-Canonical DNA Structure Is a Binding Motif for the Transcription Factor SP1 in Vitro. *Nucleic Acids Res.* **2012**, 40 (4), 1499–1508.
- [105] Soldatenkov, V. A.; Vetcher, A. A.; Duka, T.; Ladame, S. First Evidence of a Functional Interaction between DNA Quadruplexes and Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1. *ACS Chem. Biol.* **2008**, 3 (4), 214–219.
- [106] Cogoi, S.; Paramasivam, M.; Membrino, A.; Yokoyama, K. K.; Xodo, L. E. The KRAS Promoter Responds to Myc-Associated Zinc Finger and Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Proteins, Which Recognize a Critical Quadruplex-Forming GA-Element. *J. Biol. Chem.* **2010**, 285 (29), 22003–22016.
- [107] Paramasivam, M.; Membrino, A.; Cogoi, S.; Fukuda, H.; Nakagama, H.; Xodo, L. E. Protein HnRNP A1 and Its Derivative Up1 Unfold Quadruplex DNA in the Human KRAS Promoter: Implications for Transcription. *Nucleic Acids Res.* **2009**, 37 (9), 2841–2853.
- [108] Cogoi, S.; Paramasivam, M.; Spolaore, B.; Xodo, L. E. Structural Polymorphism within a Regulatory Element of the Human KRAS Promoter: Formation of G4-DNA Recognized by Nuclear Proteins. *Nucleic Acids Res.* **2008**, 36 (11), 3765–3780.
- [121] Kumari, S.; Bugaut, A.; Huppert, J. L.; Balasubramanian, S. An RNA G-Quadruplex in the 5' UTR of the NRAS Proto-Oncogene Modulates Translation. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, 3 (4), 218–221.
- [122] Gomez, D.; Guédin, A.; Mergny, J.-L.; Salles, B.; Riou, J.-F.; Teulade-Fichou, M.-P.; Calsou, P. A G-Quadruplex Structure within the 5'-UTR of TRF2 mRNA Represses Translation in Human Cells. *Nucleic Acids Res.* **2010**, 38 (20), 7187–7198.
- [123] Balkwill, G. D.; Derecka, K.; Garner, T. P.; Hodgman, C.; Flint, A. P. F.; Searle, M. S. Repression of Translation of Human Estrogen Receptor α by G-Quadruplex Formation. *Biochemistry* **2009**, 48 (48), 11487–11495.
- [124] Morris, M. J.; Basu, S. An Unusually Stable G-Quadruplex within the 5'-UTR of the MT3 Matrix Metalloproteinase mRNA Represses Translation in Eukaryotic Cells. *Biochemistry* **2009**, 48 (23), 5313–5319.
- [125] Arora, A.; Dutkiewicz, M.; Scaria, V.; Hariharan, M.; Maiti, S.; Kurreck, J. Inhibition of Translation in Living Eukaryotic Cells by an RNA G-Quadruplex Motif. *RNA* **2008**, 14 (7), 1290–1296.

- [126] Halder, K.; Wieland, M.; Hartig, J. S. Predictable Suppression of Gene Expression by 5'-UTR-Based RNA Quadruplexes. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37* (20), 6811–6817.
- [127] Beaudoin, J.-D.; Perreault, J.-P. 5'-UTR G-Quadruplex Structures Acting as Translational Repressors. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38* (20), 7022–7036.
- [128] Lammich, S.; Kamp, F.; Wagner, J.; Nuscher, B.; Zilow, S.; Ludwig, A.-K.; Willem, M.; Haass, C. Translational Repression of the Disintegrin and Metalloprotease ADAM10 by a Stable G-Quadruplex Secondary Structure in Its 5'-Untranslated Region. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (52), 45063–45072.
- [129] Lin, S.; Li, S.; Chen, Z.; He, X.; Zhang, Y.; Xu, X.; Xu, M.; Yuan, G. Formation, Recognition and Bioactivities of a Novel G-Quadruplex in the STAT3 Gene. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (19), 5987–5991.
- [130] Morris, M. J.; Negishi, Y.; Pázsint, C.; Schonhoft, J. D.; Basu, S. An RNA G-Quadruplex Is Essential for Cap-Independent Translation Initiation in Human VEGF IRES. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (50), 17831–17839.
- [131] Murat, P.; Zhong, J.; Lekieffre, L.; Cowieson, N. P.; Clancy, J. L.; Preiss, T.; Balasubramanian, S.; Khanna, R.; Tellam, J. G-Quadruplexes Regulate Epstein-Barr Virus-Encoded Nuclear Antigen 1 mRNA Translation. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10* (5), 358–364.
- [132] Marcel, V.; Tran, P. L. T.; Sagne, C.; Martel-Planche, G.; Vaslin, L.; Teulade-Fichou, M.-P.; Hall, J.; Mergny, J.-L.; Hainaut, P.; Van Dyck, E. G-Quadruplex Structures in TP53 Intron 3: Role in Alternative Splicing and in Production of P53 mRNA Isoforms. *Carcinogenesis* **2011**, *32* (3), 271–278.
- [133] Gomez, D. Telomerase Downregulation Induced by the G-Quadruplex Ligand 12459 in A549 Cells Is Mediated by HTERT RNA Alternative Splicing. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32* (1), 371–379.
- [134] Rodriguez, R.; Miller, K. M.; Forment, J. V.; Bradshaw, C. R.; Nikan, M.; Britton, S.; Oelschlaegel, T.; Xhemalce, B.; Balasubramanian, S.; Jackson, S. P. Small-Molecule-Induced DNA Damage Identifies Alternative DNA Structures in Human Genes. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8* (3), 301–310.
- [135] Haeusler, A. R.; Donnelly, C. J.; Periz, G.; Simko, E. A. J.; Shaw, P. G.; Kim, M.-S.; Maragakis, N. J.; Troncoso, J. C.; Pandey, A.; Sattler, R.; Rothstein, J. D.; Wang, J. C9orf72 Nucleotide Repeat Structures Initiate Molecular Cascades of Disease. *Nature* **2014**, *507* (7491), 195–200.
- [136] Schaffitzel, C.; Berger, I.; Postberg, J.; Hanes, J.; Lipps, H. J.; Plückthun, A. In Vitro Generated Antibodies Specific for Telomeric Guanine-Quadruplex DNA React with *Stylonychia Lemnae* Macronuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98* (15), 8572–8577.
- [137] Henderson, A.; Wu, Y.; Huang, Y. C.; Chavez, E. A.; Platt, J.; Johnson, F. B.; Brosh, R. M.; Sen, D.; Lansdorp, P. M. Detection of G-Quadruplex DNA in Mammalian Cells. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42* (2), 860–869.
- [138] Biffi, G.; Di Antonio, M.; Tannahill, D.; Balasubramanian, S. Visualization and Selective Chemical Targeting of RNA G-Quadruplex Structures in the Cytoplasm of Human Cells. *Nat. Chem.* **2014**, *6* (1), 75–80.
- [139] Biffi, G.; Tannahill, D.; McCafferty, J.; Balasubramanian, S. Quantitative Visualization of DNA G-Quadruplex Structures in Human Cells. *Nat. Chem.* **2013**, *5*

- (3), 182–186.
- [140] Lam, E. Y. N.; Beraldi, D.; Tannahill, D.; Balasubramanian, S. G-Quadruplex Structures Are Stable and Detectable in Human Genomic DNA. *Nat. Commun.* **2013**, *4* (1), 1796.
- [141] Monchaud, D.; Teulade-Fichou, M.-P. A Hitchhiker's Guide to G-Quadruplex Ligands. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6* (4), 627–636.
- [142] Haider, S. M.; Neidle, S.; Parkinson, G. N. A Structural Analysis of G-Quadruplex/Ligand Interactions. *Biochimie* **2011**, *93* (8), 1239–1251.
- [143] Georgiades, S. N.; Abd Karim, N. H.; Suntharalingam, K.; Vilar, R. Interaction of Metal Complexes with G-Quadruplex DNA. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2010**, *49* (24), 4020–4034.
- [144] Savva, L.; Georgiades, S. N. Recent Developments in Small-Molecule Ligands of Medicinal Relevance for Harnessing the Anticancer Potential of G-Quadruplexes. *Molecules* **2021**, *26* (4), 841.
- [145] Yan, Y.; Tan, J.; Ou, T.; Huang, Z.; Gu, L. DNA G-Quadruplex Binders: A Patent Review. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2013**, *23* (11), 1495–1509.
- [146] Ohnmacht, S. A.; Neidle, S. Small-Molecule Quadruplex-Targeted Drug Discovery. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (12), 2602–2612.
- [147] Gavathiotis, E.; Heald, R. A.; Stevens, M. F. G.; Searle, M. S. Drug Recognition and Stabilisation of the Parallel-Stranded DNA Quadruplex d(TTAGGGT)₄ Containing the Human Telomeric Repeat. *J. Mol. Biol.* **2003**, *334* (1), 25–36.
- [148] Chung, W. J.; Heddi, B.; Hamon, F.; Teulade-Fichou, M.-P.; Phan, A. T. Solution Structure of a G-Quadruplex Bound to the Bisquinolinium Compound Phen-DC 3. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2014**, *53* (4), 999–1002.
- [149] Chung, W. J.; Heddi, B.; Tera, M.; Iida, K.; Nagasawa, K.; Phan, A. T. Solution Structure of an Intramolecular (3 + 1) Human Telomeric G-Quadruplex Bound to a Telomestatin Derivative. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (36), 13495–13501.
- [150] Campbell, N. H.; Patel, M.; Tofa, A. B.; Ghosh, R.; Parkinson, G. N.; Neidle, S. Selectivity in Ligand Recognition of G-Quadruplex Loops. *Biochemistry* **2009**, *48* (8), 1675–1680.
- [151] Phan, A. T.; Kuryavyi, V.; Gaw, H. Y.; Patel, D. J. Small-Molecule Interaction with a Five-Guanine-Tract G-Quadruplex Structure from the Human MYC Promoter. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1* (3), 167–173.
- [152] Collie, G. W.; Promontorio, R.; Hampel, S. M.; Micco, M.; Neidle, S.; Parkinson, G. N. Structural Basis for Telomeric G-Quadruplex Targeting by Naphthalene Diimide Ligands. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (5), 2723–2731.
- [153] Campbell, N. H.; Karim, N. H. A.; Parkinson, G. N.; Gunaratnam, M.; Petrucci, V.; Todd, A. K.; Vilar, R.; Neidle, S. Molecular Basis of Structure–Activity Relationships between Salphen Metal Complexes and Human Telomeric DNA Quadruplexes. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (1), 209–222.
- [154] Cosconati, S.; Marinelli, L.; Trotta, R.; Virno, A.; Mayol, L.; Novellino, E.; Olson, A. J.; Randazzo, A. Tandem Application of Virtual Screening and NMR Experiments in the Discovery of Brand New DNA Quadruplex Groove Binders. *J. Am. Chem. Soc.*

- 2009, *131* (45), 16336–16337.
- [155] Di Leva, F. S.; Novellino, E.; Cavalli, A.; Parrinello, M.; Limongelli, V. Mechanistic Insight into Ligand Binding to G-Quadruplex DNA. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42* (9), 5447–5455.
- [156] Li, Q.; Xiang, J.; Li, X.; Chen, L.; Xu, X.; Tang, Y.; Zhou, Q.; Li, L.; Zhang, H.; Sun, H.; Guan, A.; Yang, Q.; Yang, S.; Xu, G. Stabilizing Parallel G-Quadruplex DNA by a New Class of Ligands: Two Non-Planar Alkaloids through Interaction in Lateral Grooves. *Biochimie* **2009**, *91* (7), 811–819.
- [157] Cosconati, S.; Marinelli, L.; Trotta, R.; Virno, A.; De Tito, S.; Romagnoli, R.; Pagano, B.; Limongelli, V.; Giancola, C.; Baraldi, P. G.; Mayol, L.; Novellino, E.; Randazzo, A. Structural and Conformational Requisites in DNA Quadruplex Groove Binding: Another Piece to the Puzzle. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (18), 6425–6433.
- [158] Haudecoeur, R.; Stefan, L.; Denat, F.; Monchaud, D. A Model of Smart G-Quadruplex Ligand. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (2), 550–553.
- [159] Laguerre, A.; Stefan, L.; Larrouy, M.; Genest, D.; Novotna, J.; Pirrotta, M.; Monchaud, D. A Twice-As-Smart Synthetic G-Quartet: PyroTASQ Is Both a Smart Quadruplex Ligand and a Smart Fluorescent Probe. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (35), 12406–12414.
- [160] Parkinson, G. N.; Ghosh, R.; Neidle, S. Structural Basis for Binding of Porphyrin to Human Telomeres. *Biochemistry* **2007**, *46* (9), 2390–2397.
- [161] De Cian, A.; DeLemos, E.; Mergny, J.-L.; Teulade-Fichou, M.-P.; Monchaud, D. Highly Efficient G-Quadruplex Recognition by Bisquinolinium Compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (7), 1856–1857.
- [162] Drewe, W. C.; Nanjunda, R.; Gunaratnam, M.; Beltran, M.; Parkinson, G. N.; Reszka, A. P.; Wilson, W. D.; Neidle, S. Rational Design of Substituted Diarylureas: A Scaffold for Binding to G-Quadruplex Motifs. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (24), 7751–7767.
- [163] Lombardo, C. M.; Welsh, S. J.; Strauss, S. J.; Dale, A. G.; Todd, A. K.; Nanjunda, R.; Wilson, W. D.; Neidle, S. A Novel Series of G-Quadruplex Ligands with Selectivity for HIF-Expressing Osteosarcoma and Renal Cancer Cell Lines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (18), 5984–5988.
- [164] Ren, J.; Chaires, J. B. Sequence and Structural Selectivity of Nucleic Acid Binding Ligands. *Biochemistry* **1999**, *38* (49), 16067–16075.
- [165] Wu, X. Substrate-Specific Inhibition of RecQ Helicase. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29* (8), 1765–1771.
- [166] Nicoludis, J. M.; Barrett, S. P.; Mergny, J.-L.; Yatsunyk, L. A. Interaction of Human Telomeric DNA with N-Methyl Mesoporphyrin IX. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40* (12), 5432–5447.
- [167] Koirala, D.; Dhakal, S.; Ashbridge, B.; Sannohe, Y.; Rodriguez, R.; Sugiyama, H.; Balasubramanian, S.; Mao, H. A Single-Molecule Platform for Investigation of Interactions between G-Quadruplexes and Small-Molecule Ligands. *Nat. Chem.* **2011**, *3* (10), 782–787.
- [168] Tseng, T.-Y.; Chien, C.-H.; Chu, J.-F.; Huang, W.-C.; Lin, M.-Y.; Chang, C.-C.; Chang, T.-C. Fluorescent Probe for Visualizing Guanine-Quadruplex DNA by

- Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy. *J. Biomed. Opt.* **2013**, *18* (10), 101309.
- [169] White, E. W.; Tanious, F.; Ismail, M. A.; Reszka, A. P.; Neidle, S.; Boykin, D. W.; Wilson, W. D. Structure-Specific Recognition of Quadruplex DNA by Organic Cations: Influence of Shape, Substituents and Charge. *Biophys. Chem.* **2007**, *126* (1–3), 140–153.
- [170] Cuenca, F.; Greciano, O.; Gunaratnam, M.; Haider, S.; Munnur, D.; Nanjunda, R.; Wilson, W. D.; Neidle, S. Tri- and Tetra-Substituted Naphthalene Diimides as Potent G-Quadruplex Ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (5), 1668–1673.
- [171] Hampel, S. M.; Sidibe, A.; Gunaratnam, M.; Riou, J.-F.; Neidle, S. Tetrasubstituted Naphthalene Diimide Ligands with Selectivity for Telomeric G-Quadruplexes and Cancer Cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (22), 6459–6463.
- [172] Suntharalingam, K.; White, A. J. P.; Vilar, R. Two Metals Are Better than One: Investigations on the Interactions between Dinuclear Metal Complexes and Quadruplex DNA. *Inorg. Chem.* **2010**, *49* (18), 8371–8380.
- [173] Bejugam, M.; Sewitz, S.; Shirude, P. S.; Rodriguez, R.; Shahid, R.; Balasubramanian, S. Trisubstituted Isoalloxazines as a New Class of G-Quadruplex Binding Ligands: Small Molecule Regulation of c-Kit Oncogene Expression. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (43), 12926–12927.
- [174] Koepfel, F. Ethidium Derivatives Bind to G-Quartets, Inhibit Telomerase and Act as Fluorescent Probes for Quadruplexes. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29* (5), 1087–1096.
- [175] Alzeer, J.; Vummidi, B. R.; Roth, P. J. C.; Luedtke, N. W. Guanidinium-Modified Phthalocyanines as High-Affinity G-Quadruplex Fluorescent Probes and Transcriptional Regulators. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2009**, *48* (49), 9362–9365.
- [176] Teulade-Fichou, M.-P.; Carrasco, C.; Guittat, L.; Bailly, C.; Alberti, P.; Mergny, J.-L.; David, A.; Lehn, J.-M.; Wilson, W. D. Selective Recognition of G-Quadruplex Telomeric DNA by a Bis(Quinacridine) Macrocycle. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (16), 4732–4740.
- [177] Wang, P.; Ren, L.; He, H.; Liang, F.; Zhou, X.; Tan, Z. A Phenol Quaternary Ammonium Porphyrin as a Potent Telomerase Inhibitor by Selective Interaction with Quadruplex DNA. *ChemBioChem* **2006**, *7* (8), 1155–1159.
- [178] Kim, M.-J. M.-Y.; Gleason-Guzman, M.; Izbicka, E.; Nishioka, D.; Hurley, L. H. The Different Biological Effects of Telomestatin and TMPyP4 Can Be Attributed to Their Selectivity for Interaction with Intramolecular or Intermolecular G-Quadruplex Structures. *Cancer Res.* **2003**, *63* (12), 3247–3256.
- [179] Gonçalves, D. P. N.; Rodriguez, R.; Balasubramanian, S.; Sanders, J. K. M. Tetramethylpyridiniumporphyrazines—a New Class of G-Quadruplex Inducing and Stabilising Ligands. *Chem. Commun.* **2006**, No. 45, 4685–4687.
- [180] Wilson, T.; Williamson, M. P.; Thomas, J. A. Differentiating Quadruplexes: Binding Preferences of a Luminescent Dinuclear Ruthenium(II) Complex with Four-Stranded DNA Structures. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (11), 2617.
- [181] Huang, R.; He, N.; Li, Z. Recent Progresses in DNA Nanostructure-Based Biosensors for Detection of Tumor Markers. *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier Ltd June 30, 2018, pp 27–34.
- [182] Dincer, C.; Bruch, R.; Costa-Rama, E.; Fernández-Abedul, M. T.; Merkoçi, A.; Manz,

- A.; Urban, G. A.; Güder, F. Disposable Sensors in Diagnostics, Food, and Environmental Monitoring. *Advanced Materials*. Wiley-VCH Verlag July 26, 2019.
- [183] Li, Y.; Schluesener, H. J.; Xu, S. Gold Nanoparticle-Based Biosensors. *Gold Bull.* **2010**, *43* (1), 29–41.
- [184] Loiseau, A.; Asila, V.; Boitel-Aullen, G.; Lam, M.; Salmain, M.; Boujday, S. Silver-Based Plasmonic Nanoparticles for and Their Use in Biosensing. *Biosensors*. MDPI AG June 10, 2019, p 78.
- [185] Park, Y.; Jeong, S.; Kim, S. Medically Translatable Quantum Dots for Biosensing and Imaging. *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **2017**, *30*, 51–70.
- [186] Inan, H.; Poyraz, M.; Inci, F.; Lifson, M. A.; Baday, M.; Cunningham, B. T.; Demirci, U. Photonic Crystals: Emerging Biosensors and Their Promise for Point-of-Care Applications. *Chemical Society Reviews*. Royal Society of Chemistry January 21, 2017, pp 366–388.
- [187] Peña-Bahamonde, J.; Nguyen, H. N.; Fanourakis, S. K.; Rodrigues, D. F. Recent Advances in Graphene-Based Biosensor Technology with Applications in Life Sciences. *Journal of Nanobiotechnology*. BioMed Central Ltd. September 22, 2018, p 75.
- [188] Domljanovic, I.; Carstens, A.; Okholm, A.; Kjems, J.; Nielsen, C. T.; Heegaard, N. H. H.; Astakhova, K. Complexes of DNA with Fluorescent Dyes Are Effective Reagents for Detection of Autoimmune Antibodies. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 1–9.
- [189] Nygren, J.; Svanvik, N.; Kubista, M. The Interactions between the Fluorescent Dye Thiazole Orange and DNA. *Biopolymers* **1998**, *46* (1), 39–51.
- [190] Lee, L. G.; Chen, C. -H; Chiu, L. A. Thiazole Orange: A New Dye for Reticulocyte Analysis. *Cytometry* **1986**, *7* (6), 508–517.
- [191] Zhang, L.; Liu, X.; Lu, S.; Liu, J.; Zhong, S.; Wei, Y.; Bing, T.; Zhang, N.; Shanguan, D. Thiazole Orange Styryl Derivatives as Fluorescent Probes for G-Quadruplex DNA. *ACS Appl. Bio Mater.* **2020**, *3* (5), 2643–2650.
- [192] Yao, G.; John, S. M.; Tan, W. Molecular Beacon DNA Probes Based on Fluorescence Biosensing. In *Fluorescence Sensors and Biosensors*; Richard B. Thompson, Ed.; CRC Press, 2005; pp 85–110.
- [193] Yang, L.; Ellington, A. D. Prospects for the De Novo Design of Nucleic Acid Biosensors. In *Fluorescence Sensors and Biosensors*; Thompson, R. B., Ed.; Taylor & Francis, 2005; pp 5–43.
- [194] Ligler, F. S. Fluorescence-Based Optical Biosensors. In *Biophotonics*; Springer Berlin Heidelberg, 2008; pp 199–215.
- [195] Pereira, A. S.; Tavares, P.; Vieira-Limao, P. *Radiation in Bioanalysis - Spectroscopic Techniques and Theoretical Methods*; 2019.
- [196] Blagoi, G.; Rosenzweig, N.; Rosenzweig, Z. Fluorescence Resonance Energy Transfer-Based Sensors for Bioanalysis. In *Fluorescence Sensors and Biosensors*; Thompson, R. B., Ed.; CRC Press, 2005; pp 93–105.
- [197] Nigam, S.; Rutan, S. Principles and Applications of Solvatochromism. *Appl. Spectrosc.* **2001**, *55* (11), 362A-370A.

