

Dr Agata Głuszyńska

Autoreferat
do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

**Oddziaływanie związków o szkielecie karbazolu, antracenu i papaweryny
z G-kwadrupleksami DNA**



Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii

Poznań, 2019r.

Załącznik nr 3a

1. INFORMACJE O AUTORZE**IMIĘ I NAZWISKO:** Agata Głuszyńska

Dane kontaktowe:

Wydział Chemii, UAM

ul. Umultowska 89b

61-614 Poznań

e-mail: aglusz@amu.edu.pl

tel: +48618291770

POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE:**1989-1994** Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu

Studia magisterskie na Wydziale Chemii

Kierunek: chemia

Tytuł pracy magisterskiej: „*Reakcja Mitsunobu w układach α -ftalimidoalkoholi*”

Uzyskany stopień: magister

Promotor: prof. dr hab. Maria D. Rozwadowska

2001 Uniwersytet im. A. Mickiewicza w PoznaniuTytuł pracy doktorskiej: „*Enancjoselektywna synteza alkaloidów izochinolinowych metodą Pomeranza-Fritscha w modyfikacji Bobbitta*”

Specjalność: chemia organiczna

Uzyskany stopień: doktor nauk chemicznych

Promotor: prof. dr hab. Maria D. Rozwadowska

INFORMACJE O ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH:**10.1999-07.2002** Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii

Stanowisko: starszy technik

08.2002-12.2002 Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii

Stanowisko: specjalista

01.2003-02.2004 Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii

podoktorski staż naukowy, Zakład Spektrochemii Organicznej

10.2005–aktualnie Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu, Wydział Chemii

Stanowisko: adiunkt

OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCE Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ. U. 2016 R. POZ. 882 ZE ZM. W DZ. U. Z 2016 R. POZ.1311.):**TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO****Oddziaływanie związków o szkielecie karbazolu, antracenu i papaweryny z G-kwadrupleksami DNA**

Przedstawiona rozprawa habilitacyjna pt.: **Oddziaływanie związków o szkielecie karbazolu, antracenu i papaweryny z G-kwadrupleksami DNA** obejmuje cykl monotematycznych 8 publikacji (H1-H8), zawierających wyniki i interpretację prowadzonych przeze mnie badań eksperymentalnych.

Publikacje, jako autor do korespondencji: 7

Sumaryczny Impact Factor dla publikacji **H1-H8** wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej wynosi **IF=21.407** (z roku wydania według bazy danych JCR)

Średni Impact Factor na pracę **IF=2.676**

Sumaryczny 5-letni Impact Factor dla publikacji **H1-H8** wchodzących w skład rozprawy habilitacyjnej wynosi **IF=21.792** (według bazy danych JCR)

Średni 5-letni Impact Factor na pracę **IF=2.724**

Średni udział habilitanta w pracy: **~76%**

Łączna liczba punktów MNiSW wynosi **225**

Średnia liczba punktów MNiSW na pracę to **28.125**.

Nr	Publikacja	IF	5-letni IF	MNiSW 2017	Udział w %
H1	L. Mądry, E. Gałęzowska, A. Głuszyńska , T. W. Hermann, M. Zabel, B. Juskowiak „Interaction of the Oxidation Products of Papaverine with Guanine Quadruplex” <i>Polish J. Chem.</i> 2006 , 80, 921-929.	0.491	0.380	15	30
	Udział własny: badanie oddziaływania pochodnej papaweryny z DNA, wykonanie rysunków i udział w pisaniu manuskryptu.				
H2	A. Głuszyńska , K. Bajor, I. Czerwińska, D. Kalet, B. Juskowiak „The synthesis and spectral properties of new DNA binding ligands” <i>Tetrahedron Lett.</i> 2010 , 51, 5415-5418.	2.618	1.954	25	75
	Udział własny (autor do korespondencji): zaplanowanie syntezy badanych związków, zaplanowanie i wykonanie badań spektroskopowych, interpretacja wyników, napisanie manuskryptu, wykonanie wszystkich rysunków i schematów, dyskusja z recenzentami i korespondencja z edytorem.				
H3	A. Głuszyńska , E. Rajczak, B. Juskowiak „Synthesis and spectroscopic characterisation of (<i>E</i>)-2-(2-(9-(4-(1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1-yl)butyl)-9 <i>H</i> -carbazol-3-yl)vinyl)-3-ethylbenzo-[<i>d</i>]thiazol-3-ium, a new ligand and potential DNA intercalator” <i>Chem. Papers</i> 2013 , 67 (9), 1231-1239.	1.193	1.198	20	80
	Udział własny (autor do korespondencji): zaplanowanie syntezy liganda, koncepcja pracy, zaplanowanie badań spektroskopowych, pomoc w interpretacji wyników, napisanie manuskryptu, dyskusja z recenzentami i korespondencja z edytorem.				
H4	A. Głuszyńska „Biological potential of carbazole derivatives” <i>Eur. J. Med. Chem.</i> 2015 , 94, 405-426.	3.902	4.527	40	100
	Udział własny: zebranie materiału, koncepcja pracy, napisanie manuskryptu, dyskusja z recenzentami i korespondencja z edytorem.				

H5	A. Głuszyńska , B. Juskowiak, M. Kuta-Siejkowska, M. Hoffmann, S. Haider „Carbazole ligands as c-myc G-quadruplex binders” <i>Int. J. Biol. Macromol.</i> 2018 , 114, 479-490.	3.909	3.929	35	70
	Udział własny (autor do korespondencji): synteza ligandów, koncepcja pracy, zaplanowanie i wykonanie badań spektroskopowych, interpretacja wyników, napisanie manuskryptu, dyskusja z recenzentami i korespondencja z edytorem.				
H6	A. Głuszyńska , B. Juskowiak, M. Kuta-Siejkowska, M. Hoffmann, S. Haider „Carbazole derivatives binding to c-KIT G-quadruplex DNA” <i>Molecules</i> 2018 , 23, 1134.	3.098	3.268	30	70
	Udział własny (autor do korespondencji): synteza ligandów, koncepcja pracy, zaplanowanie i wykonanie badań spektroskopowych, interpretacja wyników, napisanie manuskryptu, dyskusja z recenzentami i korespondencja z edytorem.				
H7	A. Głuszyńska , B. Juskowiak, B. Rubiś „Binding study of the fluorescent carbazole derivative with human telomeric G-quadruplexes” <i>Molecules</i> 2018 , 23, 3154.	3.098	3.268	30	90
	Udział własny (autor do korespondencji): zaplanowanie syntezy liganda, koncepcja pracy, zaplanowanie i wykonanie badań spektroskopowych, interpretacja wyników, napisanie manuskryptu, dyskusja z recenzentami i korespondencja z edytorem.				
H8	A. Głuszyńska , B. Juskowiak "Practical microwave synthesis of carbazole aldehydes for the development of DNA-binding ligands" <i>Molecules</i> 2019 , 24, 965.	3.098	3.268	30	95
	Udział własny (autor do korespondencji): koncepcja pracy, zaplanowanie i wykonanie badań syntetycznych i spektroskopowych, interpretacja wyników, napisanie manuskryptu, dyskusja z recenzentami i korespondencja z edytorem.				

Liczba publikacji ogółem **40**, w tym **20** publikacji naukowych z listy filadelfijskiej;

20 publikacji w czasopismach spoza listy filadelfijskiej;

67 wystąpień na konferencjach (**28** międzynarodowych i **39** krajowych, w tym **3** wygłoszone komunikaty)

Sumaryczny Impact Factor według listy JCR zgodnie z rokiem opublikowania **IF=53.379**

przed uzyskaniem stopnia doktora: **5.444**

po uzyskaniu stopnia doktora: **47.935**

Średni IF na pracę **2.669**

Łączna liczba punktów MNiSW₂₀₁₇ wynosi **580**

przed uzyskaniem stopnia doktora: **50**

po uzyskaniu stopnia doktora: **530**

Średnia liczba punktów MNiSW₂₀₁₇ na pracę to **29**

Liczba cytowań na dzień **15.03.2019** według

bazy Web of Science: **303**, bez autocytowań: **275**

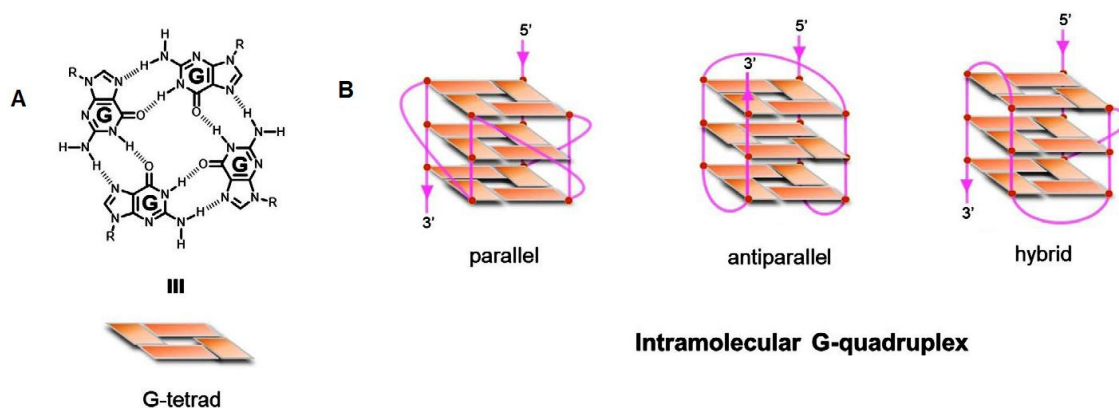
bazy Scopus: **327**, bez autocytowań: **292**

Indeks Hirscha według baz Web of Science i Scopus: **9**

<https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=13805433700>

OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WW. PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW WRAZ Z OMÓWIENIEM ICH EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA

Pozytywny finał badań nad poznaniem genomu ludzkiego zaowocował gwałtownym wzrostem zainteresowania ligandami oddziałującymi specyficznie z DNA, zarówno w aspekcie bioanalitycznym (detekcja i diagnostyka sekwencji genowych lub ich zmutowanych analogów), jak i biomedycznym (nowe leki i strategie w leczeniu chorób nowotworowych, wirusowych i genetycznych). Większość klasycznych ligandów DNA dedykowana jest zastosowaniom z udziałem dwuniciowego DNA. W ostatnich latach zwrócono uwagę na szczególną rolę, jaką w procesach komórkowych odgrywają trójniciowe (trypleksy) i czteroniciowe (kwadrupleksy) DNA oraz rozpoczęto intensywne badania nad selektywnymi ligandami zdolnymi do oddziaływania z tymi formami strukturalnymi DNA [1,2]. Kwadrupleksy guaninowe (G-tetrapleksy, G-quadruplex, G4 DNA) są to niekanoniczne, zwinięte jedno- lub wieloniciowe struktury kwasów nukleinowych utworzone przez warstwowo ułożone kwartety guaninowe (G-tetrads), które są stabilizowane przez wiązania wodorowe typu Hoogsteena w obecności wybranych kationów metali (Na^+ , K^+) i mogą być stabilizowane przez małe ligandy organiczne (Rys. 1) [3-6]. W zależności od liczby nici tworzących G-kwadrupleksy wyróżniamy kwadrupleksy jednocząsteczkowe, dwucząsteczkowe lub czterocząsteczkowe. G-kwadrupleksy DNA wykazują duży polimorfizm strukturalny, wynikający z różnej kierunkowości nici, aranżacji G-tetrad, czy sposobu ułożenia pętli. Nukleotydy niewchodzące w skład tetrad tworzą łączące je różne rodzaje pętli, jak np. boczne, przekątne/diagonalne, zewnętrzne zwane śmigłowymi, czy pętle w kształcie litery V. Wszystkie te czynniki wpływają na końcową topologię G-kwadrupleksu, ale ogromny wpływ na nią ma również rodzaj kationu oraz jego stężenie, pH roztworu, temperatura, dodane rozpuszczalniki czy ligandy.



Rys. 1. Struktura i schematyczna ilustracja G-tetrad (A); Schematyczne ilustracje typowych wewnątrzcząsteczkowych struktur G-kwadrupleksowych: równoległej, antyrównoległej i hybrydowej (B) [6].

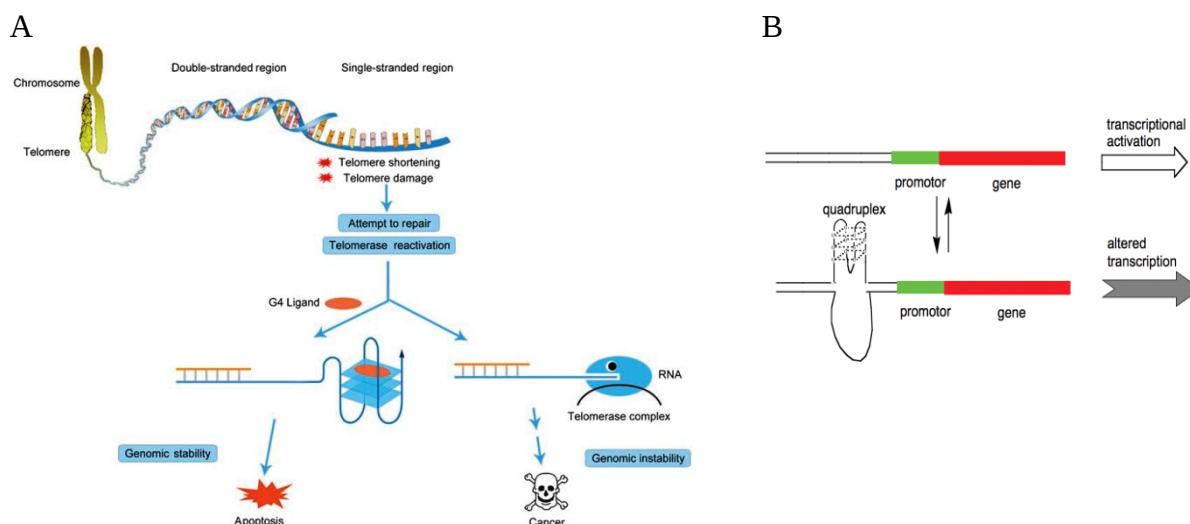
Moja rozprawa habilitacyjna jest fragmentem szerszego programu badań nad syntezą nowych ligandów oddziałujących z kwasami nukleinowymi do celów biotechnologicznych i bioanalitycznych. Jej celem jest synteza nowych ligandów oddziałujących specyficznie z różnymi formami strukturalnymi DNA, a w szczególności ludzkim telomerowym DNA i różnymi sekwencjami protoonkogenów bogatych w guaniny. Wpisuje się tym samym w nurt badań traktujących G-kwadrupleksy DNA jako cel molekularny w projektowaniu leków przeciwnowotworowych oraz biorących udział w regulacji ekspresji genów. Zbadanie procesów takich oddziaływań i określenie ich mechanizmu powinno dostarczyć cennego materiału eksperymentalnego do projektowania efektywnych ligandów DNA, potencjalnie aktywnych w terapii antynowotworowej oraz przydatnych, jako sondy fluorescencyjne do badań strukturalnych DNA lub do detekcji śladowych ilości DNA. Od wielu lat nasza grupa badawcza zajmuje się fotofizyką, fotoizomeryzacją i powinowactwem wiązania ligandów fluorescencyjnych do dwuniciowego DNA i kwadrupleksów guaninowych, jak również syntezą i charakterystyką ligandów o potencjalnej zdolności hamowania telomerazy, a w ostatnim czasie również i regulacji ekspresji genów. Uważam, że także w Polsce mogą i powinny być prowadzone badania z pogranicza chemii analitycznej i biotechnologii prowadzące do opracowania nowoczesnych narzędzi diagnostyki biomedycznej lub/oraz nowych specyfików w terapii chorób nowotworowych i pokrewnych.

Głównym celem omawianego osiągnięcia naukowego było wykazanie przydatności związków karbazolowych, antracenowych i pochodnych papaweryny do stabilizacji G-kwadrupleksów o sekwencji ludzkiego telomerowego DNA oraz o sekwencjach ludzkich protoonkogenów.

Zakres badań stanowiących podstawę rozprawy habilitacyjnej obejmuje syntezę nowych związków, dających możliwość dalszych modyfikacji strukturalnych i otrzymanie pochodnych o potencjalnych właściwościach biologicznych, oraz nowych ligandów, ich badania fizykochemiczne i spektralne (spektrofotometria UV-Vis, spektrofluorymetria, dichroizm kołowy), wyznaczenie stałych trwałości tworzących się połączeń kompleksowych z DNA oraz identyfikację miejsc wiążących.

Jako cel molekularny wybrałam G-kwadrupleksy DNA tworzące się na oligonukleotydach o sekwencji ludzkiego telomerowego DNA 5'-AGGG(TTAGGG)₃-3' (22HT) oraz sekwencjach różnych ludzkich protoonkogenów takich jak c-MYC: 5'-TGA GGG TGG GTA GGG TGG GTA A-3' (pdb id: 2L7V) i 5'-TAG GGAG GGT AGG GAG GGT-3' (pdb id: . 2LBY), c-KIT1 5'-AGG GAG GGC GCT GGG AGG AGG G-3' (pdb id: 2O3M) i c-KIT2 5'-CGG GCG GGC GCT AGG GAG GGT-3' (pdb id: 2KYP), bcl-2 5'-GGG CGC GGG AGG AAT TGG GCG GG-3' (pdb id: 2F8U), RET 5'-GGG GCG GGG CGG GGC GGG GT-3' (pdb id: 2L88), ceb25 5'-AAG GGT GGG TGT AAG TGT GGG TGG GT-3' (pdb id: 2LPW), KRAS21 5'-AGG GCG GTG TGG GAA GAG GGA-3', hTERT 5'-AGG GIA GGG GCT GGG AGG GC-3' (pdb id: 2KZD), VEGF 5'-CGG GGC GGG CCT TGG GCG GGG T-3' (pdb id: 2M27). Wszystkie one mogą tworzyć wewnątrzcząsteczkowe struktury G-kwadrupleksów przez składanie pojedynczej nici oligonukleotydowej. Badania powinowactwa do DNA prowadziłam również z udziałem oligonukleotydów tworzących klasyczną dwuniciową helisę (dsDNA) oraz mniej popularne struktury trójniciowe DNA (trypleks).

