



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Purificação do pVAX-G4 utilizando suportes cromatográficos derivados de compostos heterocíclicos

João Miguel Machado Ferreira

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof^a. Doutora Carla Cruz
Co-orientador: Prof^a. Doutora Fani Sousa

Covilhã, outubro de 2015

*“Out of the night that covers me,
Black as the pit from pole to pole,
I thank whatever gods may be
For my unconquerable soul.*

*In the fell clutch of circumstance
I have not winced nor cried aloud.
Under the bludgeonings of chance
My head is bloody, but unbowed.*

*Beyond this place of wrath and tears
Looms but the horror of the shade,
And yet the menace of the years
Finds and shall find me unafraid.*

*It matters not how strait the gate,
How charged with punishments the scroll,
I am the master of my fate:
I am the captain of my soul.”*

William Ernest Henley

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Carla Cruz, pela orientação, conhecimentos transmitidos, disponibilidade e apoio durante todas as etapas do meu trabalho.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Fani Sousa, por toda a ajuda, disponibilidade e conhecimento científico transmitido.

A todos os meus colegas de laboratório, especialmente ao Tiago Santos, Sérgio Rodrigues e Josué Carvalho pela disponibilidade, apoio e ajuda que prestaram.

À minha família, especialmente os meus pais, por todos os sacrifícios feitos que me permitiram chegar onde cheguei, bem como a preocupação e apoio constante ao longo deste ano.

Por fim, quero agradecer à minha namorada, Eva Marques, por toda a compreensão, apoio e carinho, sem os quais tudo teria sido mais difícil.

Obrigado.

Resumo

Apesar do DNA se encontrar geralmente na forma de dupla hélice, este também pode formar outras estruturas que desempenham um papel importante no controlo de vários processos celulares como a transcrição, replicação e recombinação. Um exemplo dessas estruturas são os G-quadruplex que têm sido considerados como potenciais alvos terapêuticos no tratamento de doenças como o cancro. A síntese de moléculas de baixo peso molecular (< 500 Da) com capacidade de induzir e estabilizar estruturas do G-quadruplex, provou ser uma ferramenta para a síntese de uma nova classe de agentes anticancerígenos.

O plasmídeo pVAX-G4, que foi produzido através da fermentação da *E. coli* DH5 α , contém uma sequência com 58 pb, a 58S γ 3, que possui a capacidade para formar G-quadruplex durante a transcrição. Em estudos anteriores verificou-se que a predominância destas estruturas é maior na isoforma superenrolada (sc) do que nas isoformas circular aberta (oc) ou linear (ln).

Neste trabalho sintetizaram-se ligandos derivados de quinolina (L₄) e naftaleno (L₅, L₆ e L₇), com o objetivo de induzirem e estabilizarem a estrutura do G-quadruplex 58S γ 3.

A indução e estabilização da estrutura de G-quadruplex pelos ligandos L₄, L₅, L₆ e L₇ foi avaliada por espectroscopia de dicroísmo circular. Verificou-se que a sequência 58S γ 3 forma uma estrutura G-quadruplex paralela na presença de 100 mM de KCl. Após adição dos ligandos esta estrutura mantém-se, verificando-se ainda o aumento da sua estabilidade térmica entre 4°C e 7°C.

Posteriormente sintetizaram-se os suportes cromatográficos a partir da imobilização do ligando L₅ na Sefarose por dois métodos químicos diferentes. No primeiro método o ligando foi imobilizado na Sefarose através do braço espaçador 1,4-butanodiol diglicidil éter, dando origem ao suporte A. No segundo método o ligando foi imobilizado diretamente na Sefarose ativada com CNBr sem o braço espaçador, dando origem ao suporte B.

Ensaio cromatográficos iniciais, realizados em mini-colunas de bancada, demonstraram que o suporte A apresentava interação com o plasmídeo modelo pVAX-LacZ tanto em condições favorecendo interações iónicas como hidrofóbicas, mostrando potencial para a purificação da isoforma sc. A purificação desta isoforma de ambos os plasmídeos (pVAX-LacZ e pVAX-G4) utilizando o suporte A, foi posteriormente otimizada no sistema AKTA Avant, utilizando um gradiente por passos crescente. No primeiro passo foi usada uma solução de 0,15 M de NaCl em Tris-HCl 10 mM (pH 8) e no segundo passo uma solução de 1,5 M de NaCl em Tris-HCl 10 mM (pH 8) à temperatura de 4°C. Por fim, foi realizada a transcrição *in vitro* da isoforma sc do pVAX-G4 resultante da purificação, de forma a comprovar a formação da estrutura G-quadruplex. A análise dos espectros de dicroísmo circular evidenciou que o transcrito adota a estrutura de G-quadruplex paralela.

Palavras-chave

G-quadruplex; ligandos heterocíclicos; dicroísmo circular; cromatografia de afinidade; pVAX-G4; isoforma sc

Abstract

Although DNA is usually found in double helix, it can also form other complex structures which play important roles on regulating several cellular processes like transcription, replication and recombination. An example of these alternative structures is G-quadruplex. Nowadays, the G-quadruplexes are viewed as a potential therapeutic targets for several diseases, like cancer. The synthesis of molecules with low molecular weight (< 500 Da) which can induce and stabilize G-quadruplex structures, is viewed as a new class of anticancer agents.

The plasmid pVAX-G4, which was amplified by a cell culture of *E. coli* DH5 α , contains a sequence of 58 bp (58Sy3) that is capable of forming G-quadruplex structures during transcription. Previous studies shown that the formation of these structures occurs more frequently on supercoiled (sc) isoform than open-circular (oc) and linear (ln) isoforms.

In this work were synthesized quinoline (L₄) and naphthalene (L₅, L₆ and L₇) based ligands in order to induce and stabilize the G-quadruplex structure formed by 58Sy3.

The induction and stabilization of G-quadruplex structure by L₄, L₅, L₆ and L₇ ligands was measured by circular dichroism spectroscopy. It was found that the sequence 58Sy3 folds into a parallel G-quadruplex structure in presence of 100 mM KCl. After ligands addition it was noticed that they interact with DNA maintaining its structure and improving thermal stability in values between 4°C and 7°C.

After that two chromatographic supports were synthesized by immobilizing ligand L₅ into Sepharose by two different chemical methods. In the first one, the ligand was immobilized into Sepharose using 1,4-butanediol diglycidyl ether spacer arm (Support A) and in the second method it was immobilized in CNBr-activated Sepharose without spacer arm (Support B).

An initial screening revealed that support A has the potential to be used in purification once it interacts with the model plasmid pVAX-LacZ using conditions either favoring electrostatic or hydrophobic interactions. Purification of sc pVAX-G4 and pVAX-LacZ was carried on AKTA Avant system, using an increasing stepwise gradient from 0,15 M NaCl in 10 mM Tris-HCl (pH 8) to 1,5 M NaCl in 10 mM Tris-HCl (pH 8) at 4°C. Purification of sc isoform was achieved but it was not completely recovered. Finally, sc pVAX-G4 resultant from purification was *in vitro* transcribed to induce G-quadruplex formation which was confirmed by circular dichroism. CD spectra showed that the transcript folds into a parallel G-quadruplex structure.

Keywords

G-quadruplex; heterocyclic ligands; circular dichroism; affinity chromatography; pVAX-G4; sc isoform

Índice

1	Introdução.....	1
1.1	G-Quadruplex	3
1.2	Conformações G-quadruplex	4
1.3	Implicações do G-quadruplex a nível biológico	6
1.3.1	Telómeros.....	7
1.3.2	G-quadruplex na transcrição	8
1.3.2.1	c-MYC.....	8
1.4	Compostos heterocíclicos e a sua ligação ao G-quadruplex	9
1.4.1	Compostos derivados de acridina.....	9
1.4.1.1	Compostos derivados de quinolina	11
1.4.2	Compostos derivados de naftaleno.....	12
1.5	Avaliação da interação e estabilização do G-quadruplex com ligandos	13
1.5.1	Dicroísmo circular	14
1.6	Purificação de DNA.....	16
1.6.1	Cromatografia.....	16
1.6.1.1	DNA plasmídico	16
1.6.2	Métodos cromatográficos	18
1.6.2.1	Cromatografia de exclusão molecular	18
1.6.2.2	Cromatografia de troca iónica	19
1.6.2.3	Cromatografia de interação hidrofóbica	19
1.6.2.4	Cromatografia de afinidade	20
2	Objetivos	21
3	Materiais e métodos	22
3.1	Materiais	22
3.1.1	Síntese química	22
3.1.2	Produção e purificação do pDNA	22
3.1.3	Ensaio cromatográficos.....	22
3.2	Síntese química	23
3.2.1	Síntese dos compostos iniciais	23
3.2.1.1	Síntese do 4,5-di(bromometil)acridina (1).....	23
3.2.1.2	Tosilação da dietilenotriamina (2)	24
3.2.1.3	Tosilação da trietilenotetramina (3).....	25
3.2.1.4	Tosilação da tetraetilenopentamina (4).....	26

3.2.2	Síntese e caracterização dos ligandos	27
3.2.2.1	Síntese do N ¹ ,N ^{1'} -(acridina-4,5-diilbis(metileno))bis(N ² -(2-aminoetil)etano-1,2-diamina) (L ₁)	27
3.2.2.2	N ¹ ,N ^{1'} -(acridina-4,5-diilbis(metileno))bis(N ² -(2-((2-aminoetil)amino)etil)etano-1,2-diamina) (L ₂).....	29
3.2.2.3	Síntese do N ¹ ,N ^{1'} -(acridina-4,5-diilbis(metileno))bis(N ² -(2-((2-((2-aminoetil)amino)etil)amino)etil)etano-1,2-diamina) (L ₃)	30
3.2.2.4	Síntese de N ¹ -(2-aminoetil)-N ² -(quinolina-2-ilmetil)etano-1,2-diamina (L ₄) 31	
3.2.2.5	Síntese do N ¹ -(2-aminoetil)-N ² -(naftaleno-1-ilmetil)etano-1,2-diamina (L ₅) 32	
3.2.2.6	Síntese do N ¹ -(2-aminoetil)-N ² -(2-((naftaleno-1-ilmetil)amino)etil) etano-1,2-diamina (L ₆)	33
3.2.2.7	Síntese do N ¹ -(2-aminoetil)-N ² -(2-((2-((naftaleno-1-ilmetil)amino)etil)amino)etil)etano-1,2-diamina (L ₇)	34
3.2.3	Síntese dos suportes cromatográficos	35
3.2.3.1	Suporte A	35
3.2.3.2	Suporte B.....	36
3.3	Produção do pDNA.....	36
3.3.1	Pré-fermentação e Fermentação	36
3.3.2	Lise celular e Pré-purificação dos pDNA.....	37
3.4	Cromatografia de afinidade.....	38
3.4.1	<i>Screening</i> dos suportes	38
3.4.1.1	Condições iônicas.....	38
3.4.1.2	Condições hidrofóbicas	38
3.4.2	Purificação da isoforma sc dos plasmídeos pVAX- <i>LacZ</i> e pVAX-G4).....	39
3.4.3	Eletroforese em gel de agarose	39
3.4.4	Transcrição do plasmídeo pVAX-G4	39
3.4.5	Dicroísmo circular	40
4	Resultados e Discussão	41
4.1	Síntese Química	41
4.1.1	Síntese de derivados de acridina	41
4.1.2	Síntese de derivados de quinolina	43
4.1.3	Síntese de derivados de naftaleno	43
4.2	Estudos de interação entre os ligandos L ₄ , L ₅ , L ₆ e L ₇ e a sequência 58Sγ3 formadora de G-quadruplex	44
4.2.1	Dicroísmo circular	44
4.3	Síntese dos suportes cromatográficos.....	47
4.3.1	Suporte A.....	48

4.3.2	Suporte B	48
4.4	Screening dos suportes sintetizados	49
4.4.1	Suporte A	49
4.4.1.1	Condições hidrofóbicas.....	49
4.4.1.2	Condições iônicas	51
4.4.2	Suporte B	52
4.4.2.1	Condições hidrofóbicas.....	52
4.4.2.2	Condições iônicas	54
4.5	Purificação da isoforma sc dos plasmídeos pVAX-LacZ e pVAX-G4	55
4.5.1	sc pVAX-LacZ	55
4.5.2	sc pVAX-G4	59
4.6	Transcrição in vitro da isoforma sc do plasmídeo pVAX-G4.....	60
5	Conclusões.....	64
6	Perspetivas futuras	66
7	Referências.....	67

Lista de Figuras

Figura 1 - Bases constituintes do DNA (adaptado de Alberts B, 2007).	1
Figura 2 - Estrutura do DNA (adaptado de Alberts B, 2007),.....	2
Figura 3 - (A) Estrutura tridimensional de um G-quadruplex; (B) Ligações de Hoogsteen estabelecidas na formação de uma téttrade de guaninas. (adaptado de Monchaud & Teulade-Fichou, 2010).	3
Figura 4 - Tipo de estruturas de G-quadruplex (intramoleculares e intermoleculares) (adaptado de Xiong et al, 2015).	5
Figura 5 - Conformações <i>anti</i> e <i>syn</i> das ligações glicosídicas (adaptado de Phan, 2010)	5
Figura 6 - Esquema representativo dos três tipos de <i>loops</i> . A) Em hélice; B) Lateral; C) Diagonal (adaptado de Zhang, Wu & Zhang, 2014).	6
Figura 7 - Indução e estabilização da estrutura G4 através de um ligando na região de cadeia única do telómero, impedindo a ação da telomerase (adaptado de Bochman et al., 2012).	8
Figura 8 - Promotor do gene c-MYC e localização da região NHE III ₁ (adaptado de Seenisamy et al., 2004).	9
Figura 9 - Representação do bloqueio da polimerase (a roxo) através da formação de uma estrutura G-quadruplex, inibindo a transcrição (adaptado de Bochman et al, 2012).	9
Figura 10 - Estrutura química da acridina.	10
Figura 11 - Exemplos de compostos derivados de acridina (adaptado de Cholewiński et al., 2011). A) BRACO-19. B) Piridinoacridina. C) Dibenzenofenantrolina	10
Figura 12 - Composto AS1410 (adaptado de Neidle, 2009).	11
Figura 13 - Estrutura química da quinolina.	11
Figura 14 - Exemplos de estruturas de ligandos derivados de quinolina.	12
Figura 15 - Estrutura química do naftaleno.	13
Figura 16 - Estrutura geral de naftaleno-diimida tetra-substituída.	13
Figura 17 - Espetro CD de uma estrutura G4 paralela (adaptado de Randazzo, 2013).	14
Figura 18 - Espetro CD de uma estrutura G4 anti-paralela (adaptado de Randazzo, 2013). ...	15
Figura 19 - Espetro CD de uma estrutura G4 híbrida (adaptado de Randazzo, 2013).	15
Figura 20 - Representação esquemática dos tipos de interações na cromatografia (adaptado de Handbook, 2001).	18
Figura 21 - Esquema típico da eluição na cromatografia de afinidade (adaptado de Pfaunmiller, 2013).	20
Figura 22 - Síntese do 4,5-(dibrometil)acridina.	23
Figura 23 - Tosilação da dietileno triamina.	24
Figura 24 - Tosilação da trietileno tetramina.	25
Figura 25 - Tosilação da tetraetileno pentamina.	26
Figura 26 - Síntese do ligando L ₁	27

Figura 27 - Síntese do ligando L ₂	29
Figura 28 - Síntese do ligando L ₃	30
Figura 29 - Síntese do ligando L ₄	31
Figura 30 - Síntese do ligando L ₅	32
Figura 31 - Síntese do ligando L ₆	33
Figura 32- Síntese do ligando L ₇	34
Figura 33 - Ativação da Sefarose CL-6B via epóxido.	35
Figura 34 - Imobilização do ligando L ₄ na Sefarose CL-6B ativada.	35
Figura 35 - Ativação da Sefarose CL-6B com CNBr.	36
Figura 36 - Imobilização do ligando L ₄ na Sefarose ativada.	36
Figura 37 - Método 1 utilizado na síntese de ligandos derivados de acridina	42
Figura 38 - Método 2 utilizado na síntese de ligandos derivados de acridina.	42
Figura 39 - Síntese do ligando L ₄	43
Figura 40 - Síntese dos ligandos L ₅ , L ₆ e L ₇	44
Figura 41 - Espectro da sequência 58Sy3 a 20°C, na presença de KCl 100 mM.	45
Figura 42 - Espectros de dicroísmo circular obtidos para as titulações da sequência 58Sy3 com os ligandos L ₄ , L ₅ , L ₆ e L ₇ . A - Titulação com uma concentração crescente de L ₄ ; B - Titulação com uma concentração crescente de L ₅ ; C - Titulação com uma concentração crescente de L ₆ ; A - Titulação com uma concentração crescente de L ₇	46
Figura 43 - Representação esquemática do suporte A.	48
Figura 44 - Representação esquemática do suporte B	48
Figura 45 - Perfil cromatográfico obtido após injeção da amostra de pDNA no suporte A, utilizando um gradiente decrescente de (NH ₄) ₂ SO ₄ , representado pela linha tracejada: Primeiro passo 1 M de sal, e segundo passo 0 M.	50
Figura 46 - Perfil cromatográfico obtido após injeção da amostra de pDNA no suporte de Sefarose com braço espaçador sem ligando imobilizado (branco), utilizando um gradiente decrescente de (NH ₄) ₂ SO ₄ , representado pela linha tracejada: Primeiro passo 1 M de sal, e segundo passo 0 M.	50
Figura 47 - Perfil cromatográfico obtido após injeção da amostra de pDNA no suporte A, utilizando um gradiente crescente de NaCl, representado pela linha tracejada: Primeiro passo 0 M de sal, e segundo passo 2,5 M.	51
Figura 48 - Perfil cromatográfico obtido após injeção da amostra de pDNA no suporte de Sefarose com braço espaçador sem ligando imobilizado (branco), utilizando um gradiente crescente de NaCl, representado pela linha tracejada: Primeiro passo 0 M de sal, e segundo passo 2,5 M.	52
Figura 49 - Perfil cromatográfico obtido após injeção da amostra de pDNA no suporte B, utilizando um gradiente decrescente de (NH ₄) ₂ SO ₄ , representado pela linha tracejada: Primeiro passo 3 M de sal, e segundo passo 0 M.	53

Figura 50 - - Perfil cromatográfico obtido após injeção da amostra de pDNA no suporte de Sefarose (branco), utilizando um gradiente decrescente de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, representado pela linha tracejada: Primeiro passo 1,8 M de sal, e segundo passo 0 M.	53
Figura 51 - Perfil cromatográfico obtido após injeção da amostra de pDNA no suporte B, utilizando um gradiente decrescente de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, representado pela linha tracejada: Primeiro passo 1,8 M de sal, e segundo passo 0 M.	54
Figura 52 - Perfil cromatográfico obtido após injeção da amostra de pDNA no suporte B, utilizando um gradiente crescente de NaCl, representado pela linha tracejada: Primeiro passo 0 M de sal, e segundo passo 2,5 M.	54
Figura 53 - Perfil cromatográfico obtido após a injeção da amostra de pVAX-LacZ e respetiva eletroforese em gel agarose a 1%. A - Amostra de pDNA injetado na coluna; 1 - Fração recolhida utilizando 1,5 M de NaCl.	56
Figura 54 - Perfil cromatográfico obtido após a injeção da amostra de pVAX-LacZ e respetiva eletroforese em gel agarose a 1%. A - Amostra de pDNA injetado na coluna; 1 - Fração recolhida utilizando 0,15 M de NaCl. 2 - Fração recolhida utilizando 1,5 M de NaCl.	58
Figura 55 - Perfil cromatográfico obtido após a injeção da amostra de pVAX-LacZ e respetiva eletroforese em gel agarose a 1%. A - Amostra de pDNA injetado na coluna; 1 - Fração recolhida utilizando 0,145 M de NaCl. 2 - Fração recolhida utilizando 1,5 M de NaCl.	59
Figura 56 - Perfil cromatográfico obtido após a injeção da amostra de pVAX-G4 e respetiva eletroforese em gel agarose a 1%. A - Amostra de pDNA injetado na coluna; 1 - Fração recolhida utilizando 0,15 M de NaCl. 2 - Fração recolhida utilizando 1,5 M de NaCl.	60
Figura 57 - Espectro de dicroísmo circular obtido para a amostra tratada com DNase.	61
Figura 58 - Espectro de dicroísmo circular obtido para a amostra tratada com RNase.	61
Figura 59 - Eletroforese em gel agarose 1% das amostras após digestão. M - Marcador de peso molecular. 1 - Amostra tratada com DNase. 2 - Amostra tratada com RNase.	62
Figura 60 - Espectro de dicroísmo circular das diferentes amostras (pVAX-G4 sc; amostra tratada com DNase e amostra tratada com RNase).	62