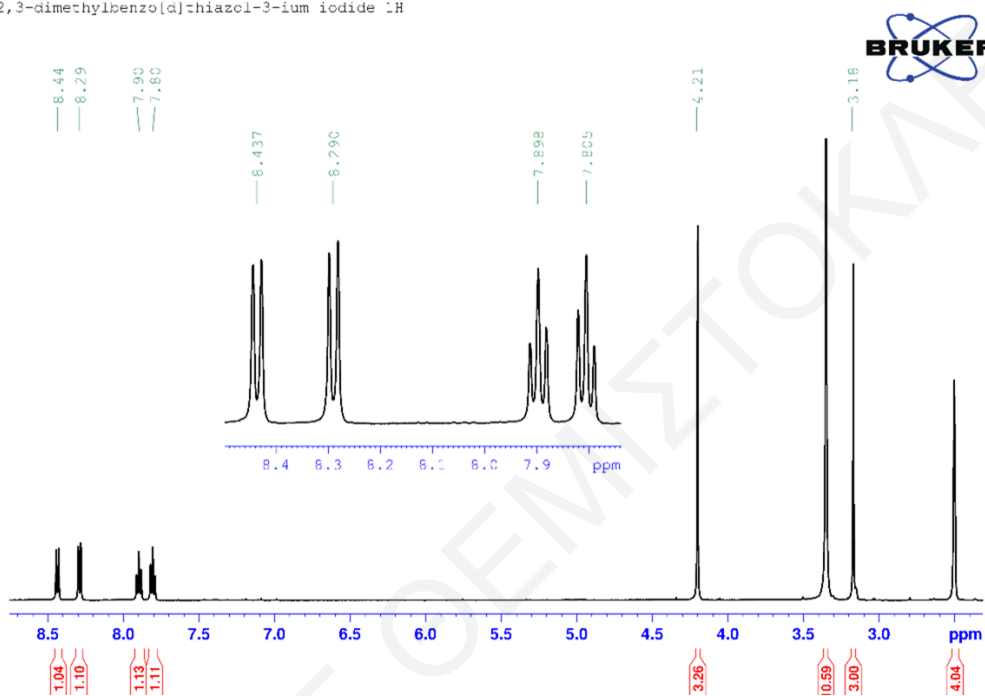
- [198] Fodor, S. P. A.; Rava, R. P.; Hays, T. R.; Spiro, T. G. Ultraviolet Resonance Raman Spectroscopy of the Nucleotides with 266-, 240-, 218-, and 200-Nm Pulsed Laser Excitation. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107* (6), 1520–1529.
- [199] Karaballi, R. A.; Nel, A.; Krishnan, S.; Blackburn, J.; Brosseau, C. L. Development of an Electrochemical Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (EC-SERS) Aptasensor for Direct Detection of DNA Hybridization. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2015**, *17* (33), 21356–21363.
- [200] Benevides, J. M.; Overman, S. A.; Thomas, G. J. Raman, Polarized Raman and Ultraviolet Resonance Raman Spectroscopy of Nucleic Acids and Their Complexes. *J. Raman Spectrosc.* **2005**, *36* (4), 279–299.
- [201] Niaura, G. Raman Spectroscopy in Analysis of Biomolecules. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2014; pp 1–34.
- [202] Huang, K. J.; Liu, Y. J.; Wang, H. B.; Wang, Y. Y. A Sensitive Electrochemical DNA Biosensor Based on Silver Nanoparticles-Polydopamine@graphene Composite. *Electrochim. Acta* **2014**, *118*, 130–137.
- [203] Li, D.; Long, W.; Hou, J.; Deng, Q.; Guo, Q.; Wong, W.-L.; Lu, Y.-J.; Zhang, K. A Series of Modified Thiazole Orange Dye as the Highly Fluorescent G-Quadruplex DNA Binders: The Study of Electronic Effects of the Substituent on 1-Methylquinolinium Moiety. *J. Lumin.* **2019**, *205*, 367–373.
- [204] Mengting, S.; Yujing, L.; Senyuan, C.; Wenle, S.; Xuanhe, H.; Ying, L.; Cuicui, C. Thiazole Orange Styrene Compound Is as G-Tetra-Serobila Nucleic Acid Fluorescent Probe. CN106147753A, 2019.
- [205] Bumagin, N. A.; Veselov, I. S.; Belov, D. S. An Effective Activation of Palladium Phosphine Complexes in Aqueous Phase Reactions of Hetero-Aromatic Boronic Acids with Aryl Halides. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2014**, *50* (1), 19–25.
- [206] Tintori, C.; Brai, A.; Dasso Lang, M. C.; Deodato, D.; Greco, A. M.; Bizzarri, B. M.; Cascone, L.; Casian, A.; Zamperini, C.; Dreassi, E.; Crespan, E.; Maga, G.; Vanham, G.; Ceresola, E.; Canducci, F.; Ariën, K. K.; Botta, M. Development and in Vitro Evaluation of a Microbicide Gel Formulation for a Novel Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor Belonging to the N -Dihydroalkyloxybenzyloxypyrimidines (N-DABOs) Family. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (6), 2747–2759.
- [207] Trott, O.; Olson, A. J. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31* (2), 455–461.
- [208] Webster, C. E.; Drago, R. S.; Zerner, M. C. Molecular Dimensions for Adsorptives. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (22), 5509–5516.
- [209] Ridley, J.; Zerner, M. An Intermediate Neglect of Differential Overlap Technique for Spectroscopy: Pyrrole and the Azines. *Theor. Chim. Acta* **1973**, *32* (2), 111–134.
- [210] Zerner, M. C. Semiempirical Molecular Orbital Methods; 1991; pp 313–365.
- [211] Thompson, M. A. ArgusLab. Planaria Software LLC: Seattle, WA.
- [212] Nissum, M.; Nielsen, O. F.; Jensen, F.; Jensen, P. W. Surface-enhanced Raman Spectroscopic Investigations of Thiazole Orange Derivatives Using Visible and Near-infrared Excitation. *J. Raman Spectrosc.* **1995**, *26* (11), 1009–1017.

- [213] Nissum, M.; Jacobsen, J. P.; Nielsen, O. F.; Jensen, P. W. Determination of the Stability of Complexes between DNA and the Thiazole Orange Derivatives TO6 and TOTO by Surface-Enhanced Resonance Raman Spectroscopy. *Biospectroscopy* **1997**, *3* (3), 207–213.
- [214] Polavarapu, P. L. Ab Initio Vibrational Raman and Raman Optical Activity Spectra. *J. Phys. Chem.* **1990**, *94* (21), 8106–8112.
- [215] Michels, J. J.; O’Connell, M. J.; Taylor, P. N.; Wilson, J. S.; Cacialli, F.; Anderson, H. L. Synthesis of Conjugated Polyrotaxanes. *Chem. – A Eur. J.* **2003**, *9* (24), 6167–6176.
- [216] Xu, H.; Di Antonio, M.; McKinney, S.; Mathew, V.; Ho, B.; O’Neil, N. J.; Santos, N. Dos; Silvester, J.; Wei, V.; Garcia, J.; Kabeer, F.; Lai, D.; Soriano, P.; Banáth, J.; Chiu, D. S.; Yap, D.; Le, D. D.; Ye, F. B.; Zhang, A.; Thu, K.; Soong, J.; Lin, S.; Tsai, A. H. C.; Osako, T.; Algara, T.; Saunders, D. N.; Wong, J.; Xian, J.; Bally, M. B.; Brenton, J. D.; Brown, G. W.; Shah, S. P.; Cescon, D.; Mak, T. W.; Caldas, C.; Stirling, P. C.; Hieter, P.; Balasubramanian, S.; Aparicio, S. CX-5461 Is a DNA G-Quadruplex Stabilizer with Selective Lethality in BRCA1/2 Deficient Tumours. *Nat. Commun.* **2017**, *8* (1), 14432.
- [217] Burger, A. M.; Dai, F.; Schultes, C. M.; Reszka, A. P.; Moore, M. J.; Double, J. A.; Neidle, S. The G-Quadruplex-Interactive Molecule BRACO-19 Inhibits Tumor Growth, Consistent with Telomere Targeting and Interference with Telomerase Function. *Cancer Res.* **2005**, *65* (4), 1489–1496.
- [218] Wu, Y.; Zan, L.-P.; Wang, X.-D.; Lu, Y.-J.; Ou, T.-M.; Lin, J.; Huang, Z.-S.; Gu, L.-Q. Stabilization of VEGF G-Quadruplex and Inhibition of Angiogenesis by Quindoline Derivatives. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2014**, *1840* (9), 2970–2977.
- [219] Shin-ya, K.; Wierzba, K.; Matsuo, K.; Ohtani, T.; Yamada, Y.; Furihata, K.; Hayakawa, Y.; Seto, H. Telomestatin, a Novel Telomerase Inhibitor from *Streptomyces Anulatus*. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (6), 1262–1263.
- [220] Gampp, H.; Maeder, M.; Meyer, C. J.; Zuberbu“hler, A. D. Calculation of Equilibrium Constants from Multiwavelength Spectroscopic Data—II32, 95. *Talanta* **1985**, *32* (4), 257–264.
- [221] Maeder, M.; Zuberbuehler, A. D. Nonlinear Least-Squares Fitting of Multivariate Absorption Data. *Anal. Chem.* **1990**, *62* (20), 2220–2224.
- [222] Zapata Trujillo, J. C.; McKemmish, L. K. Model Chemistry Recommendations for Scaled Harmonic Frequency Calculations: A Benchmark Study. *J. Phys. Chem. A* **2023**, *127* (7), 1715–1735.
- [223] Zhang, L.; Yi, M.; Zhong, S.; Liu, J.; Liu, X.; Bing, T.; Zhang, N.; Wei, Y.; Shangguan, D. P-Aminostyryl Thiazole Orange Derivatives for Monitoring Mitochondrial Viscosity in Live Cells. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2022**, *265*, 120394.

VI. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

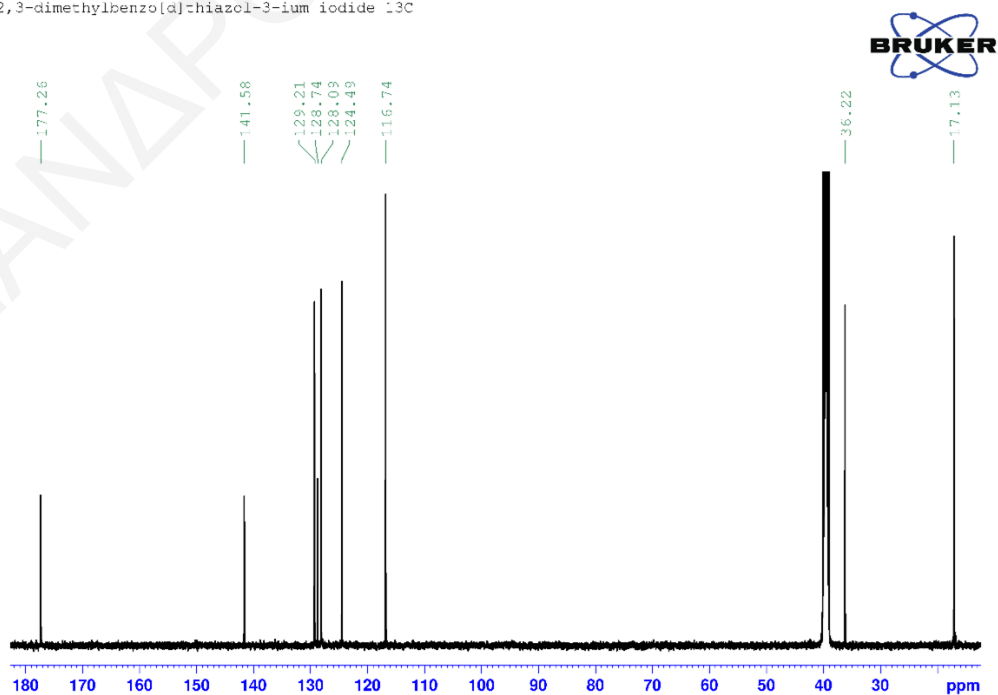
VI.A. Φασματοσκοπία NMR

2,3-dimethylbenzo[d]thiazol-3-ium iodide 1H

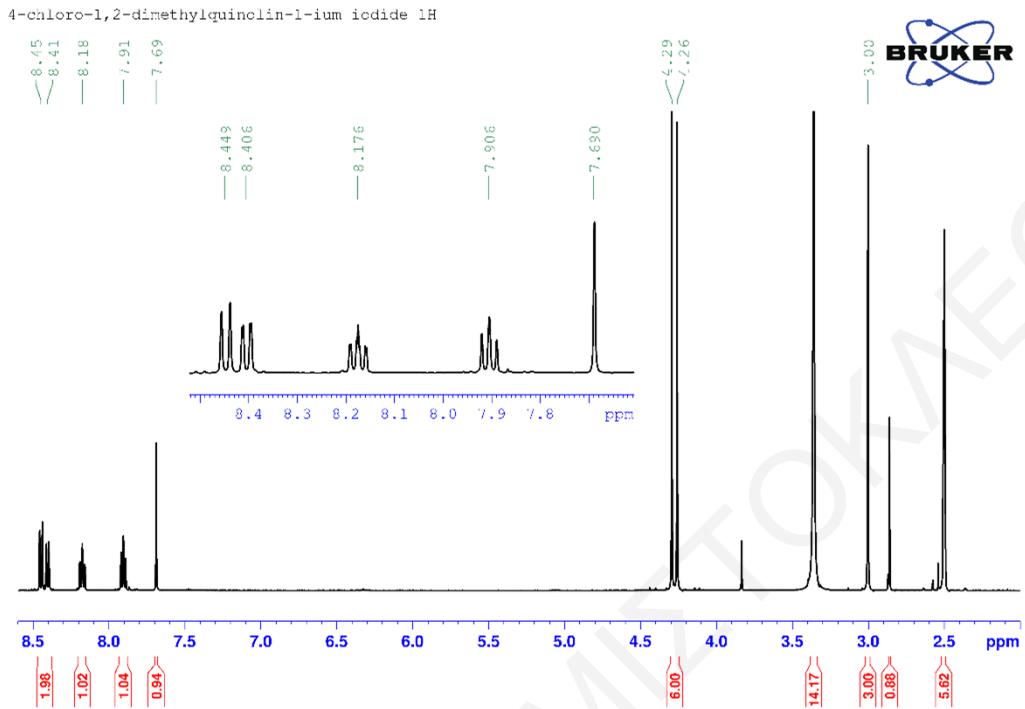


Σχήμα Π- 1: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ της Ένωσης Α.

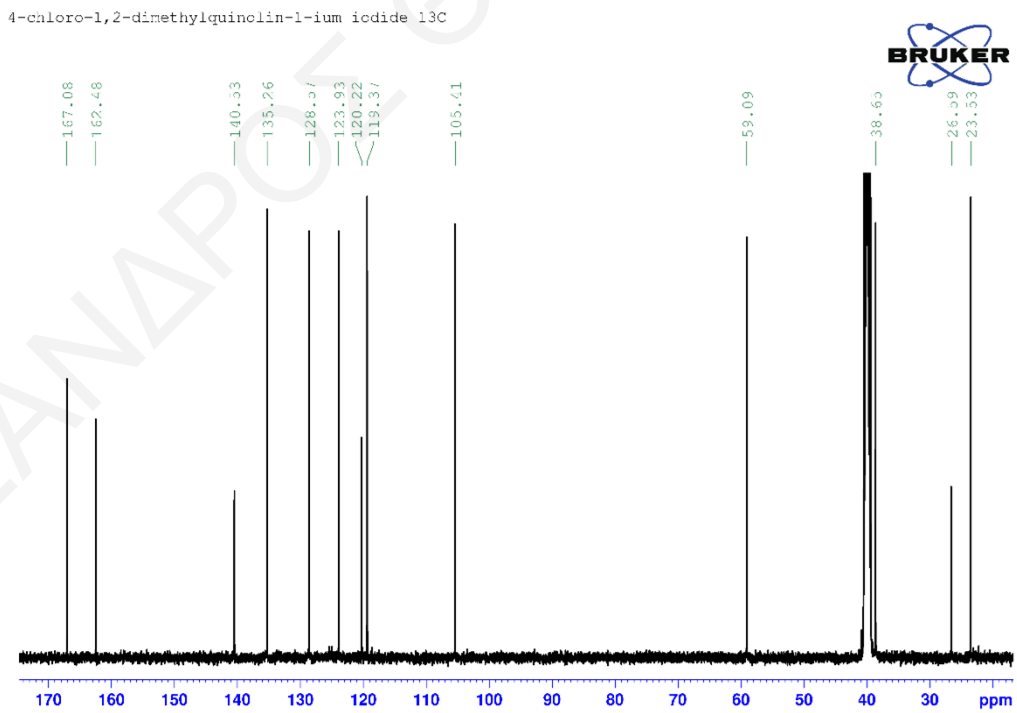
2,3-dimethylbenzo[d]thiazol-3-ium iodide 13C



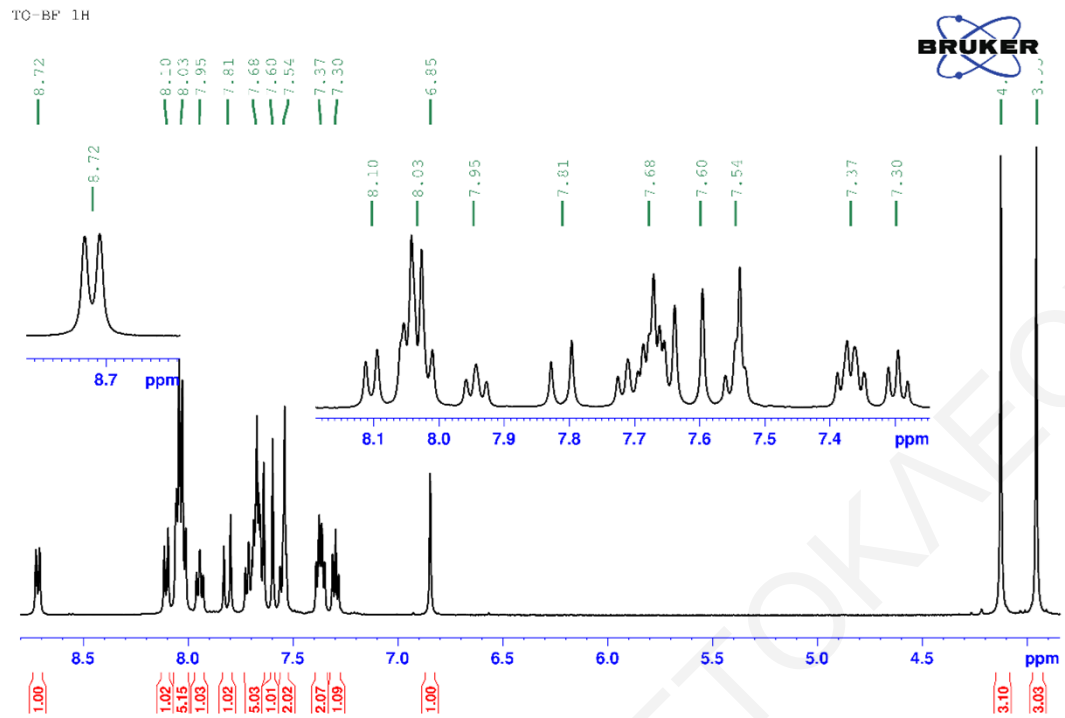
Σχήμα Π- 2: Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ της Ένωσης Α.