Badanie oddziaływań ligandów z G-kwadrupleksem o sekwencji ludzkiego telomerowego DNA jest bardzo ważne w kontekście badań nad chorobami nowotworowymi i telomerazą, enzymem aktywnym w komórkach nowotworowych gwarantującym im nieograniczoną liczbę replikacji i „nieśmiertelność” (Rys. 2) [7]. Badanie oddziaływań ligandów z G-kwadrupleksami o sekwencji ludzkich protoonkogenów jest zaś bardzo ważne w kontekście badań nad zmianami transkrypcji przez tworzenie G-kwadrupleksów w regionie promotorowym genów (Rys. 2) [8].



Rys. 2. Struktura i biologiczna rola telomerów (A) [5]; Model wpływu na transkrypcję poprzez tworzenie G-kwadrupleksu w regionie promotorowym genu (B) [8].

Zdolność ligandów do tworzenia kompleksów z trójniciowym i czteroniciowym DNA jest pierwszym sygnałem i prognostykiem potencjalnych właściwości przeciwnowotworowych badanych ligandów. Od czasu pierwszego doniesienia literaturowego o aktywności biologicznej G-kwadrupleksów (inhibicja ludzkiej telomerazy) w 1997 roku [9] liczba i różnorodność ligandów "G-kwadrupleksowych" o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych gwałtownie wzrosła [4,5,10]. W związku z potwierdzeniem hipotezy o tworzeniu się struktur kwadrupleksowych *in vivo* liczba tych publikacji mimo upływu lat nie maleje [11,12]. Ligandy aktywne w stosunku do DNA to związki pochodzenia naturalnego (np. antybiotyki: antracyklina lub daunorubicyna; alkaloidy typu berberyn lub koralin), wiele jest także wytwarzanych syntetycznie (antrachinony, akrydyny, pochodne perylenu). Wspólną ich cechą są:

- płaska sztywna struktura zawierająca 3 lub więcej skondensowanych pierścieni aromatycznych - ligandy powinny posiadać powinowactwo wiązania do DNA;
- obecność heteroatomów, często obdarzonych ładunkiem dodatnim - obecność kationowej grupy zwiększa rozpuszczalność ligandów w środowisku wodnym i umożliwia oddziaływania typu „charge-transfer” z DNA;
- różnorodne podstawniki funkcyjne, najczęściej ugrupowania amidowe, aminowe;

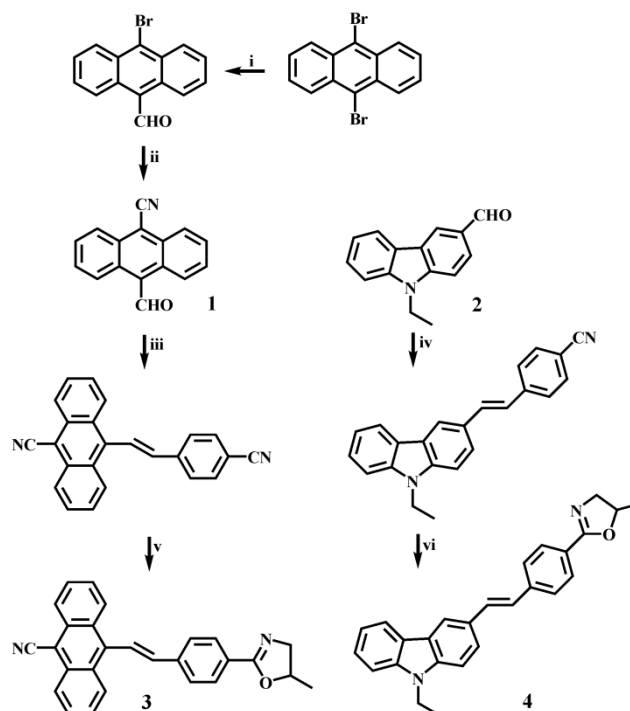
W projektowaniu swoich ligandów kierowałam się właśnie tymi kryteriami. Planowany zakres badań obejmował:

1. Syntezę nowych ligandów o szkielecie skondensowanych pierścieni aromatycznych;
2. Charakterystykę fizykochemiczną wszystkich otrzymanych pochodnych;
3. Badanie właściwości spektralnych ligandów (widma absorpcyjne UV-Vis, widma fluorescencyjne, dichroizm kołowy);
4. Badanie oddziaływania ligandów z DNA techniką dializy równowagowej przy zastosowaniu opracowanej procedury badawczej i 14 różnych form kwasów nukleinowych;
5. Rejestrację absorpcyjnych widm temperaturowych, analizę krzywych topnienia, wstępną ocenę aktywności biologicznej nowych związków, ocenę czystości strukturalnej G-kwadrupleksów i ich stabilności w obecności ligandów;
6. Badania mające na celu określenie struktury kwadrupleksów, dynamiki i oddziaływania G4 DNA z nowymi ligandami przy zastosowaniu spektroskopii NMR (niezbędnego narzędzia w badaniu struktur kwadrupleksowych kwasów nukleinowych);

7. Teoretyczne badania oddziaływań ligandów z G-kwadrupleksami o znanej strukturze, wykorzystujące obliczenia na poziomie mechaniki molekularnej i kwantowej;
8. W oparciu o analizę właściwości spektralnych i powinowactwa ligandów do DNA wytypowanie związków do badań biomedycznych – badanie aktywności biologicznej (badanie cytotoksyczności, aktywności telomerazy (TRAP - protokół amplifikacji powtórzeń telomerowych) i inne).

Po rozpoczęciu pracy w grupie badawczej prof. Bernarda Juskowiaka włączyłam się w nurt badań prowadzonych we współpracy z Katedrą i Zakładem Farmacji Fizycznej i Farmakokinetiki Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Eksperymenty prowadzone w naszej Pracowni związane były z badaniem właściwości spektralnych i zdolności do agregacji różnych pochodnych utleniania papaweryny oraz ich oddziaływaniami z DNA [13,14]. Nowym, kolejnym z tej grupy związkami, była pochodna indoloizochinoliniowa, którą badaliśmy m.in. pod kątem oddziaływania z różnymi strukturami DNA: dwuniciowym DNA (calf thymus DNA) oraz z G-kwadrupleksem o sekwencji ludzkiego telomerowego DNA. W eksperymentach miareczkowania spektrofotometrycznego wraz ze wzrostem stężenia DNA zmieniały się znacząco maksima absorpcji związku - obserwowałam przesunięcie batochromowe oraz efekt hipochromowy. Jednocześnie to zmiany pasma w zakresie widzialnym przy 398 nm pozwoliły na obliczenia stałych trwałości z wykorzystaniem modelu Scatcharda. Badania wykazały, że pochodna papaweryny nie oddziałuje selektywnie z G-kwadrupleksem DNA i może się wiązać z badanymi strukturami DNA na trzy sposoby: poprzez niespecyficzne oddziaływania elektrostatyczne dodatnio naładowanego związku z ujemnie naładowanymi grupami fosforanowymi DNA, klasyczną interkalację z dwuniciowym DNA oraz poprzez specyficzne wiązanie *end-stacking* z tetradami G-kwadrupleksu [H1].

Aby pozyskać środki na własne badania napisałam grant „Oksazolinowe pochodne arylostilbenów: synteza, właściwości, oddziaływanie z DNA” (kierownik projektu prof. dr hab. Bernard Juskowiak, MNiSzW nr N20400432/0254, 01.2007-12.2009), którego byłam głównym wykonawcą. W projekcie tym chciałam wykorzystać swoje doświadczenie w syntezie oksazolin i sprawdzić jak ten element strukturalny, oprócz skondensowanego pierścienia aromatycznego i podwójnego wiązania C=C dającego możliwość fotoizomeryzacji *cis-trans*, wpłynie na powinowactwo wiązania liganda do DNA. Budowa oksazoliny, np. rozmiar i kształt podstawników w pozycji 4 i 5 pierścienia, oraz czynniki elektronowe, np. rodzaj atomów donorowych lub charakter podstawników oraz możliwość ich otrzymania w postaci czystych enancjomerów, stwarzały ogromne możliwości badawcze. Z doniesień literaturowych wynikało, że konfiguracja i wielkość podstawników w pierścieniu oksazolinowym ma istotny wpływ na stereochemiczny przebieg wielu reakcji [15], a więc może mieć również wpływ na stereochemiczne oddziaływania z DNA. Różnorodność efektów, jakie mogą wpływać na stereochemię i preferencje projektowanych ligandów oraz ich podobieństwo strukturalne do niektórych znanych stabilizatorów czteroniciowego DNA pozwalały zakładać, że w grupie projektowanych ligandów zostaną zidentyfikowane pochodne, które będą przydatne do celów bioanalitycznych i biomedycznych.



Schemat 1. Reagenty i warunki: (i) (1) n-BuLi, THF, -72 °C, 1 h; (2) 4-formylmorfolina, -35 °C, 12 h; (ii) CuCN (10 ekw.), DMSO, 190 °C, 6 h; (iii) CNC₆H₄CH₂PO(OC₂H₅)₂, MeONa, DMF, 0 °C, 3 h; (iv) CNC₆H₄CH₂PO(OC₂H₅)₂, MeONa, DMF, t.w., 22 h; (v) (±)-1-amino-2-propanol (40 ekw.), glikol etylenowy/gliceryna, K₂CO₃, 115 °C, 72 h; (vi) (±)-1-amino-2-propanol (10 ekw.), glikol etylenowy/gliceryna, K₂CO₃, 115 °C, 22 h.

W reakcji Wittiga z (4-cyjanofenylo)-metylofosfonianu dietylu i wybranych aldehydów **1** i **2**, otrzymano odpowiednie nitryle. W następnym etapie ugrupowanie cyjanowe poddano reakcji z (±)-1-amino-2-propanolem otrzymując oksazolinowe pochodne **3** i **4** (Schemat 1) [H2]. Związki te poddano następnie próbie metylacji azotu oksazolinowego w celu kwaternalizacji. Nie udało się otrzymać zsyntetyzowanych związków w postaci soli, mimo zmiany wielu parametrów reakcji czwartorzędowania (użycia różnych odczynników metylujących (CH₃I, Me₃OBF₄, CF₃SO₃CH₃), rozpuszczalników (acetonitryl, DMSO, Et₂O, CH₂Cl₂) i prowadzenia eksperymentów w różnych temperaturach). Usilne próby uzyskania ligandów w postaci soli dyktowane były ograniczoną rozpuszczalnością wyjściowych związków **3** i **4** w wodzie. Z kolei, rozpuszczalność ligandów w medium wodnym jest warunkiem koniecznym do ich stosowania, jako ligandów oddziałujących z DNA. Tendencja ligandów do agregacji w roztworach wodnych utrudniała dalsze badania. Z drugiej strony DNA zachowuje swoje wyższe struktury w obecności umiarkowanych ilości rozpuszczalników organicznych, takich jak EtOH lub DMSO (do 10%). Dlatego zbadalam spektralne właściwości ligandów w układach mieszanych H₂O/EtOH zawierających od 5 do nawet 80% EtOH. Stabilność spektralna związków była satysfakcjonująca we wszystkich mieszaninach H₂O/EtOH. Efekty spektralne zaobserwowane w widmach absorpcji i emisji obu ligandów w obecności dwuniciowego DNA (ctDNA) oraz czteroniciowego kwadrupleksu utworzonego na 22-merowym oligonukleotydzie o sekwencji telomerowej były bardzo niewielkie. Postulowaliśmy, że efektywne oddziaływanie może być utrudniane w głównej mierze przez słabą rozpuszczalność ligandów w roztworach wodnych i ich tendencję do tworzenia asocjacji [H2].

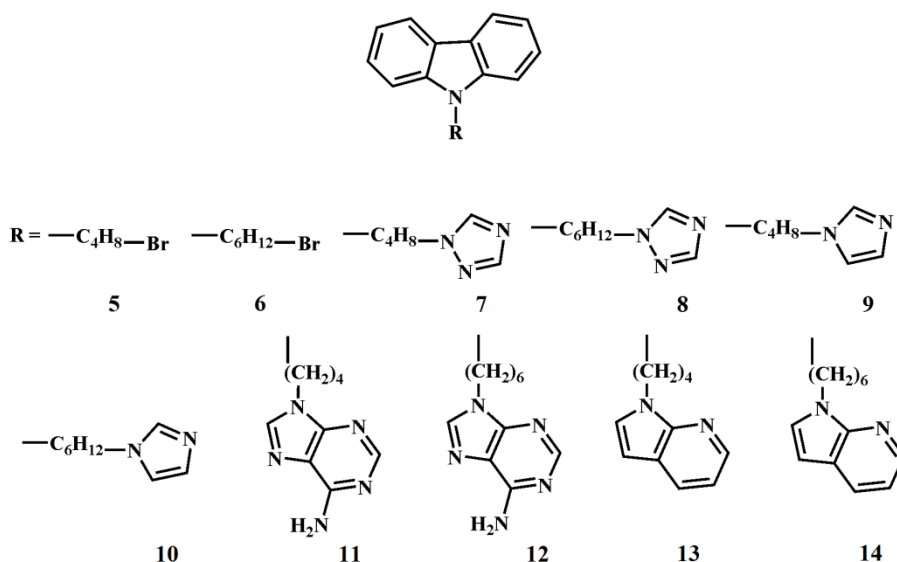
Dlatego też zdecydowałam się na zastąpienie ugrupowania oksazolinowego w cząsteczce liganda, ugrupowaniem benzoksazolinowym, a następnie benzotiazolinowym,

z powodzeniem stosowanymi w syntezie barwników cyjaninowych, które były już obdarzone ładunkiem. Ponieważ otrzymane pochodne z ugrupowaniem benzotiazoliowym były rozpuszczalne w roztworach wodnych, dlatego też zdecydowano się skoncentrować prace nad otrzymaniem nowych aldehydów o szkielecie antracenu i karbazolu, które można by poddać reakcji kondensacji nie tylko z jodkiem N-etylo-2-metylobenzotiazoliowym, ale również z innymi związkami. Dałoby to możliwość syntezy nowych ligandów potencjalnie oddziałujących z DNA.

W trakcie tych prac otrzymałam szereg pochodnych antracenu, nie tylko aldehydów, które dawały mi duże możliwości modyfikacji i stwarzały możliwość syntezy nowych, ciekawych strukturalnie związków w kontekście badań z DNA. Eksperymenty musiałam jednak przerwać ze względów zdrowotnych, ponieważ okazało się, że jestem uczulona na którąś z otrzymanych pochodnych antracenu. Nie kontynuowałam już żadnych badań z tymi związkami. Dlatego też rezultatem tego grantu była tylko jedna publikacja [H2].

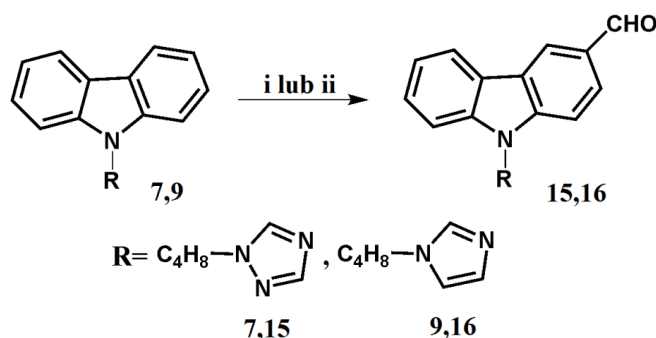
W kręgu moich zainteresowań pozostały jednak pochodne karbazolu i na realizację projektu badawczego „Synthesis of new carbazole ligands, potential inhibitors of telomerase in antitumor therapy” pozyskałam środki z Fundacji na rzecz Nauki Polskiej w ramach grantu POMOST, którego byłam kierownikiem. Związki karbazolowe są bardzo interesujące ze względu na swoje właściwości fotofizyczne i biologiczne. Niektóre związki karbazolowe mają bardzo wysoką aktywność przeciwko wielu organizmom: bakteriom, grzybom, pasożytom lub są potencjalnymi środkami przeciwzapalnymi. Niektóre pochodne karbazolu są potencjalnymi wielofunkcyjnymi środkami do leczenia zaburzeń neurologicznych, inne wykazują silną lub umiarkowaną aktywność przeciwnowotworową [H4]. Pierścień karbazolowy jest planarnym skondensowanym układem aromatycznym wykazującym powinowactwo wiązania do różnych form DNA. Dodatkowo pozostałam przy ugrupowaniu benzotiazoliowym, jako elemencie strukturalnym liganda, ze względu na wyjątkowe właściwości cyjaninowych barwników fluorescencyjnych (TOTO, BOBO) stosowanych do wybarwiania DNA [16]. Obecność atomu azotu w formie kationowej zwiększa rozpuszczalność ligandów w środowisku wodnym i umożliwia oddziaływanie typu „charge-transfer” z DNA. Innym ważnym elementem strukturalnym badanych ligandów jest podwójne wiązanie C=C stwarzające możliwość sterowania strukturą liganda przy pomocy światła (fotoizomeryzacja *cis-trans* wiązania etenowego). Ideą syntezy liganda zdolnego do fotoizomeryzacji było poszukiwanie ligandów do zastosowania we wspomaganej fototerapii DNA. Wprowadzenie do struktury liganda pierścieni azolowych w postaci grupy imidazolowej i triazolowej mogło wpłynąć na silniejsze oddziaływanie z DNA poprzez możliwe tworzenie wiązań wodorowych. Dodatkowo grupy imidazolowe i triazolowe odgrywają ważną rolę w chemii medycznej, ponieważ wiele z nich wykazuje różne właściwości biologiczne - przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwzapalne, przeciwpasożytnicze, przeciwnowotworowe, czy antywirusowe [17,18].