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Estabilidade térmica do G-quadruplex com os diferentes ligandos.....	47
Tabela 2 - Resumo dos gradientes de ligação/eluição testadas para a separação das isoformas do plasmídeo pVAX- <i>LacZ</i> a 25°C, com diferentes concentrações de NaCl.	56
Tabela 3 - Resumo dos perfis de ligação/eluição das isoformas do plasmídeo pVAX- <i>LacZ</i> a 4°C, com diferentes concentrações de NaCl.	57

Lista de Acrónimos

Abs	Absorvância
B-DNA	Forma B do DNA
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
CH_3CN	Acetonitrilo
CNBr	Brometo de cianogénio
d	Dupleto
D_2O	Água deuterada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
DO_{600}	Densidade óptica a 600 nm
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
gDNA	DNA genómico
g	Gramma
G4	G-quadruplex
GMP	Guanosina monofosfato
HBr	Ácido bromídico
HCl	Ácido clorídrico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HR-MAS	Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução de Ângulo Mágico
IC_{50}	Concentração de composto que inibe a atividade em 50%
K_2CO_3	Carbonato de potássio
Ln	Linear
m/z	Massa/carga
m	Multiplete
M	Molar
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Mr	Massa molecular relativa
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NaSO_4	Sulfato de sódio
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sulfato de amónio
oc	Circular aberta
°C	Celsius
nm	Nanómetros
Pb	Pares de base
pDNA	DNA plasmídico

ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
¹³ C RMN	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
¹ H RMN	Ressonância magnética nuclear de prótons
RCF	Força centrífuga relativa
s	Singuleto
sc	Superenrolada
t	Tripleto
Tris	Tris(hidroximetil)metilamina
μM	Micromole
μL	Microlitro
ΔT _m	Diferença da temperatura de <i>melting</i>

Capítulo 1

1 Introdução

Em 1868 um jovem químico suíço, de nome Friedrich Miescher, isolou a partir de núcleos de glóbulos brancos de humanos, algo que nunca tinha sido identificado. A este composto, Friedrich Miescher atribuiu o nome de nucleína. Passados mais de 100 anos esta biomolécula é um dos principais focos de estudo, sendo atualmente designada por DNA (ácido desoxirribonucleico) (Wolf, 2003). O DNA é composto por quatro tipos de bases, a Adenina (A), Timina (T), Guanina (G) e Citosina (C), as quais se ligam a uma pentose, nomeadamente a desoxirribose e a um ou mais grupos fosfato formando assim um nucleótido (Alberts B, 2007). Os nucleótidos ligam-se covalentemente entre si originando uma cadeia de DNA. Uma molécula de DNA é composta por duas destas cadeias ligadas por pontes de hidrogénio entre as suas bases complementares.

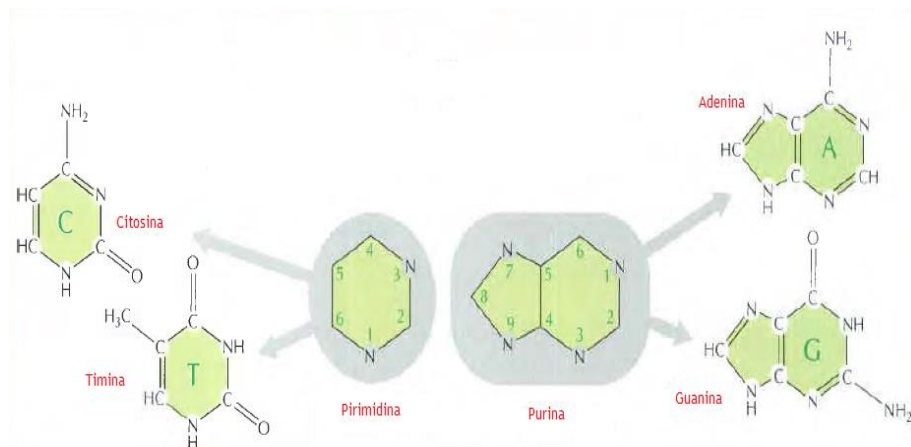


Figura 1 - Bases constituintes do DNA (adaptado de Alberts B, 2007).

Em 1953 ocorreu uma das maiores descobertas acerca deste composto, James Watson e Francis Crick, elucidaram a estrutura do DNA. Através da combinação de informações de trabalhos anteriores, como o de Chargaff, onde era descrito que o número total de purinas numa molécula de DNA é igual ao número total de pirimidinas, juntamente com ensaios de cristalografia, estes chegaram a um resultado final de um modelo de dupla hélice para estrutura de DNA, também conhecida como DNA-B (Figura 2) (Pray, 2008).

Atualmente sabe-se que para além da forma B, o DNA pode ter várias estruturas não-canónicas, que podem ajudar no controlo da expressão de genes e manter a integridade do DNA (Svozil, Kalina, Omelka, & Schneider, 2008). Entre estas estruturas encontram-se o DNA-

A, DNA-Z, Triplex e G-quadruplex (Luedtke, 2009). A estrutura do G-quadruplex é talvez a mais estudada atualmente, pois está associada a processos tais como a replicação do DNA, expressão e regulação de genes e reparação do DNA (Xu, Noguchi, & Sugiyama, 2006).

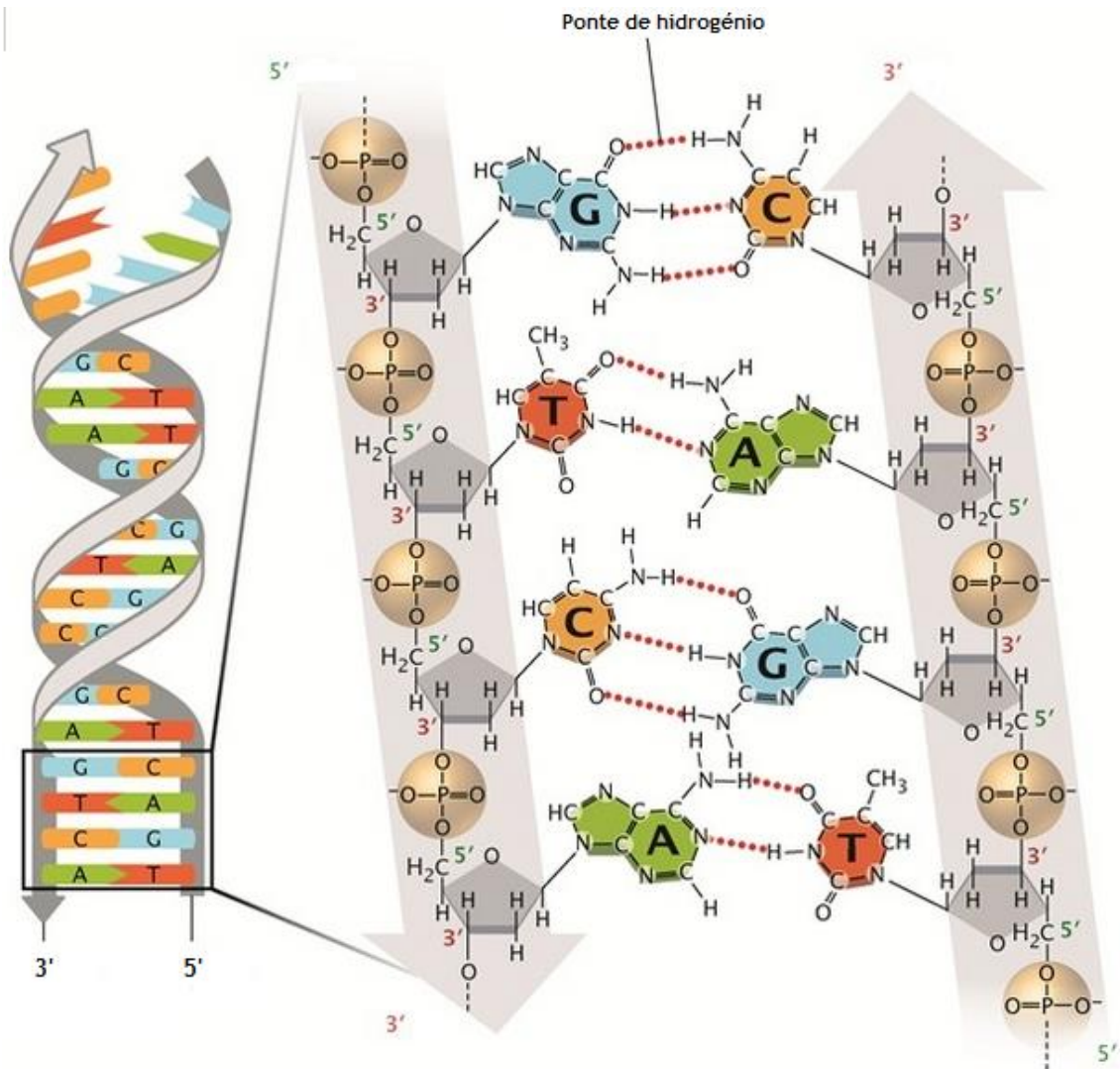


Figura 2 - Estrutura do DNA (adaptado de Alberts B, 2007),

1.1 G-Quadruplex

Em meados de 1960, através da análise de uma solução concentrada de GMP (guanosina monofosfato) por difração de raios-X, verificou-se que esta solução continha tetrâmeros planares de guaninas ligadas entre elas por ligações *Hoogsteen* (Gellert, Lipsett, & Davies, 1962). Estes tetrâmeros viriam a ser chamados de quarteto de guaninas ou tétradas (Figura 3A) (Huppert, 2008b). Testes bioquímicos realizados na década de 80, demonstraram que oligonucleótidos que contêm sequências de ácidos nucleicos ricos em guanina, podem formar estruturas de DNA de quatro cadeias chamadas G-quadruplex (Lipps & Rhodes, 2009). Estas estruturas são formadas por tétradas de guanina (Monchaud & Teulade-Fichou, 2010) que contêm anéis-aromáticos, formando arranjos empilhados entre tétradas adjacentes através de interações π - π (Figura 3B) (Huppert, 2008a). São necessárias pelo menos duas tétradas empilhadas para originar um G-quadruplex. A formação do G-quadruplex está dependente da presença de cátions monovalentes como por exemplo o K^+ ou Na^+ , uma vez que quando as tétradas de guanina são empilhadas, é produzida uma cavidade central cilíndrica (Bidzinska, Cimino-Reale, Zaffaroni, & Folini, 2013). Esta cavidade alinhada com os oxigénios O6 dos grupos carbonilo das guaninas, forma um sítio de ligação específico para iões metálicos, neutralizando assim a repulsão eletrostática dos oxigénios direcionados para o interior das tétradas de guaninas (Bochman, Paeschke, & Zakian, 2012). Tanto os iões K^+ e Na^+ são capazes de estabilizar a estrutura do G-quadruplex. Experiências demonstraram que o G-quadruplex é estabilizado por iões monovalentes na seguinte ordem: $K^+ > NH_4^+ > Rb^+ > Na^+ > Cs^+ > Li^+$ e por iões divalentes $Sr^{2+} > Ba^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+}$ (Tran, De Cian, Gros, Moriyama, & Mergny, 2013), indicando que o raio atômico do potássio ajusta-se melhor ao sítio de ligação entre as tétradas (Hardin, Watson, Corregan, & Bailey, 1992). O sítio da ligação varia com a natureza dos iões. Os iões K^+ estão sempre equidistantes entre as tétradas, interagindo igualmente com cada um dos oito oxigénios dos grupos carbonilo, enquanto os iões Na^+ podem também ligar-se aos grupos fosfato das tétradas (Wong & Wu, 2003).

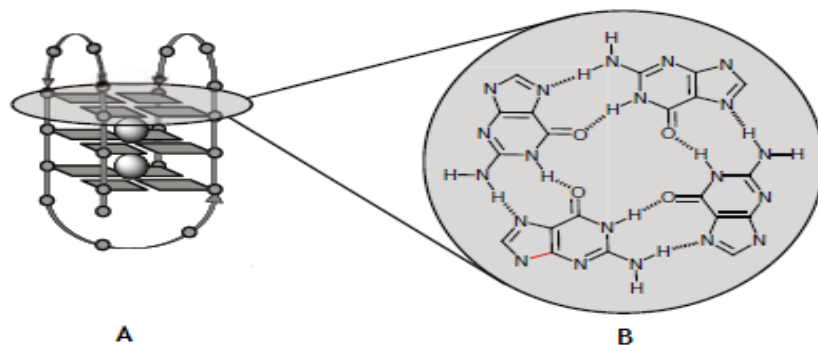


Figura 3 - (A) Estrutura tridimensional de um G-quadruplex; (B) Ligações de Hoogsteen estabelecidas na formação de uma tétrada de guaninas. (adaptado de Monchaud & Teulade-Fichou, 2010).

Para além de estabilizarem os G-quadruplexes, os iões também são determinantes no tipo de conformação do G-quadruplex (Stephen Neidle & Balasubramanian, 2006). Por exemplo, Thomas e colaboradores, verificaram que a presença de iões Na^+ e K^+ em baixa concentração, promovia a formação de uma conformação antiparalela na sequência telomérica $d(\text{T}_4\text{G}_4)_4$ de *Oxytricha nova* a $d(\text{T}_4\text{G}_4)_4$. Utilizando concentrações mais elevadas, a conformação formada era de tetramolecular paralela. No entanto a concentração de Na^+ necessária para induzir esta diferença na conformação foi mais elevada do que com K^+ , 225 mM e 65 mM respetivamente (Miura, Benevides, & Thomas, 1995). Outro exemplo é a sequência telomérica humana $d[\text{AG}_3(\text{TTAGGG})_3]$ em que na presença de Na^+ possui uma topologia antiparalela, enquanto que na presença de K^+ assume uma topologia paralela (Burge, Parkinson, Hazel, Todd, & Neidle, 2006).

1.2 Conformações G-quadruplex

Os quadruplexes podem ser constituídos por uma, duas ou quatro cadeias, e podem apresentar diferentes topologias, as quais dependem de várias variáveis tais como (Bidzinska et al., 2013; Bochman et al., 2012):

- A sequência de oligonucleótidos;
- O número de cadeias (unimolecular, bimolecular ou tetramolecular);
- A direção das cadeias (paralelas ou antiparalelas);
- O ângulo das ligações glicosídicas (*syn*, *anti*);
- O tamanho e o tipo de *loops* (diagonais, laterais ou em hélice);
- Fatores ambientais como a presença de iões metálicos ou de ligandos.

Quadruplexes unimoleculares (ou intramoleculares) (Figura 4) são originados por uma única cadeia de oligonucleótidos, que pode ser descrita pela seguinte fórmula: $\text{G}_m\text{X}_n\text{G}_m\text{X}_o\text{G}_m\text{X}_p\text{G}_m$. Onde m corresponde ao número de resíduos de guaninas (G) sucessivas que estão envolvidas diretamente nas interações das tétradas e X_n , X_o e X_p podem ser qualquer combinação de resíduos que formam os *loops*. Caso as tétradas sejam de tamanhos diferentes, ou seja, se alguma das tétradas for maior que as outras, as guaninas em excesso irão ficar localizadas nas zonas dos *loops* (Burge et al., 2006).

Já os quadruplexes bimoleculares e tetramoleculares (intermoleculares) (Figura 4) são formados por associação de duas e quatro cadeias, respetivamente. As cadeias que constituem o G-quadruplex podem ser paralelas ou anti-paralelas, influenciando a conformação da ligação glicosídica entre a guanina e a desoxirribose (Murat, Singh, & Defrancq, 2011). Quando todas as cadeias se encontram na mesma direção, a estrutura quadruplex é considerada paralela e todas as suas bases encontram-se em conformação *anti* originando assim *grooves* de igual tamanho. Caso exista uma cadeia orientada em direção oposta às outras, a estrutura do quadruplex é considerada híbrida. No caso de duas cadeias

estarem orientadas para uma direção e as outras duas para a direção oposta, a estrutura é considerada anti-paralela e contém bases em posição *anti* e *syn* originando assim *grooves* de diferente tamanho (Huppert, 2008a; Phan, 2010).

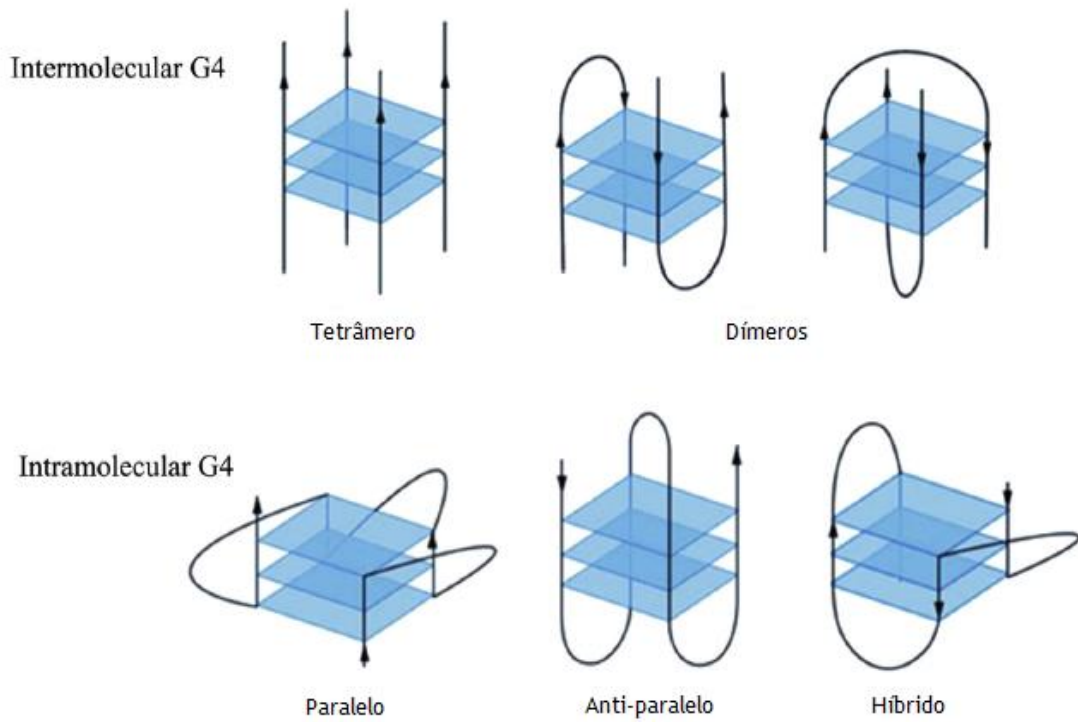


Figura 4 - Tipo de estruturas de G-quadruplex (intramoleculares e intermoleculares) (adaptado de Xiong et al, 2015).

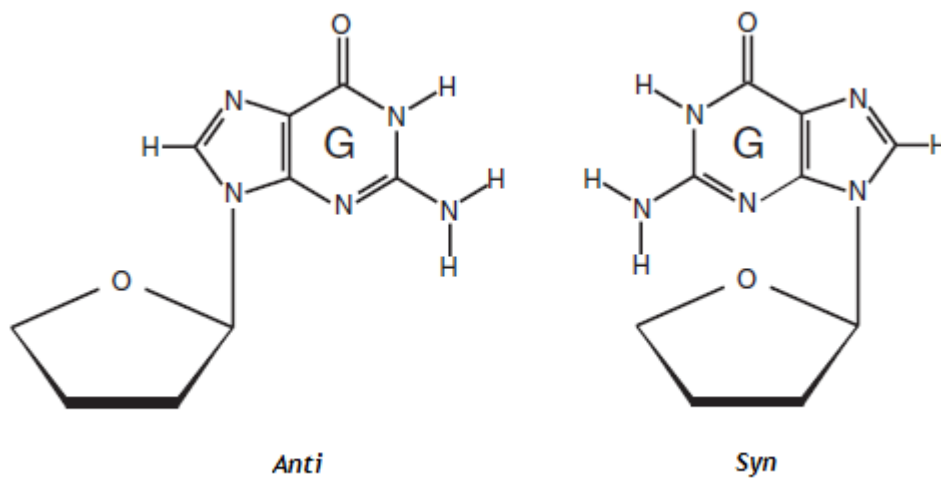


Figura 5 - Conformações *anti* e *syn* das ligações glicosídicas (adaptado de Phan, 2010)

Como referido anteriormente, os *loops* podem ser de três tipos: em hélice, que conecta cadeias paralelas adjacentes (Figura 6a) e geralmente apenas tem um resíduo; lateral, que conecta cadeias antiparalelas adjacentes (Figura 6b) e geralmente apresenta três ou mais resíduos; diagonal, que conecta cadeias diagonais antiparalelas (Figura 6c) e normalmente contém dois ou mais resíduos (S. Zhang, Wu, & Zhang, 2014).