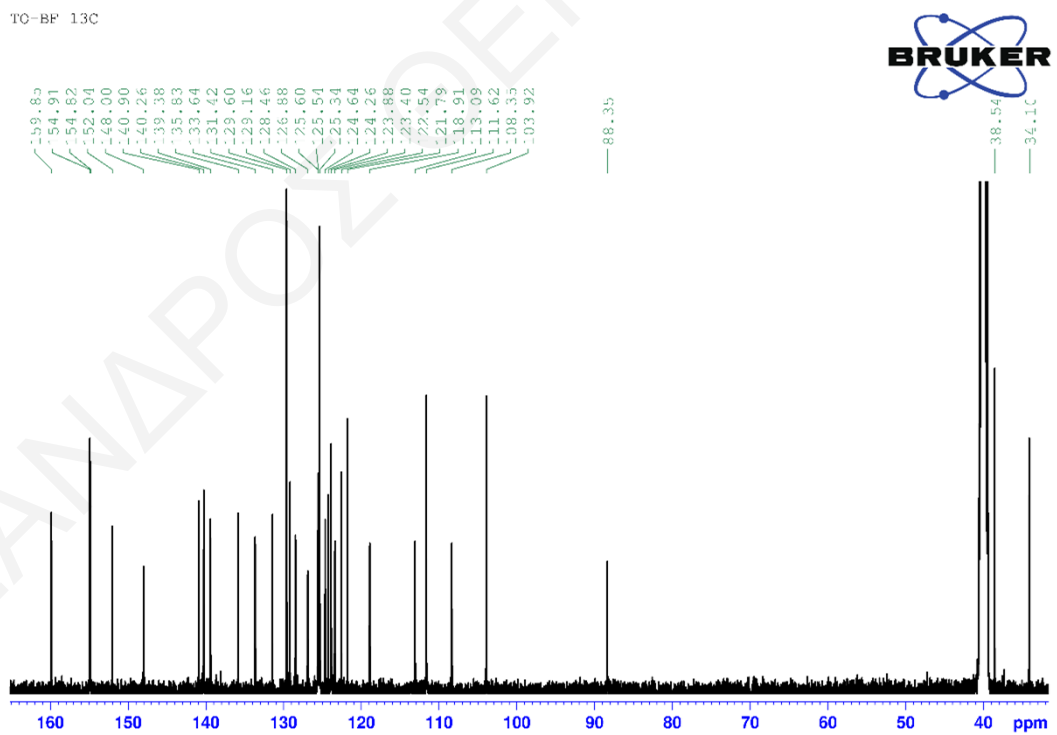
Σχήμα Π- 3: Φάσμα ¹H-NMR της Ένωσης Β.



Σχήμα Π- 4: Φάσμα ¹³C-NMR της Ένωσης Β.

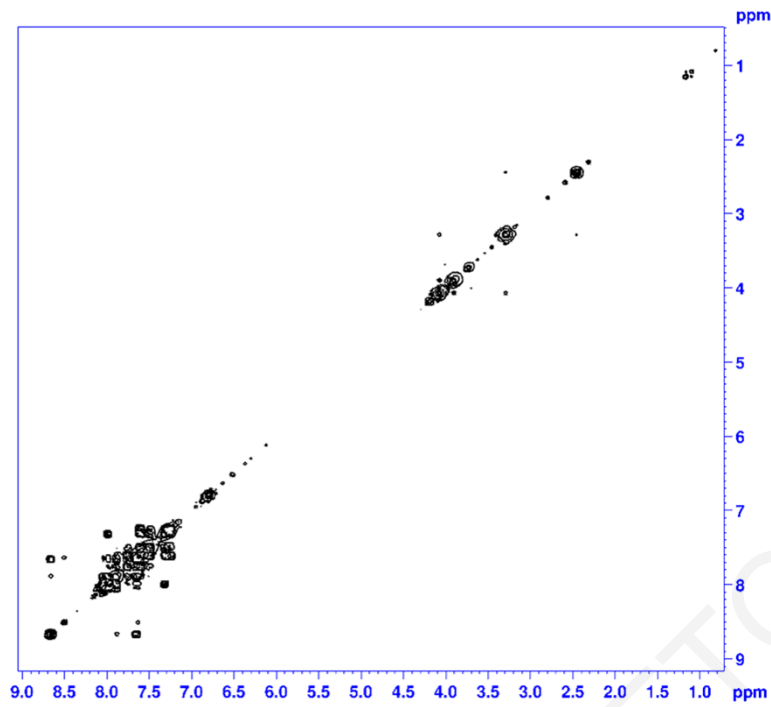


Σχήμα Π- 5: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του TO-BF.



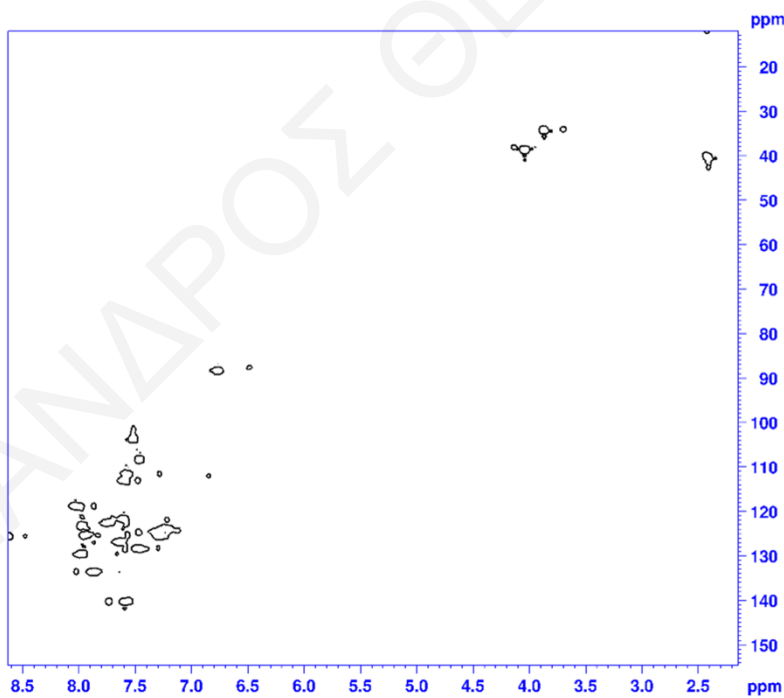
Σχήμα Π- 6: Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ του TO-BF.

TO-BF COSY

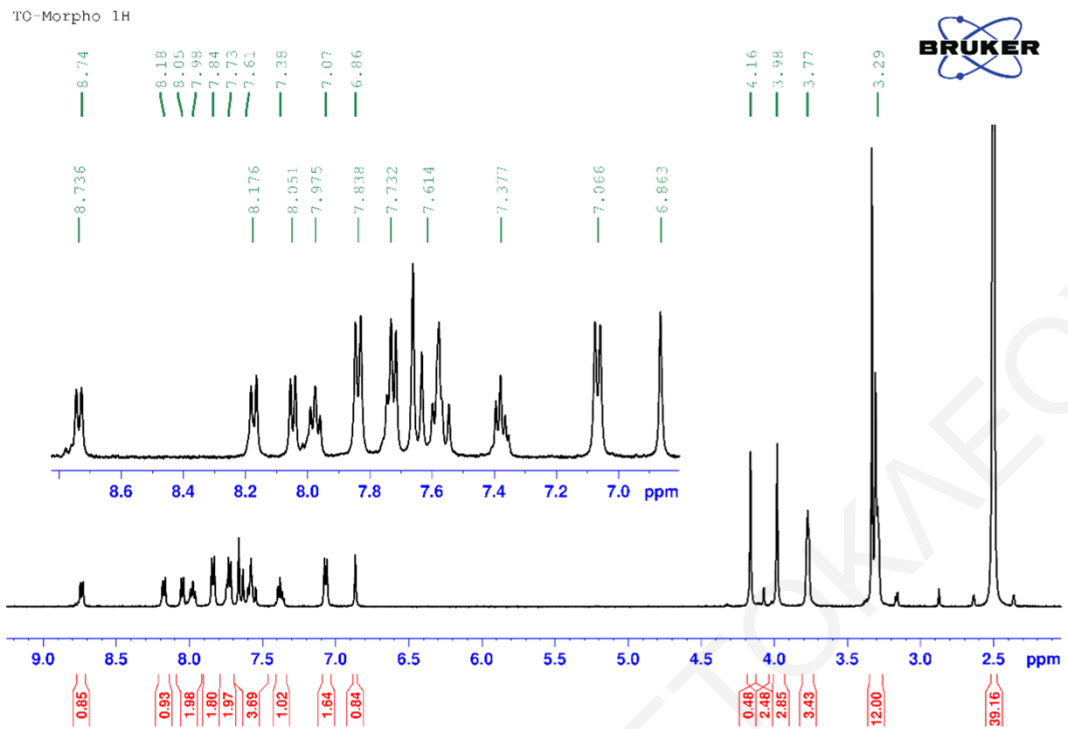


Σχήμα Π- 7: Φάσμα 2D-NMR COSY του TO-BF.

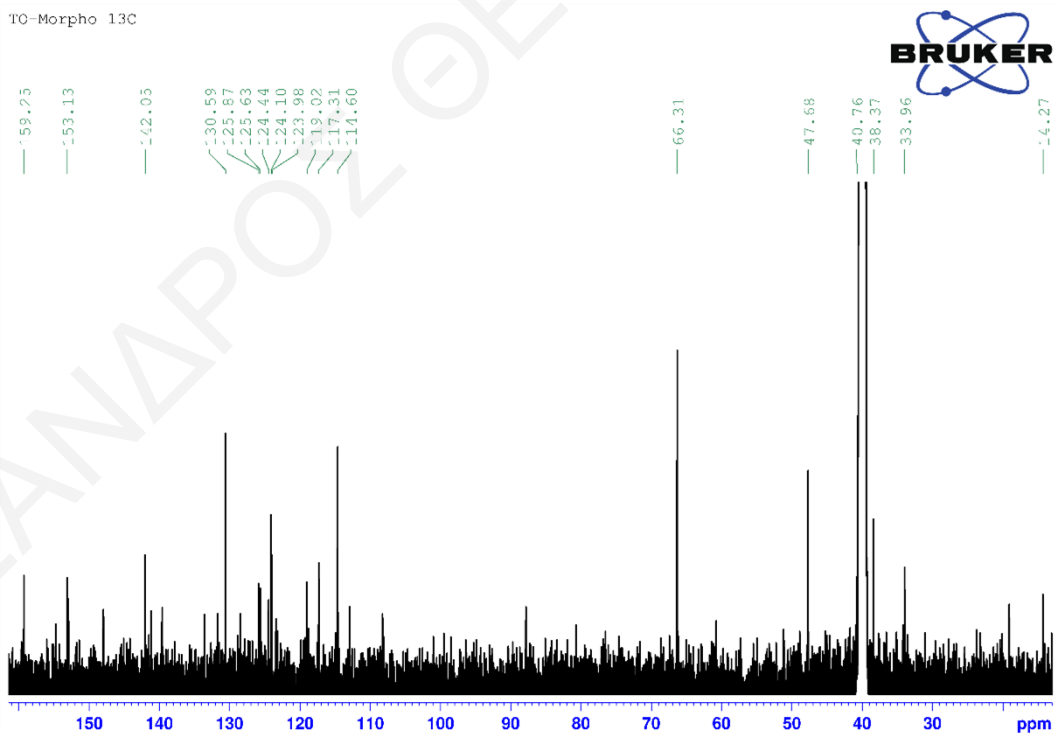
TO-BF HSQC



Σχήμα Π- 8: Φάσμα 2D-NMR HSQC του TO-BF.

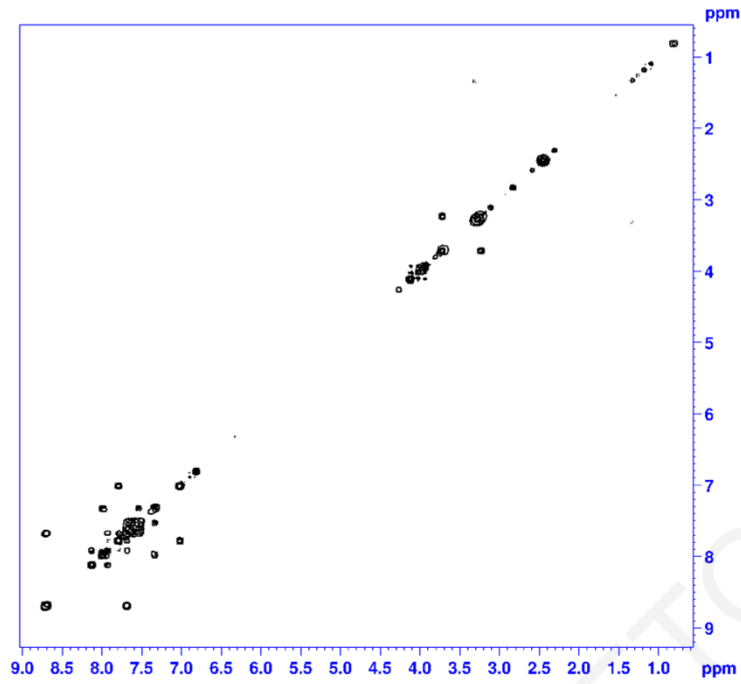


Σχήμα Π- 9: Φάσμα $^1\text{H-NMR}$ του TO-Morpho.



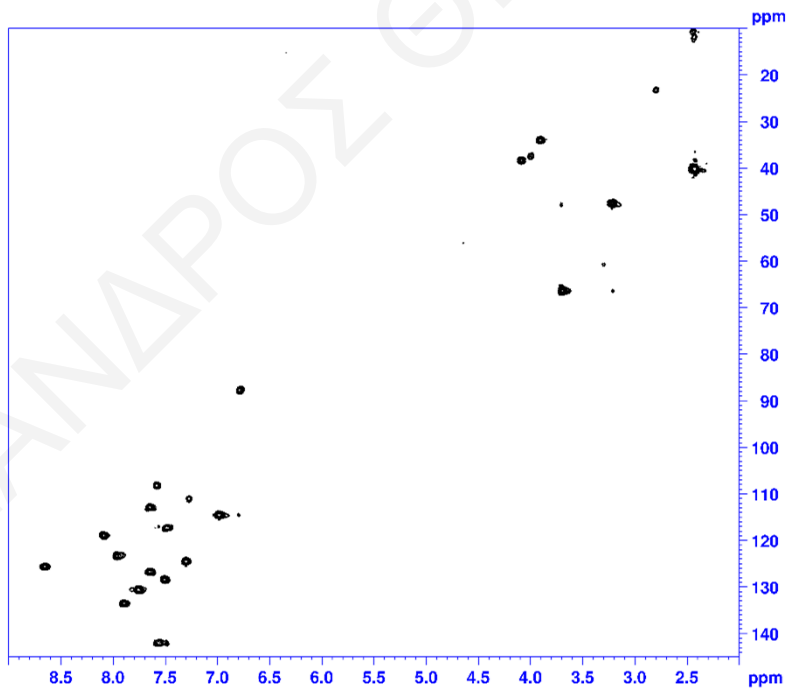
Σχήμα Π- 10: Φάσμα $^{13}\text{C-NMR}$ του TO-Morpho.

TC-Morpho COSY

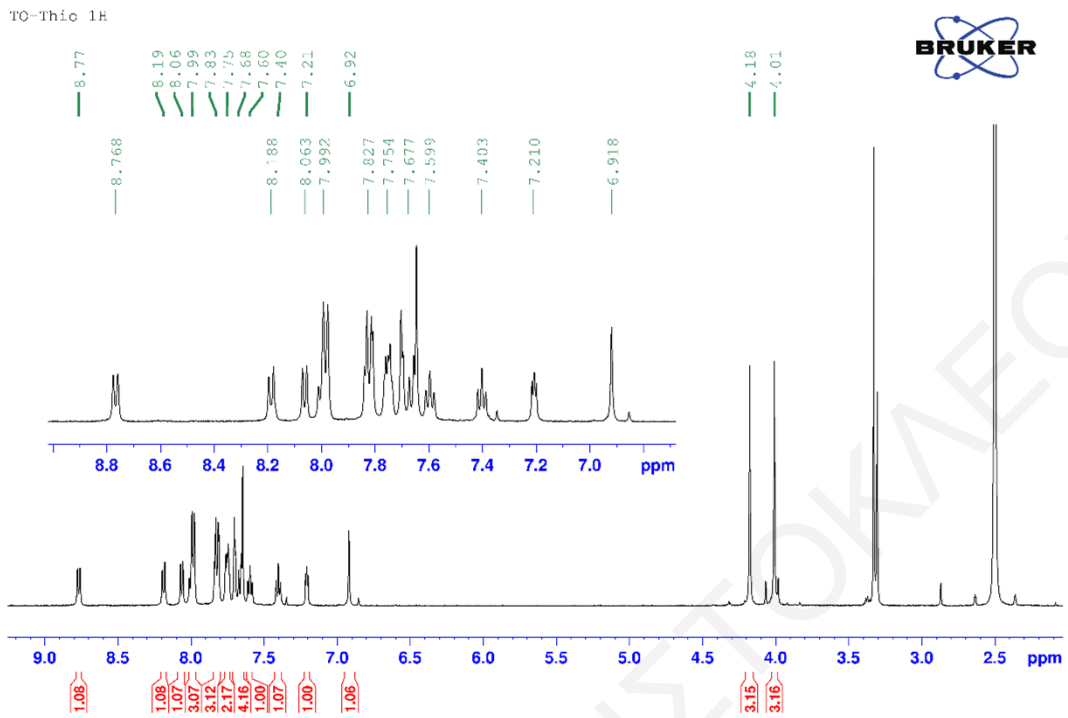


Σχήμα Π- 11: Φάσμα 2D-NMR COSY του TO-Morpho.

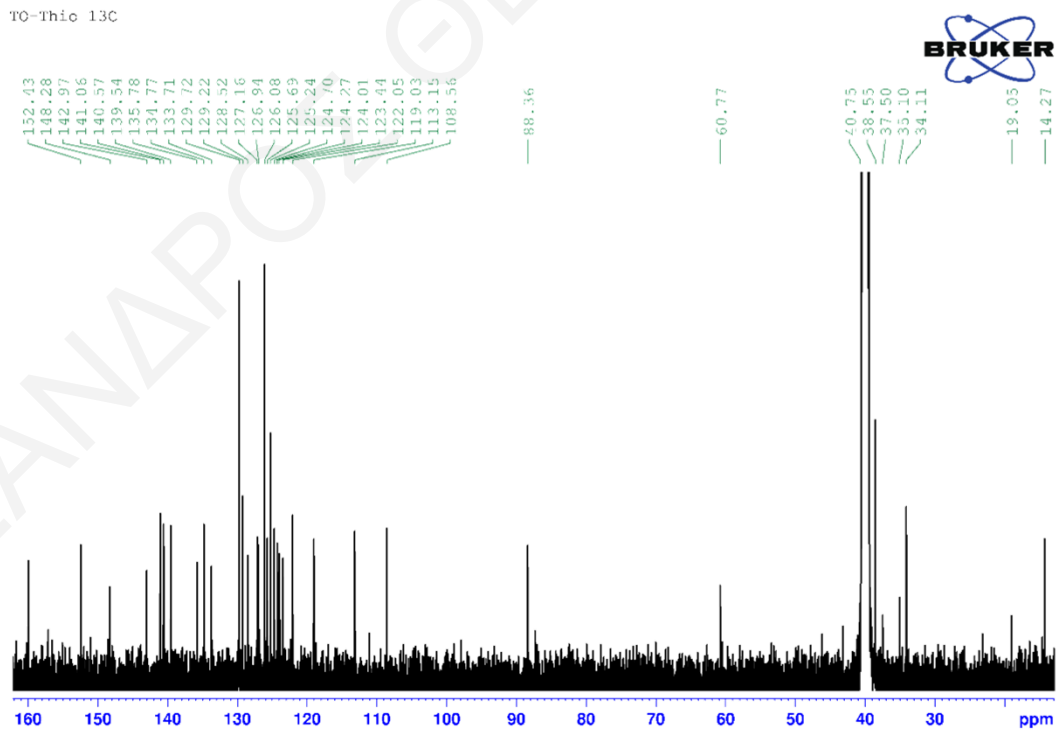
TC-Morpho HSQC



Σχήμα Π- 12: Φάσμα 2D-NMR HSQC του TO-Morpho.

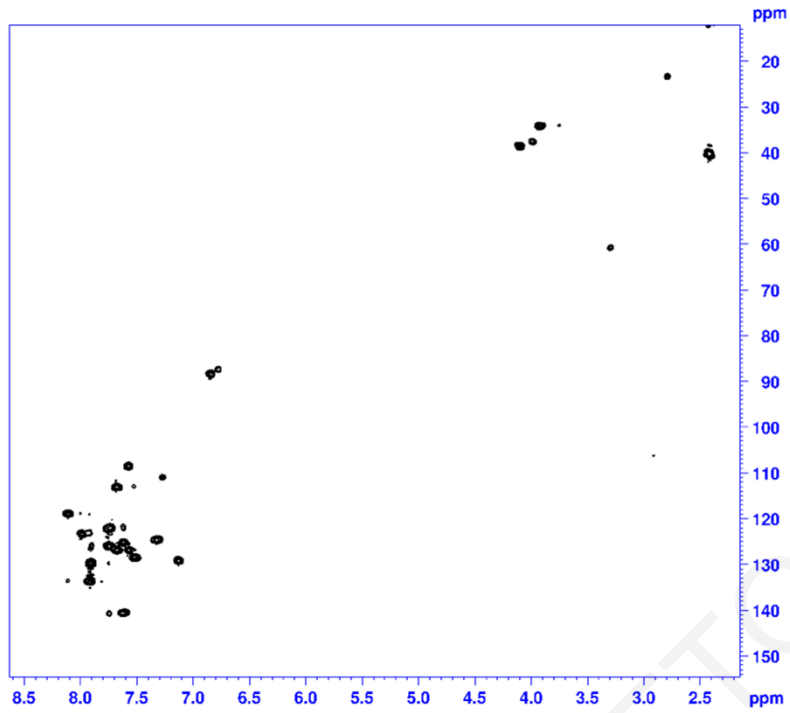


Σχήμα Π- 13: Φάσμα 1H-NMR του TO-Thio.