Otrzymałam serię N-podstawionych pochodnych karbazolu **5-14** [19,H3,H5]. Pochodne **11-14** z podstawnikiem adeninowym i azaindolowym są nowymi, nieopublikowanymi dotychczas związkami, otrzymanymi z umiarkowanymi wydajnościami z odpowiednich bromopochodnych **5** i **6**. Planuję wykorzystać je wraz z N-butylo- i N-heksyloazolowymi pochodnymi **7-10** do syntezy nowych dwukleszczowych ligandów G-kwadrupleksowych z ugrupowaniem amidowym.



Rys. 3. Otrzymane N-podstawione pochodne karbazolu 5-14.

Synteza aromatycznych aldehydów ma ogromne znaczenie w chemii organicznej, ponieważ związki te, ze względu na reaktywność grupy aldehydowej są użytecznymi substratami i ważnymi związkami pośrednimi w syntezie różnych nowych związków, m.in. naturalnych lub bioaktywnych cząsteczek. Jedną z metod syntezy aldehydów poprzez tworzenie nowych wiązań węgiel-węgiel jest reakcja Vilsmeiera-Haacka. W syntezie formylowych pochodnych karbazolu metoda ta jest szczególnie efektywna w otrzymywaniu N-alkilo-3,6-diformylokarbazoli z wysoką wydajnością przy użyciu mieszaniny formylującej DMF i POCl_3 z dużym (18,8-24,3 ekw.) [20,21] lub niewielkim nadmiarem (2,5-3 ekw.) [22]. Jednak już pochodne mające podstawnik na łańcuchu N-alkilowym ulegają reakcji ze znacznie mniejszą wydajnością. Metodą tą otrzymuje się również N-alkilomonoformylowe pochodne karbazolu z wydajnością 40-79% w zależności od zastosowanej procedury stosując niewielki nadmiar mieszaniny formylującej (1-6,5 ekw.) w czasie 6-8 godzin [23-25]. W syntezie monoaldehydów **15** i **16** stosując tak jak Xu i Song prawie stechiometrycznych ilości odczynników, produkty otrzymałam z niską wydajnością 13-22% [20,21]. Dlatego też zastosowałam większy nadmiar mieszaniny formylującej (ponad 20 ekw.) otrzymując odpowiednie aldehydy z wydajnością 49 i 29 % po 22 i 32 godzinach grzania [**H3**,**H7**]. Krótszy czas reakcji miał wpływ na słabą wydajność procesu, podczas gdy znaczne wydłużenie czasu reakcji spowodowało powstanie tylko bisaldehydów z niską wydajnością, przy jednoczesnym tworzeniu się produktów ubocznych. Ponieważ ten etap reakcji obniżał całkowitą wydajność syntezy ligandów G-kwadrupleksowych, dlatego postanowiłam zmienić metodę konwencjonalną na chemię wspomaganą mikrofalami, która daje wiele korzyści - reakcje są szybsze, wydajniejsze, a tym samym bardziej ekonomiczne [26].



Schemat 2. Synteza aldehydów **15** i **16** w warunkach konwencjonalnych oraz z wykorzystaniem promieniowania mikrofalowego. Reagenty i warunki: i) DMF (24 ekw.), POCl₃ (21 ekw.), Cl(CH₂)₂Cl, T=90 °C, t=22-32 h, Y: 29-49%; ii) DMF (3 ekw.), POCl₃ (3 ekw.), T=100 °C, t=100 min, moc 150 W, Y: 86-88%.

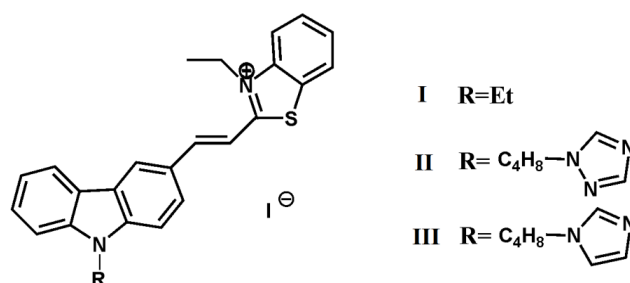
We wstępnych doświadczeniach 9-(4-(1H-imidazol-1-ilo)butylo)-9H-karbazol **16**, wybrany jako substrat modelowy, poddałam reakcji wspomaganej promieniowaniem mikrofalowym z odczynnikiem formylującym Vilsmyer'a w różnych warunkach (Tabela 1). Jak na reakcje mikrofalowe zastosowałam dosyć łagodne warunki (moc 150 W i temperatura 100 °C), aby spróbować zatrzymać reakcję na etapie substytucji w pozycji 3 pierścienia karbazolowego. Zastosowanie zbyt małej ilości odczynnika formylującego (1-2 ekw.) wykazało raczej niską konwersję substratu (Tabela 1, poz. 1 i 2), podczas gdy nieznaczne jego zwiększenie do 4 ekw., czy podwyższenie temperatury do 120 °C sprzyjało szybszemu powstawianiu 3,6-bispodstawionej pochodnej. Taki sam efekt obserwowałam przy zastosowaniu dużego nadmiaru reagenta (19 ekw.) - otrzymałam monoaldehyd **16** po zaledwie 15 minutach, ale z 51% wydajnością (poz. 7). W zoptymalizowanych warunkach (3 ekw. odczynnika formylującego, T=100 °C, t=100 minut, moc 150 W) przeprowadziłam reakcję z pochodną **15**, a wynik przedstawiłam w Tabeli 1 (poz. 8). Jak na reakcje prowadzone w reaktorze mikrofalowym, 100 minut to długi czas eksperymentu, ale udało mi się otrzymać monopodstawione aldehydy **15** i **16** z bardzo dobrą wydajnością 88 i 86 % [H8].

Tabela 1. Optymalizacja formylowania Vilsmyer'a wspomagana mikrofalami [H8].

Lp.	Substrat	reagent Vilsmyer'a [ekw.]	T [°C]	t [min] ^a	Y [%] ^b
1	16	1	100	120	49
2	16	2	100	120	58
3	16	3	100	80	82
4	16	3	100	100	88
5	16	3	120	60	78
6	16	4	100	90	58
7	16	19	100	15	51
8	15	3	100	100	86

^a Monitorowany przy zastosowaniu TLC. ^b Wydajność izolowana.

Monoaldehydy **15** i **16** oraz handlowo dostępny aldehyd **17** posłużyły mi do syntezy ligandów **I-III** otrzymanych w reakcji kondensacji typu Knoevenagela z jodkiem 3-etylo-2-metylobenzotiazoliowym w MeOH (w numeracji ligandów zastosowałam numerację rzymską). W przypadku pochodnych **I** i **II**, konieczne było zastosowanie piperydyny jako katalizatora (pKa piperydyny 11.22, pKa triazolu 10.3). Syntezę liganda **III** przeprowadziłam bez dodatku zasadowego katalizatora, ponieważ zasadowość samego podstawnika imidazolowego (pKa 14,5) była wystarczająca do zajścia reakcji, a eksperymenty z dodatkiem piperydyny przebiegały z niższą wydajnością [**H3,H7,H8**]. Strukturę ligandów potwierdziłam za pomocą spektroskopii ^1H NMR. Konfigurację związków jako *E* ustaliłam na podstawie wysokiej wartości stałych sprzężenia $J = 15.4, 15.4, 15.5$ Hz dla protonów z podwójnego wiązania $\text{CH}=\text{CH}$, znalezionych jako izolowane dublety przy 8.02, 8.03, 8.03 ppm i dublety w grupie protonów aromatycznych przy δ 8.42, 7.78, 7.77 ppm, odpowiednio dla ligandów **I-III**. W widmach ES-MS ligandy charakteryzowały się jonami dodatnimi $[\text{M}]^+$ o m/z 383, 478, 477 i jodem ujemnym $[\text{M}]^-$ o m/z 127, odpowiednio dla ligandów **I-III**. Czystość ligandów sprawdziłam za pomocą HPLC z detektorem absorpcyjnym i fluorescencyjnym.



Rys. 4. Struktury ligandów karbazolowych **I-III**.

Zbadałam wpływ różnych rozpuszczalników na widma UV-Vis i widma fluorescencji otrzymanych ligandów. Wszystkie ligandy są rozpuszczalne i trwałe w wybranych rozpuszczalnikach organicznych i roztworach wodnych. Widma absorpcji UV-Vis mają charakterystyczne długofalowe pasmo absorpcyjne charakterystyczne dla karbazolu sprzężonego z grupą benzotiazoliową za pomocą wiązania podwójnego węgiel-węgiel. W przypadku każdego liganda obserwowałam duży solwatochromizm (53-57 nm) i zmiany w wielkości molowych współczynników absorpcji, które zdawały się korelować z polarnością aprotycznych i protycznych rozpuszczalników [**H3,H7,H8**]. Istotne różnice w intensywności pasm fluorescencji i małe przesunięcia w maksimach emisji (λ_{em} w zakresie 565-573 nm) obserwuje się w widmach fluorescencji ligandów zarejestrowanych w różnych rozpuszczalnikach i roztworach wodnych. Wszystkie ligandy wykazują najniższą fluorescencję w roztworach wodnych oraz toluenie. W pierwszym przypadku polarne cząsteczki wody wygaszają fluorescencję pochodnych karbazolu. Kiedy badane związki są częściowo chronione przez DNA obserwujemy odzyskanie ich właściwości fluorescencyjnych. W niepolarnym toluenie ligandy również wykazują słabe właściwości emisyjne. Takie zachowanie może wskazywać na tworzenie agregatów, co zdają się potwierdzać widma UV-Vis związków w tym rozpuszczalniku. Pasma absorpcji ligandów mają znacznie mniejszą intensywność niż te zarejestrowane w innych rozpuszczalnikach i są wyraźnie przesunięte w kierunku fal krótszych, co sugeruje tworzenie dimerów lub wyższych agregatów [**H3,H7,H8**].

Innym ważnym elementem strukturalnym badanych ligandów jest podwójne wiązanie $\text{C}=\text{C}$ stwarzające możliwość sterowania strukturą liganda przy pomocy światła (fotoizomeryzacja *cis-trans* wiązania etenowego). Ideą syntezy związków o takiej budowie była potencjalna możliwość ich zastosowania we wspomaganej fototerapii DNA. Wiadomo,

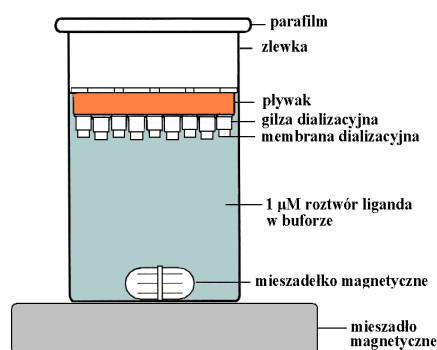
że powinowactwo wiązania liganda do DNA zależy od jego struktury, a także od topologii G-kwadrupleksu. Czynniki strukturalne odgrywają kluczową rolę w molekularnym rozpoznawaniu poszczególnych form DNA, które można wykorzystać do celów detekcyjnych, na przykład niektóre ligandy rozpoznają równoległe lub antyrównoległe struktury G-kwadrupleksów. Nasza grupa badawcza od lat bada ligandy ulegające fotoizomeryzacji *cis-trans* [27-30]. Badania nad ligandami arylostilbazoliowymi wykazały, że wyizolowane izomery *cis* i *trans* selektywnie wiązały do różnych strukturalnie G-kwadrupleksów [30]. Jednak w przypadku badanych ligandów **I-III** nie udało mi się potwierdzić efektywnej fotoizomeryzacji. Pomimo typowych zmian charakterystycznych dla transformacji izomeru *trans* do *cis* występujących w widmach absorpcji i fluorescencji, nie obserwowałam powrotu do stanu początkowego po naświetleniu mieszaniny izomerycznej o krótszej długości fali - obserwowane zmiany były nieodwracalne, chociaż izomer *trans* jest termodynamicznie bardziej stabilny. Te różnice spektroskopowe mogą wskazywać na możliwość udziału innych procesów fotochemicznych, takich jak fotodegradacja, fotocyklizacja lub fotoaddycja. Zdają się potwierdzać to wyniki innych eksperymentów z użyciem takich technik jak NMR i HPLC, w których obserwowałam tworzenie się niewielkiej ilości fotoproduktów po napromieniowaniu roztworu ligandów światłem polichromatycznym. Uznałam, że te zmiany są tak małe, że mogę je zaniedbać, ponieważ przeprowadzałam eksperymenty w znacznie krótszym czasie i nie napromieniowałam próbek w sposób ciągły. Jednocześnie roztwory bazowe ligandów (1.5 mM w DMSO) przechowywane w temperaturze 4 °C i chronione przed światłem były stabilne przez kilka miesięcy, co kontrolowałam za pomocą technik UV-Vis, fluorescencji i HPLC [**H3,H7,H8**]. W badaniach interakcji ligand-DNA należy upewnić się, że roztwór badanego związku w wybranym buforze jest stabilny w czasie. Potwierdziłam, że roztwory moich ligandów (1 µM - 50 µM) w buforze Tris-HCl taką stabilność wykazują, nie obserwowałam zjawiska agregacji ani strącania, ponieważ widma rejestrowane natychmiast oraz po 10 i 20 minutach od dodania kolejnej porcji liganda idealnie nakładały się na siebie i były nie do odróżnienia. Ligandy były również stabilne w wyższych temperaturach, ponieważ ich widma UV-Vis rejestrowane w zakresie temperatur 20-95 °C wykazywały jedynie niewielkie różnice w absorbancji.

Głównym elementem strukturalnym różniącym trzy badane ligandy jest podstawnik na atomie azotu karbazolu. Zastąpienie podstawnika etylowego (ligand **I**) bardziej elastycznym łańcuchem butylowym zakończonym pierścieniem azolowym (triazolowym w ligandzie **II** i imidazolowym w ligandzie **III**) otwiera dodatkowe możliwości interakcji między ligandami, a badanymi G-kwadrupleksami (Rys. 4). Mimo tych różnic, praktycznie nie zaobserwowałam żadnych systematycznych zmian spektralnych badanych pochodnych. Ale związki te różnią się aktywnością biologiczną. Zaobserwowaliśmy różnice w cytotoksyczności *in vitro* na wybranych liniach komórkowych. Oczekujemy również różnic w aktywności przeciwdrobnoustrojowej, ponieważ zgodnie z doniesieniami literaturowymi małe zmiany strukturalne jak zamiana pierścienia imidazolowego i triazolowego wpływają na właściwości przeciwbakteryjne czy przeciwgrzybicze związków [**H4**].

Ale to właśnie właściwości spektralne badanych ligandów, jak pasmo absorpcyjne w zakresie widzialnym i właściwości fluorescencyjne pozwoliły mi na zastosowanie spektroskopii UV-Vis i fluorescencji w bezpośrednim badaniu oddziaływań związków karbazolowych z DNA [**H3,H5-H8**]. W naszej grupie badawczej to właśnie te techniki, wraz ze spektroskopią dichroizmu kołowego, wykorzystujemy w badaniach oddziaływań nowych związków z DNA. Powinowactwo wiązania pojedynczego liganda do różnych próbek DNA badałam za pomocą metody dializy równowagowej z detekcją absorpcyjną i fluorescencyjną [**H8**]. W badaniu oddziaływania ligandów karbazolowych z G-kwadrupleksami DNA przeprowadziłam klasyczne eksperymenty miareczkowań spektrofotometrycznych

i fluorescencyjnych, które pozwoliły mi na wyznaczenie stałych trwałości kompleksów ligand-DNA [H5-H7]. Z wykorzystaniem tych technik oraz dichroizmu kołowego określałam stochiometrię kompleksów ligand-DNA (metoda Joba, FID *Fluorescence Intercalator Displacement assay*) [H5,H7]. Zastosowanie tej ostatniej techniki pozwoliło mi na ocenę powstawania, stabilności (analiza krzywych topnienia, pomiary w temp. pokojowej), topologii G-kwadrupleksów, prawdopodobnego sposobu oddziaływania ligand-DNA oraz wpływu badanych ligandów na te struktury DNA [H5-H7].

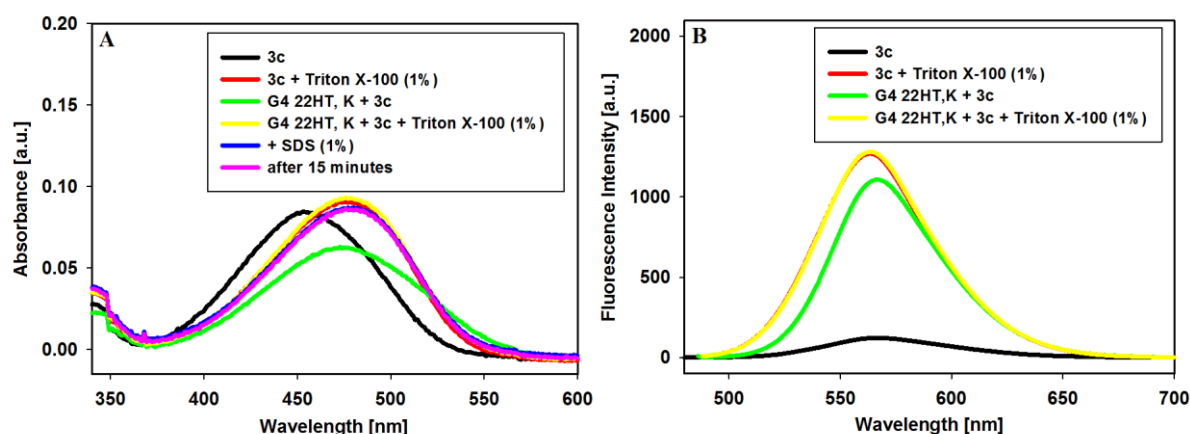
Aby ocenić selektywność i powinowactwo ligandów karbazolowych do dwuniciowych i czteroniciowych struktur DNA, przeprowadziłam konkurencyjne eksperymenty dializacyjne z wykorzystaniem ośmiu struktur kwasów nukleinowych [H8]. Spośród metod odpowiednich do badania selektywności wiązania ligandów do różnych struktur kwasów nukleinowych (jednoniciowych, dupleksów, trypleksów lub tetrapleksów) o różnych topologiach (kwadrupleksy antyrównoległe, hybrydowe lub równoległe), metoda dializy równowagowej/konkurencyjnej jest szczególnie użyteczna. Zalet tej metody jest wiele, w tym szybkość (mimo, że eksperyment prowadzony jest przez 3 kolejne dni) i możliwość badania wielu próbek kwasów nukleinowych w tych samych warunkach w tym samym czasie. Tak więc możemy zbadać powinowactwo badanego związku do wielu różnorodnych form strukturalnych DNA, w celu określenia selektywności oddziaływań ligand-DNA w jednym eksperymencie. Nie uważam jednak, że jest to metoda prosta, ponieważ wymaga bardzo dobrze zaplanowanego eksperymentu oraz ogromnego skupienia w celu osiągnięcia jak najwyższej precyzji i dokładności. Jest też droga ze względu na cenę jednorazowych gilz dializacyjnych.