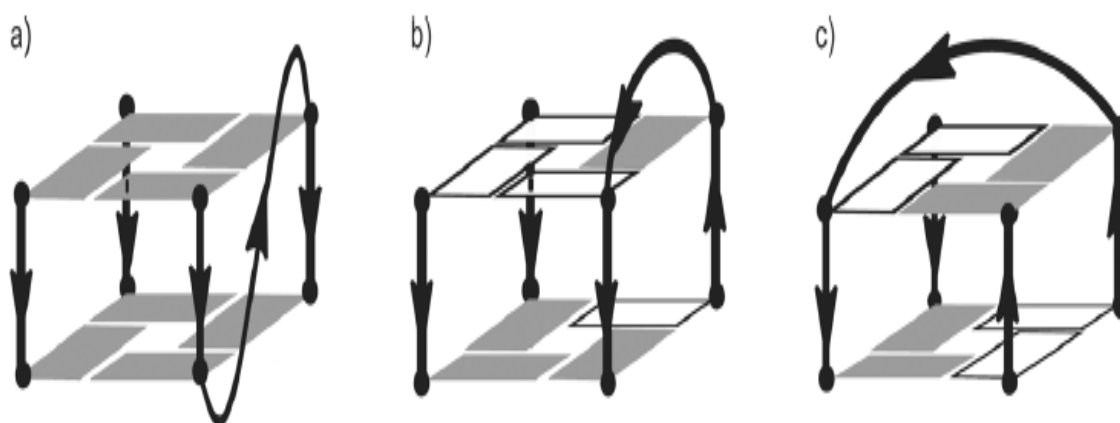


Figura 6 - Esquema representativo dos três tipos de *loops*. A) Em hélice; B) Lateral; C) Diagonal (adaptado de Zhang, Wu & Zhang, 2014).

1.3 Implicações do G-quadruplex a nível biológico

Atualmente existe um grande interesse no G-quadruplex como alvo terapêutico (Wang et al., 2015), uma vez que este está associado a doenças como o cancro (Han & Hurley, 2000), o HIV (Amrane et al., 2014) e diabetes (Paritala & Firestine, 2010). Uma análise computacional revelou que existem cerca de 370 000 sequências, ou até mais, potenciais formadoras de G-quadruplex no genoma humano (Huppert & Balasubramanian, 2005). Estas sequências podem ser encontradas em DNA ribossômico, RNA, regiões teloméricas e promotores de oncogenes (Luedtke, 2009; Xiong, Huang, & Tan, 2015), sendo que 40% dos promotores do genoma humano apresentam pelo menos uma sequência formadora de quadruplex (Monchaud & Teulade-Fichou, 2008). Entre estes genes estão o c-MYC (Ghosh & Dasgupta, 2015; Nagesh et al., 2015), c-KIT (Manaye, Eritja, Avino, Jaumot, & Gargallo, 2012), BCL-2 (H. Sun et al.,

2014), KRAS (Cogoi & Xodo, 2006), VEGF (Wu et al., 2014), RB (Xu & Sugiyama, 2006), PDGF-A (Xiong et al., 2015).

O DNA de cadeia simples, rico em guaninas, forma espontaneamente estruturas de G-quadruplexes em determinadas condições fisiológicas. Excetuando a região de cadeia simples nas extremidades 3' dos telómeros, as sequências formadoras de quadruplex têm que competir com o DNA de dupla cadeia, uma que para ocorrer a formação de quadruplexes as cadeias de DNA têm de estar separadas, o que acontece de forma transiente em processos como a replicação, transcrição e recombinação (Mathad, Hatzakis, Dai, & Yang, 2011).

1.3.1 Telómeros

Nas extremidades dos cromossomas das células eucarióticas estão presentes sequências repetidas de DNA (5'-TTAGGG-3'), denominadas por telómeros, os quais são responsáveis pela manutenção da integridade dos cromossomas (Huppert, 2008a; Luedtke, 2009). Para além desta função, os telómeros asseguram a correta duplicação da informação genética e também mantêm a estabilidade estrutural do cromossoma (Luedtke, 2009).

Os telómeros são constituídos por uma região de dupla cadeia e outra de cadeia simples rica em guaninas. Esta última tem a direção 5' para 3' partindo do centrómero com direção ao telómero e é sempre maior que a sua cadeia complementar, daí formar uma região de cadeia simples. Independentemente da sequência da cadeia, esta tem sempre a capacidade de formar estruturas de quadruplexes (Bochman et al., 2012).

Em condições normais, e após cada divisão celular, os telómeros vão ficando progressivamente mais curtos, o que pode levar a célula a perder a sua capacidade de divisão, podendo sofrer morte celular quando estes ficarem demasiado curtos. Assim, este mecanismo impõe um tempo de vida limite às células, a não ser que algo atue para alongar os telómeros. As células estaminais conseguem contornar este limite, devido a à presença de uma transcriptase reversa (hTERT), a enzima telomerase (Huppert, 2008a). A telomerase alonga os telómeros a partir de um molde interno de RNA, adicionando sequências específicas e repetitivas de DNA à extremidade 3'. Verifica-se que em cerca de 85% dos cancros, as células expressam esta enzima de forma a manterem a capacidade de proliferação celular. Numa célula somática não cancerígena, esta enzima não possui atividade detetável (Xiong et al., 2015).

Assim, é de grande interesse desenvolver abordagens para reduzir a atividade da telomerase, nestes processos patológicos. Uma dessas abordagens passa pela formação e estabilização de G-quadruplexes na região de cadeia simples dos telómeros, através da ligação reversível de ligandos, inibindo a atividade da telomerase (Han & Hurley, 2000), uma vez que a formação de uma estrutura de quadruplex assegura que a extremidade 3' fique inacessível para hibridizar com o molde de RNA da telomerase (S. Neidle, 2010).

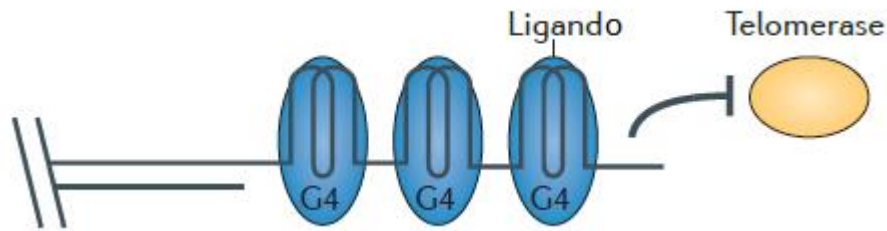


Figura 7 - Indução e estabilização da estrutura G4 através de um ligando na região de cadeia única do telômero, impedindo a ação da telomerase (adaptado de Bochman et al., 2012).

1.3.2 G-quadruplex na transcrição

Como referido anteriormente, existem potenciais sequências formadoras de G-quadruplex em vários oncogenes. No próximo subcapítulo irá ser feita uma abordagem ao c-MYC dada a sua importância.

1.3.2.1 c-MYC

A oncoproteína c-MYC desempenha um papel importante em vários processos celulares, incluindo a regulação da progressão do ciclo celular, crescimento celular, diferenciação, transformação, angiogénese e apoptose (Gonzalez & Hurley, 2010). Esta é capaz de ativar vários genes, através da formação de complexos heterodiméricos com outros fatores, como por exemplo o MAX e o MAD, que interagem com sequências de DNA específicas. O complexo c-MYC-MAX por exemplo, promove a proliferação celular ativando ciclinas (D1, D2, E1 e A2) e cinases dependentes de ciclinas (CDK4) necessárias para a progressão do ciclo celular, para além disso inibe a função de inibidores de cinases dependentes de ciclinas (p15 e p21) (Gonzalez & Hurley, 2010). Em condições anormais pode ocorrer a sobre-expressão da proteína c-MYC, o que provoca a desregulação de vários genes envolvidos no ciclo de proliferação celular levando assim ao aparecimento de cancro (Attila Ambrus, Chen, Dai, Jones, & Yang, 2005).

No promotor do c-MYC, estão presentes sete elementos de hipersensibilidade a nucleases (NHEs), sendo uma delas a NHE III₁ (Figura 8). Esta região encontra-se localizada acima do promotor P₁ e controla 90% do nível de transcrição do c-MYC (Seenisamy et al., 2004). Estudos demonstraram que esta região de 27 nucleótidos, rica em guaninas, tem a capacidade de formar estruturas de quadruplexes que atuam como um repressor da transcrição (Ghosh & Dasgupta, 2015).

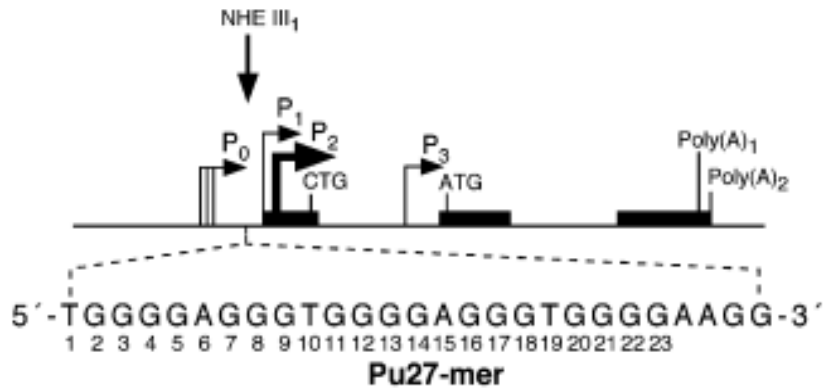


Figura 8 - Promotor do gene c-MYC e localização da região NHE III₁ (adaptado de Seenisamy et al., 2004).

Tal como nos telómeros, a indução e estabilização de G-quadruplexes através de ligandos é uma abordagem de interesse, neste caso para controlar os níveis de transcrição (Figura 9).

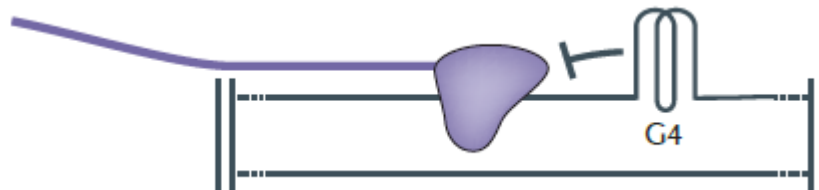


Figura 9 - Representação do bloqueio da polimerase (a roxo) através da formação de uma estrutura G-quadruplex, inibindo a transcrição (adaptado de Bochman et al, 2012).

1.4 Compostos heterocíclicos e a sua ligação ao G-quadruplex

1.4.1 Compostos derivados de acridina

A acridina e os seus derivados são conhecidos pelas suas propriedades medicinais, especialmente como agentes antibacterianos e antimaláricos (Charmantray & Martelli, 2001). Embora estas aplicações tenham diminuído ao longo do tempo, a acridina continua vista como um composto com bastante potencial noutras áreas, nomeadamente como anticancerígeno (Ferguson & Denny, 1991).

Este composto heterocíclico consiste numa estrutura planar com três anéis aromáticos (Figura 10), que lhe permite intercalar com o DNA e interferir em vários dos processos metabólicos, como por exemplo, a inibição da telomerase (Cholewiński, Dzierzbicka, & Kołodziejczyk, 2011; Xiong et al., 2015). O tipo de interações presentes são essencialmente de empilhamento π - π entre o núcleo da acridina e as bases do DNA (Ferguson & Denny, 1991).

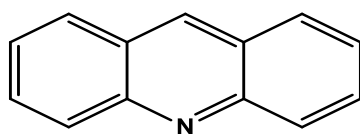


Figura 10 - Estrutura química da acridina.

Vários ligandos foram sintetizados e descritos como inibidores da telomerase, através da estabilização das estruturas de G-quadruplex. Entre estas moléculas estão estruturas derivadas de acridina entre as quais: acridinas tri-substituídas (ex. BRACO-19 (Figura 11a)), piridoacridinas (Figura 11b) e dibenzenofenantrolinas (Figura 11c) (Cholewiński et al., 2011).

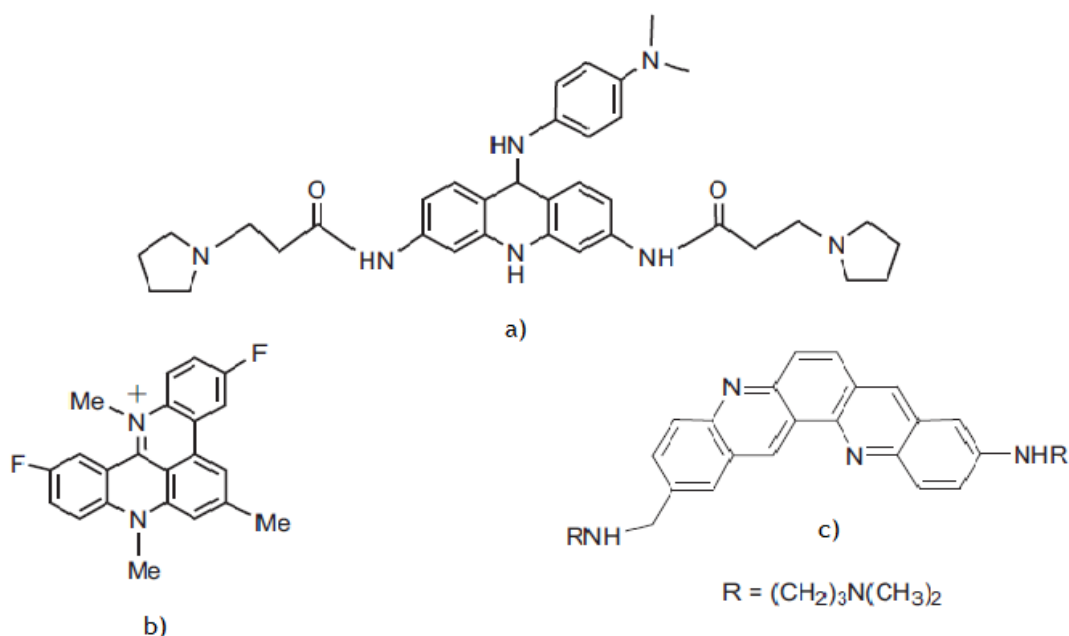


Figura 11 - Exemplos de compostos derivados de acridina (adaptado de Cholewiński et al., 2011). A) BRACO-19. B) Piridinoacridina. C) Dibenzenofenantrolina

O composto BRACO-19 foi estudado em detalhe como um potente ligando com afinidade para G-quadruplex e inibidor da telomerase. Os estudos demonstraram que este tipo de moléculas, que têm como alvo os telómeros, suspendem a ação da telomerase nas extremidades dos telómeros, resultando na indução de dano no DNA e conseqüentemente a morte celular (Cholewiński et al., 2011). Em 2007 o grupo do S. Neidle apresentou a síntese e a avaliação biofísica e bioquímica de um novo composto, o AS1410 (Figura 12), uma acridina trissubstituída, que revelou resultados de estabilização favoráveis com $\Delta T_m = 29,5^\circ\text{C}$ e $\text{EC}_{50} = 0,03\mu\text{M}$, quando comparados com o BRACO-19 ($\Delta T_m = 28,0^\circ\text{C}$ e $\text{EC}_{50} = 0,12\mu\text{M}$), o que levou à seleção deste ligando como potencial molécula para tratamento clínico (Martins et al., 2007).

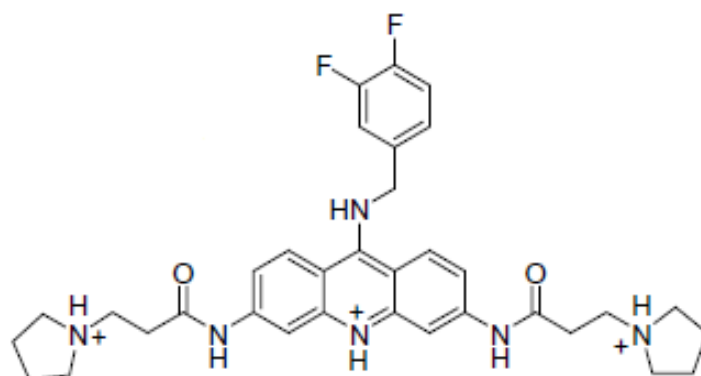


Figura 12 - Composto AS1410 (adaptado de Neidle, 2009).

1.4.1.1 Compostos derivados de quinolina

Outros tipos de compostos que têm vindo a apresentar bons resultados em estudos de estabilização do G-quadruplex são os compostos derivados de quinolina.

A quinolina é um composto heterocíclico aromático, com uma estrutura de dois anéis, um anel de benzeno ligado a um outro anel de piridina, por dois carbonos adjacentes (Figura 13).

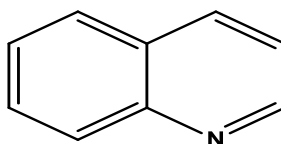


Figura 13 - Estrutura química da quinolina.

Os compostos de quinolina são também usados para sintetizar moléculas com benefícios medicinais, especialmente com atividade anti-malária, anti-bacteriana e anti-cancerígena (Afzal et al., 2015).

Neidle e os seus colaboradores sintetizaram derivados de quinolina dissustituídos (Figura 14a), com grupos amina nas posições 2 e 7, separados por cadeias alifáticas, verificando-se que estes compostos promoviam a estabilização do G-quadruplex, bem como inibição da telomerase com um IC_{50} a variar entre os 6 e 16 μM (Caprio et al., 2000).

Mais tarde, Zhou e os seus colaboradores desenharam e sintetizaram uma nova série de ligandos monosustituídos (Figura 14b) de forma a obterem novos inibidores da telomerase. Os estudos com estes ligandos confirmaram que a adição de grupos doadores de eletrões, como por exemplo grupos aminas, conduzia ao aumento da inibição da telomerase ($IC_{50} > 138$

μM para a quinolina; 0,44-12,3 μM para os derivados de quinolina com grupos amina) (Zhou et al., 2005).

Outro tipo de compostos como o 115405 (Figura 14c), que é constituído por duas quinolinas ligadas a um anel aromático central, demonstrou uma elevada afinidade e seletividade para diferentes estruturas de G-quadruplex em detrimento do duplex, apresentando também uma elevada capacidade de estabilização ($\Delta T_m = 20^\circ\text{C}$). Este composto atua como inibidor da telomerase com um IC_{50} de 41 nM, verificando-se o encurtamento dos telómeros e a apoptose em células cancerígenas humanas (Riou et al., 2002).