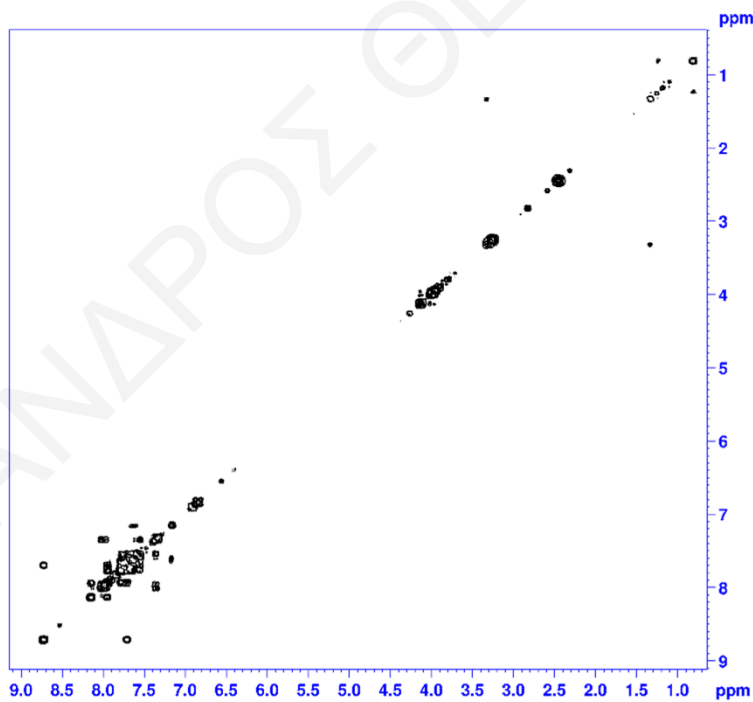
Σχήμα Π- 14: Φάσμα 13C-NMR του TO-Thio.

TO-Thio HSQC



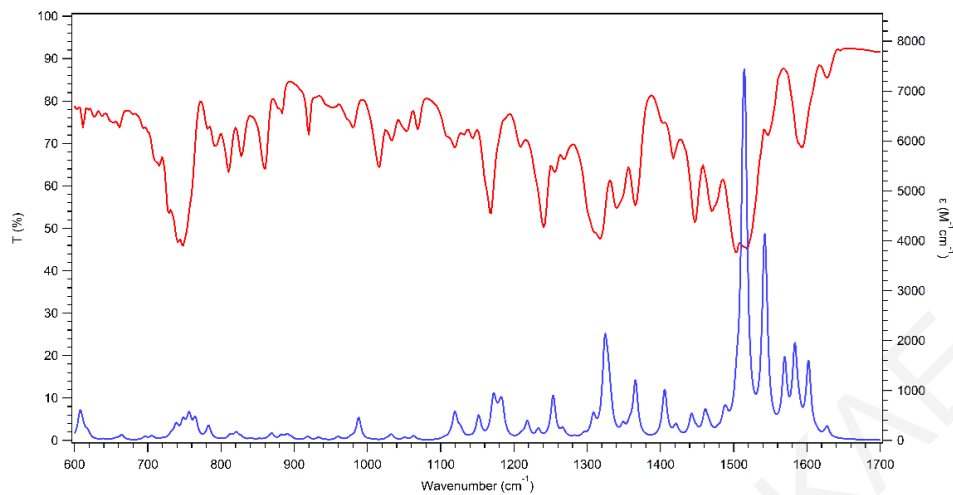
Σχήμα Π- 15: Φάσμα 2D-NMR COSY του TO-Thio.

TO-Thio COSY

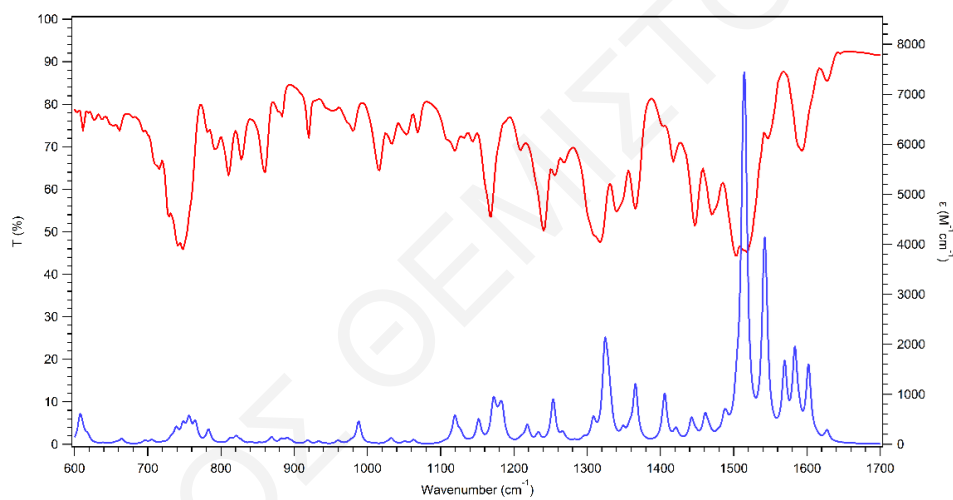


Σχήμα Π- 16: Φάσμα 2D-NMR HSQC του TO-Thio.

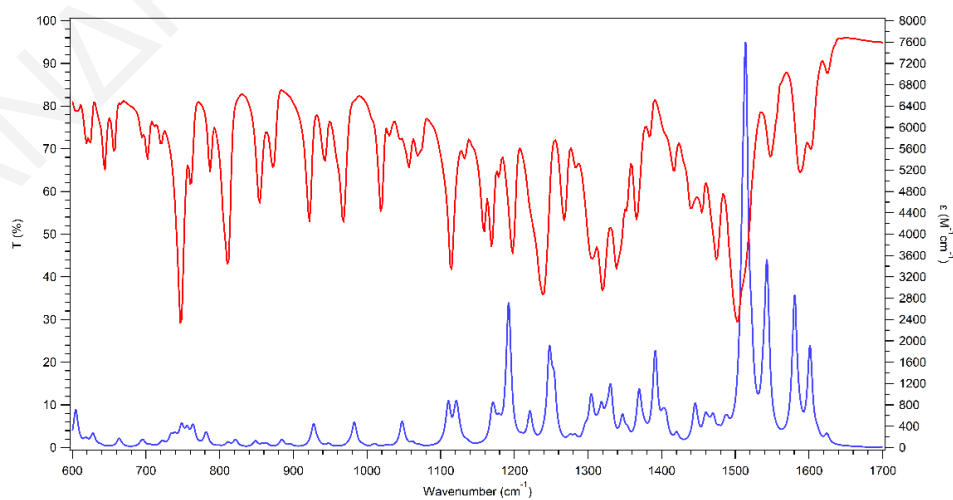
VI.B. Φασματοσκοπία IR



Σχήμα Π- 17: Πειραματικό (κόκκινο) και θεωρητικό (μπλε) φάσμα IR του TO-BF.



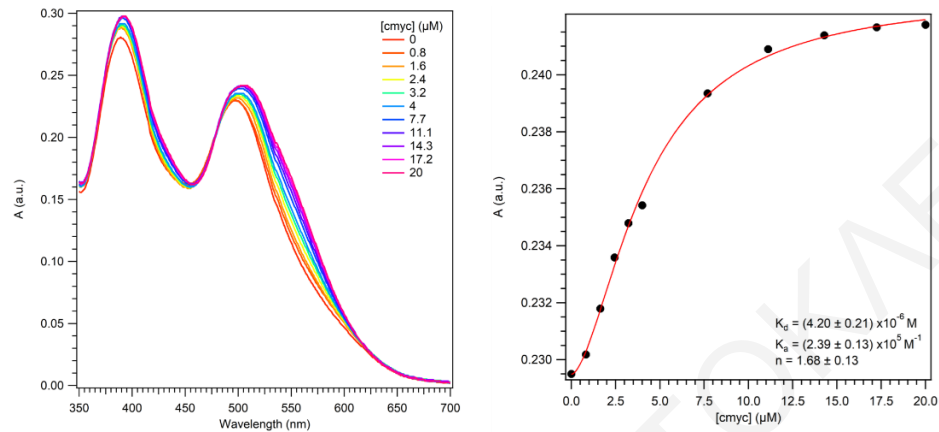
Σχήμα Π- 18: Πειραματικό (κόκκινο) και θεωρητικό (μπλε) φάσμα IR του TO-Morpho.



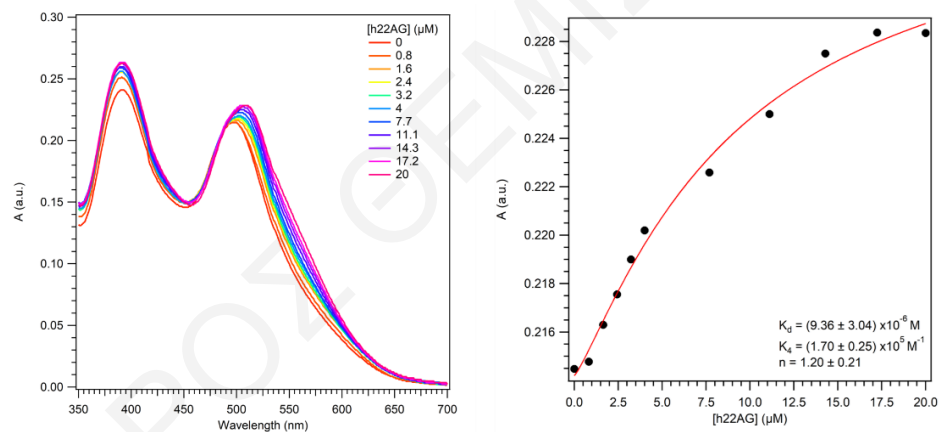
Σχήμα Π- 19: Πειραματικό (κόκκινο) και θεωρητικό (μπλε) φάσμα IR του TO-Thio.

VI.C. Τιτλοδοτήσεις UV-Vis

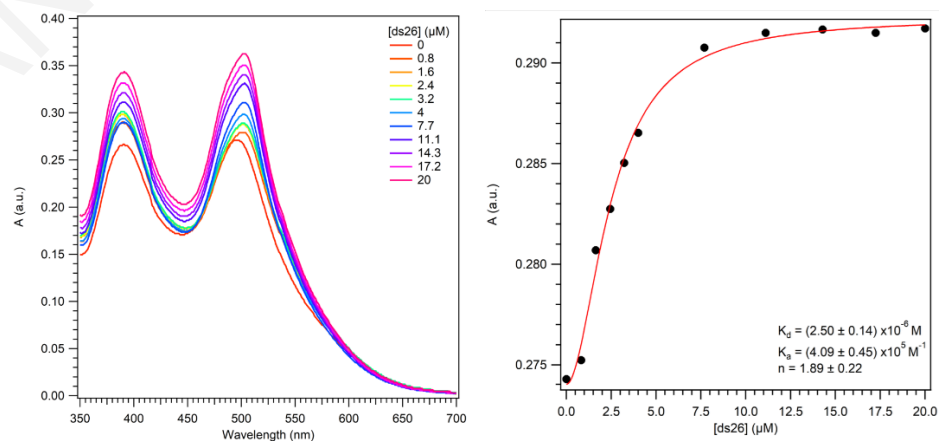
VI.C.1. Τιτλοδοτήσεις TO-BF



Σχήμα Π- 20: Τιτλοδότηση απορρόφησης για το TO-BF (~20 μM , 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με c-mys.

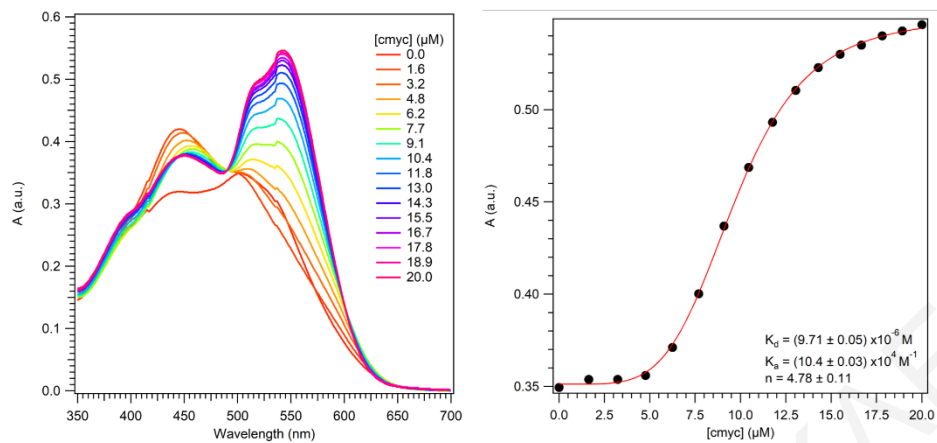


Σχήμα Π- 21: Τιτλοδότηση απορρόφησης για το TO-BF (~20 μM , 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με h22AG.

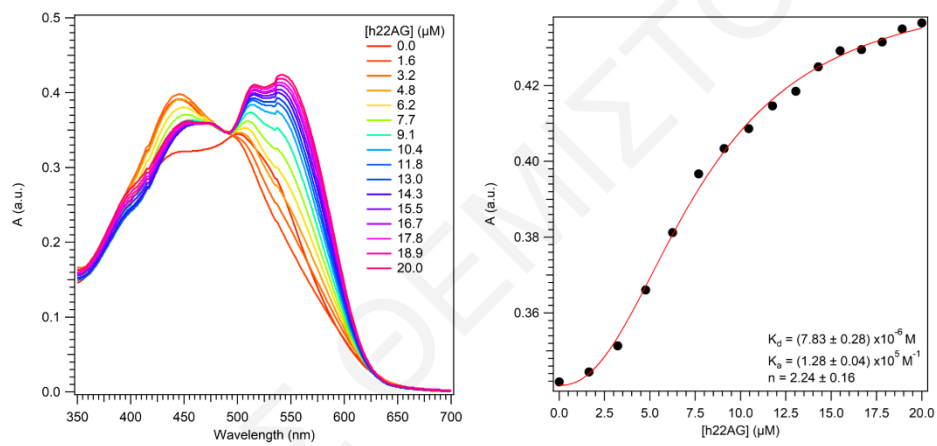


Σχήμα Π- 22: : Τιτλοδότηση απορρόφησης για το TO-BF (~20 μM , 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με ds26.

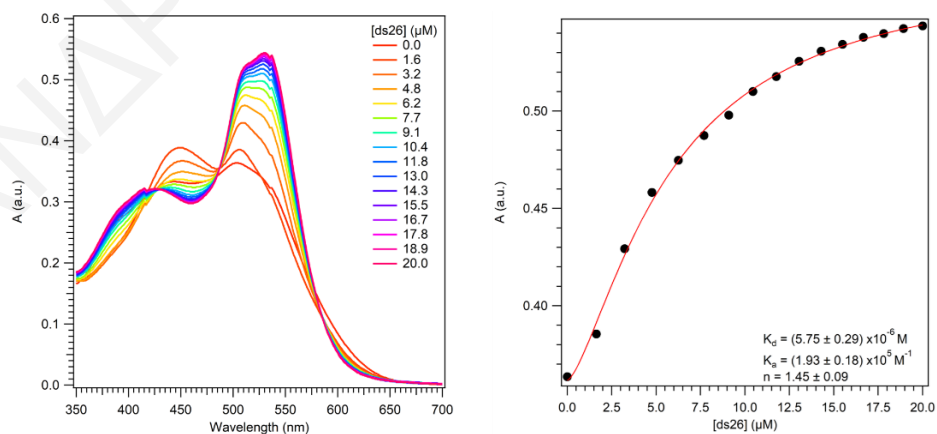
VI.C.2. Τιτλοδοτήσεις TO-Morpho



Σχήμα Π- 23: Τιτλοδότηση απορρόφησης για το TO-Morpho (~20 μM , 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με c-myc.

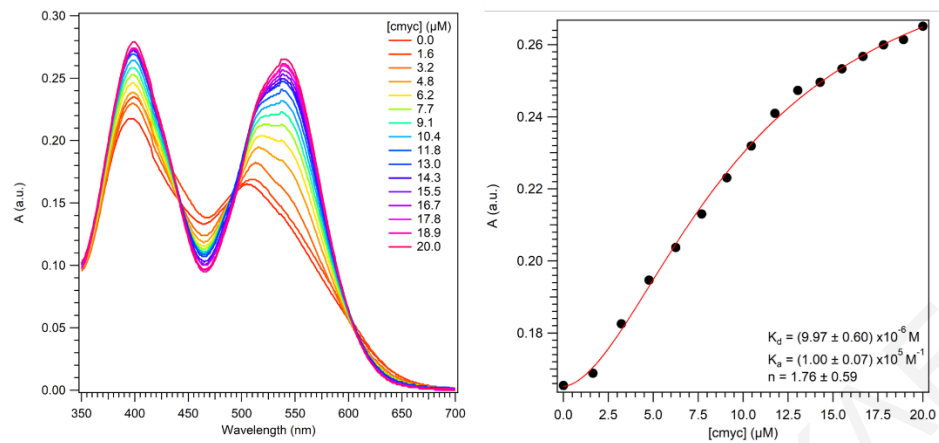


Σχήμα Π- 24: Τιτλοδότηση απορρόφησης για το TO-Morpho (~20 μM , 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με h22AG.

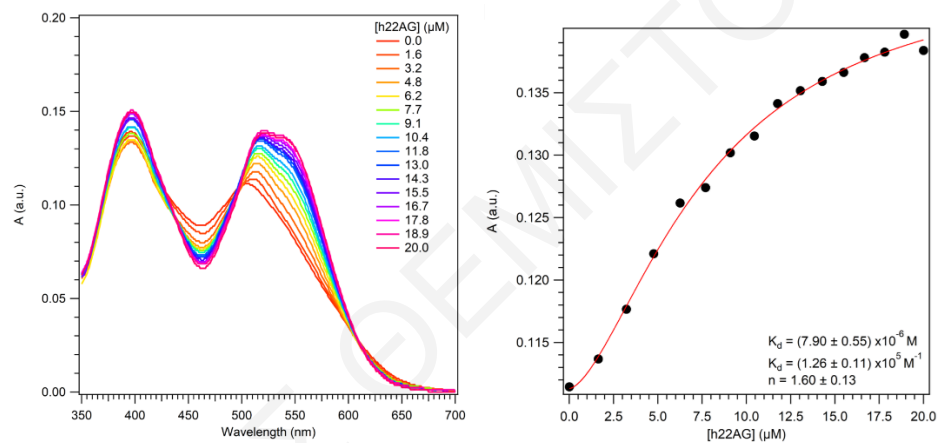


Σχήμα Π- 25: Τιτλοδότηση απορρόφησης για το TO-Morpho (~20 μM , 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με ds26.

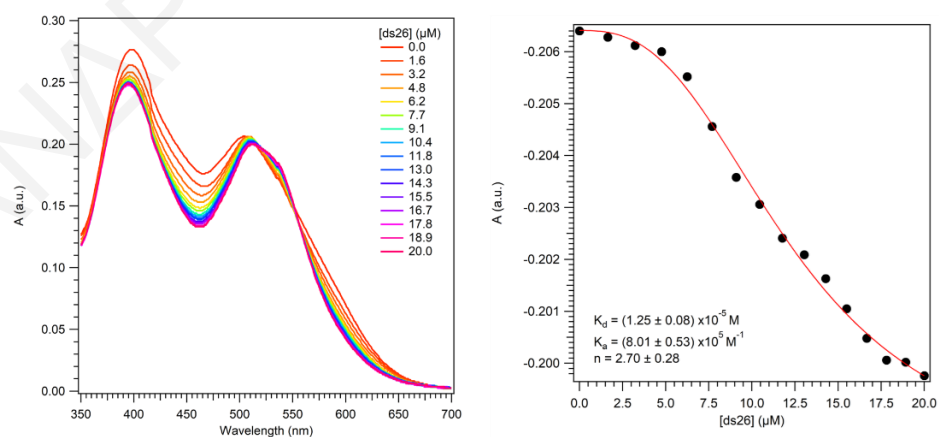
VI.C.3. Τιτλοδοτήσεις TO-Thio



Σχήμα II- 26: Τιτλοδότηση απορρόφησης για το TO-Thio (~20 μM , 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με c-myc.

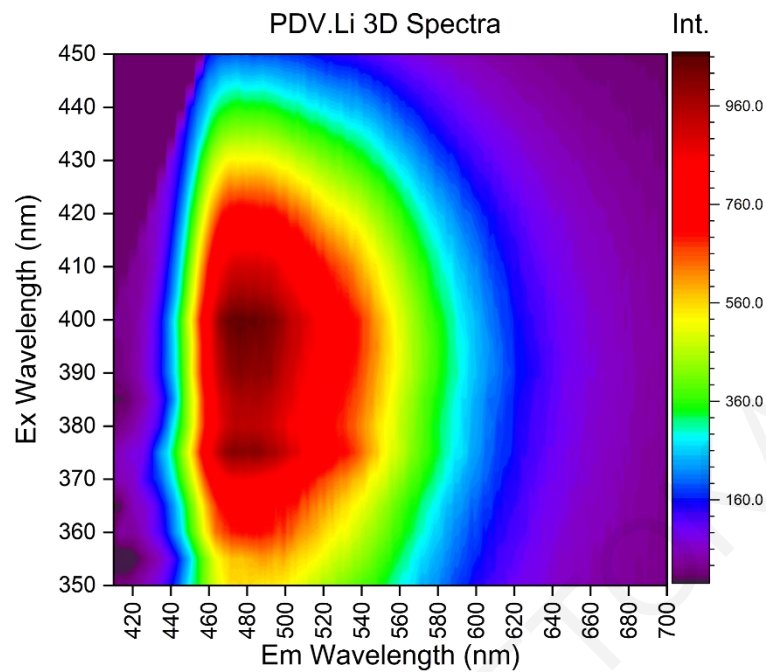


Σχήμα II- 27: Τιτλοδότηση απορρόφησης για το TO-Thio (~20 μM , 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με h22AG.