Rys. 5. Eksperyment dializy równowagowej.

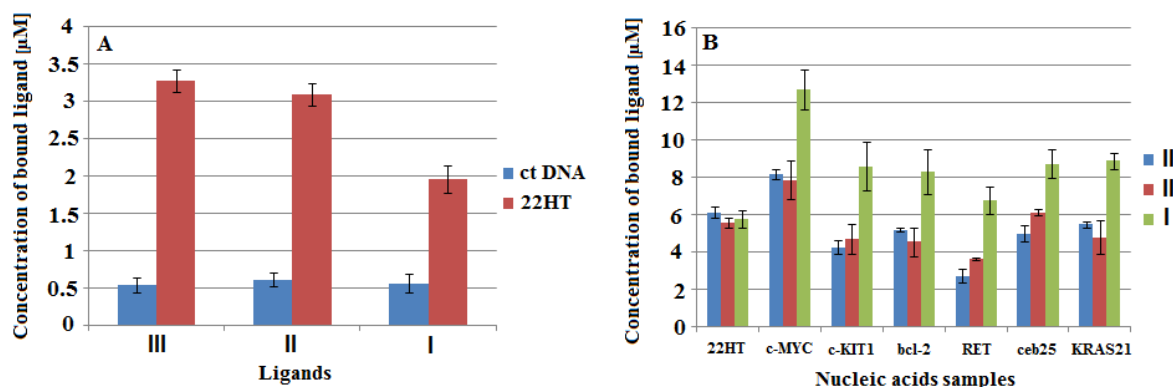
W eksperymencie dializy równowagowej równe objętości wybranych próbek DNA o tym samym stężeniu umieszcza się w osobnych gilzach dializacyjnych zaopatrzonych w błonę dializacyjną nieprzepuszczalną dla cząsteczek DNA, podczas gdy składniki małowcząstkowe z dializatu, jak ligand, jony soli czy bufor mogą dyfundować przez nią swobodnie (Rys. 5). Tam, gdzie silniejsze są oddziaływania ligand-DNA, tam w gilzach jest większe stężenie badanego związku. Po 24-godzinach eksperymentu i rozbiciu kompleksu ligand-DNA ilość związanego liganda określa się za pomocą spektroskopii UV-Vis lub fluorescencyjnej. Eksperymenty można prowadzić w różnych buforach z dodatkiem kationów sodu lub potasu [31,32], jednak głównie stosuje się różne bufony na bazie sodu mimo badania specyficznych struktur DNA tworzących się w buforze w obecności potasu [33-35]. Aby zbadać selektywność ligandów do różnych G-kwadrupleksów wydawało się zasadne przeprowadzenie eksperymentów w takich właśnie warunkach. W doświadczeniach przeprowadzonych w buforze w obecności jonów sodowych po dializie standardowo dodaje się SDS (roztwór dodecylsiarczanu sodu), aby rozbić kompleks ligand-DNA i przeprowadzić pomiary spektralne. Ale podczas pracy z buforami w obecności jonów potasu dodanie SDS prowadzi do wytrącenia siarczanów. Ferreira i in. rozwiązali ten problem, trawiąc kompleks

fosfodiesterazą z jadu węża pod koniec eksperymentu dializacyjnego [36]. Alternatywny sposób obejmuje zastosowanie innego środka powierzchniowo czynnego np. niejonowego w celu zdysocjowania kompleksu ligand-DNA [31,32]. Postanowiłam sprawdzić prostszy sposób i do rozbicia kompleksu ligand-DNA użyłam Tritonu X-100 [H8]. Przedtem jednak sprawdziłam, czy cały ligand jest uwalniany z kompleksu pod wpływem tego surfaktanta. Jak widać na rysunku 6A po dodaniu Tritonu X-100 (1% (w/v)) do roztworu liganda **I**, długofalowe pasmo w widmie absorpcyjnym przy 453 nm, charakterystyczne dla chromoforu karbazolowego sprzężonego z ugrupowaniem benzotiazoliowym poprzez podwójne wiązanie C=C, uległo przesunięciu batochromowemu do 478 nm ($\Delta\lambda = 25$ nm) i obserwowałam mały hiperchromizm (6,6%) (Rys. 6A). Gdy Triton X-100 dodałam do kompleksu G4 22HT z taką samą ilością liganda w buforze w obecności jonów potasowych, ligand został uwolniony z kompleksu i nie obserwowałam zmętnienia roztworu. Ponadto dodatek SDS (1% (w/v)) nie wpłynął na absorbancję, ani nie zaobserwowałam tego po 15 minutach. Widma wolnego liganda i liganda uwalnianego z kompleksu w obecności Tritonu X-100 praktycznie nakładały się na siebie (Rys. 6A). W widmach fluorescencji po dodaniu Tritonu X-100 do roztworu samego liganda **I** jego emisja znacznie wzrosła (Rys. 6B). Gdy Triton X-100 dodałam do jego kompleksu z 22HT G4, ligand został uwolniony, a jego widmo pokryło się widmem emisyjnym wolnego liganda w obecności Tritonu X-100 (Rys. 6B). W rezultacie udało mi się wykorzystać Triton X-100 w eksperymencie dializy równowagowej do zbadania selektywności ligandów karbazolowych do G-kwadrupleksów utworzonych na sekwencjach różnych protoonkogenów w buforze zawierającym jony potasu [H8].



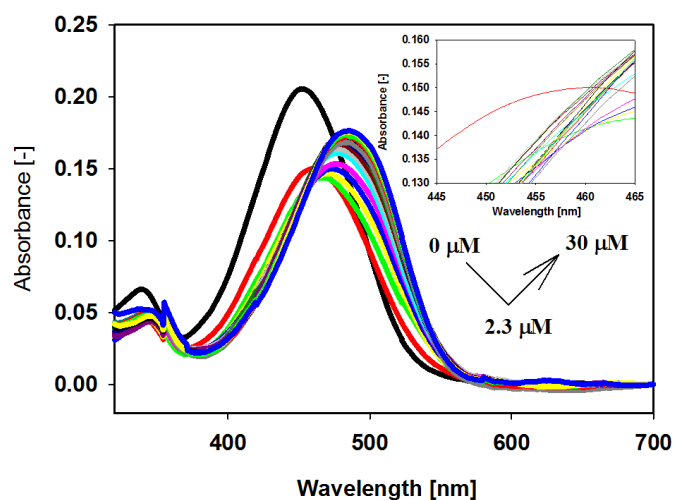
Rys. 6. Wpływ Tritonu X-100 na dysocjację liganda **I** (3 μM) z kompleksu z DNA w buforze na bazie potasu. (A) Widma absorpcyjne i (B) widma fluorescencyjne; warunki: [L] = 3 μM, [22HT G4] = 3 μM, 10 mM bufor Tris-HCl (pH 7.2) zawierający 100 mM KCl; λ_{wzb} : 453 i 478 nm.

Otrzymane wyniki z eksperymentów przeprowadzonych w roztworze buforowym w obecności jonów sodu wskazują, że badane ligandy mają większe powinowactwo do struktur G-kwadrupleksowych niż dwuniciowego DNA (Rys. 7A). Ligandy wykazują również wysokie powinowactwo do wszystkich tetrapleksów, z preferencją wiązania do G-kwadrupleksu c-MYC. Zmiany obserwowane w tych doświadczeniach były silniejsze dla liganda **I**, a takich różnic w oddziaływaniu nie obserwowałam podczas innych eksperymentów wykorzystujących spektrofotometrię UV-Vis i fluorescencję. Jednak tendencja w powinowactwie dwóch pozostałych ligandów **II** i **III** z podstawnikami azolowymi jest zgodna z poprzednimi doświadczeniami: c-MYC > KRAS21 ~ bcl-2 ~ 22HT/K > c-KIT1 > 22HT/Na [H5,H6,H8,37].



Rys. 7. Wyniki eksperymentu dializy równowagowej (A,B). Ilość ligandów karbazolowych związanych z ctDNA i różnymi G-kwadrupleksami przedstawiono w postaci wykresu słupkowego. Stężenie wolnego liganda w doświadczeniu wynosi 1 μM , a całkowite stężenie każdego G-kwadrupleksu wynosiło 75 μM na G4 DNA, jako jednostkę monomeryczną.

Szczegółowe badanie oddziaływania ligandów karbazolowych z G-kwadrupleksami DNA utworzonymi na oligonukleotydach o sekwencji ludzkiego telomerowego DNA i różnych ludzkich protoonkogenów rozpoczęłam od analizy widm absorpcyjnych. Doświadczenia prowadziłam w 10 mM buforze Tris-HCl (pH 7.2) zawierającym 100 mM NaCl lub KCl. Ligandy karbazolowe tworzą silne kompleksy z badanymi sekwencjami, na co wskazują widma absorpcji ligandów w zakresie widzialnym zarejestrowane przy braku i w obecności G-kwadrupleksów (Rys. 8) [H3,H5-H7].



Rys. 8. Przykładowy wynik miareczkowania spektrofotometrycznego. Ligand III (6 μM) miareczkowano G-kwadrupleksem 22HT (0–30 μM) w buforze Tris-HCl (10 mM, pH 7.2) zawierającym 100 mM NaCl.

Długofalowe maksima w widmach absorpcyjnych ligandów, charakterystyczne dla chromoforu karbazolowego sprzężonego z ugrupowaniem benzotiazoliowym poprzez wiązanie podwójne C=C, zmieniały się znacząco wraz ze wzrostem stężenia G-kwadrupleksów. Postulowaliśmy dwuetapowe tworzenie kompleksów między ligandami, a G-kwadrupleksami. Początkowo obserwowany efekt hipochromowy przy niższych stosunkach molowych G4/ligand związany był z możliwością ułożenia na powierzchni G-kwadrupleksu nadmiaru dodatnio naładowanego liganda w wyniku przyciągania elektrostatycznego z ujemnie naładowanymi grupami fosforanowymi DNA, co prowadziło ostatecznie do agregacji ligand-ligand. Pod wpływem wyższych stężeń G4 następowała

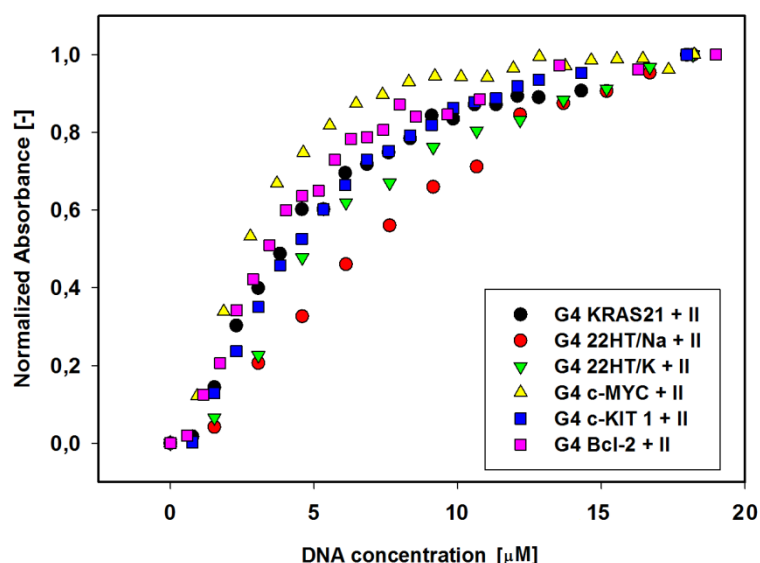
redystrybucja cząsteczek liganda (dysocjacja agregatów) do miejsc wiążących o wyższym powinowactwie (oddziaływania *end-stacking*). Proces ten przejawiał się w postaci efektu hiperchromowego i przesunięcia batochromowego (Tabela 2) [H5-H7]. Mogę jednoznacznie stwierdzić, że w wodnych roztworach buforowych badane związki agregatów nie tworzą, co potwierdzają widma temperaturowe UV-Vis. Ale nie możemy tego wykluczyć w prowadzonych eksperymentach miareczkowań, gdzie w badanym roztworze mamy ujemnie naładowany polimer DNA.

Tabela 2. Efekty spektralne ligandów **I-III** związanych z badanymi G-kwadrupleksami DNA.

G4 DNA	$\Delta\lambda_{\max}$ [nm] ^a			Hipochromizm [%] ^b			Hiperchromizm [%] ^b		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
c-MYC	57	52	52	30	24	28	32	14	18
c-KIT1	36	38	42	35	30	31	15	16	25
BCL-2	47	41	42	33	26	28	22	10	13
KRAS	51	40	42	36	25	33	21	9	27
22HT/Na	33	35	33	31	31	27	15	12	17
22HT/K	37	38	33	29	24	22	16	8	19

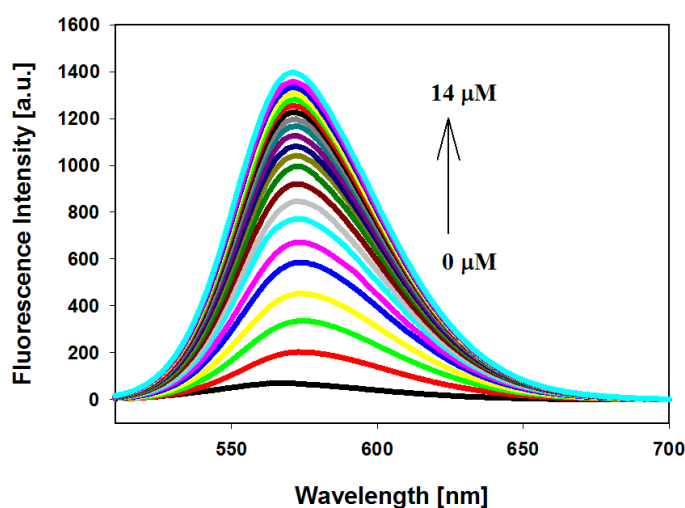
^a $\Delta\lambda$ przesunięcie batochromowe. ^bHipochromizm i hiperchromizm mierzony przy $\lambda_{\max}$. Wartości procentowe hipo- i hiperchromizmu obliczono stosując następujące równania: % Hipo = $[(A_w - A_{z, \min}) / A_w] \times 100$ i % Hiper = $[(A_{z, \max} - A_{z, \min}) / A_{z, \max}] \times 100$, gdzie A_w , $A_{z, \min}$, $A_{z, \max}$ to odpowiednio absorbancja liganda wolnego, związanego o minimalnej absorbancji i związanego o maksymalnej absorbancji (przy nadmiarze nadmiar G4 DNA).

Wyraźne zmiany w widmach UV-Vis wskazują na silne oddziaływania między ligandami karbazolowymi, a zewnętrznymi tetradami badanych G-kwadrupleksów niezależnie od ich struktury (antyrównoległa w przypadku G4 22HT/Na, hybrydowa G4 22HT/K, równoległe G4 c-MYC i c-KIT1, KRAS i mieszana Bcl-2), wskazując jednocześnie na ten sam typ oddziaływania. Brak punktów izozbestycznych w eksperymentach miareczkowania wskazuje, że w badanych układach zachodzą bardziej złożone procesy niż dwuskładnikowa równowaga pomiędzy wolnym i związanym ligandem [H5-H7]. Mimo stosowania nadmiaru DNA praktycznie nigdy nie następowało wysycenie, co bardzo utrudniało obliczenia stałych wiązania (Rys. 9). Kształt znormalizowanych krzywych jednoznacznie wykazał na silniejsze wiązanie badanych ligandów do G-kwadrupleksu utworzonego na oligonukleotydzie o sekwencji protoonkogenu c-MYC.



Rys. 9. Znormalizowane zmiany absorbancji liganda **II** vs. wzrost stężenia różnych G-kwadrupleksów w eksperymentach miareczkowania spektrofotometrycznego.

Powinowactwo wiązania ligandów karbazolowych do G-kwadrupleksów badałam również za pomocą pomiarów fluorescencji [H5-H8]. Związki **I-III** słabo emitują w buforowym roztworze wodnym Tris HCl/KCl lub NaCl. Jednak dodatek G-kwadrupleksu DNA powodował w każdym przypadku znaczny wzrost intensywności emisji dla każdego liganda, co może być związane z ochroną liganda przed wygaszaniem przez polarne cząsteczki wody. Hydrofobowe środowisko wewnątrz G-kwadrupleksu pomaga cząsteczkom liganda odzyskać swoją fluorescencję (Rys. 10) [38,39].