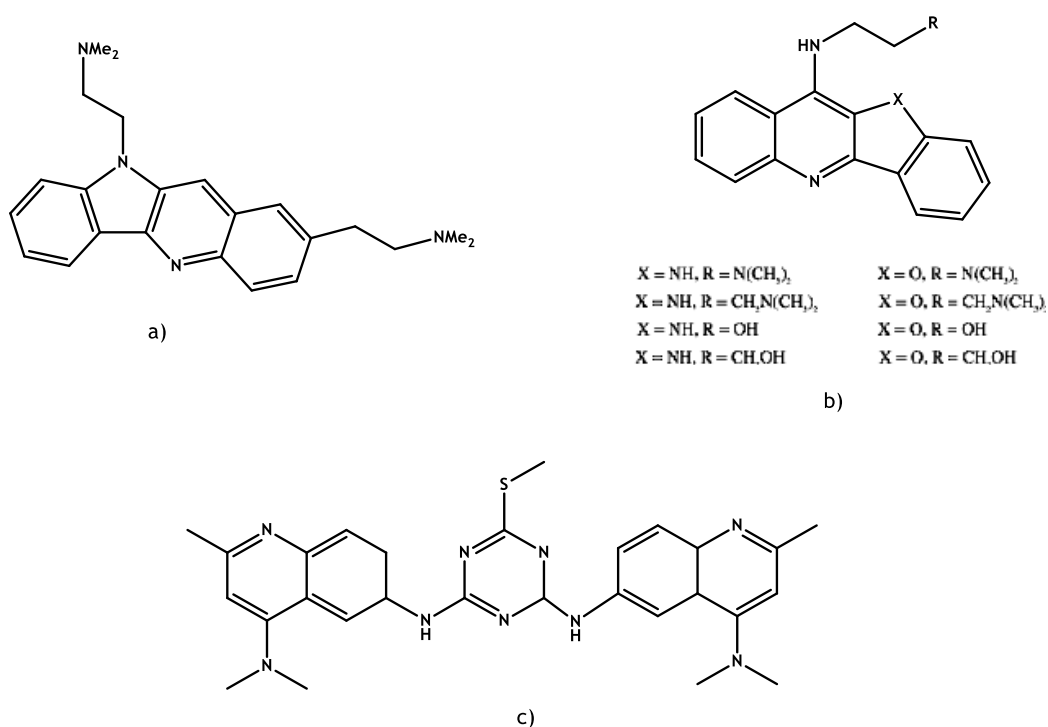


Figura 14 - Exemplos de estruturas de ligandos derivados de quinolina.

1.4.2 Compostos derivados de naftaleno

Na literatura, existe um grande número de estudos relacionados com a síntese de naftaleno-diidmidas (ND), di, tri e tetra substituídos, no âmbito da interação e estabilização do G-quadruplex.

O naftaleno consiste num hidrocarboneto aromático policíclico, com dois anéis benzeno ligados entre si por dois átomos de carbono adjacentes. A sua conformação planar é a principal característica que lhe permite uma interação com ácidos nucleicos.

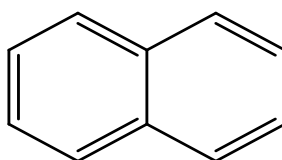


Figura 15 - Estrutura química do naftaleno.

Os anéis aromáticos do naftaleno permitem a estabilização dos terminais das tétradas de guaninas dos G-quadruplexes, através de interações de empilhamento π - π . Ao utilizar substituintes como grupos amino nas suas extremidades, estes permitem a formação de interações eletrostáticas nas *grooves* do G-quadruplex (Cuenca et al., 2008; Hampel, Sidibe, Gunaratnam, Riou, & Neidle, 2010). Cuenca e os seus colaboradores desenvolveram uma nova série destes compostos e os estudos realizados revelaram que naftaleno-diimidas tetra-substituídas apresentam uma maior capacidade estabilizadora de G-quadruplex ($\Delta T_m = 35.2^\circ\text{C}$) do que naftaleno-diimidas tri-substituídas ($\Delta T_m = 28.2^\circ\text{C}$) e di-substituídas ($\Delta T_m = 5.2^\circ\text{C}$) (Cuenca et al., 2008).

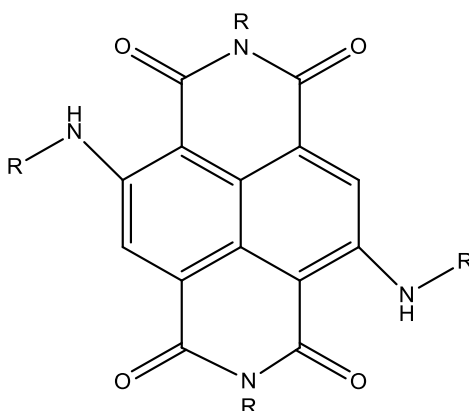


Figura 16 - Estrutura geral de naftaleno-diimida tetra-substituída.

1.5 Avaliação da interação e estabilização do G-quadruplex com ligandos

Atualmente existe uma grande variedade de técnicas para estudar a interação entre ligandos e o DNA G-quadruplex. Entre estas técnicas encontram-se a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), cristalografia de raios-X, dicroísmo circular (DC), transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET), ressonância de plasma de superfície (RPS), *displacement* do intercalador fluorescente (G4-FID), stop da reação em cadeia da polimerase (PCR-Stop), entre outras (Ma et al., 2015; Monchaud & Teulade-Fichou, 2010).

No próximo subcapítulo será abordada a técnica de dicroísmo circular, pois foi a técnica utilizada neste projeto.

1.5.1 Dicroísmo circular

O dicroísmo circular tem sido uma técnica bastante útil em estudos conformacionais de ácidos nucleicos (Murat et al., 2011). Esta técnica baseia-se na absorção diferencial da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita. Os fenômenos de alteração de direção e magnitude dos componentes da luz polarizada quando incidem numa dada amostra, traduzem-se e são acompanhados por espectros num dado intervalo de comprimento de onda que permitem avaliar a elipticidade da amostra (Figura 17).

Dada a sua sensibilidade a variações estereoquímicas, esta técnica permite estudar as topologias das estruturas de G-quadruplex e a capacidade dos ligandos para alterar estas topologias, para estabilizar as estruturas de G-quadruplex ou induzir a sua formação. Isto é possível dadas as características específicas e diferenças que o espectro de um G-quadruplex apresenta relativamente ao DNA dupla hélice (B-DNA) (Pagano et al., 2015; Randazzo, Spada, & da Silva, 2013). Os espectros característicos de B-DNA geralmente apresentam um pico positivo entre 260 e 280 nm e um pico negativo a 245 nm (Chang, Chen, & Hou, 2012). Relativamente aos espectros de G-quadruplex, estes apresentam um pico negativo a 240 nm e um pico positivo a 260 nm para estruturas paralelas, ou um pico negativo a 265 nm e um positivo a 295 nm na estrutura anti-paralela. Uma estrutura híbrida apresenta picos positivos a 268 nm e 290 nm e um pequeno pico negativo a 240 nm (A. Ambrus et al., 2006).

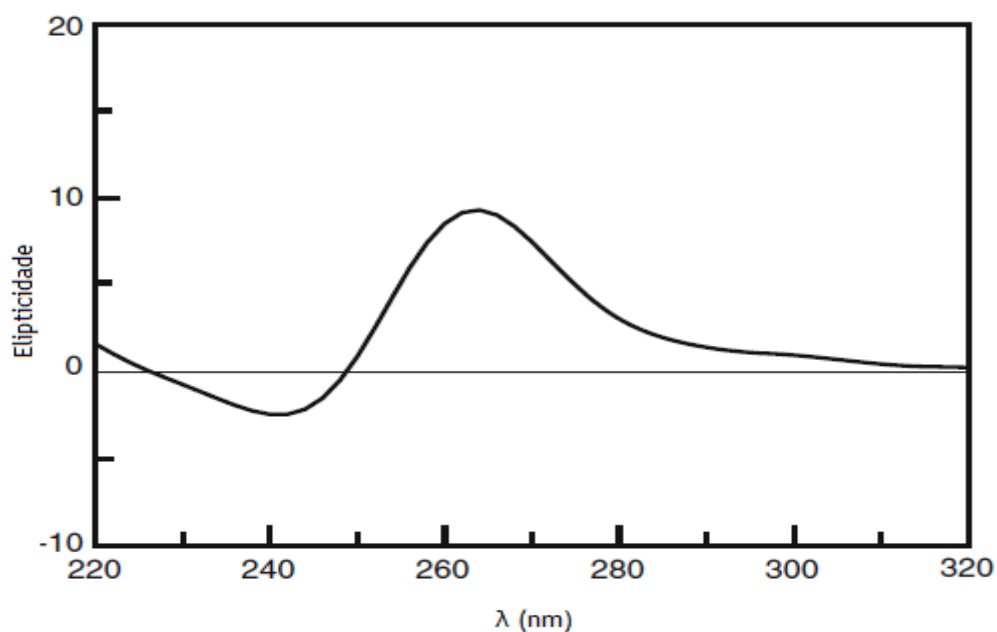


Figura 17 - Espectro CD de uma estrutura G4 paralela (adaptado de Randazzo, 2013).

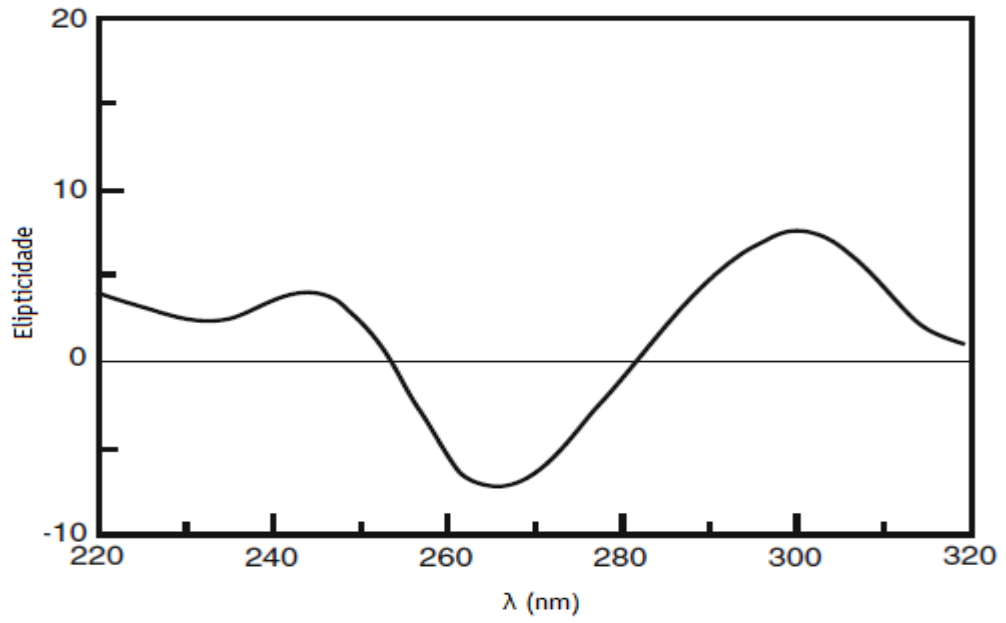


Figura 18 - Espectro CD de uma estrutura G4 anti-paralela (adaptado de Randazzo, 2013).

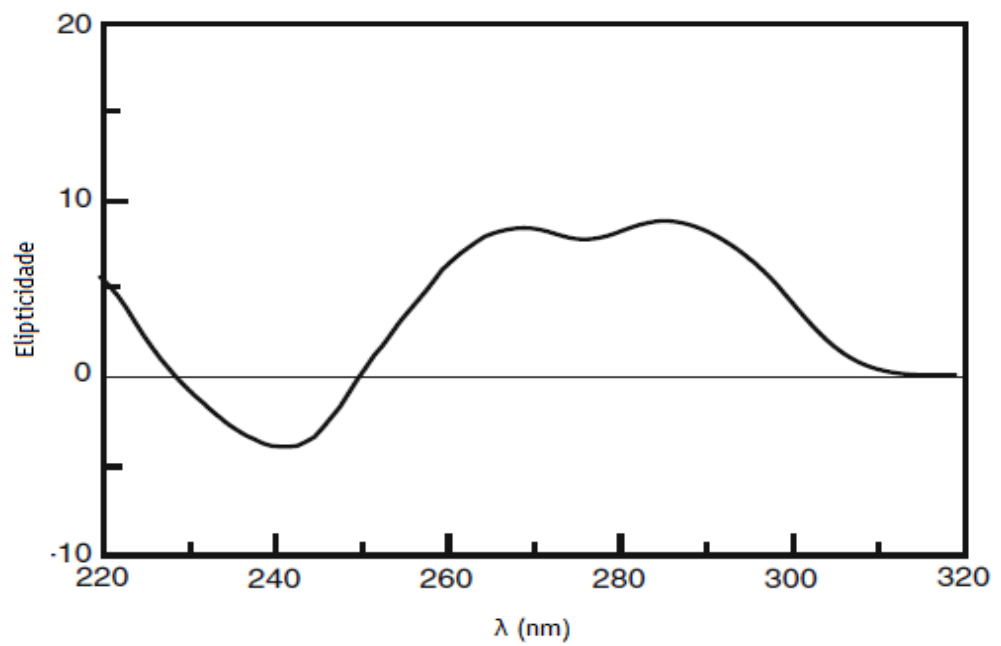


Figura 19 - Espectro CD de uma estrutura G4 híbrida (adaptado de Randazzo, 2013).

1.6 Purificação de DNA

Geralmente a separação e purificação dos ácidos nucleicos é realizada através de eletroforese ou cromatografia, no entanto a obtenção de G-quadruplexes a partir de amostras complexas ainda é visto como um grande desafio (T. Chang et al., 2012). Assim, este projeto tem como um dos objetivos a síntese de um suporte cromatográfico, capaz de isolar a isoforma superenrolada do DNA plasmídico pVAX-G4, contendo uma sequência formadora de G-quadruplex.

1.6.1 Cromatografia

A cromatografia é um método de separação, que se baseia na diferente distribuição dos vários componentes de uma amostra, entre duas fases. Uma das fases encontra-se fixa (fase estacionária), enquanto a outra move-se pelo sistema cromatográfico (fase móvel).

A primeira utilização desta técnica remonta para os inícios do século XX, quando Mikhail Tswett separou pigmentos de plantas (xantofilas, carotenos e clorofilas) utilizando uma coluna de adsorção líquida contendo carbonato de cálcio (Ettre, 2003).

Nas últimas duas décadas, a purificação de moléculas como o DNA plasmídico (pDNA), tornou-se um procedimento de rotina tanto em laboratório, como a nível industrial. O desenvolvimento de áreas terapêuticas como as vacinas de DNA e a terapia génica, levou a um consequente aumento da necessidade de grandes quantidades de pDNA ultra puro, de forma a cumprir os parâmetros impostos pelas agências reguladoras.

1.6.1.1 DNA plasmídico

Os plasmídeos são moléculas de DNA extra-cromossómicas de cadeia dupla, covalentemente fechadas. Estas moléculas são bastante grandes ($M_r > 10^6$, tamanho na ordem dos μm), quando comparados com as proteínas. Cada cadeia desta molécula consiste num polímero desoxirribonucleico linear, com os grupos fosfato a apresentarem carga negativa para pH superior a 4. O enrolamento das cadeias anti-paralelas originam uma estrutura clássica de dupla hélice, que é estabilizada por ligações de hidrogénio de Watson-Crick e forças de empilhamento. As bases aromáticas encontram-se orientadas para o interior da molécula, fazendo assim com que o interior da hélice dupla seja altamente hidrofóbico (M. M. Diogo, Queiroz, & Prazeres, 2005). Tal como o DNA cromossómico das células hospedeiras, o DNA plasmídico é duplicado antes de cada divisão celular. Durante esta divisão, pelo menos uma cópia do DNA é segregado para cada célula-filha. Os plasmídeos são constituídos por vários componentes, entre os quais uma origem de replicação, permitindo a sua replicação através do reconhecimento da DNA polimerase; um gene de resistência a antibióticos; uma região promotora eucariota e uma região de múltipla clonagem, que consiste num pequeno

segmento de DNA que contém vários sítios para enzimas de restrição, permitindo assim a clonagem do gene desejado (Lodish et al., 2000).

O DNA plasmídico pode apresentar diferentes topologias, nomeadamente a forma superenrolada (sc), circular aberta (oc) e linear (ln). A sequência de DNA, bem como as condições desfavoráveis como pH extremo e alta temperatura, são responsáveis pela existência das três topologias de pDNA. (F. Sousa, Prazeres, & Queiroz, 2008). A isoforma sc é a mais relevante em termos biológicos, uma vez que facilita o processo de transcrição, estando assim relacionado com o grau de expressão do gene (Dorman, 2006; Hirose & Matsumoto, 2005).

Em aplicações terapêuticas, o pDNA tem como função entregar a informação genética desejada nas células e induzir a produção de proteínas relevantes (F. Sousa, Prazeres, et al., 2008). Apesar de existirem outros vetores, como por exemplo vetores virais (retrovírus, adenovírus, vírus adeno-associados) (Mountain, 2000) estes apresentam uma desvantagem relativa à produção em larga escala e não são considerados tão seguros quando comparados com vetores não-virais como o DNA plasmídico (M. M. Diogo et al., 2005).

Segundo as agências reguladoras como a FDA (*Food and Drug Administration*) o produto final de pDNA não pode conter DNA genómico (gDNA), proteínas do hospedeiro, RNA e endotoxinas. Para além disso, as isoformas ln (linear) e oc (circular aberta) também são consideradas contaminantes, sendo por isso necessário a separação destas isoformas. O produto de pDNA final deverá conter mais de 90% da isoforma sc (M. M. Diogo et al., 2005).

Recentemente tem surgido o interesse nesta isoforma também porque a sua superhelicidade facilita a formação de estruturas secundárias de DNA, nomeadamente o G-quadruplex, sob certas condições fisiológicas (Mathad et al., 2011; D. Sun & Hurley, 2009). Num estudo recente, Zhang e os seus colaboradores, verificaram que após a transcrição *in vitro*, a isoforma superenrolada favorece a formação de estruturas G-quadruplex. Estes estudos demonstram que a formação do G-quadruplex, aconteceu a milhares de pares de base de distância do local onde ocorria a transcrição (C. Zhang, Liu, Zheng, Hao, & Tan, 2013).

Tendo em conta estes aspetos é de extrema importância a utilização de técnicas que permitam uma eficaz separação da sc pDNA das impurezas. A cromatografia líquida desempenha aqui um papel fundamental, dada a sua simplicidade, robustez e alta reprodutibilidade (A. Sousa, Sousa, & Queiroz, 2012).

1.6.2 Métodos cromatográficos

Vários tipos de cromatografia têm sido utilizados na purificação da sc pDNA. Estas exploram diferentes propriedades físicas e químicas dos ácidos nucleicos, como o tamanho, hidrofobicidade, carga e bioespecificidade. Sendo assim é possível dividir a cromatografia em quatro grupos, dependendo do tipo de propriedade explorada e interações envolvidas: cromatografia de exclusão molecular; cromatografia de troca iônica, cromatografia de interação hidrofóbica e cromatografia de afinidade (Figura 18) (Handbook, 2001; A. Sousa et al., 2012)

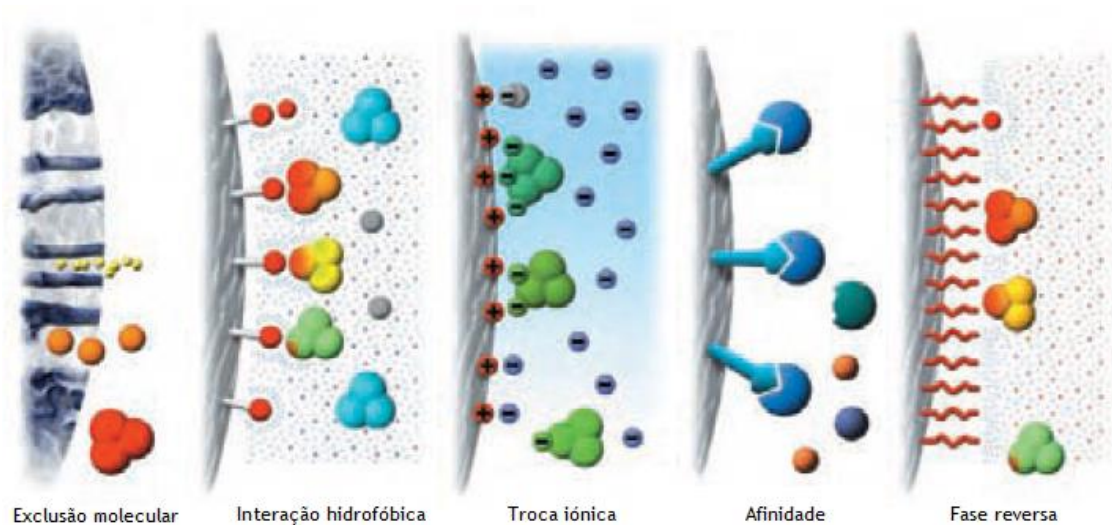


Figura 20 - Representação esquemática dos tipos de interações na cromatografia (adaptado de Handbook, 2001).