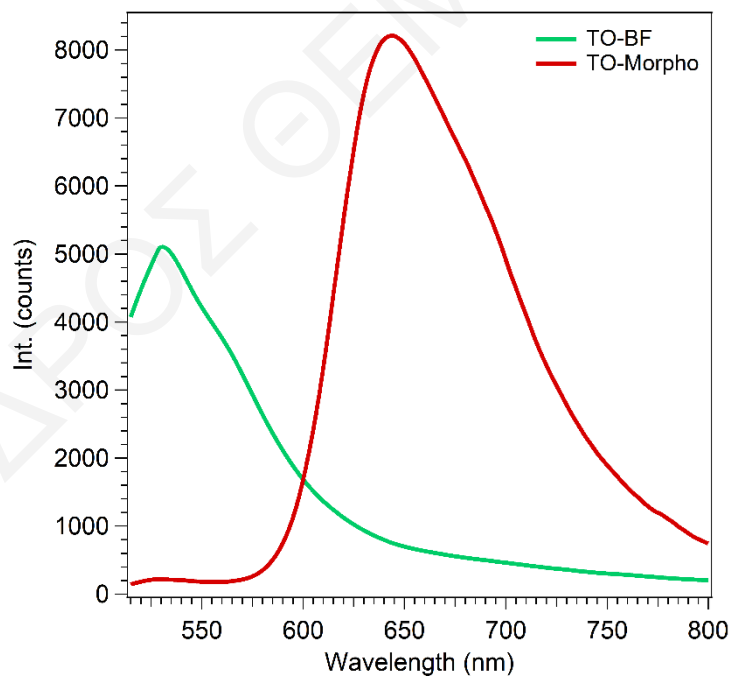


Σχήμα II- 28: Τιτλοδότηση απορρόφησης για το TO-Thio (~20 μM , 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με ds26.

VI.D. Τιτλοδοτήσεις Φθορισμού

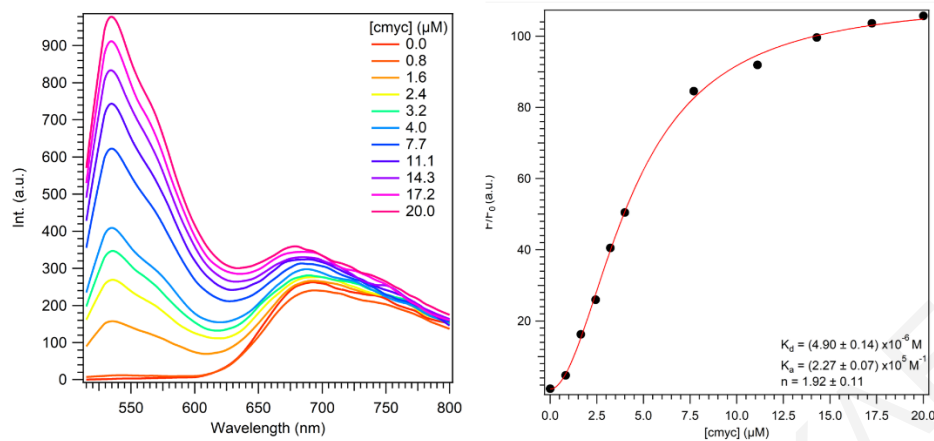


Σχήμα Π- 29: Τρισδιάστατο Φάσμα Εκπομπής του πολυμερούς PDV.Li. Με διέγερση στην περιοχή 390 - 410 nm έχουμε μέγιστη εκπομπή στην περιοχή 470 - 500 nm.

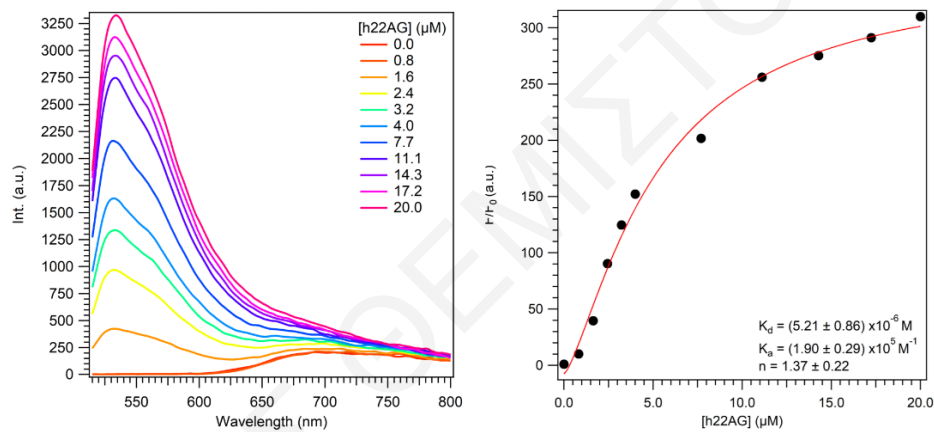


Σχήμα Π- 30: Ανίχνευση δύο καναλιών για ar22AG από ένα διάλυμα TO-BF και TO-Morpho.

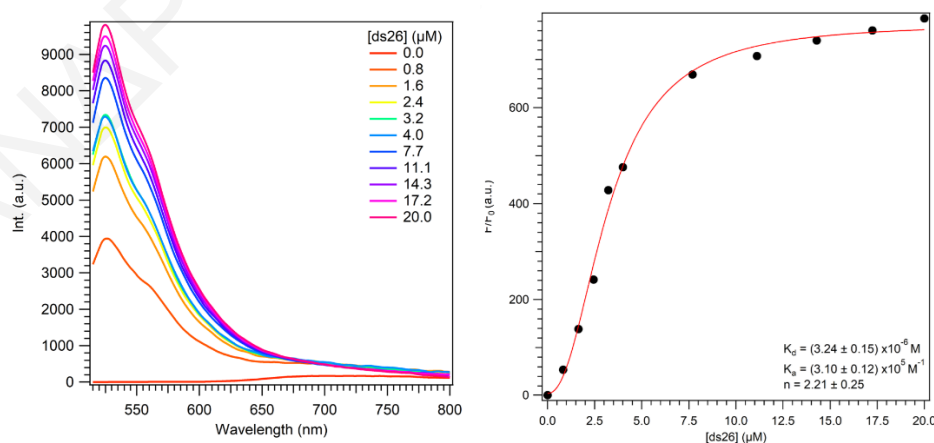
VI.D.1. Τιτλοδοτήσεις TO-BF



Σχήμα II- 31: Τιτλοδότηση φθορισμού για το TO-BF (~20 μM , 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με c-myc.

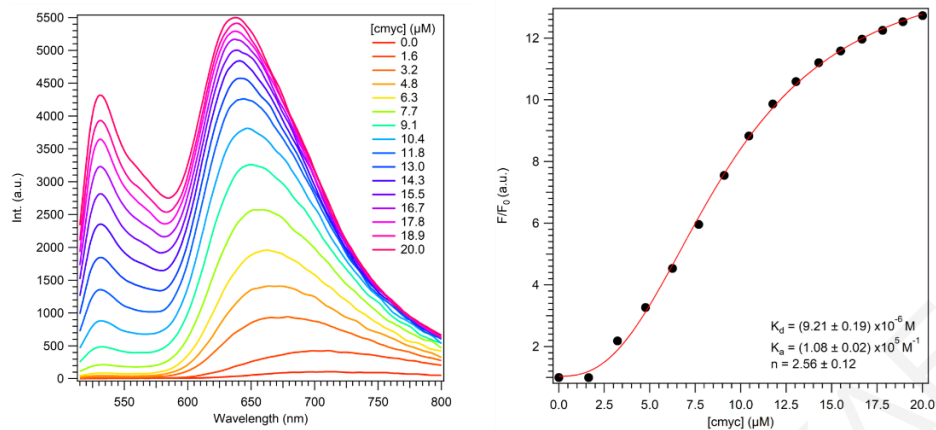


Σχήμα II- 32: Τιτλοδότηση φθορισμού για το TO-BF (~20 μM , 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με h22AG.

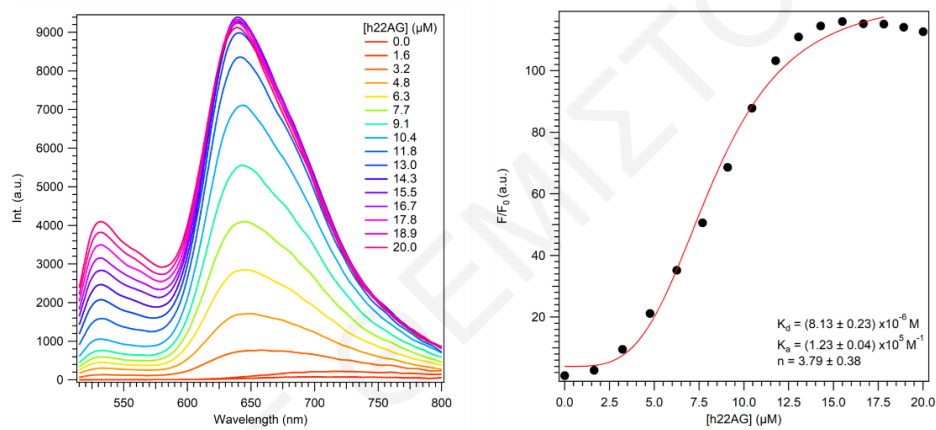


Σχήμα II- 33: Τιτλοδότηση φθορισμού για το TO-BF (~20 μM , 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με ds26.

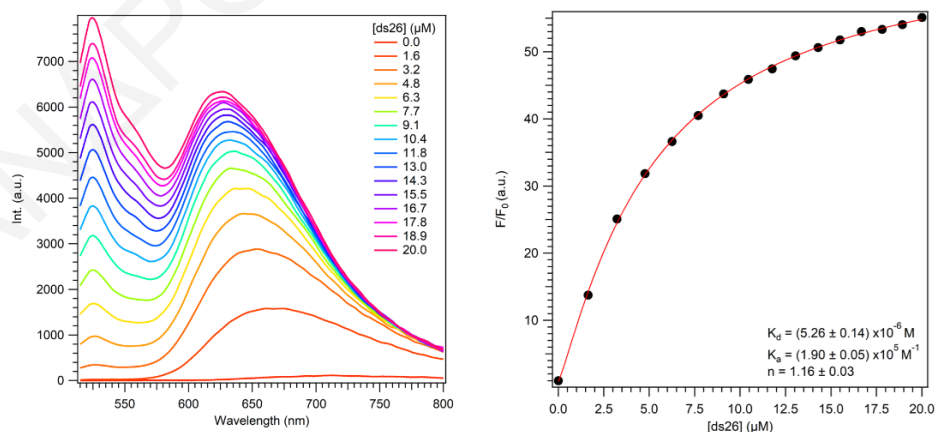
VI.D.2. Τιτλοδοτήσεις TO-Morpho



Σχήμα II- 34: Τιτλοδότηση φθορισμού για το TO-Morpho (~20 μM , 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με c-myc.

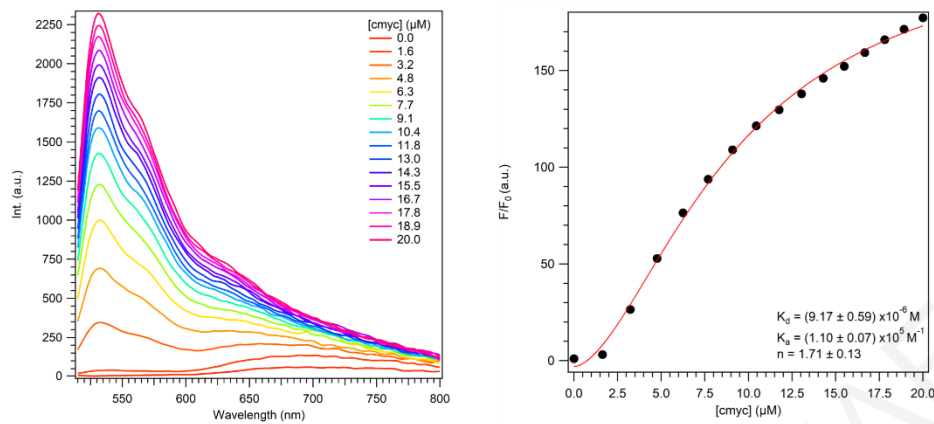


Σχήμα II- 35: Τιτλοδότηση φθορισμού για το TO-Morpho (~20 μM , 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με h22AG.

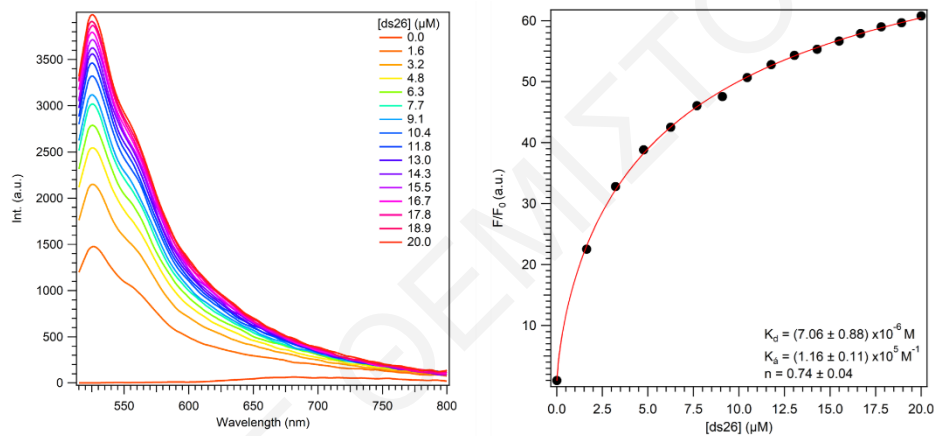


Σχήμα II- 36: Τιτλοδότηση φθορισμού για το TO-Morpho (~20 μM , 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με ds26.

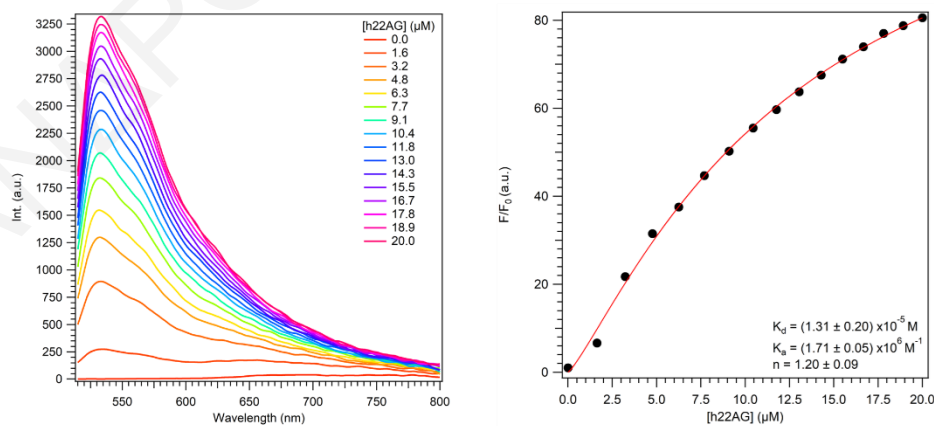
VI.D.3. Τιτλοδοτήσεις TO-Thio



Σχήμα Π- 37: Τιτλοδότηση φθορισμού για το TO-Thio (~20 μM, 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με c-myc.

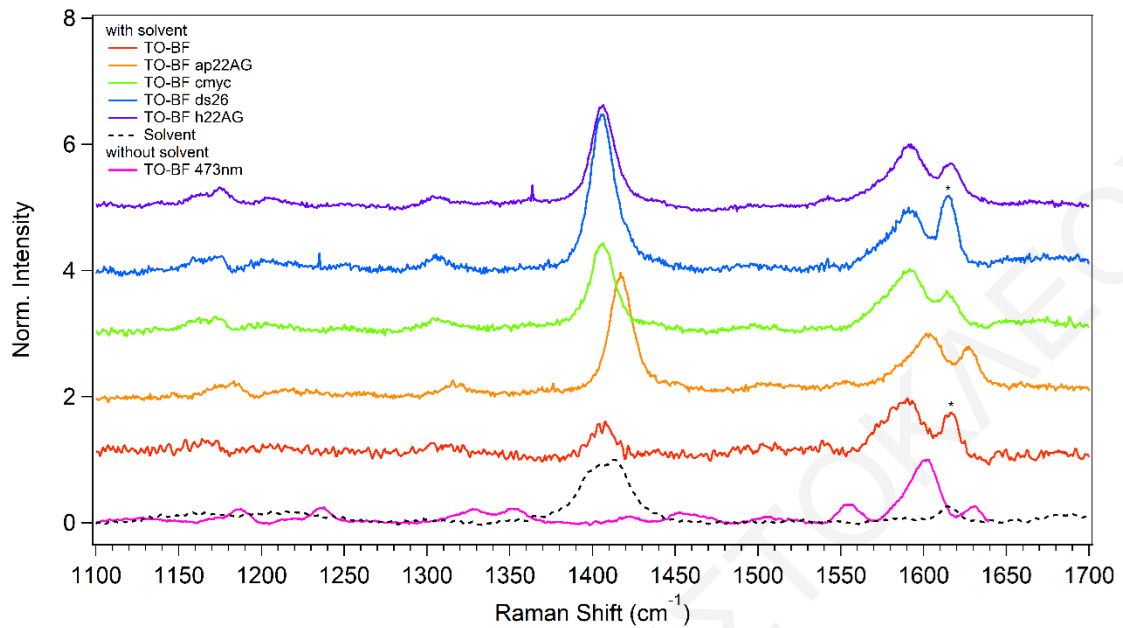


Σχήμα Π- 38: Τιτλοδότηση φθορισμού για το TO-Thio (~20 μM, 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με ds26.

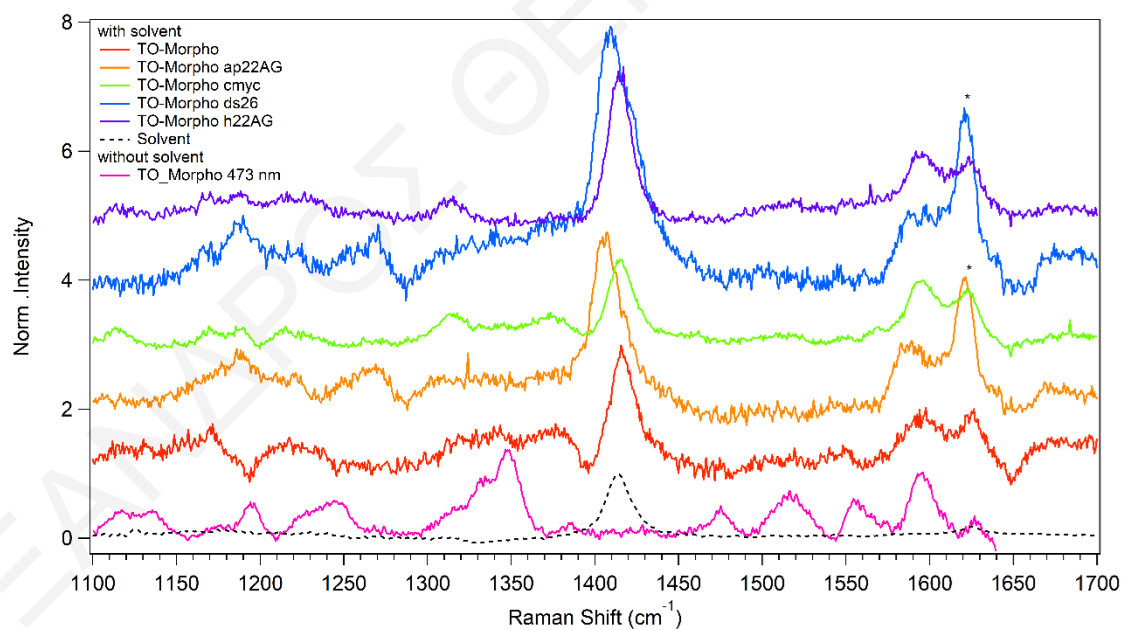


Σχήμα Π- 39: Τιτλοδότηση φθορισμού για το TO-Thio (~20 μM, 10 mM κακοδυλικό λίθιο ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.3, 100 mM KCl) με h22AG.

VI.E. Φάσματα Raman Συντονισμού των μορίων και των συμπλόκων τους με τα DNA



Σχήμα Π- 40: Φάσματα Vis-RR του TO-BF με διέγερση στα 473 nm (ροζ) και 405 nm και του συμπλόκου με τα DNA. Η κορυφή στους $\sim 1425 \text{ cm}^{-1}$ είναι κορυφή του διαλυτή και με αστερίσκο επισημαίνεται ένα τεχνούργημα.



Σχήμα Π- 41: Φάσματα Vis-RR του TO-BF με διέγερση στα 473 nm (ροζ) και 405 nm και του συμπλόκου με τα DNA. Η κορυφή στους $\sim 1425 \text{ cm}^{-1}$ είναι κορυφή του διαλυτή και με αστερίσκο επισημαίνεται ένα τεχνούργημα.

VI.E.1. Ταυτοποίηση κορυφών βάσει των θεωρητικών φασμάτων

Πίνακας Π- 1: Ταυτοποίηση Όλων των Κορυφών του φάσματος Raman του TO-BF βάσει του θεωρητικού υπολογισμού DFT/B3LYP).