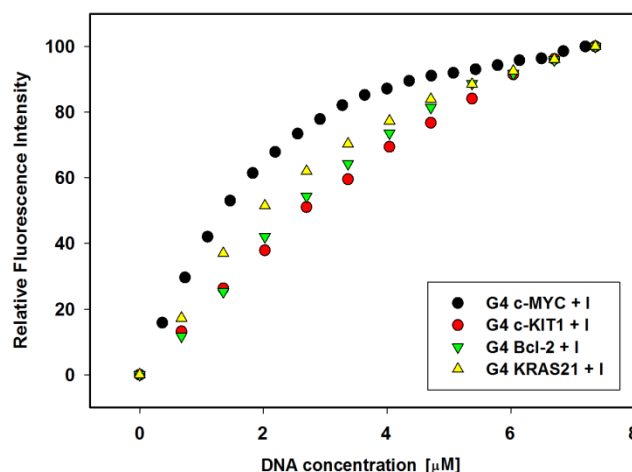


Rys. 10. Widma miareczkowania fluorescencyjnego liganda **I** (2 μM) G-kwadrupleksem c-KIT1 (0–14 μM) w buforze Tris-HCl (10 mM, pH 7.2) zawierającym 100mM KCl, λ_{wzb} 493 nm.

Alternatywnym wytłumaczeniem tego zjawiska może być dezaktywacja stanu wzbudzonego związków w wodzie przez niską barierę energii rotacyjnej ugrupowania benzotiazoliowego liganda. Wzrost intensywności fluorescencji ligandów podczas oddziaływania *end-stacking* z G4 spowodowana jest ograniczonym obrotem wokół pojedynczego wiązania łączącego ugrupowanie benzotiazoliowe i winylo-karbazolowe barwnika [40]. Potwierdzeniem tego

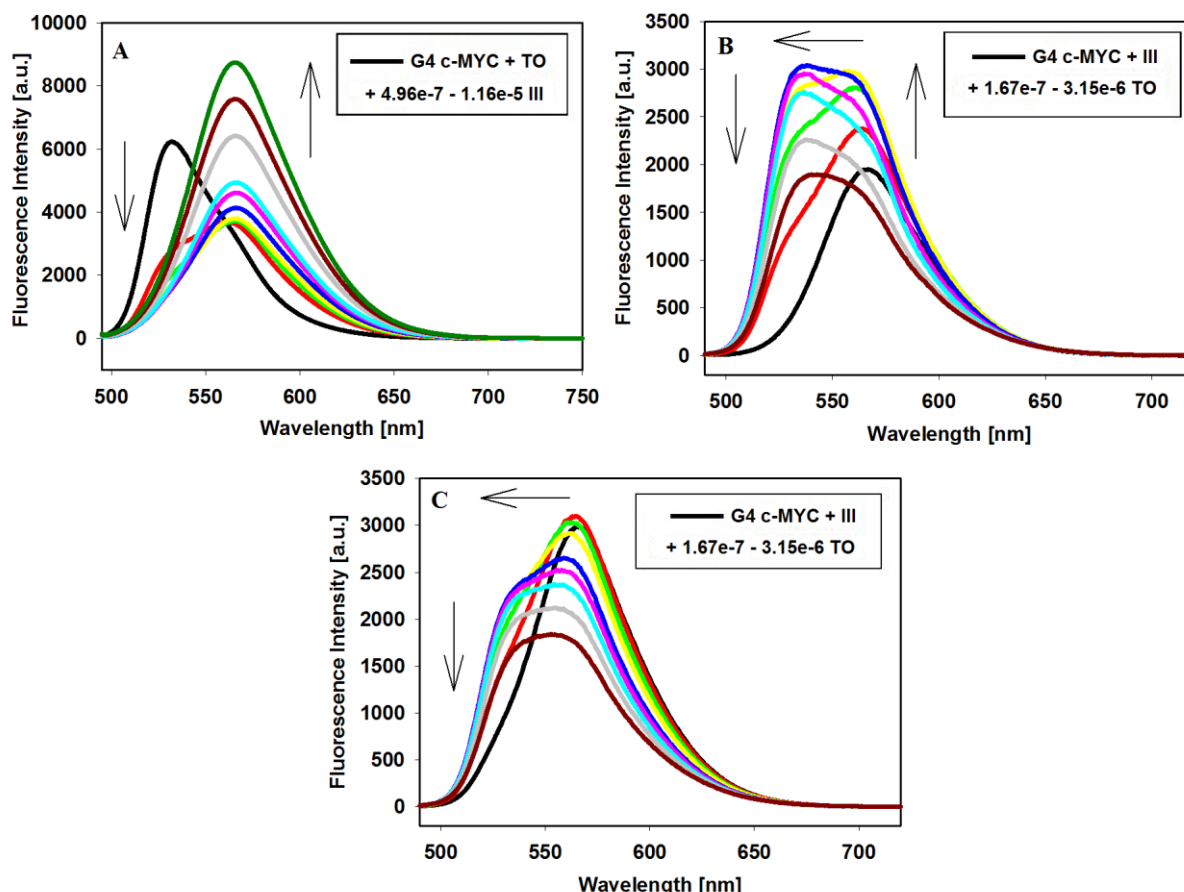
wyjaśnienia może być obserwacja, że intensywność fluorescencji wolnego liganda wzrasta również w obecności 40% roztworu PEG (glikolu polietylenowego), który ma wyższą lepkość i powoduje efekt stłoczenia molekularnego.

Należy podkreślić, że względne wzmocnienie intensywności fluorescencji jest skorelowane z wynikami otrzymanymi w eksperymentach miareczkowania spektrofotometrycznego i obliczonymi stałymi wiązania, wynikami dializy równowagowej oraz stabilnością termiczną G-kwadrupleksów w obecności ligandów **I-III** (Rys. 11, Tabele 3-5) [H5-H7,37].



Rys. 11. Relatywne wzmocnienie intensywności fluorescencji liganda **I** vs. wzrastające stężenie różnych G-kwadrupleksów; λ_{wzb} odpowiednio 506nm, 493nm, 501nm i 515nm.

Jak wspomniałam wcześniej właściwości spektralne badanych ligandów pozwalają na stosowanie bezpośrednich metod wykorzystywanych do monitorowania oddziaływań ligand-DNA. Miareczkowanie spektrofluorymetryczne dostarcza danych o sile wiązania, ale nie dostarcza informacji o stechiometrii kompleksu G4 DNA/ligand. Aby dowiedzieć się, ile ligandów karbazolowych związało się z G-kwadrupleksem c-MYC, użyłam oranżu tiazolowego (TO) jako sondy fluorescencyjnej w eksperymencie wypierania fluorescencyjnego interkalatora (*G-quadruplex Fluorescent Interkalator Displacement test* G4-FID) [H5,41]. Zastosowałam technikę niestosowaną powszechnie do badania oddziaływań fluorescencyjnych ligandów z G-kwadrupleksami, a stosowaną do pośredniego badania oddziaływań DNA z ligandami niewykazującymi właściwości fluorescencyjnych.



Rys. 12. (A) Widma fluorescencyjne w eksperymencie FID dla liganda **III**; warunki: [G4 c-MYC]=0.25 μ M, [TO]=0.5 μ M, [**III**]=0–11.6 μ M, 10mM bufor Tris-HCl (pH 7.2), 150mM KCl. (B,C) Fluorescencyjne eksperymenty miareczkowania kompleksu G4/ligand **III** oranżem tiazoliowym (TO); warunki: [G4 c-MYC]=0.25 μ M, [**III**]=0.25 μ M (B) lub 0.5 μ M (C), [TO]= 0–3.15 μ M, 10 mM bufor Tris-HCl (pH 7.2), 150 mM KCl; λ_{wzb} = 480 nm.

Eksperymenty te nie tylko potwierdziły stechiometrię kompleksu G4 c-MYC/ligand **III** jako 1:2. Podczas miareczkowania kompleksów G4-ligand oranżem tiazoliowym (TO) obserwowałam poszerzenie pasma fluorescencji przy zwiększonym stężeniu TO (6-krotny nadmiar) ze względu na pojawienie się emisji TO przy 532 nm (Rys. 12B,C). Końcowym efektem był stopniowy spadek pasma emisji, który można wytłumaczyć efektem wewnętrznego filtra lub tworzeniem mieszanych kompleksów liganda, w których może występować FRET (Förster Resonance Energy Transfer) [H5]. Dlatego też w przypadku moich ligandów wykazujących właściwości fluorescencyjne, do badania oddziaływań ligand-DNA nie stosowałam żadnych dodatkowych metod bazujących na fluorescencji, które są powszechnie stosowane do takich badań (np. G4-FID, wyznaczanie temperatury topnienia T_m bazujące na oligonukleotydach znakowanych fluorescencyjnie [42,43]).

Większą część badań miareczkowań spektrofotometrycznych i spektrofluorometrycznych wykonałam najpierw metodą z ligandem w titracie. Chciałam, aby obserwowane zmiany wynikały jedynie z oddziaływań ligand-G4 DNA bez wpływu rozcieńczenia próbki. Okazało się jednak, że wyniki uzyskane za pomocą spektroskopii UV-Vis i fluorescencji nie są porównywalne i nie można ich wykorzystać w dyskusji analizując oddziaływania ligandów karbazolowych **I-III** z DNA. Ogrom pracy włożony w te badania znacznie spowolnił prezentację moich wyników naukowych, ponieważ musiałam ponownie przeprowadzić wszystkie eksperymenty. Tym razem zastosowałam technikę

miareczkowań bez liganda w titraniu, stosując stężone próbki DNA, aby rozcieńczenie nie było większe niż 5%. Wyniki eksperymentów miareczkowania przeanalizowałam zgodnie z prostym modelem Scatcharda. Model ten jest wykorzystywany do opisu oddziaływań międzycząsteczkowych ligand-makrocząsteczka, a otrzymanie prostoliniowego wykresu Scatcharda potwierdza obecność jednego miejsca wiązania. Jak już wcześniej wspomniałam sam przebieg miareczkowania spektrofotometrycznego wskazuje na skomplikowane oddziaływanie ligandów **I-III** z DNA - nie obserwujemy punktu izozbestycznego, występuje duże przesunięcie batochromowe oraz początkowy hipochromizm z następującym po nim hiperchromizmem. Zgodnie z przewidywaniami otrzymane wykresy Scatcharda potwierdziły, że w badanych przeze mnie układach występują dwa rodzaje miejsc wiązania o zdecydowanie różnych stałych wiązania. W przypadku badanych struktur DNA mamy niewielką ilość zewnętrznych G-tetrad, z którymi ligandy wiążą się silnie i specyficjnie (oddziaływania *end-stacking*) oraz ujemnie naładowane reszty fosforanowe, z którymi dodatnio naładowane ligandy mogą oddziaływać słabiej przez niespecyficzne oddziaływania elektrostatyczne. Dodatkowo w prawie wszystkich eksperymentach krzywe miareczkowania w obu metodach nigdy nie uzyskały nasycenia, przez co oszacowane parametry wiązania zawierały względnie wysoką niepewność. Dlatego też do analizy danych i oszacowania wartości nK_b zdecydowałam się użyć metodę Benesi-Hildebranda (B-H) (Tabela 3) [44]. Należy wspomnieć, że w tej metodzie przyjęto stechiometrię utworzonego kompleksu ligand/G4 1:1, zatem wynik obliczeń B-H należy uznać za produkt nK_b [**H5-H7**].

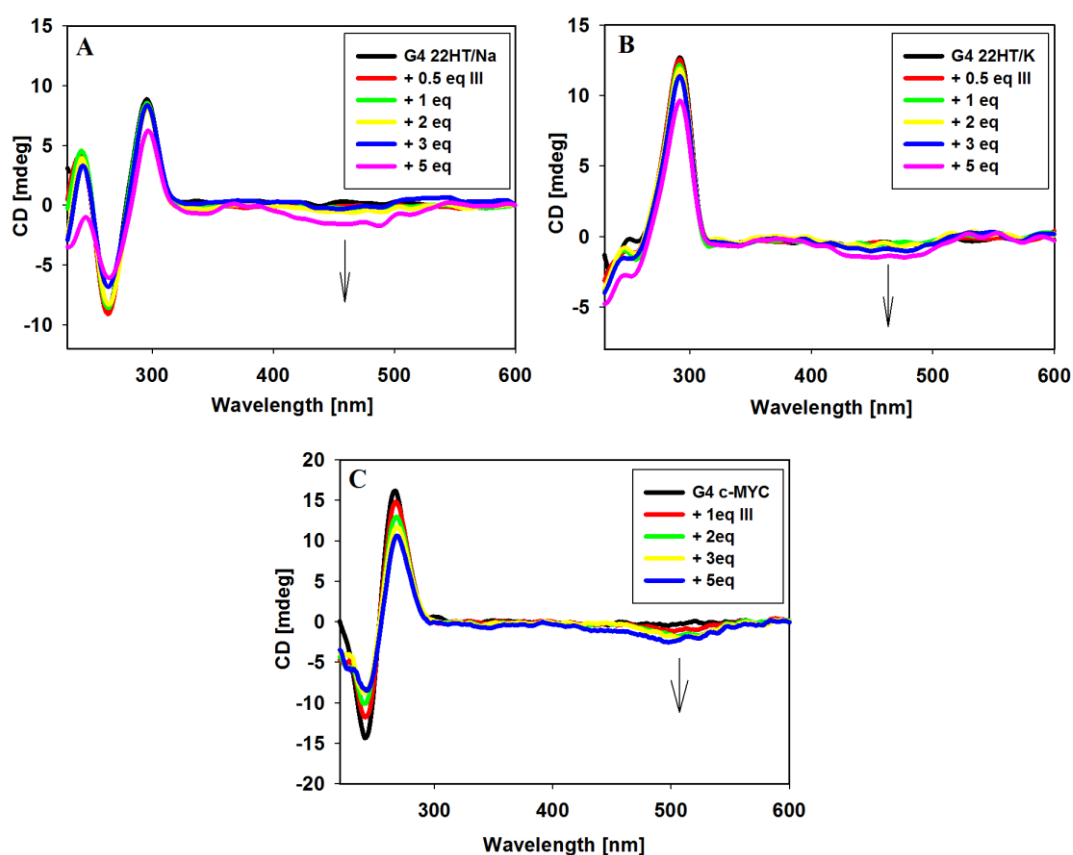
Tabela 3. Parametry oddziaływania ligandów **I-III** z różnymi G-kwadrupleksami określone za pomocą metody Benesi-Hildebranda z danych otrzymanych w eksperymentach miareczkowania spektrofotometrycznego (A) i fluorescencyjnego (F) (stała wiązania K_b , n-liczba związanych cząsteczek liganda na G-kwadrupleks).

L.p.	G-kwadrupleks	Metoda Benesi-Hildebranda, nK_b ($\times 10^5 \text{ M}^{-1}$)					
		I		II		III	
		A	F	A	F	A	F
1	22HT/Na	1.1±0.2	1.7±0.3	0.7±0.1	0.5±0.1	1.3±0.1	0.8±0.1
2	22HT/K	1.9±0.4	1.2±0.1	1.4±0.2	1.3±0.1	1.5±0.3	1.7±0.3
3	c-MYC	6.0±0.2	6.9±0.2	4.6±0.2	4.0±0.2	4.4±0.2	3.9±0.2
5	c-KIT1	1.1±0.1	1.5±0.2	1.4±0.1	1.2±0.1	2.0±0.1	1.4±0.1
6	KRAS	1.8±0.2	2.7±0.4	1.4±0.2	3.0±0.3	3.2±0.2	3.6±0.1
7	Bcl-2	2.2±0.3	2.5±0.2	2.8±0.2	3.6±0.2	3.8±0.2	4.7±0.2

Jak widać z danych zamieszczonych w tabeli 3 stałe wiązania otrzymane z trzech niezależnych eksperymentów za pomocą dwóch różnych metod spektroskopowych pozostają ze sobą w większości przypadków w dużej zgodności. Jednocześnie obserwujemy silne wiązanie ligandów do G-kwadrupleksu o sekwencji protoonkogenu c-MYC, co potwierdzają eksperymenty badania termicznej stabilizacji G-kwadrupleksów DNA wykonane z zastosowaniem spektroskopii dichroizmu kołowego.

Spektroskopia dichroizmu kołowego (CD) jest metodą stosowaną do oznaczania absolutnej struktury przestrzennej cząsteczek (konfiguracja), jak również badania konformacji chiralnych molekuł i makromolekuł, w szczególności peptydów, białek oraz kwasów

nukleinowych [45]. Badania CD pozwalają na określenie struktur II-rzędowych rozpuszczalnych białek, stosowane są w badaniu przemian konformacyjnych DNA takich jak np. denaturacja, zmiany form B/A czy B/Z, rozróżnienie DNA dwuniciowego od trójniciowego czy czteroniciowego. Ta chiralooptyczna metoda znalazła szerokie zastosowanie w badaniu oddziaływań kwasów nukleinowych z małymi cząsteczkami (ligandami) zawierającymi chromofory, czy lekami. Spektroskopia dichroizmu kołowego dostarczyła mi cennych informacji na temat powstawania, stabilności, topologii G-kwadrupleksów oraz wpływu ligandów na te struktury i prawdopodobnego sposobu oddziaływania [46-48]. Typowe widmo CD G-kwadrupleksu utworzonego na oligonukleotydzie o sekwencji ludzkiego telomerowego DNA w obecności jonów Na^+ posiada dodatnie pasmo przy 295 nm i dwa mniejsze pasma o przeciwnej orientacji: ujemne przy 265 nm i dodatnie przy 240 nm, charakterystyczne dla antyrównoległej struktury typu koszyk [49]. W obecności jonów K^+ G-kwadrupleks przyjmuje mieszaną strukturę hybrydową o widmie CD charakteryzującym się silnym dodatnim pasmem przy 293 nm oraz ramieniem przy około 270 nm i mniejszym ujemnym pasmem przy 240 nm [50]. Widma CD G-kwadrupleksów o sekwencji ludzkich protoonkogenów w większości zdominowane są przez intensywne dodatnie pasmo przy 262 nm i mniejsze ujemne przy 245 nm, typowe dla równoległej struktury G-kwadrupleksu [51]. Badanie wpływu ligandów na G-kwadrupleksy przeprowadza się rejestrując widma DNA po dodaniu kolejnych porcji liganda. Wszystkie badane ligandy karbazolowe nie wpływają na położenie pasm badanych G-kwadrupleksów, co wskazuje, że struktury te zachowują swoją topologię. Stopniowe zmniejszanie intensywności sygnałów CD po dodaniu większych ilości ligandów nie wskazuje zależnego od ligandów zaburzenia idealnego ułożenia tetrad w G-kwadrupleksie, ale raczej są to zmiany wynikające z oddziaływań *end-stacking* (Rys. 13) [52,53].