1.6.2.1 Cromatografia de exclusão molecular

A cromatografia de exclusão molecular fraciona e purifica o plasmídeo com base no tamanho, podendo ser usada como processo único ou em conjunto com outros métodos cromatográficos, como a cromatografia de troca iônica (Ghanem, Healey, & Adly, 2013). A redução do tamanho do pDNA devido ao super enrolamento permite separar a isoforma sc das restantes impurezas. Geralmente, no primeiro pico visível no cromatograma, eluem o gDNA e todas as isoformas de pDNA. No segundo pico eluem as moléculas mais pequenas como RNA, oligonucleótidos, e endotoxinas (Prazeres & Ferreira, 2004). Este método pode atingir rendimentos até 70%, no entanto apresenta limitações como capacidade limitada e a baixa seletividade para o pDNA. Sendo assim, este tipo de cromatografia não é o ideal para usar como primeiro passo de purificação, mas sim como passo de polimento (Ghanem et al., 2013).

1.6.2.2 Cromatografia de troca iónica

A cromatografia de troca iónica baseia-se na interação entre os grupos fosfatos do pDNA carregados negativamente e os grupos da fase estacionária carregados positivamente (M. M. Diogo et al., 2005).

Apesar da semelhança da carga e do peso molecular das diferentes topologias de pDNA, as diferentes isoformas possuem diferentes conformações e consequentemente diferentes densidades de cargas locais. Sendo assim, as isoformas irão ter tempos de retenção diferentes com um gradiente crescente de sal. A isoforma sc tem uma maior densidade de cargas do que as restantes isoformas. Assim, verificam-se atrações eletrostáticas mais fortes para os ligandos carregados positivamente, fazendo com que a isoforma sc elua mais tarde do que as outras formas (Ghanem et al., 2013). No entanto, para além do efeito da densidade de cargas, a purificação da sc pDNA é também afetada por outros parâmetros como por exemplo, a composição do pDNA. Estudos demonstraram que altas quantidades de adenina e timina (AT), provocam a inversão dos tempos de retenção (Huber, 1998).

Esta técnica é das mais utilizadas na purificação da isoforma sc, dada a sua capacidade de executar rápidas separações e análises, o facto de não ser necessário a utilização de solventes orgânicos e a larga disponibilidade de fases estacionárias comerciais (F. Sousa, Prazeres, et al., 2008).

1.6.2.3 Cromatografia de interação hidrofóbica

A interação entre as regiões hidrofóbicas das moléculas alvo e os ligandos não polares imobilizados na matriz permitem a purificação neste tipo de cromatografia (Healthcare, 2006). No caso dos ácidos nucleicos, as diferentes hidrofobicidades entre as conformações do pDNA, ácidos nucleicos de cadeia única e endotoxinas, permitem o isolamento e purificação da isoforma sc (F. Sousa, Prazeres, et al., 2008).

Em água pura, os efeitos hidrofóbicos são demasiado fracos para causar interação entre os ligandos e a molécula alvo, sendo necessárias altas concentrações de sal de forma a aumentar as interações hidrofóbicas e a ligação das moléculas aos ligandos (Healthcare, 2006). Impurezas mais hidrofóbicas como o RNA, gDNA, oligonucleótidos e pDNA desnaturado ficam retidos na coluna, enquanto que a sc pDNA elui. A eluição das impurezas é efetuada com uma diminuição da concentração de sal na fase móvel (M. Diogo, Queiroz, & Prazeres, 2001).

A necessidade de altas concentrações de sal é vista como uma desvantagem, uma vez que está associada a um aumento dos custos do processo e também devido ao impacto ambiental (F. Sousa, Prazeres, et al., 2008).

1.6.2.4 Cromatografia de afinidade

A cromatografia de afinidade é um método de purificação seletiva de uma molécula a partir de uma mistura complexa, baseando-se em interações biológicas específicas entre a molécula alvo e o ligando de afinidade que se encontra imobilizado na matriz cromatográfica (Pfaunmiller, Paulemond, Dupper, & Hage, 2013). Esta interação é tipicamente reversível (Urh, Simpson, & Zhao, 2009) e pode ser o resultado da conjugação de interações electroestáticas, interações hidrofóbicas, forças de van der Waals e/ou ligações de hidrogénio (F. Sousa, Prazeres, et al., 2008).

Este processo pode ser dividido em três passos: inserção da amostra no suporte de afinidade, para que a molécula alvo se ligue ao ligando imobilizado; eluição dos componentes que não se ligam (impurezas) e por fim, eluição (dissociação e recuperação) da molécula alvo, alterando o pH, a força iónica ou a polaridade da fase móvel, ou então através do uso de um ligando de competição (Handbook, 2001; F. Sousa, Prazeres, et al., 2008).

Este tipo de cromatografia permite a separação de uma biomolécula com base na sua função biológica ou na sua estrutura química. Purificações que seriam bastante demoradas, difíceis ou até impossíveis usando outras técnicas, podem ser alcançadas facilmente usando a cromatografia de afinidade (Handbook, 2001). Assim, os problemas encontrados em purificar pDNA sc, podem ser ultrapassados com o desenvolvimento de suportes cromatográficos com elevada seletividade para o pDNA sc (A. Sousa et al., 2012).

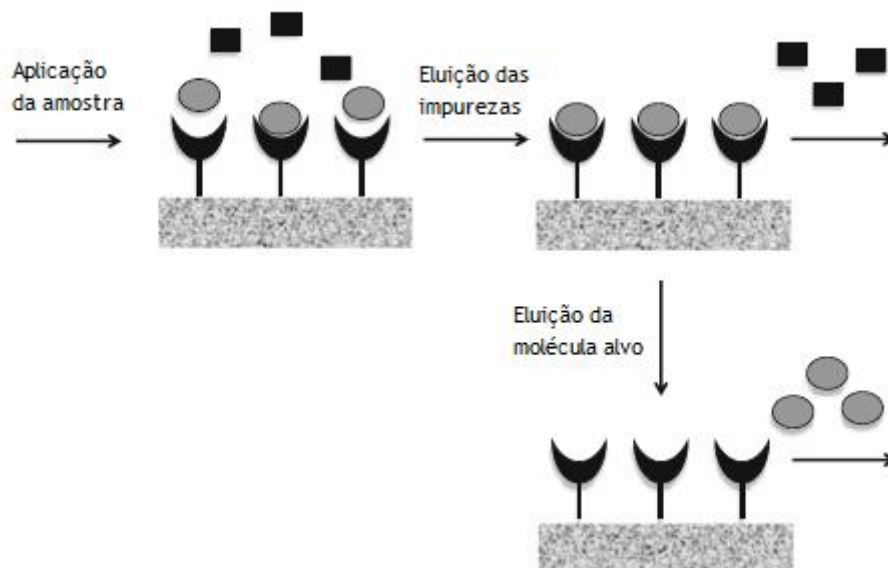


Figura 21 - Esquema típico da eluição na cromatografia de afinidade (adaptado de Pfaunmiller, 2013).

Capítulo 2

2 Objetivos

Este trabalho tem como objetivos:

- Sintetizar e caracterizar ligandos derivados de compostos heterocíclicos, com afinidade para o G-quadruplex;
- Estudar as interações entre os ligandos sintetizados e a sequência formadora de G-quadruplex (58S γ 3);
- Sintetizar e caracterizar o suporte cromatográfico através da imobilização do(s) ligando(s) mais promissores na Sefarose;
- Purificar o DNA plasmídico (pVAX-G4) contendo uma sequência formadora de G-quadruplex (58S γ 3), através da cromatografia de afinidade.
- Realizar a transcrição *in vitro* da sequência 58S γ 3 e confirmar a formação do G-quadruplex no transcrito, através da espectroscopia de dicroísmo circular.

Capítulo 3

3 Materiais e métodos

3.1 Materiais

3.1.1 Síntese química

Para a síntese dos ligandos foram utilizados os reagentes acridina (97%) (CAS 260-94-6), o naftaleno-1-carbaldeído (95%), éter diglicídico 1,4-butanediol (CAS 2425-79-8) que foram adquiridos à Sigma Aldrich (St. Louis, EUA). O 2-bromometil etil éter (90%) (CAS 13057-17-5), a dietilenotriamina (97%) (CAS 111-40-0), a trietilenotetramina (60%) (CAS 112-24-3), a tetraetilnorpentamina (CAS 4605-14-5), cloreto de 4-toluenossulfonila (CAS 98-59-9), o borohidreto de sódio (99%) (CAS 16940-66-2) e a Quinolina-2-carbaldeído (CAS 5470-96-2) foram obtidos à Acros Organics. O carbonato de potássio (CAS 584-08-7) e o ácido acético (CAS 64-19-7) foram adquiridos ao ChemLab. À Fisher Chemical foram adquiridos os seguintes solventes: piridina anidra (CAS 110-86-1), clorofórmio, acetonitrilo (CAS 75-05-8). O sulfato de sódio anidro (CAS 7757-82-6) foi obtido à Applichem Panreac, o hidróxido de sódio (CAS 1310-73-2) e o ácido sulfúrico (CAS 7664-93-9) à VWR Chemicals. O ácido clorídrico (37%) (CAS 7647-01-0) foi adquirido à Carlo Erba, o ácido acético glacial (99-100%) (CAS 64-19-7) e o carbonato de potássio (CAS 584-08-7) foram adquiridos à Chem-Lab. Estes reagentes foram usados sem qualquer tipo de purificação prévia. Os solventes deuterados usados na caracterização dos ligandos foram o clorofórmio, metanol e água deuterada.

3.1.2 Produção e purificação do pDNA

O hospedeiro usado foi a *E. coli DH5a*. O pVAX-LacZ foi adquirido na Introgen (Carlsband, EUA) e o pVAX-G4 foi biossintetizado por um membro do nosso grupo. A kanamicina foi adquirida à Sigma Aldrich (St. Louis, EUA). O kit NZY Maxiprep e o GreenSafe premium foram adquiridos à NZYTech (Lisboa, Portugal) e o isopropanol à Fischer Scientific (Fair Lawn, EUA).

3.1.3 Ensaios cromatográficos

Todas as soluções foram preparadas com água desionizada, purificada pelo sistema Milli-Q da Millipore (Billerica, EUA). As soluções foram filtradas através de membranas com poro de 0.22 µm. O tris(hidroximetil)aminoetano foi adquirido à NZYTech (Lisboa, Portugal) e o sulfato de amónio à Panreac (Barcelona, Espanha). A Sefarose CL-6B foi adquirida à GE Healthcare (Uppsala, Suécia). O *screening* dos suportes foi realizado através de cromatografia de

afinidade em mini colunas de bancada (BioRad) e a separação das isoformas do pDNA no AKTA avant.

3.2 Síntese química

3.2.1 Síntese dos compostos iniciais

3.2.1.1 Síntese do 4,5-di(bromometil)acridina (1)

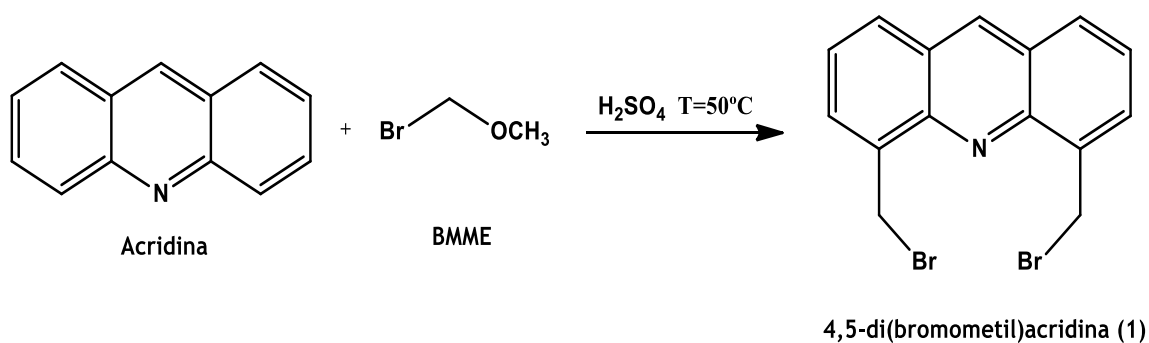


Figura 22 - Síntese do 4,5-(dibrometil)acridina.

Um balão de fundo redondo de 3 tubuladuras foi colocado sob atmosfera inerte (N₂) com um agitador magnético. Após 5 minutos, a acridina (5,6×10⁻³mol; 1g) foi transferida para o balão e em seguida dissolvida em ácido sulfúrico (12,5mL), o qual foi adicionado com a ajuda de uma proveta de 25mL. Após agitação e aquecimento num banho de parafina líquida, verificou-se que a solução tinha uma tonalidade amarelada. Ao atingir os 50°C, adicionou-se o bromometil metil éter (BMME) (2,25×10⁻²mol; 1,8mL) de uma só vez, com o auxílio de uma seringa. Após 20 horas adicionou-se novamente bromometil metil éter (2,25×10⁻²mol; 1,8mL). Passadas 20 horas parou-se a reação inserindo o balão em gelo durante aproximadamente 2 horas. De seguida a mistura reacional foi neutralizada com uma solução saturada de NaOH. Verificou-se que durante a neutralização a mistura solidificou. Foi então adicionado clorofórmio (± 50 mL) ao balão de forma a dissolver o composto e de seguida realizou-se uma filtração. Posteriormente realizaram-se múltiplas extrações líquido-líquido com água, numa ampola de decantação. Por fim a fase orgânica foi evaporada dando origem a um resíduo amarelado (0,818g; 40%) que foi seco na estufa de sólidos. (Chiron & Galy, 2003)

3.2.1.2 Tosilação da dietilenotriamina (2)

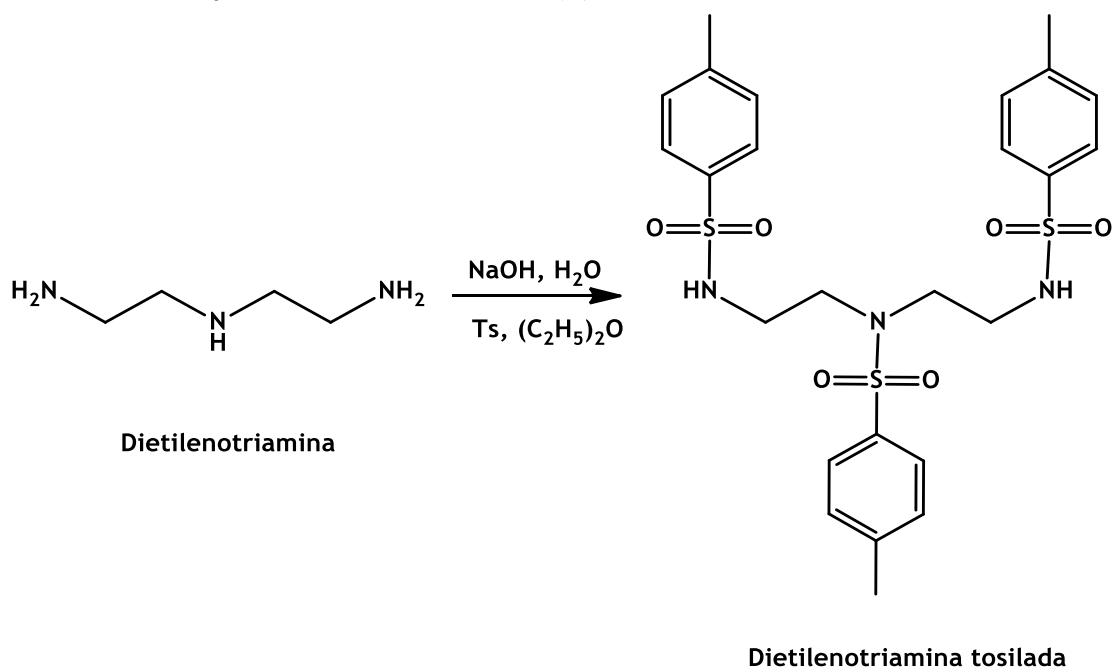


Figura 23 - Tosilação da dietilenotriamina.

A um balão de 2 tubuladuras foram adicionadas 2,23g de NaOH juntamente com 15mL de H₂O. Após dissolução do NaOH, através de agitação, foi adicionada a dietilenotriamina (1 g; 0,01 mol) e a solução foi agitada durante 40 minutos. Posteriormente o balão foi inserido em gelo e foi adicionada uma solução com cloreto de 4-toluenossulfonila (7,45g; 0,039 mol) e 37mL de éter dietílico, preparada previamente. Esta solução foi adicionada gota a gota, com o auxílio de uma ampola de adição. Após 3 horas parou-se a reação e era visível a presença de um composto de cor branca. Este composto foi filtrado e lavado com água, etanol, éter dietílico para eliminar algumas impurezas. Por fim foi realizada uma recristalização com metanol/clorofórmio quente para obter a dietilenotriamina tosilada (1,18 g; 20%). (Bencini et al., 1987)

3.2.1.3 Tosilação da trietilenotetramina (3)

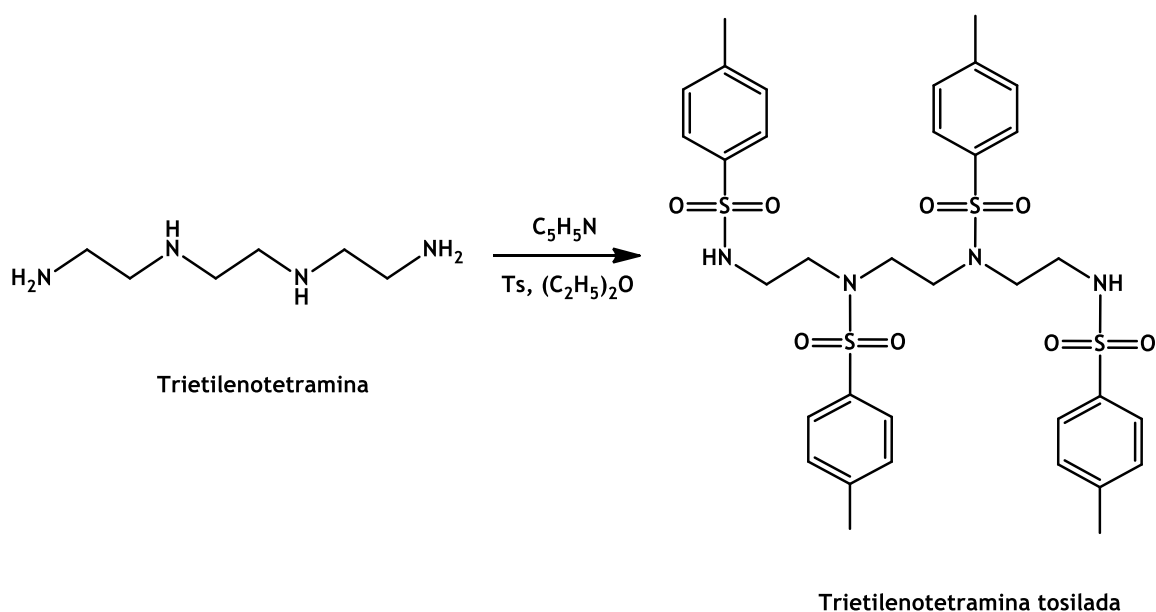


Figura 24 - Tosilação da trietilenotetramina.