Μετατόπιση Raman (cm^{-1})		Ανάθεση
Πειρ.	Θεωρ.	
609	611	vinyl h out of plane bend
627	615	vinyl h out of plane bend
	621	vinyl h out of plane bend
682	668	quinoline's 3h out of plane bend
	700	benzothiazole asymmetric in-plane bend
977	993	double bond symmetric out of plane bend
	1013	bf in-plane bend
1126	1125	quinoline's methyl group out of plane bend
	1158	bf in-plane bend
1170	1183	bf 3h in-plane bend
1185	1187	quinoline in-plane bend
	1190	benzene symmetric in-plane bend
1237	1225	quinoline's 2h in-plane bend
	1240	double bond symmetric in-plane bend
1268	1262	bf bend
1327	1314	double bond bend
1351	1338	benzene asymmetric in-plane bend
	1340	quinoline asymmetric stretch
1374	1365	bf asymmetric stretch
1420	1413	benzothiazole's methyl group umbrella bend
	1450	bf bend
1452	1469	quinoline's methyl group umbrella bend
	1495	quinoline's & benzothiazole's methyl group scissor bend
1504	1512	benzene bend
	1523	vinyl stretch
1553	1578	c=c bf stretch
1600	1592	c=c quinoline benzene double bond bf stretch
	1610	c=c benzene stretch

Πίνακας Π- 2: Ταυτοποίηση Όλων των Κορυφών του φάσματος Raman του TO-Morpho βάσει του θεωρητικού υπολογισμού DFT/B3LYP).

Μετατόπιση Raman (cm^{-1})		Ανάθεση
Πειρ.	Θεωρ.	
623	616	vinyl h out of plane bend
642	640	morpholine h bend
861	874	double bond out of plane bend / morpholine bend
1059	1067	morpholine ben
1117	1124	quinoline's methyl group out of plane bend
	1131	morpholine bend
1136	1140	benzothiazole's methyl group bend
	1141	morpholine strech
	1143	quinoline's methyl group bend
1174	1192	benzothiazole asymmetric in-plane bend
	1196	benzene bend / morpholine strech
1194	1201	quinoline in-plane bend
	1214	benzene symmetric in-plane bend
1246	1244	3 h quinoline bend
	1249	morpholine bend
1330	1328	double bond bend
1347	1355	benzene asymmetric in-plane bend
	1356	quinoline asymmetric strech
1384	1395	vinyl bend
1421	1428	morpholine bend
1475	1472	benzothiazole's methyl group / quinoline umbrella bend
	1474	quinoline's methyl group umbrella bend
	1488	morpholine bend
	1491	benzothiazole's methyl group scissor
1516	1497	morpholine scissor
	1516	quinoline's methyl group out of plane bend
	1542	vinyl strech
1554	1566	benzene strech
	1571	quinoline strech
1596	1609	double bond strech
	1615	benzothiazole strech
1627	1631	quinoline double bond strech












Πίνακας Π- 3: Ταυτοποίηση Όλων των Κορυφών του φάσματος Raman του TO-Thio βάσει του θεωρητικού υπολογισμού DFT/B3LYP).

<i>Μετατόπιση Raman (cm⁻¹)</i>		<i>Ανάθεση</i>
<i>Πειρ.</i>	<i>Θεωρ.</i>	
680	675	3 h quinoline out of plane bend
746	744	thiophene in-plane bend
	754	benzene out of plane bend
801	797	quinoline out of plane bend
858	843	thiophene benzene out of plane bend
	868	3 h quinoline out of plane bend
978	967	thiophene in-plane bend
	1005	double bond symmetric out of plane bend
1054	1079	thiophene symmetric in-plane bend
1104	1111	thiophene symmetric in-plane bend
1132	1140	quinoline's methyl group out of plane bend
	1194	benzothiazole asymmetric in-plane bend
1188	1202	quinoline in-plane bend
	1208	benzene symmetric in-plane bend
1211	1230	thiophene in-plane bend
1217	1232	vinyl in-plane bend
	1241	3 h quinoline in-plane bend
1304	1323	benzothiazole stretch
	1333	double bond in-plane bend
1326	1348	benzothiazole stretch
	1353	benzene asymmetric / double bond in-plane bend
1427	1446	quinoline's methyl group umbrella bend
	1449	thiophene stretch
1451	1474	quinoline's methyl group umbrella bend
	1487	benzothiazole in-plane bend
1502	1542	vinyl stretch
1553	1559	thiophene benzene double bond stretch coj
	1570	quinoline stretch
1599	1612	benzene double bond quinoline stretch coj
	1614	benzothiazole stretch
1627	1630	benzene double bond quinoline stretch coj
	1640	quinoline stretch

VI.F. Υπολογιστική Μοντελοποίηση και Μοριακή Προσομοίωση

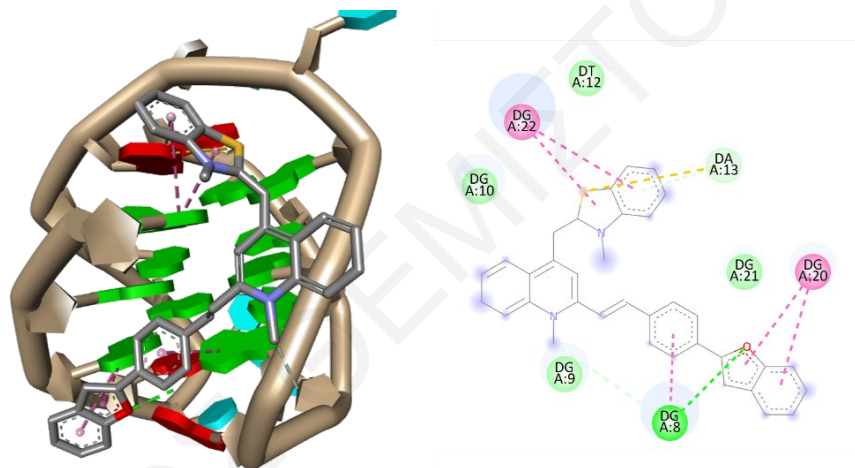
VI.F.1. Μοριακή πρόσδεση στα μοντέλα DNA

Αλληλεπιδράσεις

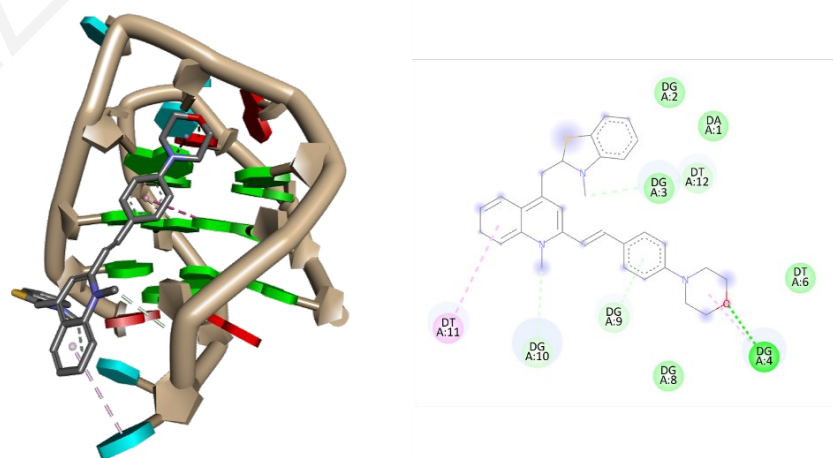
 van der Waals	 π-Δότης Δεσμού Υδρογόνου	 π-π Στοιβαξη
 Συμβατικός Δεσμός Υδρογόνου	 π-Θείο	 π-Ανιόν
 Δεσμός Υδρογόνου Άνθρακα	 π-π σχήματος T	 π-Άλκυλιο
 π-σ	 Θείο-Χ	

Σχήμα Π- 42: Υπόμνημα Μοριακών Αλληλεπιδράσεων.

VI.F.1.a. Μοριακή Πρόσδεση στο μοντέλο ap22AG

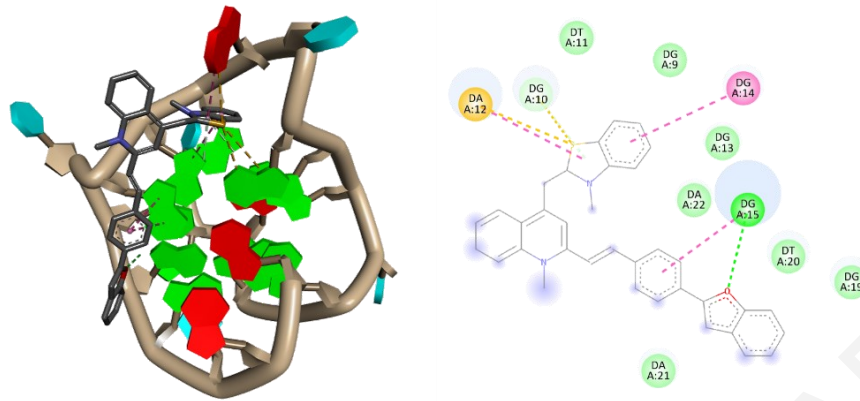


Σχήμα Π- 43: Αριστερά: Αποτέλεσμα της Μοριακής πρόσδεσης του TO-BF στην αντιπαράλληλη τετραπλή έλικα που σχηματίζεται από την τελομερική αλληλουχία (ap22AG). Δεξιά: Δυσδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ του TO-BF και του ap22AG.

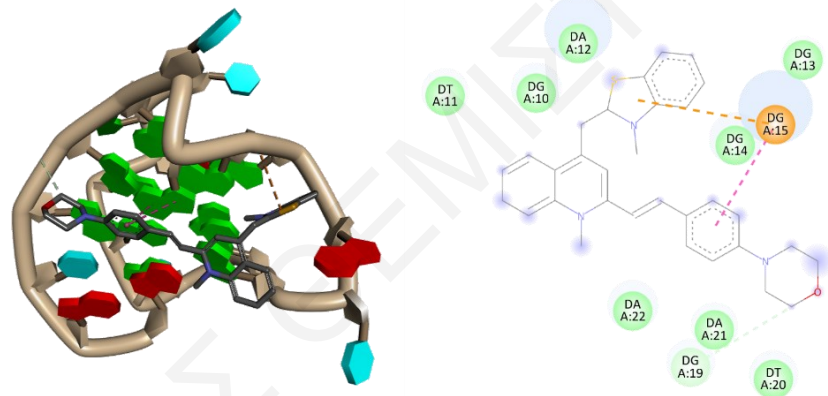


Σχήμα Π- 44: Αριστερά: Αποτέλεσμα της Μοριακής πρόσδεσης του TO-Morpho στην αντιπαράλληλη τετραπλή έλικα που σχηματίζεται από την τελομερική αλληλουχία (ap22AG). Δεξιά: Δυσδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ του TO-Morpho και του ap22AG.

VI.F.1.b. Μοριακή Πρόσδεση στο μοντέλο c-myc

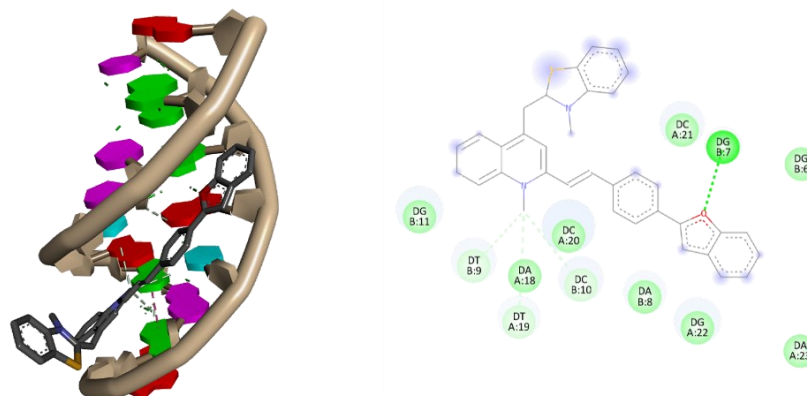


Σχήμα II- 45: Αριστερά: Αποτέλεσμα της Μοριακής πρόσδεσης του TO-BF στην παράλληλη τετραπλή έλικα που σχηματίζεται από τον προαγωγέα ογκογονιδίου c-myc. Δεξιά: Δυσδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ του TO-BF και του c-myc.

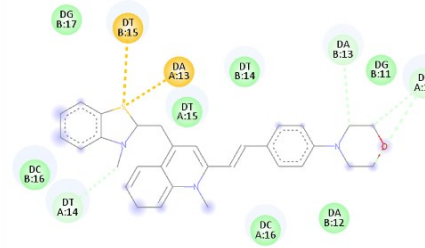
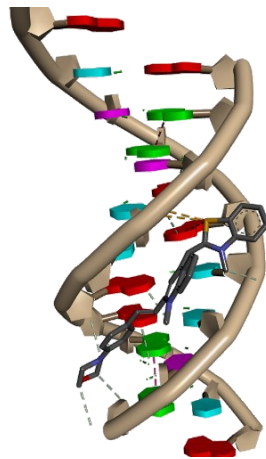


Σχήμα II- 46: Αριστερά: Αποτέλεσμα της Μοριακής πρόσδεσης του TO-Morpho στην παράλληλη τετραπλή έλικα που σχηματίζεται από τον προαγωγέα ογκογονιδίου c-myc. Δεξιά: Δυσδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ του TO-Morpho και του c-myc.

VI.F.1.c. Μοριακή Πρόσδεση στο μοντέλο ds26

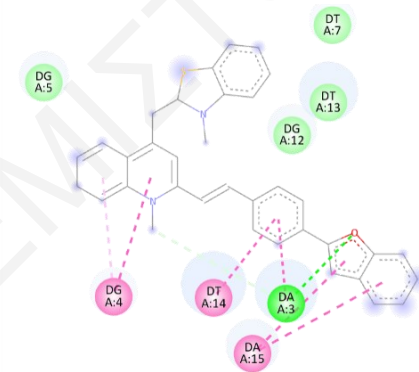
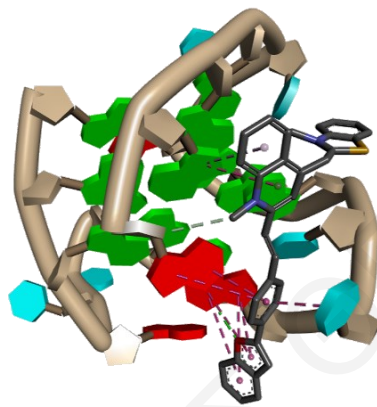


Σχήμα II- 47: Αριστερά: Αποτέλεσμα της Μοριακής πρόσδεσης του TO-BF στο μοντέλο διπλής έλικας (ds26). Δεξιά: Δυσδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ του TO-BF και του ds26.

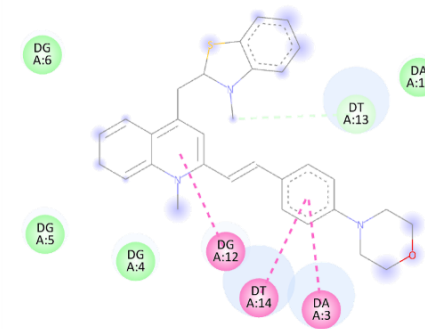
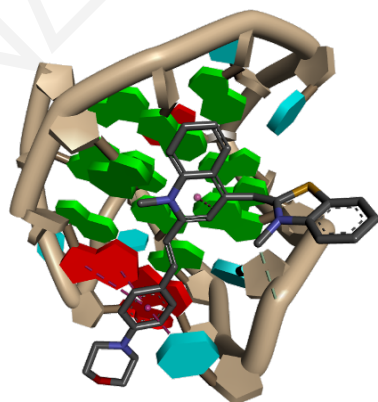


Σχήμα Π- 48: Αριστερά: Αποτέλεσμα της Μοριακής πρόσδεσης του TO-Morpho στο μοντέλο διπλής έλικας (ds26). Δεξιά: Δυσδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ του TO-Morpho και του ds26.

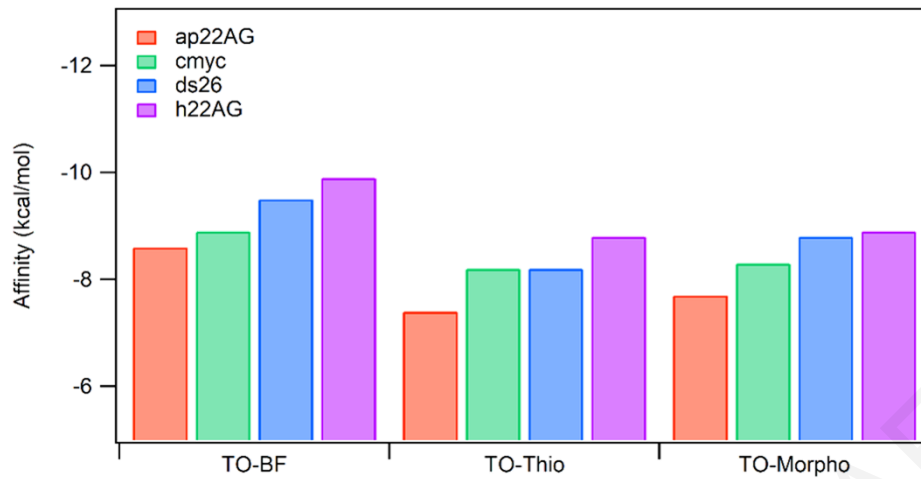
VI.F.1.d. Μοριακή Πρόσδεση στο μοντέλο h22AG



Σχήμα Π- 49: Αριστερά: Αποτέλεσμα της Μοριακής πρόσδεσης του TO-BF στην υβριδική τετραπλή έλικα που σχηματίζεται από την τελομερική αλληλουχία (h22AG). Δεξιά: Δυσδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ του TO-BF και του h22AG.

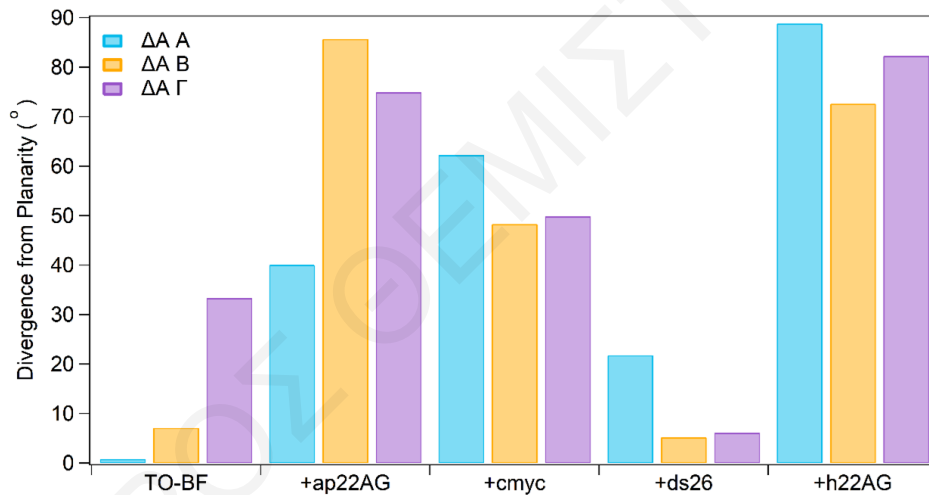


Σχήμα Π- 50: Αριστερά: Αποτέλεσμα της Μοριακής πρόσδεσης του TO-Morpho στην υβριδική τετραπλή έλικα που σχηματίζεται από την τελομερική αλληλουχία (h22AG). Δεξιά: Δυσδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ του TO-Morpho και του h22AG.

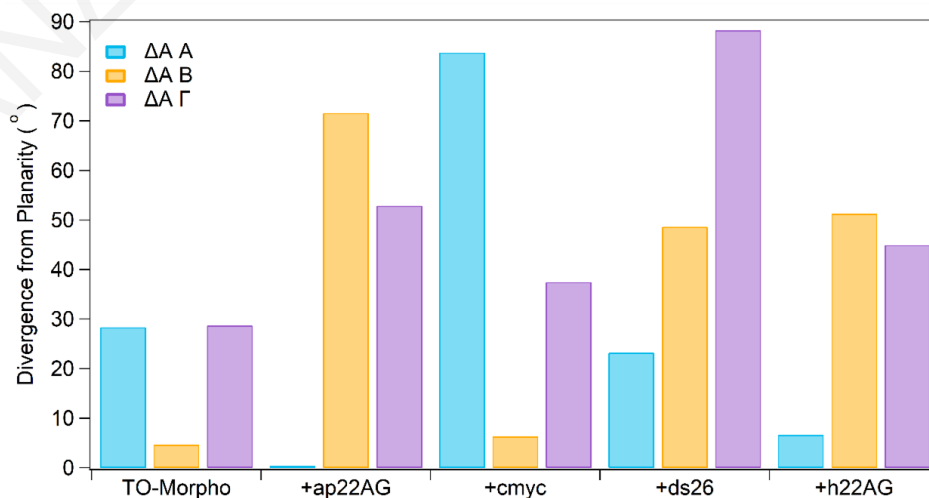


Σχήμα Π- 51: Σύγκριση τιμών συγγένειας (σε μονάδες ενέργειας) των μικρών μορίων με τα διάφορα DNA, όπως αυτές υπολογίστηκαν από τις μοριακές προσομοιώσεις πρόσδεσης.