Rys. 13. Widma dichroizmu kołowego (CD) G-kwadrupleksu 22HT (5 μM) w sodzie (A) i potasie (B) oraz G4 c-MYC (5 μM) w potasie (C) rejestrowane po kolejnych dodatkach liganda **III** (0-5 ekw.) w buforze Tris-HCl (10 mM, pH 7.2) zawierającym 100 mM NaCl (A) oraz 100 lub 150 mM KCl (B, C).

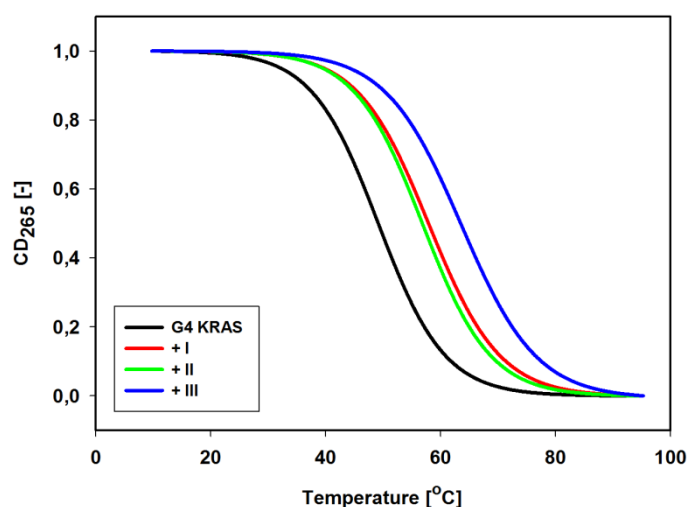
Należy zauważyć, że badane ligandy są achiralne, a więc nie wykazują aktywności CD w roztworze. Jednakże w rejonie długofalowym, w którym ligandy karbazolowe mają pasma absorpcyjne, można zaobserwować ujemne indukowane sygnały CD (ICD). Zauważyłam, że w przypadku eksperymentów z G-kwadrupleksem c-MYC pasma ICD zostały przesunięte do ok. 500 nm (Rys. 13C), co potwierdza największe przesunięcie batochromowe jakie zaobserwowałam w doświadczeniach miareczkowania spektrofotometrycznego z tą strukturą DNA (52-57 nm, Tabela 2). Tak więc pojawienie się pasm ICD wskazuje, że różne G-kwadrupleksy, takie jak c-MYC, c-KIT1, KRAS, Bcl-2 i telomerowy, niezależnie od struktury wiążą się z badanymi związkami w taki sam sposób [**H5,H6,37**]. Na widmach CD nie obserwujemy dodatnich sygnałów indukowanych, co raczej wyklucza wiązanie ligandów z bruzdami badanych struktur G-kwadrupleksowych [46, 54-56]. W badaniu oddziaływania ligandów z G-kwadrupleksami spektroskopię dichroizmu kołowego wykorzystałam również w inny sposób. Aby uzyskać informacje o stabilizacji (lub destabilizacji) struktury G-kwadrupleksu przez badany ligand określiłam termiczną stabilizację G-kwadrupleksów DNA utworzonych w obecności każdego z ligandów, w porównaniu do samego G4 DNA poprzez rejestrację profili topnienia (T_m). Eksperymenty prowadziłam w 10 mM buforze Tris-HCl (pH 7.2) zawierającym 100 mM NaCl lub KCl. W przypadku G-kwadrupleksów o wysokich wartościach T_m , gdzie nie byłoby możliwe wyznaczenie temperatur topnienia kompleksów ligand-G4 zastosowałam bufor o niskiej sile jonowej (stężenie K^+ zmniejszyłam do 10 mM i dodałam 90 mM LiCl) (Tabela 4) [37,57,**H6**]. Badane procesy charakteryzują się powolną kinetyką, na co wskazywała często obserwowana histereza między krzywymi topnienia i splatania w przypadku eksperymentów prowadzonych z szybkością grzania 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (krzywe denaturacji przesunięte były w kierunku wyższych temperatur niż krzywe renaturacji) [58,59]. Wszystkie przeprowadzone eksperymenty wykazały, że ligand **III** z ugrupowaniem imidazolowym najlepiej termicznie stabilizuje badane G-kwadrupleksy DNA. Dane te są w dobrej zgodności z danymi uzyskanymi w pomiarach z zastosowaniem absorpcji UV-Vis i fluorescencji.

Tabela 4. Podsumowanie badań nad topnieniem G-kwadrupleksów DNA w obecności 3 ekwiwalentów ligandów **I-III**.

L.p.	G-kwadrupleks	G4 DNA	I	II	III
		T_m [$^{\circ}\text{C}$]	$T_m/\Delta T_m$ [$^{\circ}\text{C}$]	$T_m/\Delta T_m$ [$^{\circ}\text{C}$]	$T_m/\Delta T_m$ [$^{\circ}\text{C}$]
1	22HT/Na ^a	49.5	51.8 $\Delta = 2.3$	53.3 $\Delta = 3.8$	54.1 $\Delta = 4.6$
2	22HT/K ^b	62.0	62.5 $\Delta = 0.5$	63.2 $\Delta = 1.2$	66.3 $\Delta = 4.3$
3	c-MYC PDB id: 2L7V ^c	70.1	76.7 $\Delta = 6.6$	74.3 $\Delta = 4.2$	80.4 $\Delta = 10.3$

4	c-MYC PDB id: 2LBY ^c	57.3	64.9 $\Delta = 7.6$	64.3 $\Delta = 7.0$	69.0 $\Delta = 11.7$
5	c-KIT1 id: 2O3M ^c	51.8	57.7 $\Delta = 5.9$	57.2 $\Delta = 5.4$	60.2 $\Delta = 8.4$
6	KRAS ^b	47.1	56.3 $\Delta = 9.2$	54.8 $\Delta = 7.7$	60.7 $\Delta = 13.6$
7	Bcl-2 id: 2F8U ^b	51.2	60.9 $\Delta = 9.7$	60.2 $\Delta = 9.3$	64.9 $\Delta = 13.7$

^a T_m G4 bez i z ligandami **I–III** w 10 mM buforze Tris-HCl (pH 7.2), 100 mM NaCl. ^b T_m G4 bez i z ligandami **I–III** w 10 mM buforze Tris-HCl (pH 7.2), 100 mM KCl. ^c T_m G4 bez i z ligandami **I–III** w 10 mM buforze Tris-HCl (pH 7.2), 90 mM LiCl i 10 mM KCl. ΔT_m otrzymałam z różnicy w temperaturach topnienia G-kwadrupleksu związanego z 3 ekw. liganda i nieskompleksowanego. Dane zbierano przy 293nm w przypadku G-kwadrupleksów 22HT/Na i 22HT/K oraz przy 265 nm we wszystkich pozostałych eksperymentach. Wykonano trzy powtórzenia eksperymentów, a średnie wartości podano w granicach ± 0.5 °C.



Rys. 14. Znormalizowane profile topnienia CD G-kwadrupleksu KRAS zarejestrowane przy 265nm bez i z 3 ekwiwalentami ligandów **I–III** w 10 mM buforze Tris-HCl (pH 7.2) zawierającym 100 mM KCl.

Zarejestrowałam również profile topnienia oligonukleotydów inkubowanych z ligandami karbazolowymi bez dodatku jonów Na^+ i K^+ , co potwierdziło zdolność ligandów do indukowania tworzenia struktur G-kwadrupleksowych (Tabela 5) [**H5,H7**]. Jedynie w przypadku oligonukleotydu o sekwencji protoonkogenu Bcl-2 nie zaobserwowałam tworzenia się G-kwadrupleksu, chociaż wszystkie badane ligandy stabilizują już utworzony G4 (Tabela 4). Również te eksperymenty potwierdziły największy wpływ liganda **III** na tworzenie G-kwadrupleksów, podczas gdy zdolność ligandów **I** i **II** była nieco niższa i na porównywalnym poziomie.

Tabela 5. Podsumowanie badań nad wpływem ligandów **I-III** na tworzenie G-kwadrupleksów DNA w przypadku braku soli.

L.p.	Oligonukleotyd	I	II	III
		T _m [°C]	T _m [°C]	T _m [°C]
1	22HT	27.2	30.6	44.6
2	c-MYC PDB id: 2L7V	47.6	47.2	55.2
3	c-MYC PDB id: 2LBY	40.8	38.4	46.0
4	c-KIT1 id: 2O3M	37.5	36.5	40.3
5	Bcl-2 id: 2F8U	b.e.	b.e.	b.e.
6	KRAS	29.3	30.3	33.5
7	Ceb25 id: 2LPW	37.2	35.5	42.4
8	RET id: 2L88	46.3	46.9	48.9

b.e. - brak efektu. T_m oligonukleotydu z 3 ekw. ligandów **I-III** w 10 mM buforze Tris-HCl (pH 7.2) bez dodatku soli. Dane zbierano przy 293nm w przypadku oligonukleotydu o sekwencji telomerowej oraz przy 265 nm w przypadku wszystkich pozostałych oligonukleotydów. Wykonano trzy powtórzenia eksperymentów, a średnie wartości podano w granicach ± 0.5 °C.

Oddziaływania G-kwadrupleksów c-MYC, c-KIT1 i BCL-2 z ligandami karbazolowymi potwierdzono z wykorzystaniem modelowania molekularnego. Dr Martyna Kuta-Siejewska w ramach swojej pracy doktorskiej "Studies on interactions of protooncogenic G-quadruplexes with ligands", której byłam promotorem pomocniczym, wykonała główne obliczenia w grupie badawczej dra Shozeba Haidera w University College London (Department of Pharmaceutical and Biological Chemistry, School of Pharmacy), który był kopromotorem tej pracy doktorskiej [**H5,H6**]. Do badań wybrano struktury o rozwiązanej już strukturze z bazy Protein Data Bank: id: 2L7V (c-MYC), id: 2O3M (c-KIT1) i id: 2F8U (BCL-2), które dr Haider wielokrotnie wykorzystywał do badania oddziaływań z ligandami. Dzięki temu mieliśmy pewność, że badania teoretyczne będą wykonane na najwyższym światowym poziomie. Poprzez dokowanie ligandów karbazolowych do wymienionych struktur (ICM Molsoft) otrzymano dziewięć kompleksów będących strukturami początkowymi w eksperymentach symulacji dynamiki molekularnej. Wykonano szczegółową analizę symulacji dla tych kompleksów oraz struktur nieskompleksowanych G-kwadrupleksów poprzez obliczenie wartości RMSD, RMSF, analizę tworzonych wiązań wodorowych, analizę położenia liganda względem zewnętrznych tetrad, klastrowanie, analizę stabilności wiązań wodorowych Hoogsteena w G-tetradach, obliczenia energii wiązania (VINA z funkcją X-score) oraz analizę SASA (Solvent Accessible Surface Area). Analizując uzyskane wyniki określono stabilność otrzymanych kompleksów w czasie, siłę oddziaływania G-kwadrupleksów z badanymi ligandami **I-III**, jak również oceniono wpływ ligandów na stabilność badanych G-kwadrupleksów. Wyniki badań wykazały, że swoboda konformacyjna liganda **II** z ugrupowaniem triazolowym jest większa od pochodnej **III** z podstawnikiem imidazolowym. Dokowanie potwierdziło występowanie oddziaływań wartstwowych *end-stacking* między ligandami, a zewnętrznymi G-tetradami. Zaobserwowano tworzenie się wiązań wodorowych między ligandami **II** i **III** z podstawnikami azolowymi, a nukleotydami znajdującymi się w pętlach. Analiza wiązań

wodorowych Hoogsteena w G-kwadrupleksach wolnych i skompleksowanych z ligandami karbazolowymi **I-III** wykazała ich dużą trwałość niezależnie od rodzaju G4 i stosowanego liganda. Uzyskane rezultaty wskazały, że wszystkie badane ligandy karbazolowe stabilizują G-kwadrupleksy tworzące się na oligonukleotydach o sekwencjach różnych ludzkich protoonkogenów, jednocześnie potwierdzając atrakcyjność tych struktur i wykazując możliwość poprawy właściwości przez kolejne modyfikacje strukturalne [**H5,H6**]. Wyniki te są zgodne z rezultatami eksperymentalnymi. Chciałabym dalej kontynuować współpracę z doktorem Haiderem w następnych projektach.

We współpracy z Katedrą Chemii Klinicznej i Diagnostyki Molekularnej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu kierowaną przez prof. dr hab. Marię Rybczyńską, a obecnie przez dr hab. Błażeja Rubisia, przeprowadzone zostały eksperymenty cytotoksyczności na estrogenozależnych i estrogenoniezależnych komórkach raka piersi MCF7 i MDA-MB-231 oraz prawidłowych komórkach gruczołu piersiowego MCF-12A. Badania wykazały, że związki różnią się aktywnością dla poszczególnych linii komórkowych, a ligand **III** nie wykazuje cytotoksyczności w stosunku do komórek prawidłowych [**H7**, 37]. Dodatkowo dla liganda **III** z ugrupowaniem imidazolowym, który wykazał największą stabilizację G-kwadrupleksu utworzonego na sekwencji telomerowej i najlepiej wpływającego na utworzenie tego G-kwadrupleksu, nawet bez obecności jonów Na^+ i K^+ , zbadano hamowanie aktywności telomerazy z wykorzystaniem testu protokołu amplifikacji powtórzeń telomerowych (TRAP). Aby ocenić wpływ liganda **III** na aktywność polimerazy Taq i zweryfikować specyficzny wpływ na aktywność telomerazy, przeprowadzono doświadczenie PCR (reakcja łańcuchowej polimerazy) w obecności różnych stężeń związku. PCR wykazał spadek aktywności polimerazy Taq przy wyższych stężeniach liganda (5 i 10 μM) [**H7**]. Ale wydaje się, że aktywność cytotoksyczna tego liganda nie jest związana z hamowaniem telomerazy. Nie jest to wniosek niespodziewany, ponieważ wiele znanych ligandów stabilizujących G-kwadrupleks nie jest ukierunkowanych na enzym telomerazę, ale sam telomer [1].

Tabela 6. Cytotoksyczność *in vitro* pochodnych karbazolu **I-III** na wybranych liniach komórkowych po 72h.

Cytotoksyczność (IC_{50} , μM)			
Linie komórkowe	I	II	III
MCF7	1.16	2.73	9.5
MDA-MB-231	2.3	6.94	11.4
MCF-12A	b.d.	b.d.	b.e.

b.d. brak danych; b.e. brak efektu

Podjęłam również próby określenia dynamiki i siły oddziaływania G-kwadrupleksu o sekwencji protoonkogenu c-MYC z badanymi ligandami z zastosowaniem spektroskopii NMR. Badania te były prowadzone w Zespole Biomolekularnego NMR w Instytucie Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu pod kierunkiem prof. dr hab. Zofii Gdaniec. Niestety, magnetyczny rezonans jądrowy, jako narzędzie niezbędne do określania struktury G-kwadrupleksów oraz badania oddziaływań ligand-G-kwadrupleks jest bardzo wymagającą techniką – bardzo często nie udaje się otrzymać, a tym samym zanalizować, tylko jednej struktury G4 DNA. I tak również było w naszym przypadku. Nie udało się przyporządkować poszczególnych protonów odpowiednim zasadom guaninowym, a tym samym nie mogliśmy użyć tej metody do potwierdzenia oddziaływania *end-stacking*. Dlatego

publikacja dotycząca oddziaływań ligandów karbazolowych ze wspomnianym G-kwadrupleksem nie została wzbogacona o wyniki NMR [H5].

PODSUMOWANIE

Najważniejsze wyniki i osiągnięcia zawierające elementy nowości naukowej dotyczące syntezy, charakterystyki i potencjalnego zastosowania ligandów karbazolowych:

- Synteza i charakterystyka fizykochemiczna nowych związków o szkielecie antracenu i karbazolu, bloków budulcowych w syntezie ligandów G-kwadrupleksowych;
- Optymalizacja syntezy N-podstawionych monoaldehidów karbazolu z wykorzystaniem promieniowania mikrofalowego;
- Synteza, charakterystyka fizykochemiczna oraz zbadanie właściwości spektralnych nowych ligandów o szkielecie karbazolu;
- Badanie oddziaływania ligandów z G-kwadrupleksami DNA techniką dializy równowagowej w buforach z dodatkiem jonów potasu;
- Wykazanie przydatności związków karbazolowych stabilizujących G-kwadrupleksy DNA do celów bioanalitycznych oraz biomedycznych;
- Wskazanie przydatności związków karbazolowych w kontekście dalszych badań biologicznych, szczególnie nad zmianami transkrypcji przez tworzenie G-kwadrupleksów w regionie promotorowym genów, a zwłaszcza w rejonie protoonkogenu c-MYC;
- Ocena cytotoksyczności ligandów karbazolowych na estrogenozależnych i estrogeniezależnych komórkach raka piersi MCF7 i MDA-MB-231 oraz prawidłowych komórkach gruczołu piersiowego MCF-12A.