A um balão de 2 tubuladuras de 250 mL foi adicionado o cloreto de 4-toluenossulfonila (5,15 g; 0,027 mol) e éter dietílico (20mL). A solução foi agitada e aquecida até 50°C. Ao atingir esta temperatura foi adicionada uma solução de trietilenotetramina (2 g; 0,013 mol) e piridina (10 mL) com a ajuda de uma ampola de adição. Foi possível verificar a formação de pequenos aglomerados. Passadas 6 horas parou-se a reação e foram adicionados 10mL de HCl 1 M. Posteriormente o produto foi filtrado (cor avermelhada) e lavado com água e etanol. De seguida foi dissolvido em clorofórmio e foi realizada uma extração líquido-líquido com uma solução de HCl 1 M e de seguida 4 vezes com água. A fase orgânica foi seca com NaSO₄ e foi realizada nova filtração. Por fim evaporou-se a fase orgânica para obter (3) (1,248 g; 13%). (Bencini et al., 1987)

3.2.1.4 Tosilação da tetraetilenopentamina (4)

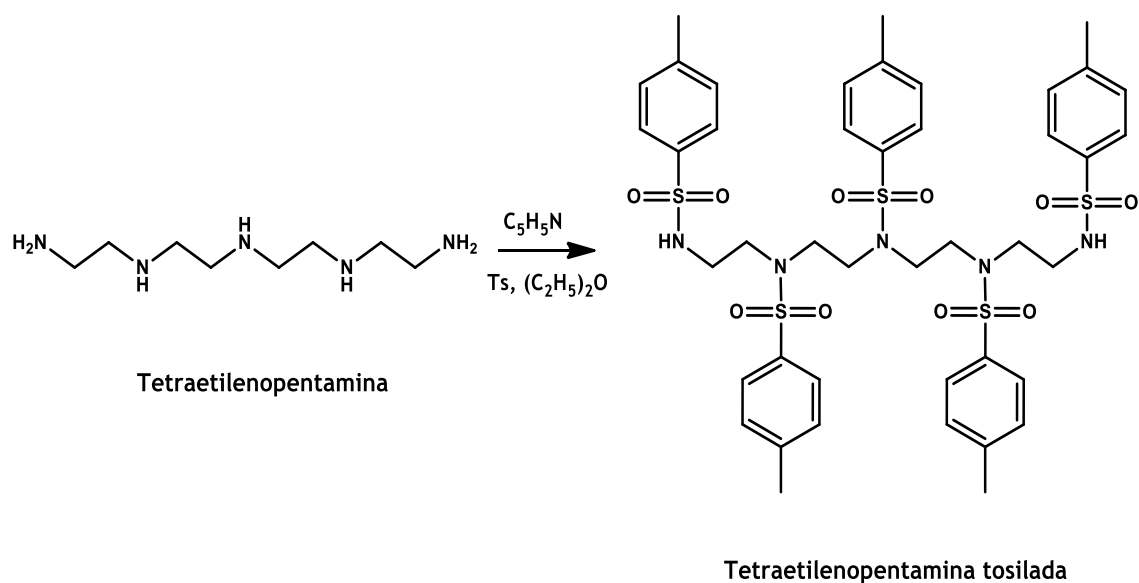


Figura 25 - Tosilação da tetraetilenopentamina.

O procedimento utilizado foi similar ao usado em 3.2.1.3, diferindo apenas na amina utilizada, neste caso foi a tetraetilenopentamina (1 g; $5,0 \times 10^{-3}$ mol) e na quantidade de cloreto 4-toluenossulfonila (4,77 g). Resumidamente, foi adicionado cloreto de 4-toluenossulfonila (4,77 g; 0,025 mol) num balão de 2 tubuladuras que foram dissolvidos em éter dietílico (20mL). Após a solução atingir os 50°C foi adicionada uma solução de tetraetilenopentamina (1 mL) e piridina (5 mL) com o auxílio de uma ampola de adição. Após 6 horas, parou-se a reação e foi adicionado HCl (10 mL) para neutralizar a piridina. Posteriormente o produto foi filtrado e lavado com água e etanol para remover impurezas. De seguida dissolveu-se o produto em clorofórmio e foram realizadas 5 extrações líquido-líquido: uma com uma solução de HCl 1M e as restantes extrações com água. A fase orgânica foi seca com NaSO₄ e foi realizada nova filtração. Por fim evaporou-se a fase orgânica para obter (4) (1,3 g; 28%). (Bencini et al., 1987)

3.2.2 Síntese e caracterização dos ligandos

3.2.2.1 Síntese do N¹,N^{1'}-(acridina-4,5-diilbis(metileno))bis(N²-(2-aminoetil)etano-1,2-diamina) (L₁)

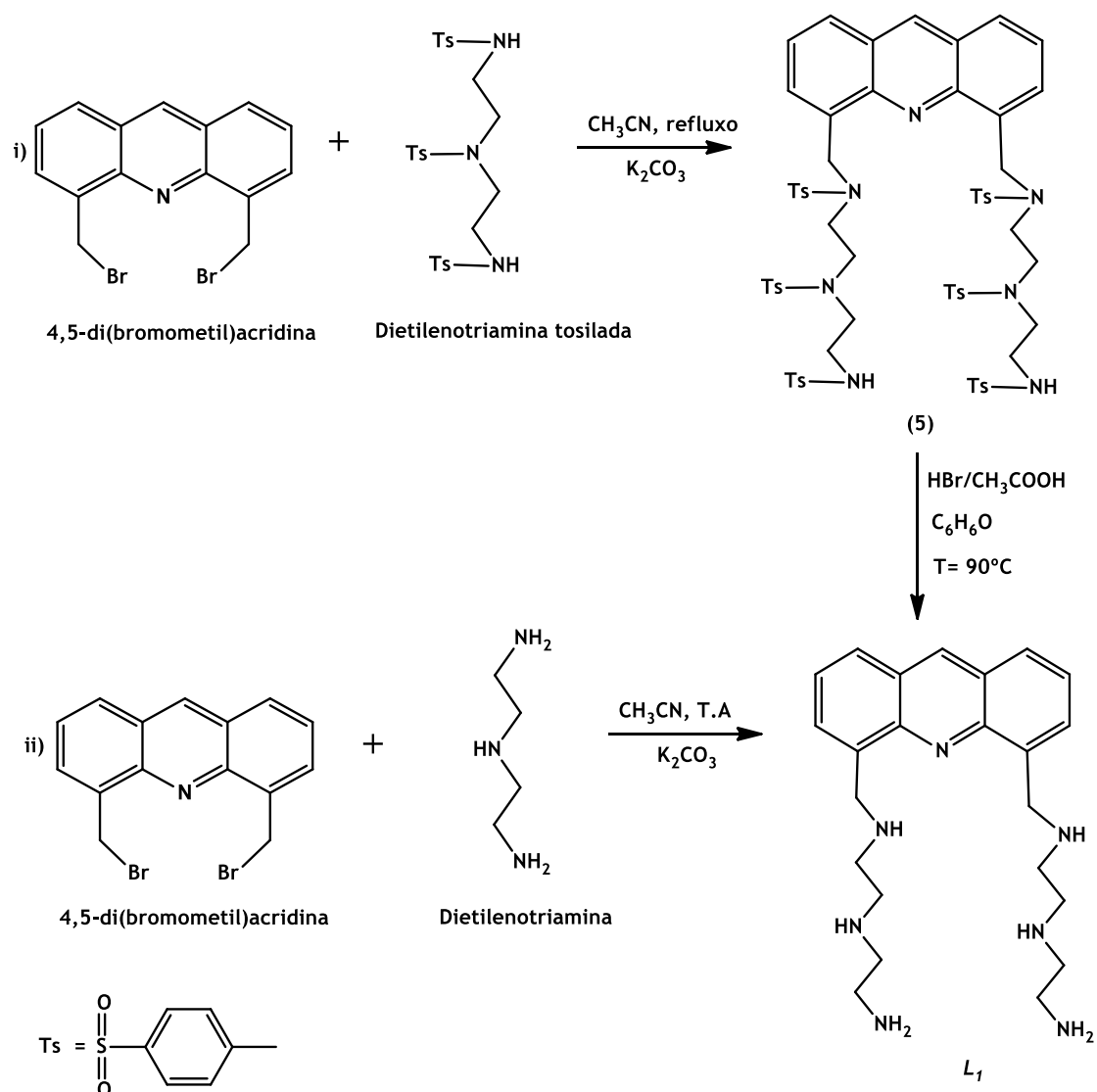


Figura 26 - Síntese do ligando L₁.

- i) A um balão de 2 tubuladuras foi adicionado K₂CO₃ (1,1 g; 8×10⁻³ mol) juntamente com dietileno triamina tosilada (0,905 g; 1,6×10⁻³ mol). Estes foram dissolvidos em 26mL de CH₃CN seco, com agitação mecânica. À parte, foi preparada uma solução com 4,5.di(bromometil)acridina (0,3 g; 8×10⁻⁴ mol) em CH₃CN seco (7 mL) e foi adicionada gota a gota à mistura no balão quando esta entrou em refluxo. Após 6h parou-se a reação e foi deixada a arrefecer à temperatura ambiente. De seguida foi realizada uma filtração para eliminar impurezas e o solvente foi evaporado para se obter o composto (5). Para proceder à remoção dos tosilos e obter o

produto final, foi preparada uma solução de 33% de HBr/CH₃COOH (100 mL) e adicionada a 0,15g do composto (5) num balão de uma tubuladura, de seguida adicionou-se fenol (1,05 g; 0,011 mol). A mistura apresentava uma cor castanha e foi deixada a agitar a 90°C durante 24 horas. Deveria ter ocorrido a formação de precipitado que corresponderia ao produto final, mas isto não se verificou. Sendo assim, a mistura foi neutralizada com uma solução saturada de NaOH verificando-se uma alteração da cor para laranja. De seguida foi feita uma filtração para remover o sal formado. Este sal foi lavado com clorofórmio para dissolver o produto desejado. De seguida foi realizada uma extração líquido-líquido com água, sendo a fase orgânica recolhida e evaporada. Por fim realizou-se uma recristalização com etanol e água (3:1) para se obter L1 (0,227 g; 21%). (Bartoli et al., 2009)

- ii) Num balão de 2 tubuladuras dissolveu-se K₂CO₃ (0,193 g; $1,4 \times 10^{-3}$ mol) em CH₃CN (1.2 mL) e de seguida a dietileno triamina (0.170 g, 1.6×10^{-3}), sob agitação mecânica. Quando a mistura entrou em refluxo, foi adicionada, através de uma ampola de adição, uma solução de 4,5-di(bromometil)acridina (0,05 g; $1,4 \times 10^{-4}$ mol) e CH₃CN (4,35 mL), gota-a-gota. Após 22 horas deu-se o término da reação, deixando-se a suspensão de cor amarela, arrefecer à temperatura ambiente. Após arrefecimento, foi realizada uma filtração para remover o K₂CO₃ que não dissolveu. De seguida evaporou-se a solução filtrada e realizou-se uma purificação através de cromatografia *flash* para se obter L₁ (<5%).

3.2.2.2 N¹,N^{1'}-(acridina-4,5-diilbis(metileno))bis(N²-(2-((2-aminoetil)amino)etil)etano-1,2-diamina) (L₂)

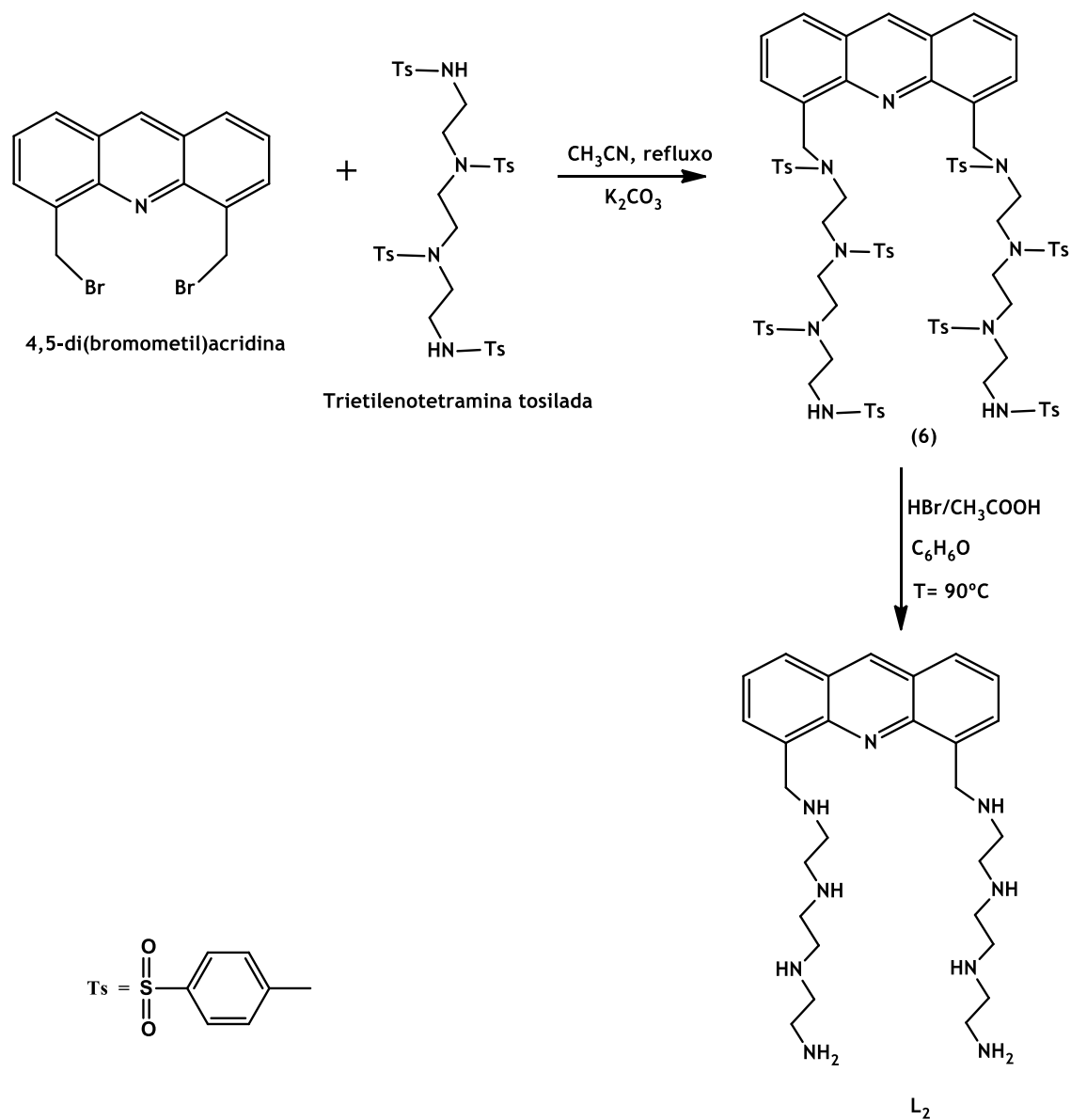


Figura 27 - Síntese do ligando L₂.

O procedimento usado para a síntese do L₂ é igual ao descrito em 3.2.2.1 I). Neste caso foi utilizada trietenotetramina tosilada (0,8 g; 3,26×10⁻⁴ mol) para se obter L₂. (Bartoli et al., 2009).

3.2.2.3 Síntese do N¹,N^{1'}-(acridina-4,5-diilbis(metileno))bis(N²-(2-((2-((2-aminoetil)amino)etil)etano-1,2-diamina) (L₃)

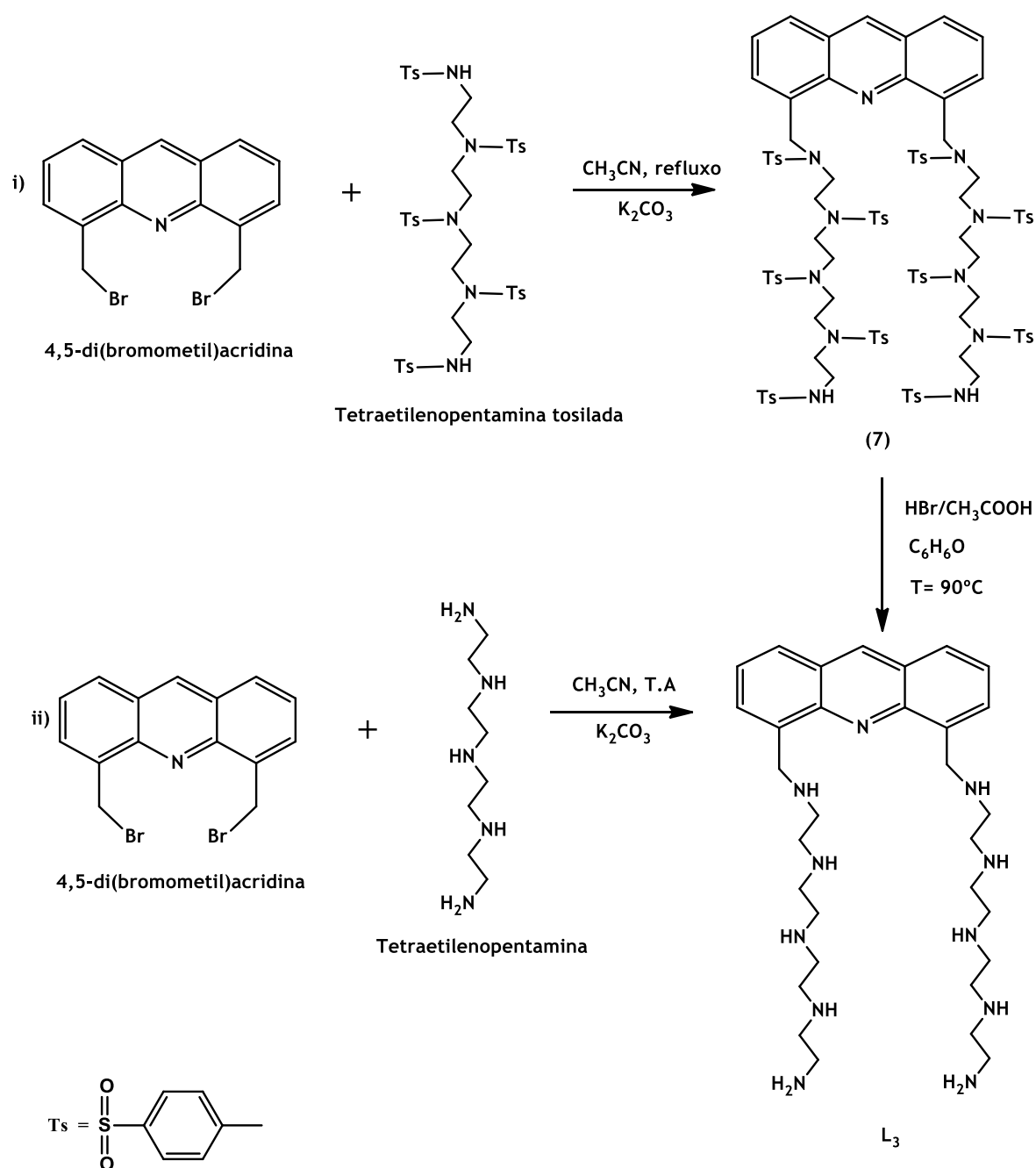


Figura 28 - Síntese do ligando L₃.

- i) O procedimento usado já foi descrito em 3.2.2.1 i). Resumidamente, num balão de 2 tubuladuras foram adicionados 22 mL de CH₃CN seco, juntamente com 3,47g de K₂CO₃ e 1,34 mL de tetraetilenopentamina. Esta mistura foi agitada e aquecida até entrar em refluxo. Seguidamente foi adicionada, gota a gota, trietilenetetramina tosilada (0,50g) dissolvida

em 43 mL de acetonitrilo. Após 6 horas, desligou-se a agitação e o aquecimento e a mistura arrefeceu à temperatura ambiente. De seguida foi feita uma filtração e o solvente foi evaporado obtendo-se o composto (7). Para remover os tosilos, foi preparada uma solução de 33% de HBr/CH₃COOH (100 mL) e adicionada a 0,15g do composto (7) num balão de uma tubuladura, sendo de seguida adicionado fenol (0,66g; 0,007mol). Após 24h a agitar a 90°C a mistura foi neutralizada com uma solução saturada de NaOH. De seguida foi feita uma filtração para remover o sal formado. Este sal foi lavado com CHCl₃ para dissolver o produto desejado. De seguida foi realizada uma extração líquido-líquido com água, sendo a fase orgânica recolhida e evaporada. Por fim realizou-se uma recristalização com etanol e água (3:1) para se obter L₃ (0,661 g; 12%). (Bartoli et al., 2009)

- ii) O procedimento usado foi igual ao descrito em 3.2.2.1 II). Neste caso foi utilizada a amina tetraetileno pentamina (5,3×10⁻² g; 2,8×10⁻⁴ mol) para se obter L₃ (<5%).