VI.F.2. Διέδρες Γωνίες και Συζυγακό Σύστημα



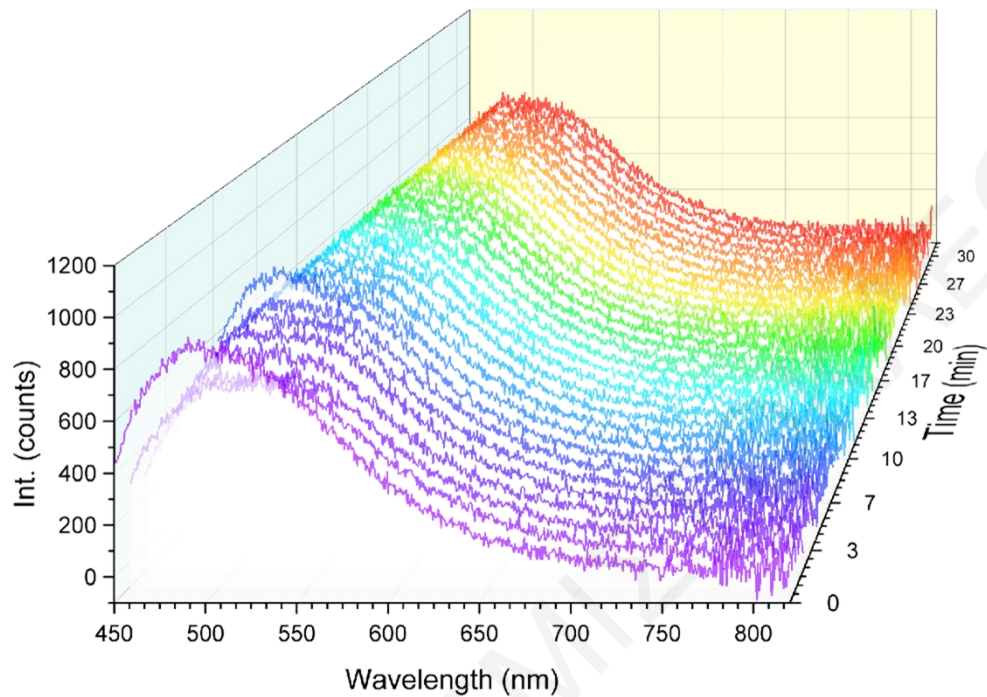
Σχήμα Π- 52: Αποκλίσεις των διεδρων γωνιών του TO-BF από την επιπεδότητα πριν και μετά την αλληλεπίδραση με τα μοντέλα DNA.



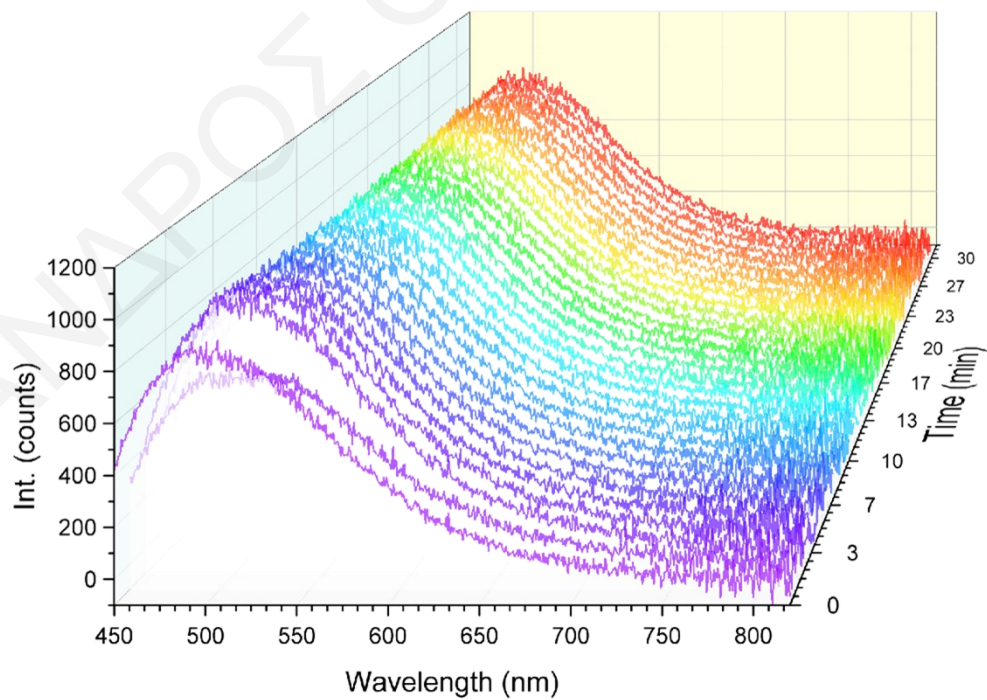
Σχήμα Π- 53: Αποκλίσεις των διεδρων γωνιών του TO-Morpho από την επιπεδότητα πριν και μετά την αλληλεπίδραση με τα μοντέλα DNA.

VI.G. Χρονικά Φάσματα Ελέγχου Λειτουργίας Βιοαισθητήρα

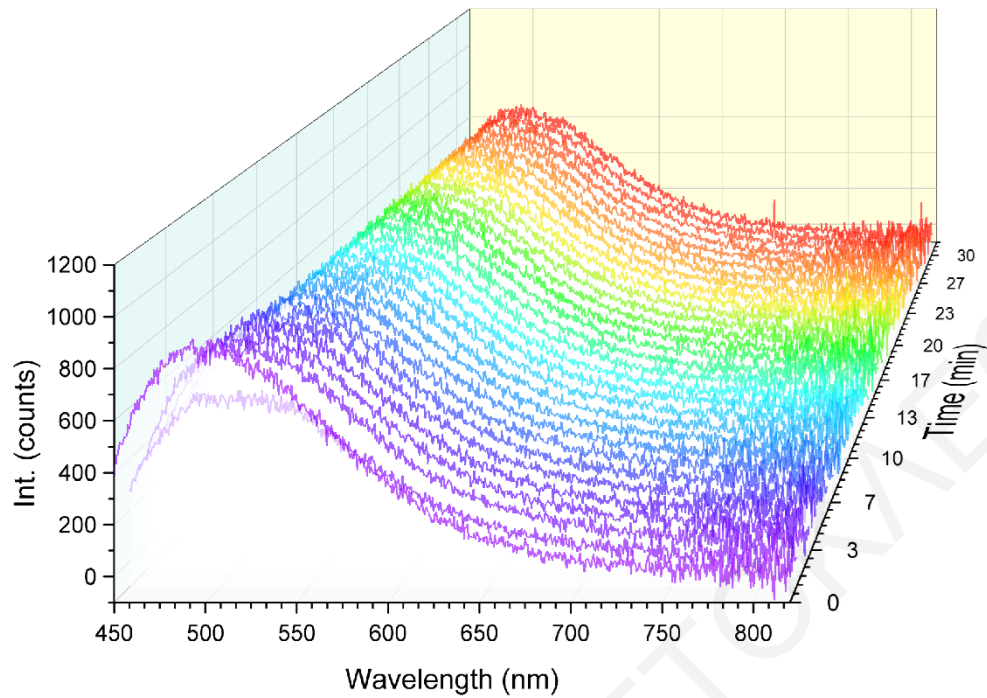
VI.G.1. Έλεγχος Βιοαισθητήρα με TO-BF



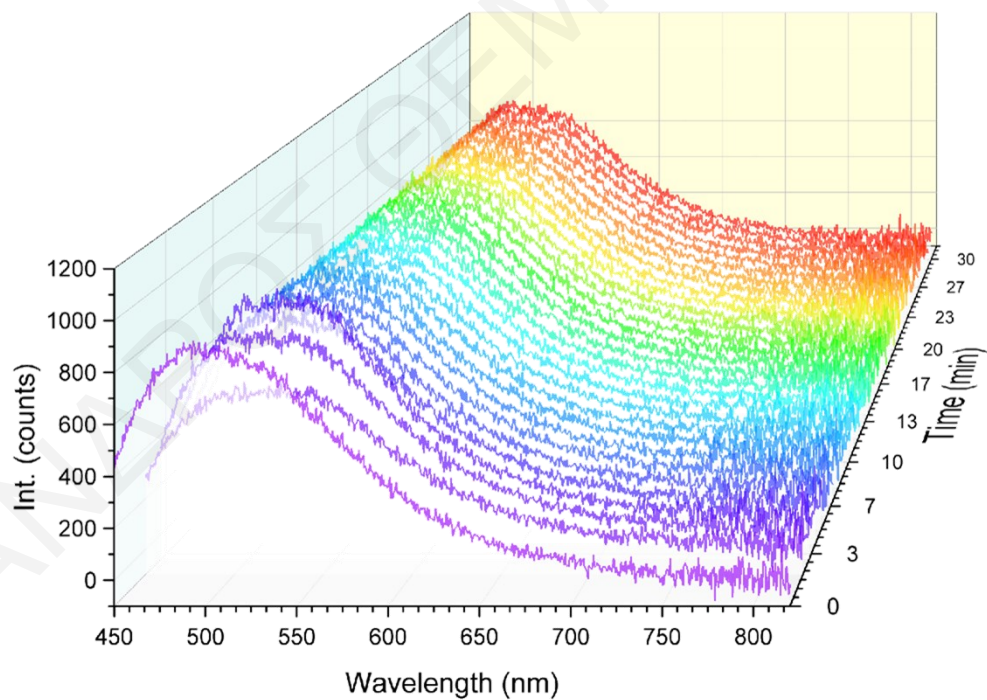
Σχήμα Π- 54: Χρονικό φάσμα βιοαισθητήρα με TO-BF και ar22AG. Πρώτο φάσμα: 16 nM PDV.Li. Δεύτερο Φάσμα: προσθήκη 49 nM TO-BF. Τρίτο Φάσμα: προσθήκη 1.5 μ M ar22AG.



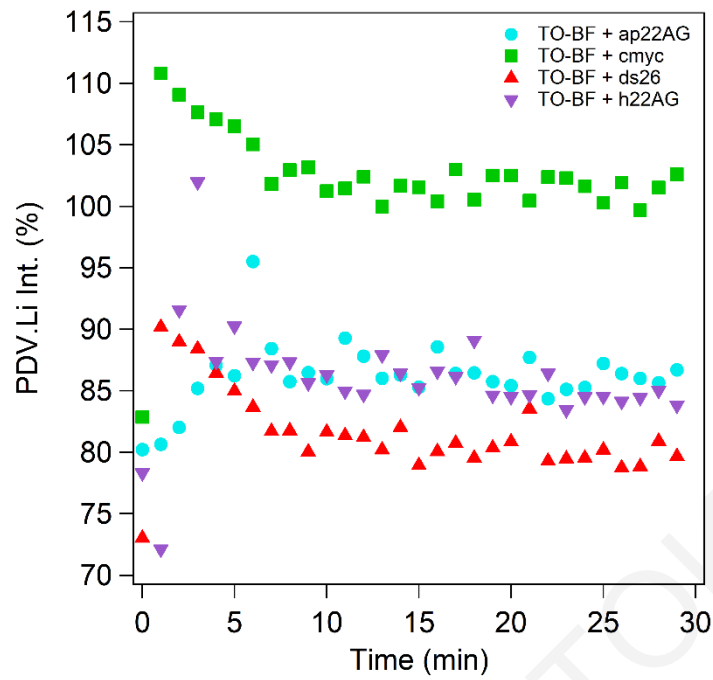
Σχήμα Π- 55: Χρονικό φάσμα βιοαισθητήρα με TO-BF και c-myc. Πρώτο φάσμα: 16 nM PDV.Li. Δεύτερο Φάσμα: προσθήκη 49 nM TO-BF. Τρίτο Φάσμα: προσθήκη 1.5 μ M c-myc.



Σχήμα Π- 56: Χρονικό φάσμα βιοαισθητήρα με TO-BF και ds26. Πρώτο φάσμα: 16 nM PDV.Li. Δεύτερο Φάσμα: προσθήκη 49 nM TO-BF. Τρίτο Φάσμα: προσθήκη 1.5 μ M ds26.

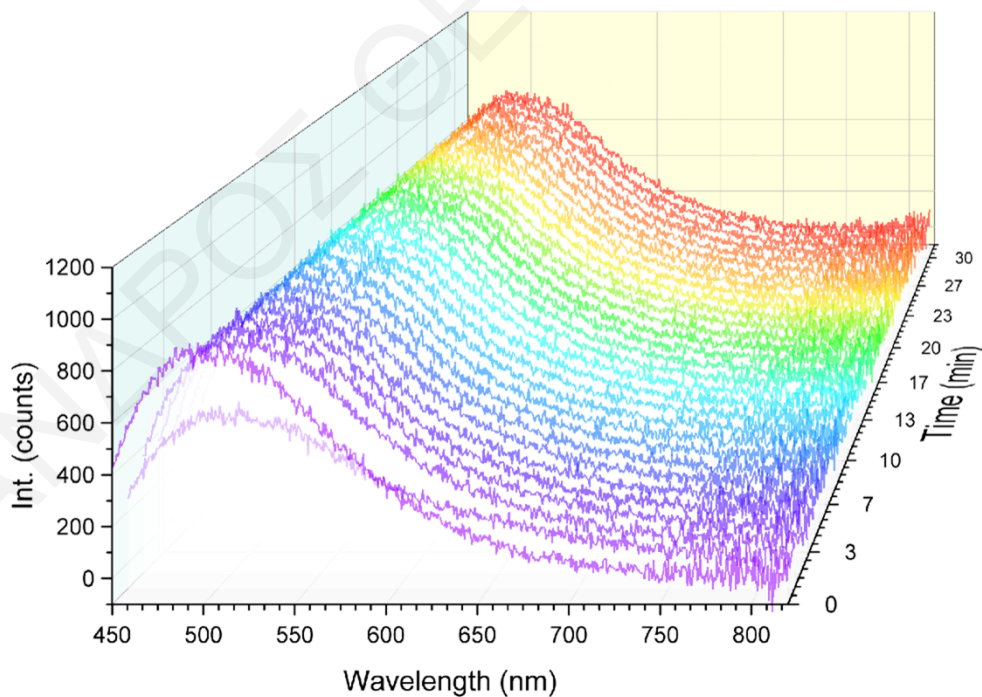


Σχήμα Π- 57: Χρονικό φάσμα βιοαισθητήρα με TO-BF και h22AG. Πρώτο φάσμα: 16 nM PDV.Li. Δεύτερο Φάσμα: προσθήκη 49 nM TO-BF. Τρίτο Φάσμα: προσθήκη 1.5 μ M h22AG.

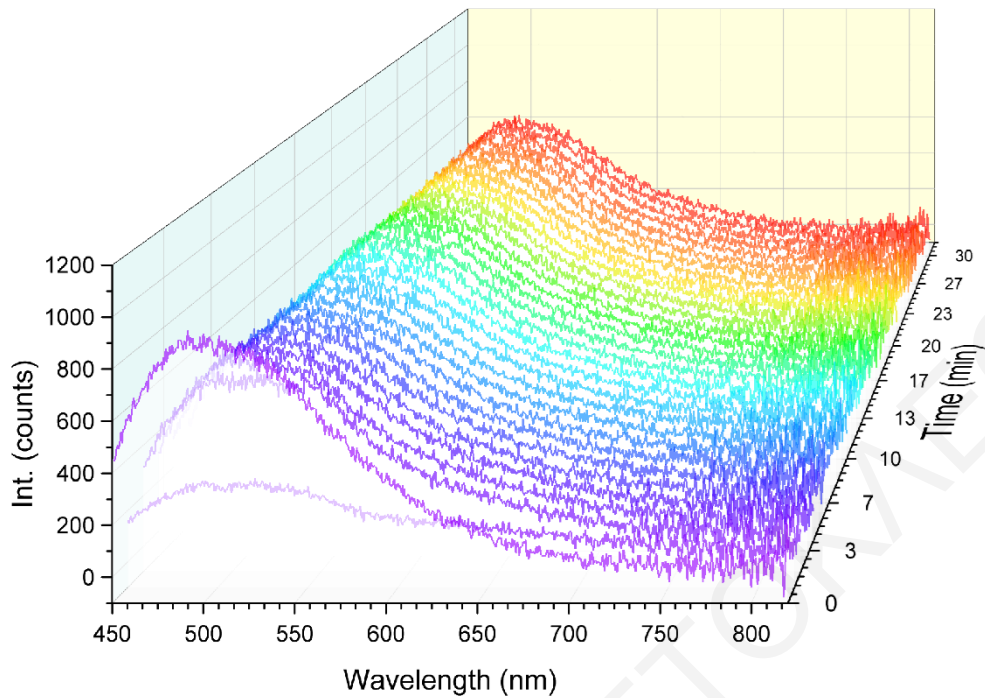


Σχήμα Π- 58: Σύγκριση έντασης φθορισμού στα 475 nm διαλύματος πολυμερούς PDV.Li και TO-BF μετά την προσθήκη διαφόρων DNA.

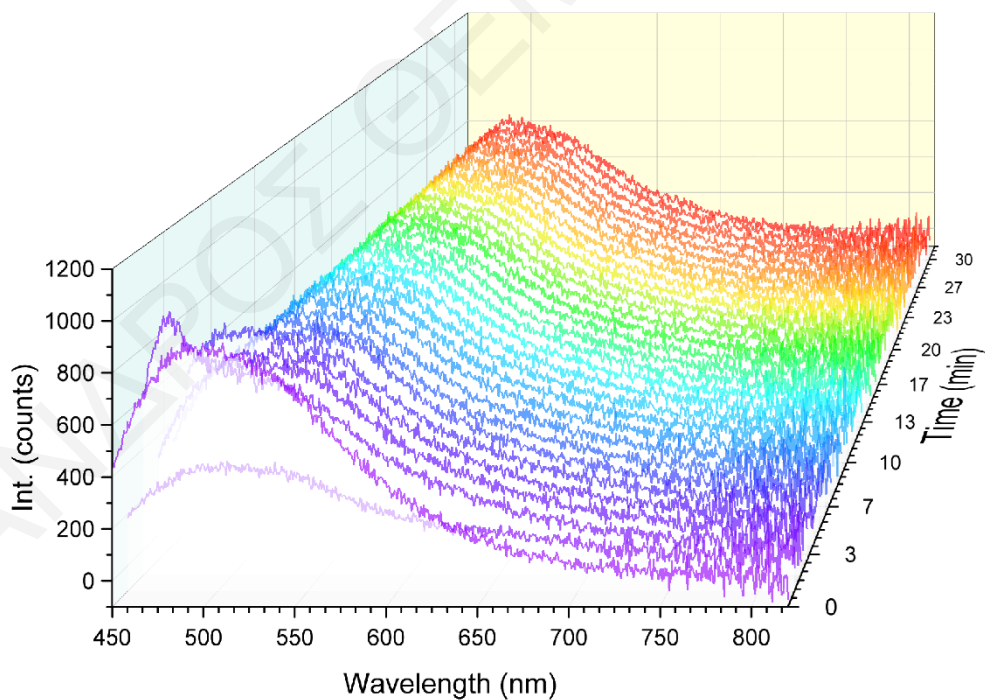
VI.G.2. Έλεγχος Βιοαισθητήρα με TO-Morpho



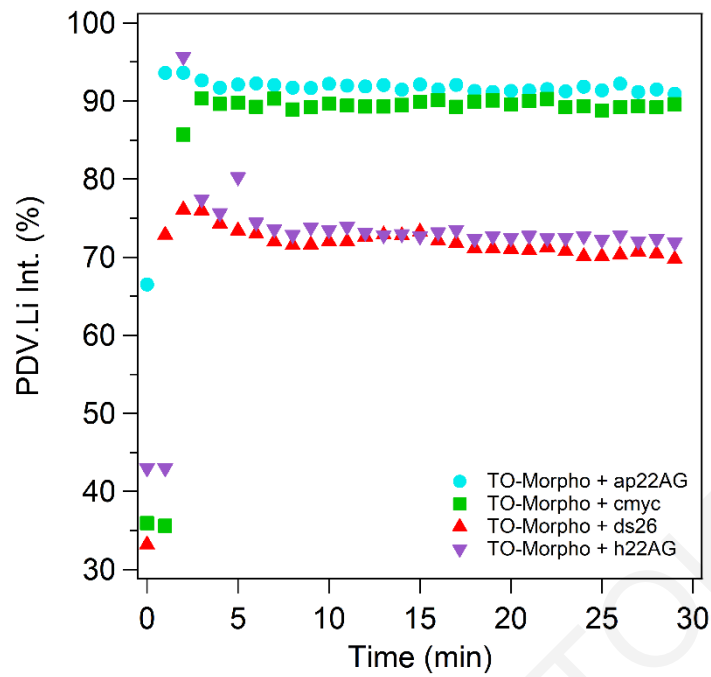
Σχήμα Π- 59: Χρονικό φάσμα βιοαισθητήρα με TO-Morpho και ap22AG. Πρώτο φάσμα: 16 nM PDV.Li. Δεύτερο Φάσμα: προσθήκη 49 nM TO-Morpho. Τρίτο Φάσμα: προσθήκη 1.5 μ M ap22AG.



Σχήμα Π- 60: Χρονικό φάσμα βιοαισθητήρα με TO-Mορφο και ds26. Πρώτο φάσμα: 16 nM PDV.Li. Δεύτερο Φάσμα: προσθήκη 49 nM TO-Mορφο. Τρίτο Φάσμα: προσθήκη 1.5 μ M ds26.