PERSPEKTYWY

Pragnę kontynuować dotychczasową tematykę badawczą i w najbliższej przyszłości:

- opublikować zebrany materiał dotyczący oddziaływania ligandów **I-III** z G-kwadrupleksami o sekwencjach protoonkogenu KRAS i Bcl-2, wzbogacony o wyniki badań teoretycznych dra Shozeba Haidera oraz badań biologicznych w kierunku aktywności przeciwwgrzybiczej pochodnych karbazolu;
- kontynuować opisaną w części "Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych" współpracę w kierunku syntezy nowych związków metalakoronowych. Chciałabym, aby była to tematyka mojego następnego samodzielnego grantu lub fragment szerszego projektu europejskiego we współpracy ze światowymi liderami w dziedzinie związków metalakoronowych.
- wykorzystać otrzymane pochodne karbazolu do syntezy nowych dwukleszczowych ligandów G-kwadrupleksowych z ugrupowaniem amidowym.
- wykonać badania oddziaływania związków chiralnych z DNA, a w szczególności zbadać wpływ czystych enancjomerów i mieszaniny racemicznej na zdolność stabilizacji G-kwadrupleksów DNA o różnej topologii. W tym celu chcę nawiązać współpracę z prof. UAM dr hab. Marią Chrzanowską z Pracowni Spektrochemii Organicznej mojego Wydziału oraz/lub prof. dr hab. Zbigniewem Czarnockim z Pracowni Chemii Związków Naturalnych UW, który był recenzentem mojej pracy doktorskiej.

LITERATURA

1. D. Rhodes, H.J. Lipps *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 8627–8637.
2. E. Ruggiero, S.N. Richter *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 3270–3283.

3. S. Burge, G.N. Parkinson, P. Hazel, A.K. Todd, S. Neidle *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 5402–5415.
4. A. De Cian, L. Lacroix, C. Douarre, N. Temime-Smaali, C. Trentesaux, J.-F. Riou, J.-L. Mergny *Biochimie* **2008**, *90*, 131–155.
5. T. Ou, Y. Lu, J. Tan, Z. Huang, K. Wong, L. Gu *Chem. Med. Chem.* **2008**, *3*, 690–713.
6. S. Asamitsu, T. Bando, H. Sugiyama *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 417 – 430.
7. E.H. Blackburn *Nature* **1991**, *350*, 569–573.
8. J.L. Huppert, S. Balasubramanian *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 406–413.
9. D. Sun, B. Thompson, B.E. Cathers, M. Salazar, S.M. Kerwin, J.O. Trent, T.C. Jenkins, S. Neidle, L.H. Hurley *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2113–2116.
10. S.A. Ohnmacht, S. Neidle *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 2602–2612.
11. G. Biffi, D. Tannahill, J. McCafferty, S. Balasubramanian *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 182–186.
12. P. Murat, S. Balasubramanian *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2014**, *25*, 22–29
13. B. Juskowiak, E. Gałęzowska, N. Koczorowska, T.W. Hermann *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 3627–3630.
14. B. Juskowiak, E. Gałęzowska, H. Kościelna, T.W. Hermann, K. Piotrowska *Polish. J. Chem.* **2005**, *79*, 831–844.
15. A. Głuszyńska *Na Pograniczu Chemii i Biologii*, Wydawnictwo Naukowe UAM, tom VIII, **2003**, ISBN 978-83-23213147, 235–273.
16. R.P. Haugland *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals* Sixth Edition **1996**.
17. L. Zhang, X.-M. Peng, G.L.V. Damu, R.-X. Geng, C.-H. Zhou *Med. Res. Rev.* **2014**, *34*, 340–437.
18. C.H. Zhou, Y. Wang *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 239–280.
19. F.-F. Zhang, L.-L. Gan, C.-H. Zhou *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1881–1884.
20. H.K. Kim, M.K. Ryu, K.D. Kim, S.M. Lee, S.W. Cho, J.W. Park *Macromolecules* **1998**, *31*, 1114–1123.
21. Y. Song, C.A. Di, Z. Wei, T. Zhao, W. Xu, Y. Liu, D. Zhang, D. Zhu *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 4731–4740.
22. H. Wang, G. Chen, X. Xu, H. Chen, S. Ji *Dyes Pigments* **2010**, *86*, 238–248.
23. T.H. Xu, R. Lu, X.P. Qiu, X.L. Liu, P.C. Xue, C.H. Tan, C.Y. Bao, Y.Y. Zhao, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 4014–4020.
24. H. Ryu, L.R. Subramanian, M. Hanack *Tetrahedron* **2006**, *62*, 6236–6247.
25. X. Fei, Y. Gu, C. Li, X. Yang *J. Fluoresc.* **2012**, *22*, 807–814.
26. *Microwave in Organic Synthesis*, 2nd edition, edited by Andre Loupy, Wiley-WCH, Weinheim, **2006**.
27. B. Juskowiak, M. Ohba, M. Sato, S. Takenaka, M. Takagi, H. Kondo *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1999**, *72*, 265–277.
28. B. Juskowiak, A. Dominiak, S. Takenaka, M. Takagi *Photochem. Photobiol.* **2001**, *74*, 391–400.
29. B. Juskowiak, M. Chudak *Photochem. Photobiol.* **2004**, *79*, 137–144.
30. I. Czerwińska, B. Juskowiak *Int. J. Biol. Macromol.* **2012**, *51*, 576–582.
31. P.A. Ragazzon, N.C. Garbett, J.B. Chaires *Methods* **2007**, *42*, 173–182.
32. P.A. Ragazzon, J.B. Chaires *Methods* **2007**, *43*, 313–323.
33. P. Wang, C.-H. Leung, D.-L. Ma, S.-C. Yan, C.-M. Che *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 6900–6911.
34. L. Xue, N. Ranjan, D.P. Arya *Biochemistry* **2011**, *50*, 2838–2849.
35. J. Wang, K. Lu, S. Xuan, Z. Toh, D. Zhang, F. Shao *Chem. Commun.* **2013**, *42*, 4758–4760.

36. R. Ferreira, A. Aviñó, R. Pérez-Tomás, R. Gargallo, R.J. Eritja *J. Nucleic Acids* **2010**, 2010, 489060.
37. nieopublikowane dane.
38. B. Maji, K. Kumar, M. Kaulage, K. Muniyappa, S. Bhattacharya *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 6973–6988.
39. J. Sun, Y. An, L. Zhang, H.-Y. Chen, Y. Han, Y.-J. Wang, Z.-W. Mao, L.-N. Ji *J. Inorg. Biochem.* **2011**, 105, 149–154.
40. W.R. Algar, M. Massey, U.J. Krull *J. Fluorescence* **2006**, 16, 555–567.
41. D. Monchaud, C. Allain, M.-P. Teulade-Fichou *Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 4842–4845.
42. D. Monchaud, M.-P. Teulade-Fichou *Methods Mol Biol.* **2010**, 608, 257–271.
43. A. De Cian, L. Guittat, M. Kaiser, B. Saccf, S. Amrane, A. Bourdoncle, P. Alberti, M.-P. Teulade-Fichou, L. Lacroix, J.-L. Mergny *Methods* **2007**, 42, 183–195.
44. G.A. Crosby, J.N. Demas *Review. J. Phys. Chem.* **1971**, 75, 991–1024.
45. G.D. Fasman *Circular Dichroism and a Conformational Analysis of Biomolecules*, Plenum Press, **1996**.
46. E.W. White, F. Tanious, M.A. Ismail, A.P. Reszka, S. Neidle, D.W. Boykin, W.D. Wilson *Biophys. Chem.* **2007**, 126, 140–153.
47. J. Kypr, I. Kejnovská, D. Renciuik, M. Vorlíčková *Nucl. Acids Res.* **2009**, 37, 1713–1725.
48. M. Vorlíčková, I. Kejnovská, J. Sagi, D. Renčiuk, K. Bednářová, J. Motlová, J. Kypr *Methods* **2012**, 57, 64–75.
49. Y. Wang, D.J. *Structure* **1993**, 4, 263–282.
50. A. Ambrus, D. Chen, J. Dai, T. Bialis, R.A. Jones, D. Yang *Nucleic Acids Res.* **2006**, 34, 2723–2735.
51. H. Fernando, A.P. Reszka, J. Huppert, S. Ladame, S. Rankin, A.R. Venkitaraman, S. Neidle, S. Balasubramanian *Biochemistry* **2006**, 45, 7854–7860.
52. B. Dumat, G. Bordeaux, E. Faurel-Paul, F. Mahuteau-Betzer, N. Saettel, M. Bombled, G. Metgé, F. Charra, C. Fiorini-Debuisschert, M.-P. Teulade-Fichou *Biochimie* **2011**, 93, 1209–1218.
53. K. Bhadra, G.S. Kumar *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, 1810, 485–496.
54. T. Yamashita, T. Uno, Y. Ishikawa *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 2423–2430.
55. H. Sun, Y. Tang, J. Xiang, G. Xu, Y. Zhang, H. Zhang, L. Xu *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 3586–3589.
56. J. Dash, P.S. Shirude, S.-T.D. Hsu, S. Balasubramanian *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 15950–15956.
57. J.-L. Mergny, A.-T. Phan, L. Lacroix *FEBS Lett.* **1998**, 435, 74–78.
58. J.-L. Mergny, L. Lacroix *Oligonucleotides* **2003**, 13, 515–537.
59. P.A. Rachwal, K.R. Fox *Methods* **2007**, 43, 291–301.
60. M. Insińska-Rak, M. Sikorski *Chem. Eur. J.* **2014**, 20, 15280–15291.
61. J. Rouden, M.-C. Lasne, J. Blanchet, J. Baudoux *Chem. Rev.* **2014**, 114, 712–778.

OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

W latach 1989-1994 studiowałam na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza na kierunku chemia i wykonałam pracę magisterską w Zakładzie Spektrochemii Organicznej pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Marii D. Rozwadowskiej zatytułowaną „*Reakcja Mitsunobu w układach α -ftalimidoalkoholi*”. Od tego czasu jestem związana z UAM, gdzie następnie rozpoczęłam studia doktoranckie pod kierunkiem prof. dr hab. Wiesława Antkowiaka w tym samym Zakładzie. Celem mojej pracy badawczej była całkowita synteza orellaniny (1,1'-ditlenku-3,3',4,4'-tetrahydroksy-2,2'-bipirydyłu), alkaloidu, którego struktura została po raz pierwszy odkryta przez Antkowiaka i Gessnera w 1979 r.,

oraz modelowego związku 5-hydroksy-9,10-dihydro-4-azafenantrenu w celu ustalenia problemów stereochemicznych wynikających z zahamowanej rotacji wokół wiązania łączącego oba pierścienie. Ustalenie trwałości atropoizomerów mogło mieć znaczenie przy ocenie zależności aktywności fizjologicznej od budowy przestrzennej cząsteczek tych związków.

W 1997 roku zmieniłam tematykę badawczą i promotora pracy, i pod kierunkiem prof. dr hab. Marii D. Rozwadowskiej przeprowadziłam pierwszą tradycyjną syntezę alkaloidów izochinolinowych metodą Pomeranza-Fritscha-Bobbitta w wersji enancjoselektywnej. Jako substancje docelowe obrałam proste alkaloidy izochinolinowe: salsolidynę i karneginę, często stosowane w różnych laboratoriach, jako substancje wzorcowe w sprawdzaniu skuteczności nowo realizowanej metody syntetycznej. Kluczowy etap obranej strategii zakładał generowanie centrum stereogenicznego na atomie węgla C-1 we wczesnym etapie syntezy, tj. poprzez enancjoselektywną addycję metylolitu do iminy "Pomeranza-Fritscha". Ponieważ celem moich badań była synteza enancjoselektywna, czyli taka, w której centrum stereogeniczne w substancji prostereogenicznej generuje się w obecności zewnętrznych induktorów asymetrii, jako chiralnych ligandów używałam związków o szkielecie oksazoliny. Są to związki stosowane jako chiralne ligandy i katalizatory, bardzo skuteczne w kompleksach z metalami, jak i w połączeniu ze związkami organicznymi, a dodatkowo łatwo otrzymywane z prostych enancjomerycznie czystych prekursorów - handlowo dostępnych aminoalkoholi lub odpowiednich α -aminokwasów. Wybór padł na oksazolinę również dlatego, że w ówczesnym czasie w Zakładzie prowadzono badania nad przekształcaniem (+)-tiomikaminy, produktu odpadowego w syntezie antybiotyków typu amfenikolu, w substancje użyteczne w syntezie organicznej. Otrzymałam 12 nowych oksazolin tak zaprojektowanych, aby zawierały podstawniki różniące się właściwościami sterycznymi i elektronowymi, które w pełni scharakteryzowałam spektralnie. Wstępnym celem pracy było zbadanie wpływu chiralnych oksazolin, jako zewnętrznych induktorów asymetrii, na enancjoselektywność reakcji addycji związków metaloorganicznych do układu iminowego i tym reakcjom poświęciłam znaczną część moich badań. W wyniku optymalizacji warunków reakcji otrzymałam aminę "Pomeranza-Fritscha" z 76% nadmiarem enancjomerycznym, a uzyskane rezultaty mogą mieć znaczenie nie tylko dla syntezy optycznie czynnych amin 2°, ale bardziej ogólne dla syntezy alkaloidów. Istotnym problemem w badaniach było określenie czystości optycznej i konfiguracji otrzymanych amin. Dysponując wzorcem opracowałam dwie metody pozwalające na określenie nadmiaru enancjomerycznego: spektroskopową i chromatograficzną. Spektroskopia ^1H NMR z zastosowaniem zsyntetyzowanego przeze mnie TADDOLu ($\alpha,\alpha,\alpha',\alpha'$ -tetrafenylo-1,2-dioksolano-4,5-dimetanol) oraz HPLC z kolumną chiralną Chiralcel OD-H, umożliwiły rozseparowanie i przyporządkowanie sygnałów odpowiednim enancjomonom badanych związków. Było to tym ważniejsze, że związek nie był znany w postaci enancjomerycznie czystej - nie mogłam skorzystać ze znaku skręcalności właściwej, a ponieważ był substancją oleistą, to nie można było wykonać analizy rentgenograficznej. Konfigurację aminy określiłam metodami chemicznymi przekształcając ją w lewoskrętną salsolidynę i karneginę o znanej konfiguracji absolutnej (S). Tak więc potwierdziłam, że konfiguracja aminy oraz salsolidyny i karneginy jest taka sama. (S)-(-)-salsolidynę i (S)-(-)-karneginę otrzymałam bez znaczącej straty czystości optycznej. W 2001 roku uzyskałam stopień doktora nauk chemicznych o specjalności chemia organiczna broniąc pracy doktorskiej zatytułowanej „*Enancjoselektywna synteza alkaloidów izochinolinowych metodą Pomeranza-Fritscha w modyfikacji Bobbitta*”. Rezultatem tych badań były 4 komunikaty zjazdowe oraz dwie publikacje (Załącznik 4).

Do lutego 2004 roku związana byłam cały czas z grupą badawczą Pani prof. Marii D. Rozwadowskiej, a wynikiem tej współpracy były 4 kolejne publikacje (Załącznik 4). W tym

samym roku otrzymałam dwuletnią pozycję post-doca (2.08.2004-1.08.2006) w Laboratory of Medicinal Chemistry w grupie badawczej dra Kennera C. Rice'a, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease (NIDDK), National Institutes of Health (NIH), Bethesda, Maryland, USA. Niestety ze względów rodzinnych (byłam w ciąży bliźniaczej) musiałam zrezygnować ze stypendium w tym prestiżowym ośrodku naukowym.

W 2005 roku stanęłam do konkursu na etat adiunkta i od 1 października tego roku rozpoczęłam pracę na tym stanowisku w grupie badawczej prof. dr hab. Bernarda Juskowiaka w Zakładzie Chemii Analitycznej Wydziału Chemii UAM. Do chwili obecnej jestem związana z tą samą grupą badawczą, która w 2007 roku przekształciła się w samodzielną Pracownię Chemii Bioanalitycznej. Ponieważ rozpoczęłam badania w całkowicie nowej dziedzinie wykorzystałam swoje doświadczenie syntetyka organika i włączyłam się w nurt badań grupy związany z syntezą nowych ligandów oddziałujących z kwasami nukleinowymi, potencjalnie przydatnych do zastosowań bioanalitycznych i biomedycznych, szczególnie w odniesieniu do trój- i czteroniciowego DNA.

W międzyczasie rozpoczęłam współpracę z grupą badawczą prof. dr hab. Marka Sikorskiego na naszym Wydziale. Pracownia Fotochemii Stosowanej, której Pan Profesor jest kierownikiem, od lat jest zainteresowana badaniem właściwości spektralnych i fotofizycznych związków z grupy flawin. Witamina B₂ i jej pochodne występują w produktach żywnościowych. Obecne w enzymach i fotoreceptorach są aktywne w procesach utleniania i redukcji zachodzących w komórkach. W stanie wzbudzonym wchodzi w reakcję z tlenem i jako fotosensybilizator tlenu singletowego mogą dezaktywować wiele wirusów i bakterii. Niektóre badania wskazują na antynowotworową aktywność pochodnych ryboflawiny, a także jej udział w terapii innych chorób [60]. Dr Małgorzata Insińska-Rak z tej grupy, zaproponowała mi zbadanie zdolności pochodnych witaminy B₂: alloksayny, lumichromu, lumiflawiny i 3-metylotetraacetyloribo-flawiny do stabilizacji G-kwadrupleksów DNA, ponieważ takie badania na tej grupie związków nie były dotychczas wykonywane.