3.2.2.4 Síntese de N¹-(2-aminoetil)-N²-(quinolina-2-ilmetil)etano-1,2-diamina (L₄)

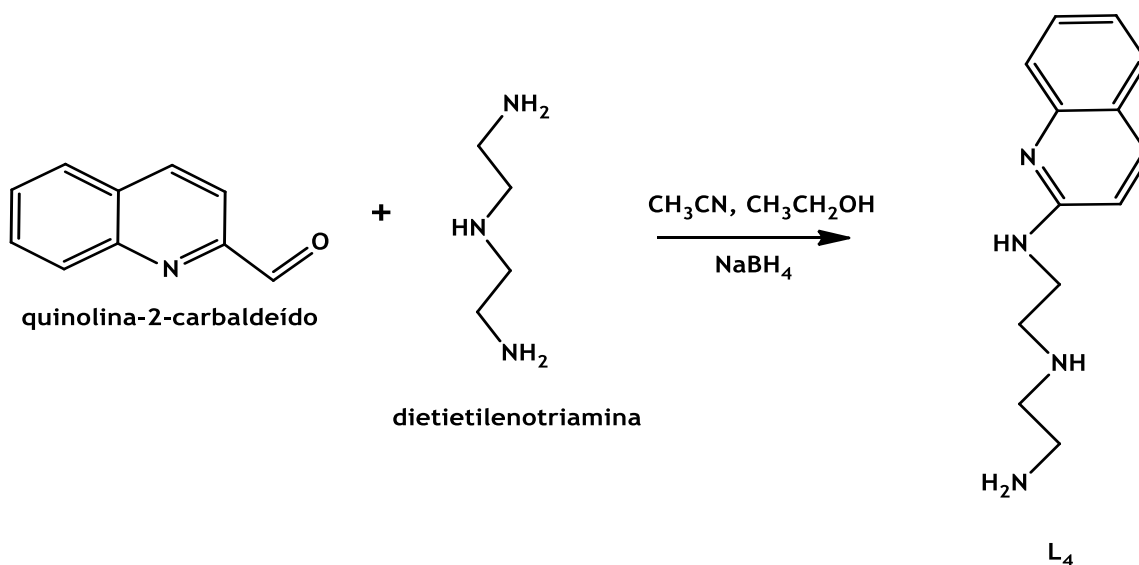


Figura 29 - Síntese do ligando L₄.

Num balão de fundo redondo de 2 tubuladuras de 100 mL, dissolveu-se 2-quinolinacetaldeído (0,50 g; 0,003 mol) e a dietilenotriamina (1,27 g; 0,012 mol) em 50 mL de uma mistura de etanol-acetonitrilo secos numa proporção 1:1. Após 2 horas de agitação à temperatura

ambiente, o solvente foi evaporado originando uns resíduos sólidos que foram dissolvidos em 15 mL de etanol. De seguida foi adicionado borohidreto de sódio (1,04 g; $2,77 \times 10^{-2}$ mol) em pequenas porções. Após 24 horas sob agitação à temperatura ambiente a mistura foi filtrada para remover o excesso de borohidreto de sódio e o solvente foi evaporado. O resíduo resultante foi tratado com água desionizada e extraído com clorofórmio (3×50 mL) utilizando uma ampola de decantação de 250 mL. A fase orgânica foi evaporada dando origem a um óleo avermelhado. Este foi dissolvido em 20 mL de uma mistura de etanol-dioxano (1:3). De seguida foram adicionadas umas gotas de ácido clorídrico 37% de forma a precipitar um composto vermelho. Este composto foi recristalizado com metanol quente verificando-se a formação de um precipitado branco. Este precipitado foi removido através de uma filtração e o solvente foi evaporado para se obter L_4 (0,284 g; 40%). (Carbonell, Delgado-Pinar, Pitarch-Jarque, Alarcón, & García-España, 2013)

Caracterização: ^1H RMN (MeOD, 400 MHz): 3,45 (t, 2H, $J = 6.19$); 3,53 (t, 2H, $J = 6.87$); 3,70 (t, 2H, $J = 6.02$); 3,78 (t, 2H, $J = 8.80$); 4,86 (s, 2H); 7,78 (t, 1H, $J = 7.57$); 7,87-7,99 (m, 2H); 8,12 (d, 1H, $J = 7.94$); 8,26 (d, 1H, $J = 8.38$); 8,73 (d, 1H, $J = 8,58$). ^{13}C RMN (MeOD, 400 MHz): 35,45; 43,50; 43,62; 44,65; 49,73; 120,44; 125,44; 128,24; 128,35; 132,21; 141,42; 143,82; 150,29 ppm. ES-MS m/z calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_4$, 244,34; foi encontrado 245,17 [$\text{M} + \text{H}$] $^+$. P.f.: 111°C

3.2.2.5 Síntese do N^1 -(2-aminoetil)- N^2 -(naftaleno-1-ilmetil)etano-1,2-diamina (L_5)

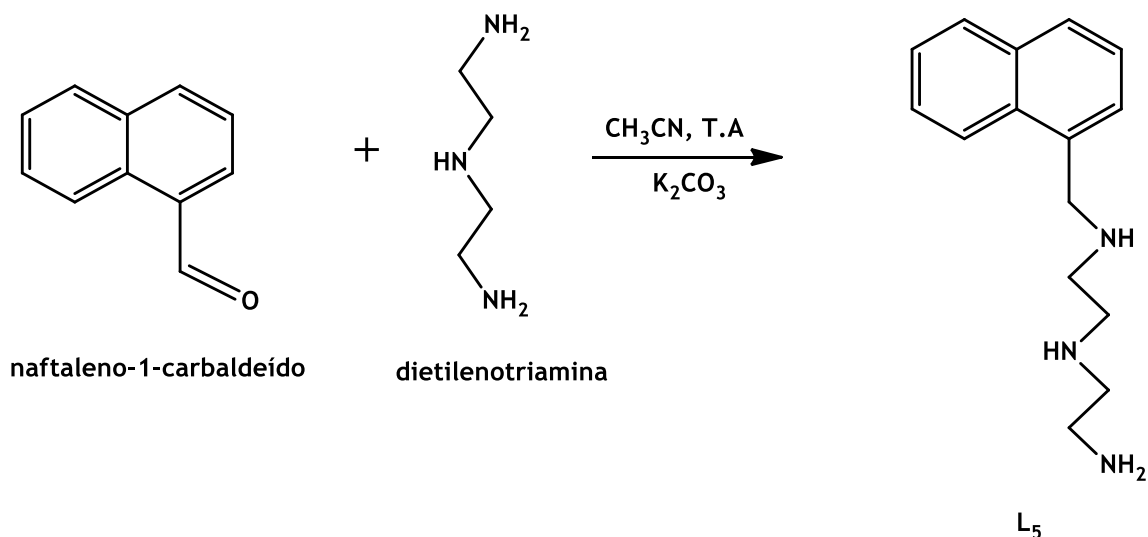


Figura 30 - Síntese do ligando L_5 .

Num balão de 100 mL de 2 tubuladuras, foi dissolvida a dietilenotriamina (0,99 g; $9,6 \times 10^{-3}$ mol) em 40 mL de uma mistura de acetonitrilo-etanol seco (1,66:1). Com o auxílio de uma ampola de adição foi adicionado, gota-a-gota, o naftaleno-1-carbaldeído (0,5 g; $3,2 \times 10^{-3}$)

dissolvido em 10 mL de acetonitrilo. O restante procedimento é igual ao descrito em 3.2.2.5. Resumidamente, após 2 horas com agitação à temperatura ambiente o solvente foi evaporado, dissolvendo-se o resíduo resultante em 15 mL de etanol. De seguida foi adicionado borohidreto de sódio (1,11g; $2,95 \times 10^{-2}$ mol) às porções. Após 24 horas de agitação à temperatura ambiente a mistura foi filtrada para remover o excesso de borohidreto de sódio. O solvente foi evaporado, sendo o resíduo resultante tratado com água desionizada e extraído com clorofórmio (3×50 mL). A fase orgânica foi evaporada originando um óleo de cor verde que foi dissolvido em 20 mL de metanol-etanol (1:1). De seguida foram adicionadas umas gotas de HCl 37% de forma a precipitar um composto branco. Este composto foi recristalizado com metanol quente dando origem ao produto puro (L₅) (1,22g; 79%). (Clares et al., 2004)

Caracterização:

¹H RMN (D₂O, 400 MHz): 3,34 (t, 2H, J = 6,89); 3,43 (t, 2H); 3,51 (t, 2H, J = 6,63); 3,57 (t, 2H, J = 6,85); 4,79 (s, 2H); 7,51-7,68 (m, 4H); 7,98-8,08 (m, 3H) ppm. ¹³C RMN (D₂O, 400 MHz): 35,69; 43,12; 43,63; 44,80; 48,76; 122,48; 125,63; 126,06; 126,77; 127,55; 129,13; 129,61; 130,74; 130,77; 133,58 ppm. ES-MS m/z calculado para C₁₅H₂₂N₃, 243,42; foi encontrado 244,18 [M+H]⁺. P.f.: 225,8°C

3.2.2.6 Síntese do N¹-(2-aminoetil)-N²-(2-((naftaleno-1-ilmetil)amino)etil) etano-1,2-diamina (L₆)

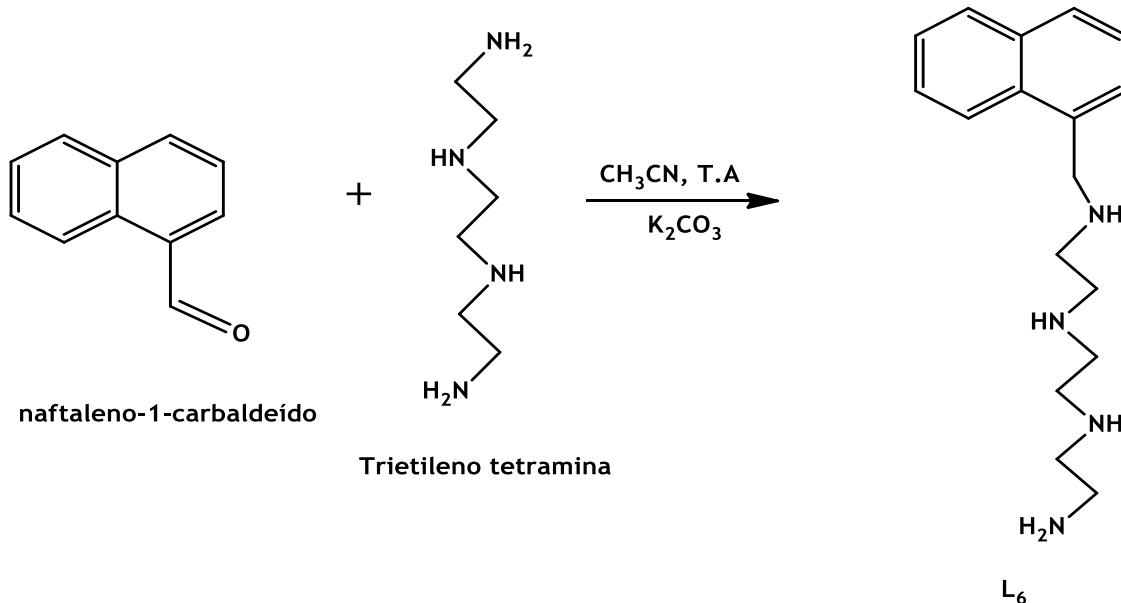


Figura 31 - Síntese do ligando L₆.

O procedimento utilizado já foi descrito anteriormente em 3.2.2.5, diferindo apenas a amina. Neste caso foi utilizada a trietilenotetramina (1,40 g; $9,6 \times 10^{-3}$ mol) para dar origem ao L₆ (0,24 g; 26%). (Clares et al., 2004)

Caracterização: ^1H RMN (D_2O , 400 MHz): 2,67-3,64 (m, 12H); 4,85 (s, 2H); 7,54-7,71 (m, 4H); 8,0-8,10 (m, 3H) ppm. ^{13}C RMN (D_2O , 400 MHz): 35,61; 43,09; 43,56; 43,64; 43,71; 44,83; 48,77; 122,49; 125,63; 126,03; 126,75; 129,13; 129,61; 130,73; 130,77; 133,58 ppm. ES-MS m/z calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_4$, 286,42; foi encontrado 287,22 $[\text{M} + \text{H}]^+$. P.f.: 281,5°C.

3.2.2.7 Síntese do N^1 -(2-aminoetil)- N^2 -(2-((2-(naftaleno-1-ilmetil)amino) etil) amino)etil)etano-1,2-diamina (L_7)

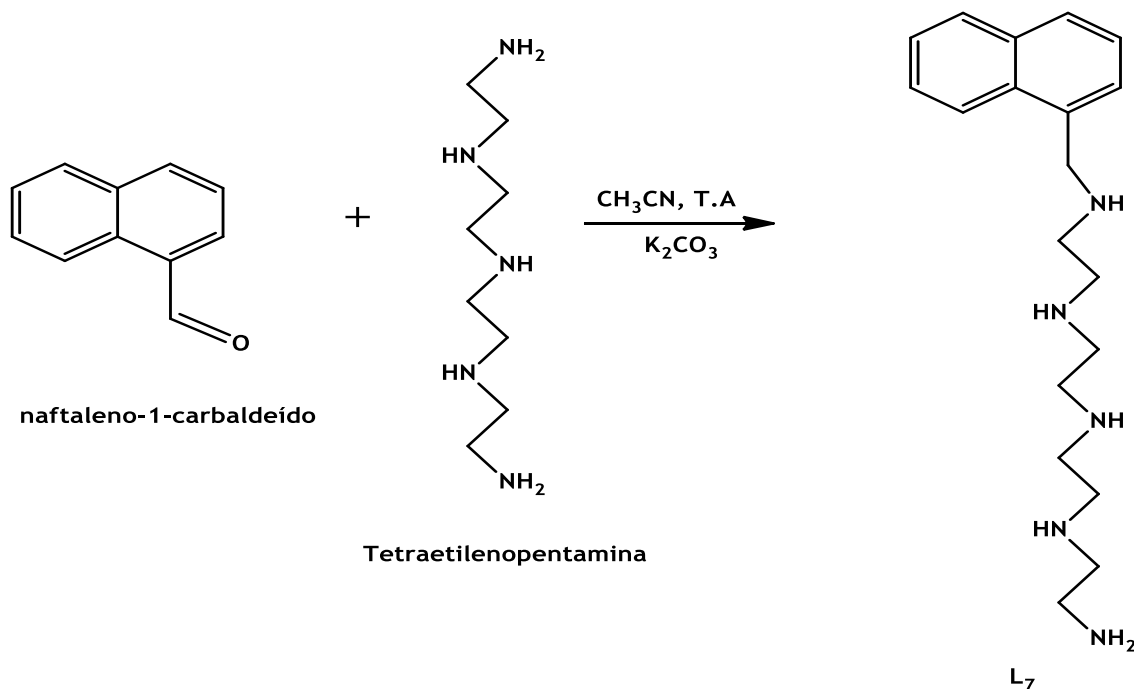


Figura 32- Síntese do ligando L_7 .

O procedimento utilizado já foi descrito anteriormente em 3.2.2.5, neste caso a amina utilizada foi a tetraetilenopentamina (1,82 g; $9,6 \times 10^{-3}$ mol) para dar origem a L_7 (0,24 g; 11%). (Clares et al., 2004)

Caracterização: ^1H RMN (D_2O , 400 MHz): 3,35-3,51 (m, 9H,), 3,58 (t, 2H, $J = 7,06$); 4,74 (s, 2H); 7,49-7,67 (m, 4H); 7,95-8,06 ppm (m, 3H). ^{13}C RMN (D_2O , 400 MHz): 35,29; 42,86; 43,40; 43,44; 43,55; 44,59; 48,64; 122,46; 125,57; 125,84; 126,72; 127,51; 129,08; 129,60; 130,70; 130,76; 133,55 ppm. ES-MS m/z calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{31}\text{N}_5$, 329,26: foi encontrado 330,26 $[\text{M} + \text{H}]^+$. P.f.: 266.0°C

3.2.3 Síntese dos suportes cromatográficos

3.2.3.1 Suporte A

Para a síntese do suporte A começou-se por lavar a Sefarose CL-6B com 1 L de água Mili-Q, através de um sistema de filtração sob pressão reduzida. De seguida pesaram-se 20 g e foram adicionadas a um *erlenmeyer* de 250 mL juntamente com 40 mL de uma solução de NaOH (1M). Após 4 horas a 25°C numa incubadora com agitação orbital, foi adicionada uma solução contendo 1,4-butanediol glicidil éter (30 mL) e borohidreto de sódio (160 mg). Esta mistura foi deixada na incubadora, nas mesmas condições, durante a noite. Por fim, a mistura foi lavada abundantemente com água desionizada e uma mistura de acetona/água com diferentes rácios (1:9, 3:7, 5:5, 8:2), de forma a remover grupos epóxidos que não reagiram. Por fim a Sefarose ativada foi liofilizada e armazenada a 4°C. (Sundberg & Porath, 1974)

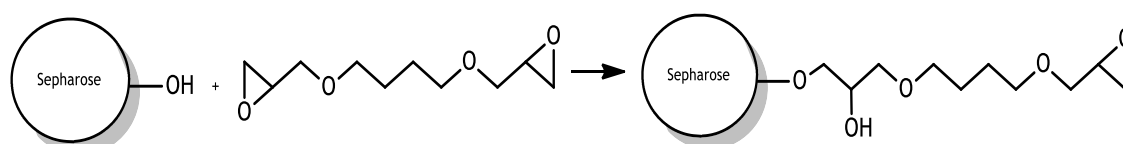


Figura 33 - Ativação da Sefarose CL-6B via epóxido.

Após a ativação da Sefarose via epóxido procedeu-se à imobilização do ligando L5. Inicialmente, pesaram-se 2 g de Sefarose que foram adicionadas a um erlenmeyer juntamente com 11 mL de uma solução de carbonato de sódio (1M). Esta suspensão esteve numa incubadora a 25°C, com agitação orbital (110 rpm) durante 6 horas. Após este tempo foi adicionado o ligando L5, dissolvido em 50 mL de uma solução de carbonato de sódio (1M) a pH 8,1. Depois desta adição a temperatura da incubadora foi aumentada para 55°C e ficou a agitar durante a noite. Após término da reação, o produto final foi lavado abundantemente com água e com solução de carbonato de sódio (1M) (Sundberg & Porath, 1974).

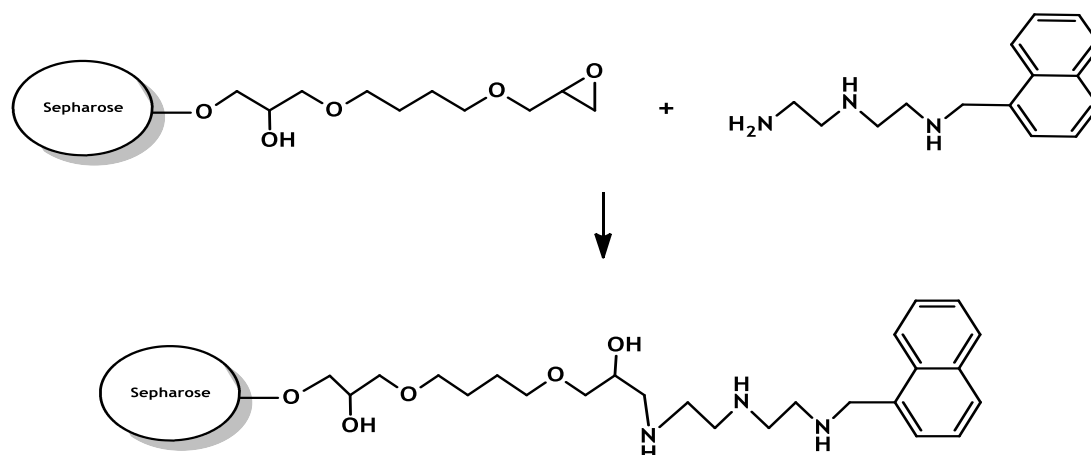


Figura 34 - Imobilização do ligando L₄ na Sefarose CL-6B ativada.

3.2.3.2 Suporte B

Inicialmente a Sefarose CL-6B foi lavada com 1 L de água desionizada, através de um sistema de vácuo com pressão reduzida. De seguida foram pesadas 20 g de Sefarose e adicionadas a um balão de 1 tubuladura, já inserido em gelo, juntamente com 20 mL de água de forma a obter-se uma suspensão espessa mas agitada. De seguida foi adicionado brometo de cianogénio (2 g) dissolvidos em acetonitrilo (4 mL). O pH da mistura foi ajustado para 12 com uma solução de hidróxido de sódio (4M). Após 15 minutos de agitação, a Sefarose foi filtrada e lavada abundantemente com água desionizada fria. (Kohn & Wilchek, 1984)

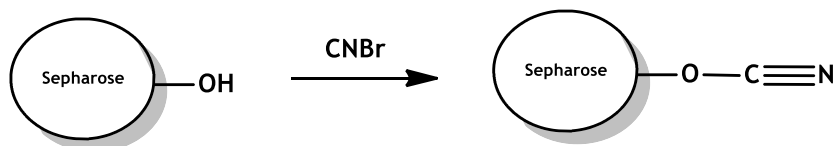


Figura 35 - Ativação da Sefarose CL-6B com CNBr.