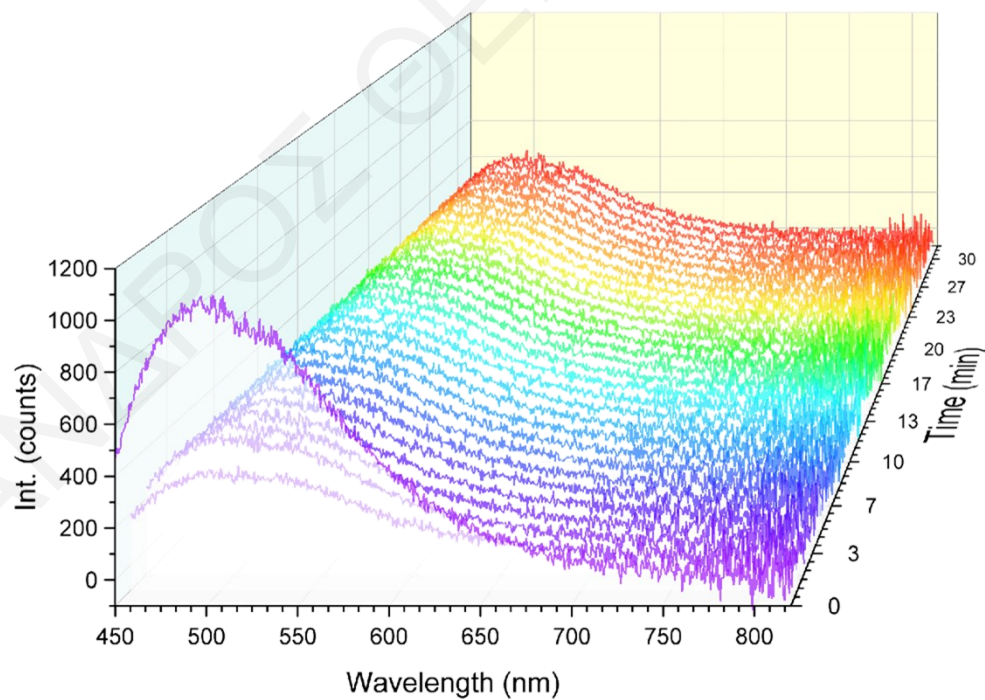


Σχήμα Π- 61: Χρονικό φάσμα βιοαισθητήρα με TO-Mορφο και h22AG. Πρώτο φάσμα: 16 nM PDV.Li. Δεύτερο Φάσμα: προσθήκη 49 nM TO-Mορφο. Τρίτο Φάσμα: προσθήκη 1.5 μ M h22AG.

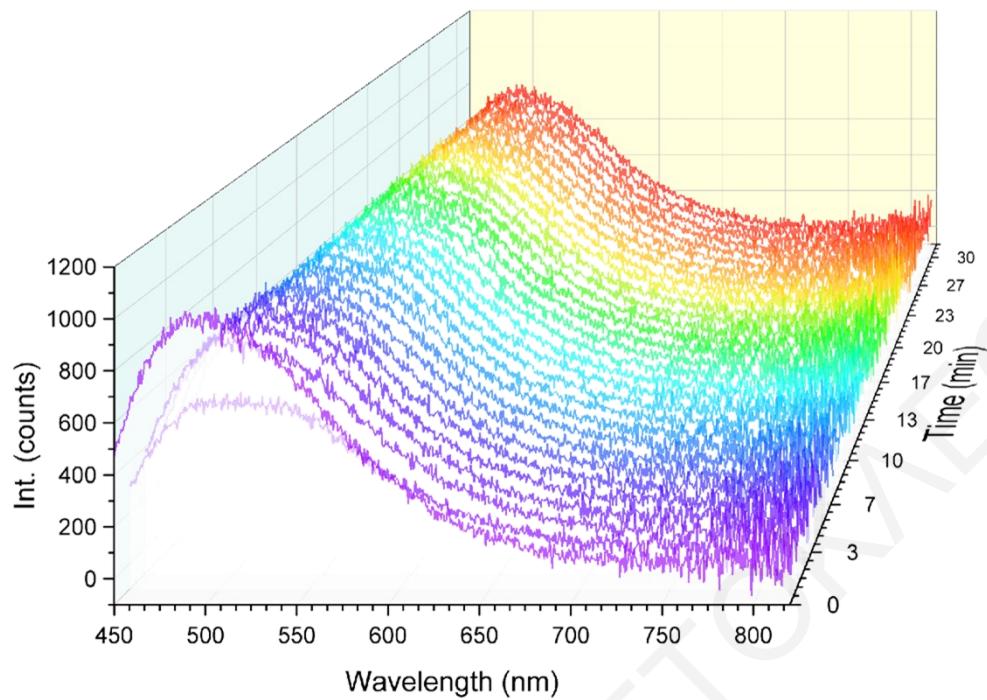


Σχήμα Π- 62: Σύγκριση έντασης φθορισμού στα 475 nm διαλύματος πολυμερούς PDV.Li και TO-Morpho μετά την προσθήκη διαφόρων DNA.

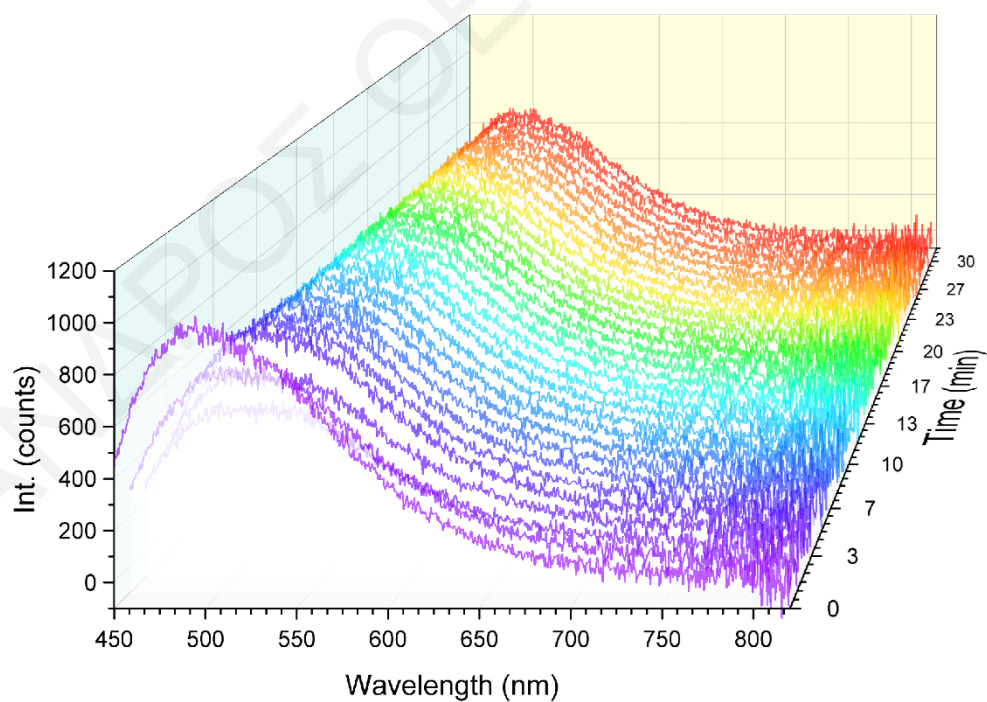
VI.G.3. Έλεγχος Βιοαισθητήρα με TO-Thio



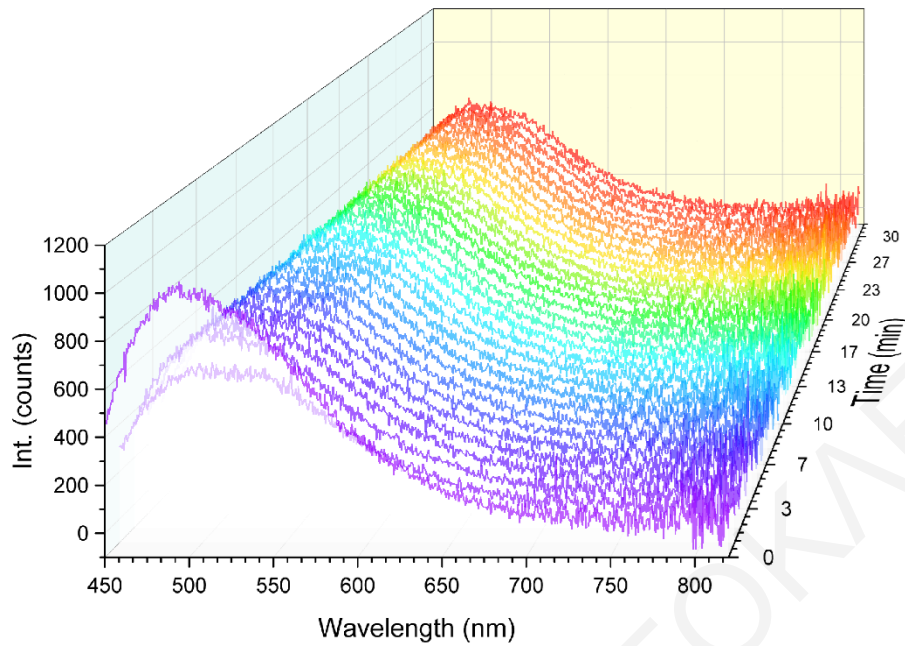
Σχήμα Π- 63: Χρονικό φάσμα βιοαισθητήρα με TO-Thio και ap22AG. Πρώτο φάσμα: 16 nM PDV.Li. Δεύτερο Φάσμα: προσθήκη 49 nM TO-Thio. Τρίτο Φάσμα: προσθήκη 1.5 μM ap22AG.



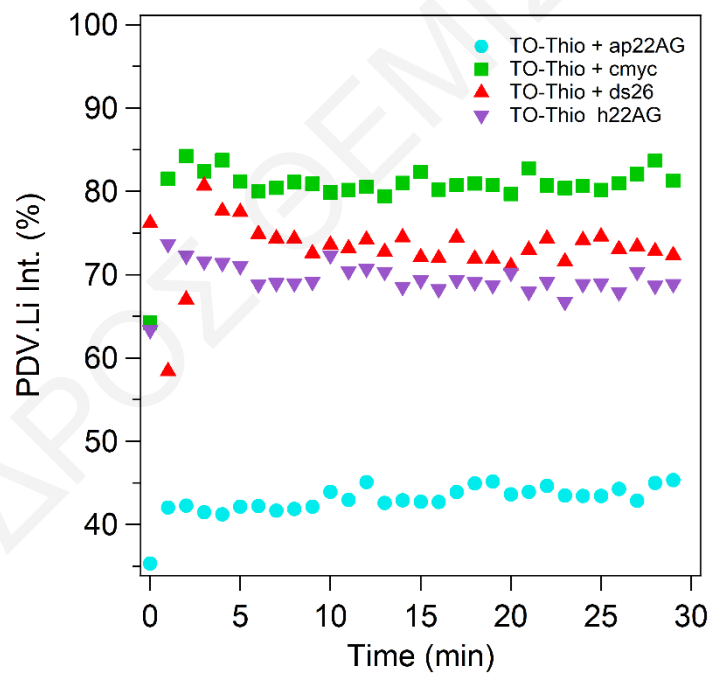
Σχήμα Π- 64: Χρονικό φάσμα βιοαισθητήρα με TO-Thio και c-myc. Πρώτο φάσμα: 16 nM PDV.Li. Δεύτερο Φάσμα: προσθήκη 49 nM TO-Thio. Τρίτο Φάσμα: προσθήκη 1.5 μ M c-myc.



Σχήμα Π- 65: Χρονικό φάσμα βιοαισθητήρα με TO-Thio και ds26. Πρώτο φάσμα: 16 nM PDV.Li. Δεύτερο Φάσμα: προσθήκη 49 nM TO-Thio. Τρίτο Φάσμα: προσθήκη 1.5 μ M ds26.



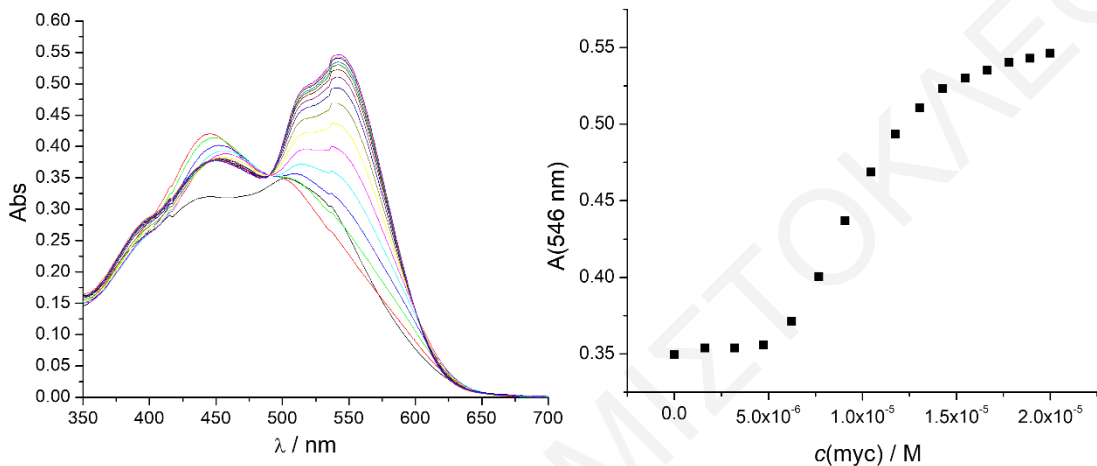
Σχήμα Π- 66: Χρονικό φάσμα βιοαισθητήρα με TO-Thio και h22AG. Πρώτο φάσμα: 16 nM PDV.Li. Δεύτερο Φάσμα: προσθήκη 49 nM TO-Thio. Τρίτο Φάσμα: προσθήκη 1.5 μM h22AG.



Σχήμα Π- 67: Σύγκριση έντασης φθορισμού στα 475 nm διαλύματος πολυμερούς PDV.Li και TO-Thio μετά την προσθήκη διαφόρων DNA.

VI.H. Μελέτη Τιτλοδοτήσεων UV-Vis με χρήση του προγράμματος SpecFit

Το πρόγραμμα Specfit χρησιμοποιείται για ανάλυση πολλαπλών μεταβλητών.^[220,221] Το πρόγραμμα έχει ως είσοδο τα ακατέργαστα δεδομένα τιτλοδότησης και μπορεί να υπολογίσει τις σταθερές πρόσδεσης για διαφορετικές στοιχειομετρικές χρωστικής:DNA βάσει ολόκληρου του φάσματος παρά ως προς ένα σημείο όταν γίνεται η διαδικασία με την εξίσωση Hill.



Σχήμα Π- 68: (αριστερά) Δεδομένα τιτλοδότησης, τα οποία μεταφορτώθηκαν στο Specfit (δεξιά) εξάρτηση του A_{546} από $[c-myc]$.

SPECFIT PRINCIPAL		FACTOR ANALYSIS	
Available Memory (bytes): 386672		Used: 16448 Free: 370224	
M2ZA3MY.DEM		SINGULAR VALUES	
		04-22-2024	
No.	Eigenvalue	Squaresum	Sigma(abs)
1	0.439D+03	0.477D+01	0.301D-01
2	0.469D+01	0.833D-01	0.398D-02
3	0.819D-01	0.143D-02	0.521D-03
4	0.419D-03	0.101D-02	0.438D-03
5	0.298D-03	0.710D-03	0.367D-03
			Predictions
			Data Vector
			Data Vector
			Data Vector
			Prob. Noise
			Prob. Noise

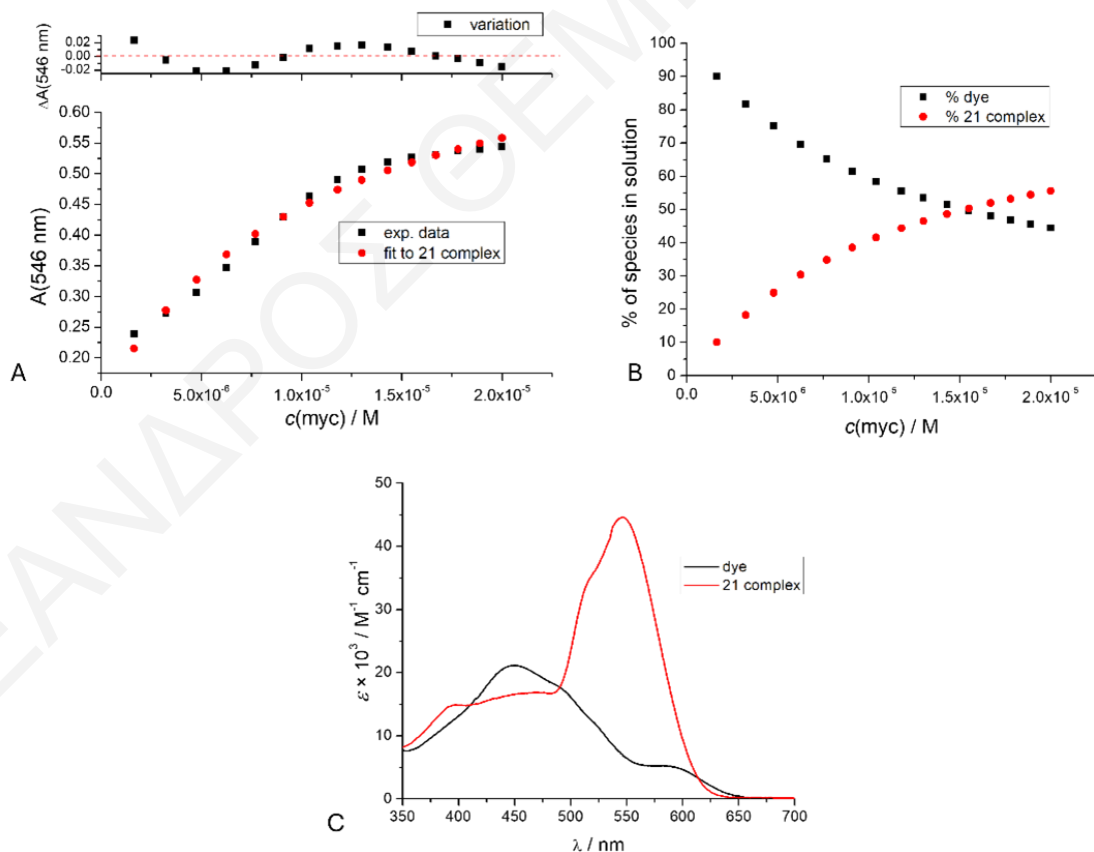
Σχήμα Π- 69: Ανάλυση Κύριων Συντελεστών: 2 πιθανά UV ενεργά είδη, 3ο δυνατό.

Οι στοιχειομετρίες του συμπλόκου χρωστικής/c-myc που δοκιμάστηκαν είναι μόνο 1:1, 1:1+1:2, 1:1+2:1, μόνο 1:2 και μόνο 2:1. Από όλες τις δοκιμασθείσες δυνατότητες μόνο η 2:1 έδωσε καλή συμφωνία προσαρμογής με τα πειραματικά δεδομένα και πέρασε όλες τις μελέτες. Αυτή η επιλογή συμφωνεί επίσης καλά με το σιγμοειδές σχήμα της τιτλοδότησης (Σχήμα Π- 68). Εν τέλει το σύστημα 1:1+2:1 δίνει παρόμοια ποιότητα προσαρμογής (επίσης παρόμοια σταθερά σύνδεσης για 2:1 όπως παρατηρήθηκε για μόνο 2:1) και μόνο μικρό σφάλμα στα υπολογισμένα φάσματα απορρόφησης των δύο συμπλόκων.

M22A3MY.DEM		S P E C F I T P A R A M E T E R S			04-22-2024	
Conc vs Ligand		[M]/[L]/[H+]			3 Parameters	
MxLyHz	colored	spectrum	fix/vary	log βxyz	ñ(log β)	
Species	(y/n)	(u/k)	(f/v) β			
10	y	u	f	0.00000D+00	0.00000D+00	
01	n	u	f	0.00000D+00	0.00000D+00	
21	y	u	v	9.68858D+00	1.78544D-01	
Iter 6	ñ(squares) = 2.479D-01		ñ(abs) = 6.8625D-03		Marq = 0.00D+00	
Species	λmax	Molar abs				
10	449.4	2.117D+04				
21	546.4	8.924D+04				

Σχήμα Π- 70: Αποτέλεσμα της στοιχειομετρίας 2:1.

Η σταθερά δέσμευσης $\log\beta_{21} = 9.69 \pm 0.18$. Να σημειωθεί ότι η σταθερά δέσμευσης περιγράφει την περίπτωση που δύο μόρια της χρωστικής αλληλεπιδρούν με ένα μόριο DNA και παίρνουμε ένα μόνο σύμπλοκο, όπου υπάρχει ισχυρή συνεργιστικότητα (συνεπώς σιγμοειδές σχήμα και απουσία μετρήσιμης ποσότητας στοιχειομετρίας 1:1). Η υπόθεση είναι ότι η χρωστική σχηματίζει διμερή στη θέση πρόσδεσης του DNA - αλλά μπορεί επίσης να συνδεθεί σε δύο διαφορετικές θέσεις, όπου η πρόσδεση του πρώτου μορίου χρωστικής επιτρέπει έντονα τη σύνδεση της δεύτερης χρωστικής στην άλλη θέση.



Σχήμα Π- 71: (Α) Συμφωνία μεταξύ πειραματικών (■) και υπολογισμένων (●) δεδομένων για στοιχειομετρία 2:1 (Β) μεταβολή του ποσοστού των φασματοσκοπικά ενεργών ειδών σε σχέση με $[c\text{-myc}]$ (Γ) φάσμα UV-Vis της χρωστικής (μαύρο) και του συμπλόκου 2:1 (κόκκινο).