Badanie oddziaływania ligandów z DNA przeprowadziłam techniką dializy równowagowej przy zastosowaniu czytnika mikropłytek z głowicą do pomiarów absorpcji i fluorescencji, wyposażonego w system programowanego dozowania odczynników, co stwarza możliwość wykonanie wielu serii pomiarów w krótkim czasie. Badania pozwoliły mi na ocenę selektywności badanych związków i wyłonienie kandydatów do dalszych badań. Zastosowałam 10 różnych form kwasów nukleinowych: dwuniciowych (Poly[dA]*Poly[dT], Poly[dG]*Poly[dC], Poly[dA-dT]*Poly[dA-dT], Poly[dG-dC]*Poly[dG-dC], ct DNA) oraz czterocząsteczkowych tworzących G-kwadrupleksy o różnej topologii: oligonukleotydy o sekwencji ludzkiego telomerowego DNA (22-mer 5'-AGGG(TTAGGG)₃-3' oraz 48-mer 5'-AGGG(TTAGGG)₇-3'), oligonukleotyd o sekwencji ludzkiego onkogenu c-MYC 5'-AGGGTGGGGAGGGTGGGG-3' i c-KIT2 5'-GGGCGGGCGCGAGGGAGGGG-3' (intramolekularne kwadrupleksy o różnej topologii) oraz oligonukleotyd 5'-TTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGT-3' tworzący intermolekularny kwadrupleks równoległy. Wyniki wykazały jednoznacznie selektywność badanych związków względem struktur DNA wyższego rzędu, niezależnie czy dwuniciowe DNA było bogate w zasady AT, czy GC. Oddziaływania strukturalnie podobnej alloksazyny i lumichromu były silniejsze niż lumiflawiny i jej pochodnej, a do dalszych badań wytypowałam dwa G-kwadrupleksy tworzące się na oligonukleotydach o sekwencji telomerowej oraz o sekwencji ludzkiego onkogenu c-MYC. Przeanalizowałam również zdolność stabilizacji termicznej G-kwadrupleksów przez 4 badane związki rejestrując profile temperaturowe bez i w obecności 3 ekw. ligandów metodą spektrofotometryczną. Ku mojemu zaskoczeniu obliczone ΔT_m nie były większe niż 1.6 ± 0.5 °C, co wskazuje na słabą zdolność stabilizacji termicznej. Otrzymane wyniki były do siebie zbliżone, co nie pozwoliło mi na wytypowanie liganda najlepiej stabilizującego którąś z badanych struktur DNA. Jednocześnie za pomocą

spektroskopii dichroizmu kołowego potwierdziłam, że badane związki nie destabilizują badanych struktur DNA. Wyniki te nie zostały do tej pory opublikowane, ale mam nadzieję, że ta współpraca wzbogacona o badania spektrofluorymetryczne oraz badania biologiczne zaowocuje wspólną publikacją.

W ostatnich latach rozpoczęłam współpracę z prof. dr hab. Maciejem Kubickim w ramach projektu badawczego „Synteza, struktura, rozkład gęstości elektronowej i aktywność biologiczna (-)cytyzyny, jej soli i nowych pochodnych” (NCN OPUS UMO-2013/11/B/ST5/01681) realizowanego w Zakładzie Krystalografii na Wydziale Chemii UAM, którego byłam wykonawcą. Moim zadaniem było sprawdzenie, czy (-)cytyzyna i jej trzy pochodne, będące dobrymi agonistami receptorów nACh, wykazującymi czasami właściwości przeciwbólowe, antydepresyjne, przeciwzapalne, hipoglikemiczne czy redukujące nadciśnienie [61], będą wykazywały zdolność stabilizacji struktur G-kwadrupeksowych DNA, a tym samym czy możliwe jest rozszerzenie właściwości tych związków o potencjalne właściwości antynowotworowe.

Typowe metody badania powinowactwa ligandów do DNA bazują na wykorzystaniu ich charakterystycznych właściwości spektroskopowych, głównie zdolności do absorpcji światła w zakresie widzialnym oraz właściwościach fluorescencyjnych. W przypadku (-)cytyzyny i jej pochodnych badania oddziaływań z G-kwadrupeksami DNA były bardzo trudne, ponieważ związki te absorbują promieniowanie w zakresie UV, czyli zakresie charakterystycznym dla kwasów nukleinowych oraz nie posiadają właściwości emisyjnych. Badania oddziaływań (-)cytyzyny i jej pochodnych z G-kwadrupeksami DNA prowadziłam z wykorzystaniem metod bezpośrednich takich jak spektroskopia dichroizmu kołowego i badanie stabilności termicznej DNA w obecności związków oraz metod pośrednich z udziałem indykatora fluorescencyjnego (metoda FID) i specjalnie przygotowanej do tych badań techniki dializy równowagowej w wersji różnicowej.

W pierwszym etapie, mimo trudności związanych z detekcją związków wynikającą z ich właściwości spektroskopowych o których pisałam powyżej, zbadałam powinowactwo wiązania (-)cytyzyny i jej soli bromowodorowej do 18 różnych struktur kwasów nukleinowych (jedno-, dwu-, trój- i czteroniciowych) wg opracowanej przeze mnie procedury badawczej. Metoda dializy równowagowej w wersji różnicowej wykazała bardzo słabe oddziaływania badanych związków ze wszystkimi badanymi strukturami DNA. Zastosowanie dializy równowagowej do badania związków o takich właściwościach spektroskopowych jest możliwe, ale nakład pracy i koszty eksperymentów są niewspółmiernie małe do osiągniętych korzyści badawczych. To cenne doświadczenie naukowe pozwala mi na stwierdzenie, że jest to metoda najlepsza dla związków absorbujących w zakresie widzialnym lub wykazujących właściwości fluorescencyjne, chyba że oddziaływania ligand-DNA są bardzo silne.

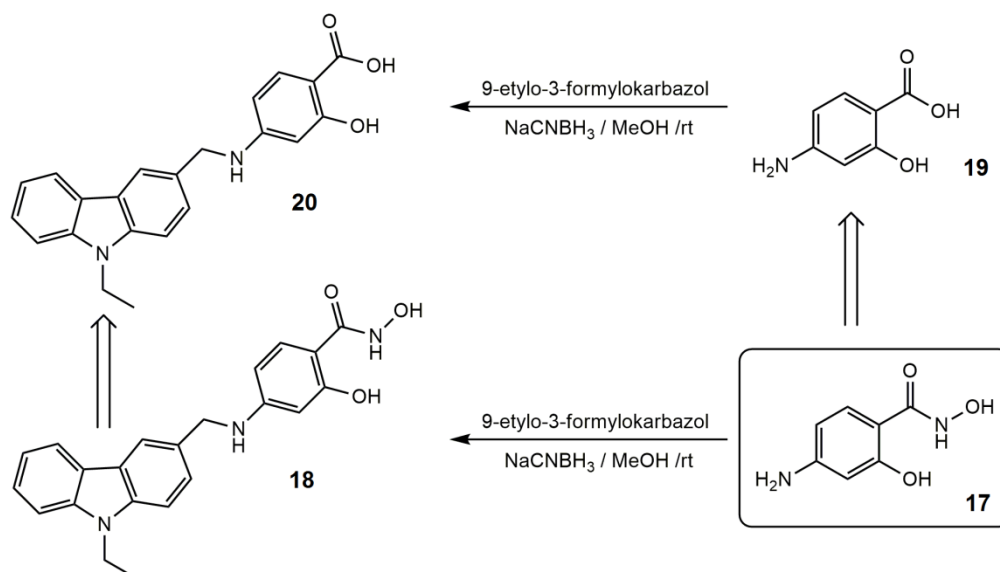
W celu sprawdzenia tych wyników do dalszych badań wytypowałam dwie sekwencje oligonukleotydowe o najwyższym powinowactwie, a jednocześnie najbardziej interesujące biologicznie: 22-mer o sekwencji ludzkiego telomerowego DNA 5'-AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3' (22HT) oraz 22-mer o sekwencji ludzkiego protoonkogenu c-MYC 5'-TGAGGGTGGGTAGGGTGGGTAA-3'. Pomiary temperatur topnienia (T_m) G-kwadrupeksów bez i w obecności czterech badanych ligandów wykazały, że (-)cytyzyna i jej 3 pochodne nie wykazują zdolności stabilizacji termicznej DNA, a zdolność taką wykazują znane literaturowo związki o właściwościach antynowotworowych, przeciwbakteryjnych, czy przeciwgrzybiczych. Wykonałam również widma dichroizmu kołowego (CD) w celu określenia ewentualnego sposobu oddziaływania badanych związków (oddziaływania *end-stacking*, elektrostatyczne lub wiązanie do rowka) z dwoma G-kwadrupeksami DNA o sekwencji telomerowej w obecności jonów Na^+ (struktura antyrównoległa) i K^+ (struktura hybrydowa) oraz o sekwencji ludzkiego protoonkogenu c-MYC w obecności jonów K^+ (struktura równoległa). (-)Cytyzyna i jej pochodne

są związkami optycznie czynnymi i posiadają swoje charakterystyczne pasma CD: dwa ujemne ok 225 nm i 300 nm oraz słabe pasmo dodatnie przy ok. 340 nm widoczne dla wyższych stężeń. Dlatego też w celu oceny faktycznego wpływu badanych związków na G-kwadrupleksy o różnej topologii zastosowałam matematyczne odjęcie widm ligandów od widm G-kwadrupleksów z dodatkiem ligandów. Generalnie badane związki nie wpływają na zmiany konformacyjne G-kwadrupleksów - intensywność pasm zmieniała się nieznacznie po dodaniu 3 i 5 ekwiwalentów niektórych ligandów, ale ich położenie pozostawało niezmiennie.

Do badania oddziaływań (-)-cytyzyny i jej pochodnych z G-kwadrupleksami idealna jest metoda pośrednia bazująca na zastąpieniu indykatora w systemie gość-gospodarz, czyli G4 FID. Eksperymenty FID przeprowadziłam z użyciem oranżu tiazolowego (TO) jako sondy fluorescencyjnej i obserwowałam zmiany w widmach emisji kompleksu G4-TO podczas wypierania barwnika z kompleksu i zastępowania go badanym ligandem. W przypadku każdego kolejnego dodatku badanych związków nie obserwowałam znaczącej zmiany w obniżeniu intensywności pasm pochodzących od oranżu tiazolowego, co tłumaczy się brakiem stopniowego wypierania barwnika z kompleksu G4:TO i zastępowaniem go miareczkowanym ligandem.

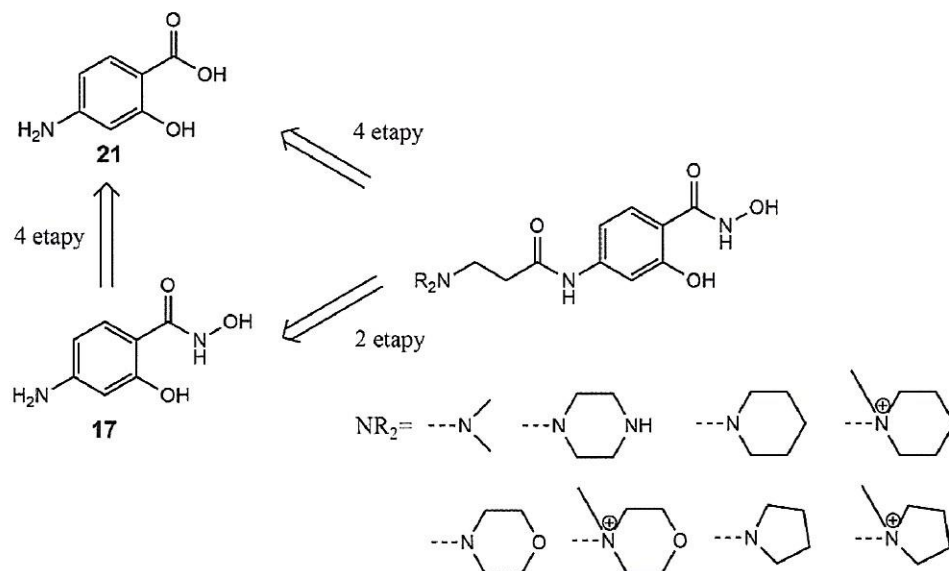
Wszystkie stosowane metody wykazały, że badana (-)-cytyzyna i jej pochodne bardzo słabo oddziałują z badanymi strukturami DNA, ale nie wykazują właściwości destabilizujących tych struktur. Mam nadzieję, że te nieopublikowane do tej pory wyniki zostaną zawarte w kolejnej publikacji.

Po doniesieniach literaturowych o oddziaływaniu makrocyclicznych eterów metalakoronowych, wykazujących właściwości antybakteryjne oraz przeciwgrzybicze, z dwuniciowym DNA, w 2013 roku nasza grupa badawcza zainteresowała się tą grupą związków. Dr Ewa Rajczak w ramach swojego doktoratu, którego byłam promotorem pomocniczym, i grantu badawczego *Preludium* nr 2014/13/N/ST4/04099 pt. „Etery metalakoronowe jako związki oddziałujące ze strukturami DNA wyższego rzędu” finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki rozpoczęła badania nad syntezą nowych związków metalakoronowych i badaniem ich oddziaływań z G-kwadrupleksami DNA. W 2016 roku międzynarodowa grupa naukowców z USA, Włoch, Francji, Ukrainy i Polski zaprosiła naszą grupę badawczą do współpracy w ramach grantu europejskiego Marie Curie Actions - International Research Staff Exchange Scheme (IRSES) 611488 "Metallacrowns-based innovative materials and supramolecular devices". W ramach tego projektu odbyłam staż w grupie badawczej profesora Vincenta L. Pecoraro, odkrywcy związków metalakoronowych, na Uniwersytecie Michigan w Ann Arbor w USA, gdzie włączyłam się w badania związane z syntezą nowych związków metalakoronowych. Aby połączyć badania będące podstawą przewodu habilitacyjnego z nowymi badaniami mój wybór padł na pochodne z ugrupowaniem karbazolowym. W syntezie eterów metalakoronowych często, jako bloki budulcowe stosuje się kwasy aminohydroksamowe wykazujące zdolność silnego chelatowania jonów metali oraz możliwość tworzenia kompleksów o różnej koordynacji. Ze względu na możliwość stabilizacji G-kwadrupleksów DNA poprzez oddziaływania *end-stacking* należało pomyśleć o syntezie jak najbardziej planarnego liganda. Wybór padł na najbardziej płaskie metalakorony typu 12-MC-4 o strukturze kwadratowej, które mogłam zsyntetyzować z wykorzystaniem kwasu hydroksamowego **17**. Obecność grupy aminowej w tym bloku budulcowym dawała możliwość przyłączenia karbazolu. Jako związek modelowy wybrałam pochodną **18**.



Schemat 3. Dwie ścieżki syntezy kwasu p-aminosalicylohydroksamowego **17** i jego karbazolowej pochodnej **18** w ujęciu retrosyntetycznym.

Aby nie tracić czasu z krótkiego pobytu w USA zaproponowałam dwie metody syntezy związku **18** (Schemat 3). Pierwsza z nich 5-etapowa zakładała sprzęganie kwasu p-aminosalicylohydroksamowego **17** z handlowo dostępnym N-etylo-3-formylokarbazolem w ostatnim etapie syntezy. Przeprowadzenie tej reakcji z cyjanoborowodorkiem sodu pozwoliłoby *in situ* zredukować otrzymaną iminę do aminy (ścieżka prawa). Ponieważ naukowcom amerykańskim nie udało się przekształcić kwasu p-aminosalicylowego **19** w kwas hydroksamowy **17** za pomocą łatwych, stosowanych najczęściej metod (ester lub bezwodnik/hydroksyloamina) wykorzystałam doświadczenie grupy profesora Pecoraro i zaproponowałam przebieg tej syntezy wykorzystując nieopublikowaną dotychczas metodę otrzymywania kwasu p-aminosalicylohydroksamowego **17**. Jednocześnie zaproponowałam krótszą 3-etapową syntezę, w której dzięki sprzęgnięciu kwasu p-aminosalicylowego z N-etylo-3-formylokarbazolem w pierwszym etapie syntezy, uniknęłabym dwóch dodatkowych etapów związanych z wprowadzeniem i usunięciem aminowej grupy ochronnej. Ponieważ etap uwolnienia kwasu hydroksamowego przebiegał w reakcji uwodornienia na węglu aktywnym, postanowiłam sprawdzić trwałość aminy **20** w tych warunkach. Okazało się, że związek jest nietrwały i następuje jego rozpad do wyjściowych substratów. Dzięki temu eksperymentowi uniknęłam bezowocnej pracy i skupiłam się na syntezie większej ilości kwasu p-aminosalicylohydroksamowego **17**. Zdobyte doświadczenie i zsyntetyzowany kwas zamierzam wykorzystać do syntezy bloków budulcowych z elementami strukturalnymi charakterystycznymi dla ligandów G-kwadrupleksowych. Jednocześnie opracowałam dwa podejścia do syntezy nowych bloków budulcowych z ugrupowaniem amidowym - dwuetapowy wykorzystujący otrzymany już przeze mnie w USA kwas p-aminosalicylohydroksamowy **17** lub 4-etapowy wykorzystujący handlowo dostępny kwas p-aminosalicylowy **19** (Schemat 4). Docelowo pozwoliłoby mi to na syntezę związków metalakoronowych będących 4-kleszczowymi ligandami G-kwadrupleksowymi. Chciałabym, aby była to tematyka mojego następnego samodzielnego grantu lub fragment szerszego projektu europejskiego we współpracy ze światowymi liderami w dziedzinie związków metalakoronowych.



Schemat 4. Retrosyntetyczne przedstawienie syntezy pochodnej kwasu salicylohydroksamowego z ugrupowaniem amidowym.

Pełny wykaz publikacji, rozdziałów w monografiach i publikacji spoza listy filadelfijskiej, komunikatów, udziału w konferencjach międzynarodowych oraz krajowych, udziału w projektach badawczych, stażach naukowych oraz współpracy z innymi ośrodkami badawczymi, a także moją działalnością organizacyjną i dydaktyczną przedstawiłam w Załączniku 4.

Agata Głuszyńska

Poznań, 26 marca 2019r.