Para a imobilização do ligando foi usado o mesmo procedimento descrito em 3.2.3.1. (Sundberg & Porath, 1974)

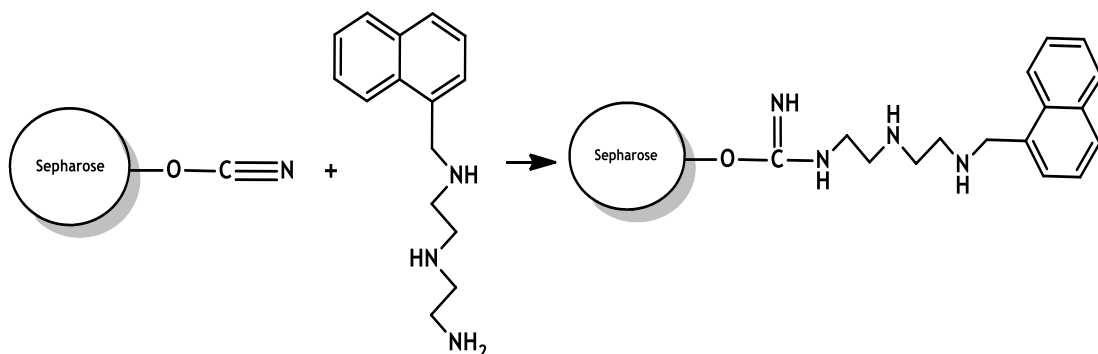


Figura 36 - Imobilização do ligando L4 na Sefarose ativada.

3.3 Produção do pDNA

3.3.1 Pré-fermentação e Fermentação

Foram utilizados dois tipos de pDNA, o pVAX-LacZ e o pVAX-G4, sendo usado o mesmo procedimento para a produção dos mesmos. Resumidamente, começou-se por inocular uma placa de Luria-Bertani agar (LB agar) suplementado com 30 µg/mL de kanamicina, com *E. coli* DH5α do banco de células transformadas, sendo de seguida incubada a 37°C durante a noite.

Após o crescimento da *E. coli DH5a*, foram inoculados 125 mL de meio TB (12 g/L triptona, 24 g/L extrato de levedura, 4 mL/L glicerol, 0,017 M KH_2PO_4 e 0,072 M K_2HPO_4) suplementado com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamicina, com algumas colônias e incubado a 37°C com agitação orbital (250 rpm) durante aproximadamente 4 horas. Quando a OD_{600} atingiu os 2,6, a pré-fermentação foi parada, retirado um determinado volume, previamente calculado, e adicionado a 4 *erlenmeyers* de 1 L contendo no final 250 mL de meio TB (12 g/L triptona, 24 g/L extrato de levedura, 4 mL/L glicerol, 0,017 M KH_2PO_4 e 0,072 M K_2HPO_4) suplementado com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamicina. Desta forma a fermentação é iniciada com uma DO_{600} de aproximadamente 0,2. A fermentação ocorreu a 37°C, com agitação orbital de 250 rpm durante aproximadamente 16 horas, sendo o crescimento interrompido ao atingir a fase logarítmica ($\text{DO}_{600} \approx 8$). Depois da fermentação, as células foram recuperadas através de centrifugação (5000 RCF, 20 min a 4°C) e congeladas a -20°C.

3.3.2 Lise celular e Pré-purificação dos pDNA

Ambos os pDNA (pVAX-LacZ e pVAX-G4) foram pré-purificados utilizando um kit de purificação com colunas NZYTech que contêm uma resina carregada positivamente. Uma vez que as células se encontravam armazenadas a -20°C, inicialmente foi necessário deixá-las descongelar à temperatura ambiente. Uma vez descongeladas, foram adicionados 10 mL de tampão M1 a 125 mL de células. De seguida, com a ajuda de um vórtex, esta mistura foi homogeneizada e transferida para um tubo apropriado para lise celular. De seguida foram adicionados 10 mL de M2 e inverteu-se o tubo 4 a 5 vezes cuidadosamente. Depois de incubado 5 minutos à temperatura ambiente, foram adicionados 10 mL de tampão M3 e inseriu-se o tubo no gelo durante 20 minutos. O precipitado formado foi removido através de uma centrifugação a 20000 RCF a 4°C durante 30 minutos. Foi necessário uma segunda centrifugação nas mesmas condições durante 20 minutos, uma vez que ainda existiam partículas sólidas no sobrenadante. Entretanto foram adicionados 10 mL de QBT à coluna NZYTech de forma a equilibrá-la, para de seguida adicionar o sobrenadante obtido na centrifugação e lavá-lo com 2×30 mL de tampão QC para remover contaminantes como RNA, proteínas e sais. O pDNA foi finalmente eluído com 15 mL de tampão QF, sendo que durante este passo o tubo que recolhia a amostra foi mantido em gelo. De seguida o pDNA foi concentrado através de uma precipitação com 10.5 mL de isopropanol frio, seguido de uma incubação em gelo durante 20 minutos. Posteriormente foi realizada uma centrifugação a 15000 RCF, 4°C durante 30 minutos e o *pellet* final foi ressuscitado em 1 mL de Tris-HCl 10 mM (pH 8.0). Por fim, a concentração da amostra foi medida através do Nanophotometer P300 (Implen). As amostras foram armazenadas a -80°C para uso posterior.

3.4 Cromatografia de afinidade

Inicialmente, foram realizados ensaios cromatográficos iniciais em mini colunas de bancada de forma a observar qual dos suportes apresentava resultados mais promissores. Foram então preparadas duas colunas através do empacotamento de 5 mL de ambos os suportes sintetizados (A e B). Após serem empacotadas, as colunas foram lavadas abundantemente com água desionizada.

Estes ensaios foram realizados a 25°C e acompanhados por duas colunas de controlo, uma continha um suporte de Sefarose CL-6B (B1) e outra contendo Sefarose CL-6B ativada via epóxido, sem ligando (B2). Nestes ensaios apenas foi utilizado pVAX-LacZ.

As condições do suporte mais promissor foram posteriormente otimizadas no sistema AKTA avant.

3.4.1 Screening dos suportes

3.4.1.1 Condições iónicas

Inicialmente, a coluna foi lavada com água desionizada sendo de seguida equilibrada com 10 mL de uma solução de NaCl 0,2M preparada em Tris-HCl 10 mM a pH 8. Após o equilíbrio, foram adicionados 100 µL de amostra (pVAX-LacZ em Tris-HCl 10 mM a pH 8) com uma concentração de 420 µg/mL. O passo seguinte foi adicionar 10 mL de solução de NaCl 0,2 M em Tris-HCl 10 mM e começou-se a recolher frações de 1 mL. De seguida adicionaram-se 10 mL de NaCl 1 M em Tris-HCl 10 mM e por fim 10 mL de de NaCl 2,5 M em Tris-HCl 10 mM recolhendo-se continuamente frações de 1 mL. No final do ensaio a coluna foi novamente lavada com água desionizada. A absorvância das amostras foi medidas no espectrómetro Ultrospec 3000.

3.4.1.2 Condições hidrofóbicas

Foram adicionados 10 mL de uma solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 de forma a equilibrar a coluna. Após o equilíbrio, foram adicionados 100 µL de amostra (pVAX-LacZ em Tris-HCl 10 mM a pH 8) com uma concentração de 420 µg/mL. De seguida foram adicionados novamente 10 mL $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1M em Tris-HCl 10 mM a pH 8 e começou-se a recolha das frações de 1 mL. Por fim adicionaram-se 10 mL de Tris-HCl 10 mM continuando-se a recolher frações de 1 mL. No final do ensaio a coluna foi novamente lavada com água desionizada. Este procedimento foi usado para ambos os suportes. A absorvância das amostras foi medidas no espectrómetro Ultrospec 3000.

3.4.2 Purificação da isoforma sc dos plasmídeos pVAX-LacZ e pVAX-G4)

Todos os ensaios foram realizados no AKTA avant com o *software* UNICORN™ 6.1 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Foi utilizado um sistema de refrigeração ligado à coluna, de forma a realizar ensaios a 4°C, 10°C, 15°C e 25°C. Foi sempre utilizado um fluxo de 1 mL/min e uma leitura da absorvância a 260 nm. As amostras recolhidas foram concentradas com concentradores Vivaspin e analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%.

Uma coluna comum de 20 mL foi empacotada com 4 mL do suporte A. Como solução de ligação foi usado Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), que se encontrava associada à bomba A (fase móvel A). Na bomba B (fase móvel B) encontra-se ligada a solução de eluição NaCl 2,5 M (pH 8,0). O primeiro passo do processo consistiu em equilibrar a coluna com NaCl 0,2 M em Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) utilizando um fluxo de 1 mL/min. A injeção da amostra na coluna foi realizada através do uso de uma seringa e um *loop* de 200 µL. As espécies com interações mais fortes com o suporte ficam retidas, enquanto as espécies com interações fracas eluem. As espécies retidas são posteriormente eluídas aumentando o gradiente de NaCl para 1,5 M.

3.4.3 Eletroforese em gel de agarose

A identificação das isoformas dos plasmídeos foi realizada através de eletroforese horizontal, utilizando 15 cm de gel de agarose 1% (Hoefer, São Francisco, EUA), corado com GreenSafe (0.01%, NZYTech) e visualizadas sob luz UV no sistema UVitec FireReader (UVitec, Cambridge, Reino Unido). O gel de agarose foi feito com tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) (40 mM Tris base, 20 mM ácido acético e 1 mM EDTA, pH 8,0). A eletroforese foi realizada a 100 V durante 35 minutos.

3.4.4 Transcrição do plasmídeo pVAX-G4

A transcrição da isoforma sc do plasmídeo *pVAX-G4* foi realizada com um kit da Ambion, o MAXIscript®, de acordo com o procedimento sugerido pelo fabricante. Resumidamente, a isoforma sc do plasmídeo previamente purificada foi linearizada através da digestão com a enzima Pst I. Após digestão a amostra foi purificada utilizando o kit *PCR clean-up*. Posteriormente deu-se início à transcrição adicionando-se os reagentes do kit MAXIscript® ao plasmídeo linearizado, sendo de seguida incubado durante 16 horas a 37°C. Por fim, foi adicionado 1/20 do volume de EDTA 0.5M, 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M e o dobro do volume de etanol, sendo de seguida incubado durante 15 minutos a -20°C. Após uma centrifugação a 4°C durante 30 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em água DEPC.

3.4.5 Dicroísmo circular

Todos os espectros de dicroísmo circular foram obtidos no espectrofotômetro Jasco J-1850 (Jasco, Easton, EUA), usando um controlador de temperatura Peltier (modelo CDF-426S/15). Os estudos de interação dos ligandos com a estrutura G-quadruplex foram realizados à temperatura de 20°C, utilizando amostras com a sequência 58Sy3 (6 µM) em 30 mM de tampão fosfato (15 mM KH₂PO₄, 15 mM K₂HPO₄, pH 7,1) contendo 100 mM de KCl. Foi realizado o *annealing* do DNA aquecendo a amostra a 95°C durante 15 minutos seguindo-se um arrefecimento em gelo durante 1 hora. Para realizar as titulações, foram preparadas soluções de cada ligando com uma concentração de 10 mM, sendo o volume necessário adicionado diretamente à célula de quartzo com uma espessura de 0,1 cm. Os espectros foram adquiridos com uma velocidade de varrimento de 50 nm/min com um tempo de resposta de 1 segundo, num intervalo de comprimento de onda dos 190 nm aos 320 nm. Os espectros foram adquiridos em triplicado e a sua linha de base corrigida subtraindo o espectro da solução tampão.

Os ensaios da temperatura de *melting* foram realizados no intervalo de temperatura 20°C-100°C, com uma velocidade de aquecimento de 2°C/minuto, monitorizando-se a elipticidade a 265 nm. Foi realizado o *annealing* da sequência 58Sy3, aquecendo a amostra a 95°C durante 15 minutos, seguindo-se um arrefecimento gradual à temperatura ambiente. Para todos os ensaios foram utilizados 16 equivalentes molar de ligando.

Os ensaios para confirmar a formação da estrutura G-quadruplex na isoforma sc do plasmídeo pVAX-G4 após transcrição, foram efetuados inserindo a amostra com uma concentração de 20 µg/mL, numa célula de quartzo com uma espessura de 0,1 cm e à temperatura de 20°C. Foi usada uma velocidade de varrimento de 50 nm/min com um tempo de resposta de 1 segundo, num intervalo de comprimento de onda entre os 190 aos 320 nm. Os espectros foram adquiridos em triplicado e a sua linha de base corrigida subtraindo o espectro do tampão (H₂O-DECP). Os resultados foram de seguida tratados com o *software* Origin Pro versão 8.

Capítulo 4

4 Resultados e Discussão

4.1 Síntese Química

O desenvolvimento de ligandos que exibem características hidrofóbicas e hidrofílicas é uma estratégia promissora para a estabilização do G-quadruplex. Os ligandos derivados de acridina, naftaleno e quinolina, têm sido apontados como opções uma vez que os seus anéis aromáticos permitem a interação com estruturas G-quadruplex, através do empilhamento com as tétradas de guanina, enquanto a adição de grupos amina protonados, permitem a ligação ao DNA através de interações electroestáticas com os grupos fosfatos dos *loops*, para além de melhorarem a solubilidade destes compostos em água (Monchaud & Teulade-Fichou, 2008).

A dietilenotriamina já foi usada anteriormente na síntese de ligandos do G-quadruplex, verificando-se a capacidade destes induzirem a formação de G-quadruplexes, bem como a alteração da sua conformação e estabilização (Rodriguez, Pantos, Goncalves, Sanders, & Balasubramanian, 2007). Noutro estudo, verificou-se que a trietilenotetramina tem a capacidade, por si só, de estabilizar estruturas de G-quadruplex, tanto intermoleculares como intramoleculares, e inibe a expressão do *c-myc* em linhas celulares HeLa (Yin, Liu, Deng, & Wang, 2007).

4.1.1 Síntese de derivados de acridina

Os ligandos L₁, L₂ e L₃ foram sintetizados a partir da unidade de acridina. Para o L₁ e L₃ foram utilizados dois métodos diferentes. O primeiro método de síntese é dividido em quatro passos principais:

- síntese do 4,5-di(bromometil)acridina (reação do bromometil metiléter, com a acridina, por substituição eletrofílica nas posições 4 e 5, sob condições acídicas fortes);
- tosilação das aminas, onde os grupos amina são protegidos com cloreto de tosilo, na presença de um catalisador (piridina);
- Adição da amina tosilada ao 4,5-di(bromometil)acridina;
- E por fim, destosilação do composto final.

Após uma análise do composto final por RMN, verificou-se que este era um método ineficaz uma vez que no último passo (Figura 37), não foi possível a remoção total dos tosilos. Em trabalhos anteriores verificou-se que a remoção dos tosilos é um processo difícil, constatando-se que alguns dos métodos já descritos na literatura nem sempre resultaram (Michaelidou & Koutentis, 2010).

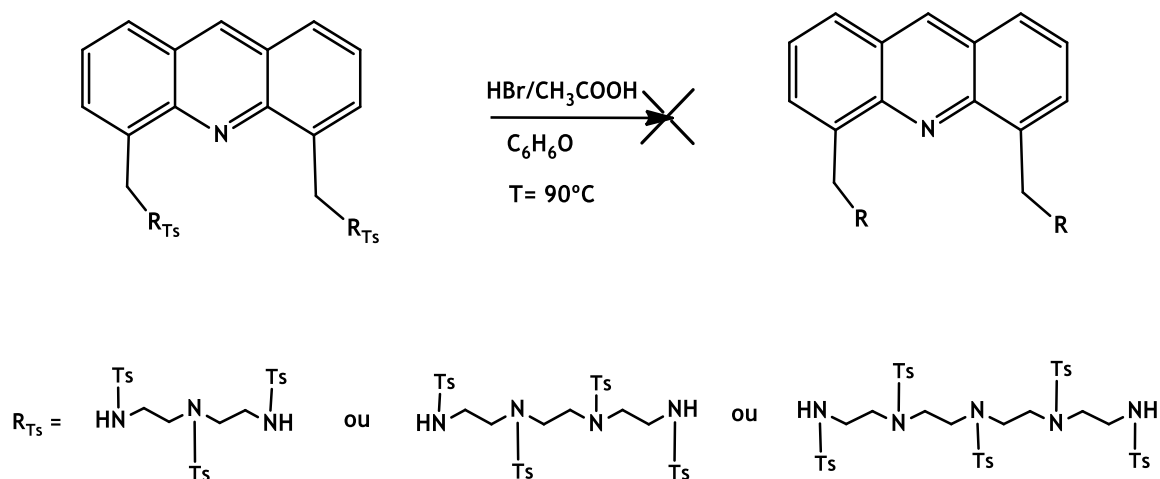


Figura 37 - Método 1 utilizado na síntese de ligandos derivados de acridina

O segundo método baseou-se em dois passos principais: a síntese do 4,5-di(bromometil)acridina e posterior adição das aminas (Figura 38). Apesar de ser obtido o produto pretendido através deste método, verificou-se que após a purificação por extração líquido-líquido e coluna cromatográfica, o rendimento obtido era demasiado baixo (<5%) para posterior utilização.

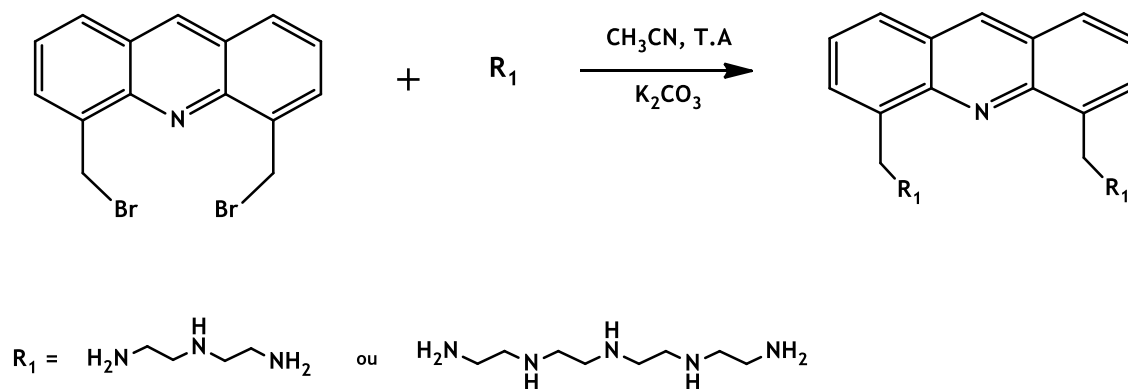


Figura 38 - Método 2 utilizado na síntese de ligandos derivados de acridina.

4.1.2 Síntese de derivados de quinolina

O ligando L_4 foi obtido a partir da reação de condensação da quinolina-2-carbaldeído, com a amina dietilenotriamina, na presença de etanol 99,9% e acetonitrilo (1:1) (Figura 39). Nesta reação ocorreu a formação da imina, que por sua vez foi reduzida com borohidreto de sódio em etanol 99,9% (Figura 39). Após evaporação do solvente, o resíduo resultante foi tratado com água e realizada uma extração líquido-líquido com clorofórmio, de forma a remover contaminantes, como a amina em excesso que não reagiu. Após a evaporação da fase orgânica, o composto resultante foi dissolvido numa mistura de etanol-dioxano (1:3), sendo de seguida adicionadas umas gotas de ácido clorídrico, sob agitação, de forma a precipitar um composto vermelho. Após uma análise por RMN deste composto, verificou-se que este era o produto de interesse mas ainda continha impurezas. Foi então realizada uma recristalização com metanol quente, verificando-se a precipitação de um composto de cor branca. Este precipitado foi removido por filtração e o solvente foi evaporado, para se obter o composto L_4 puro.

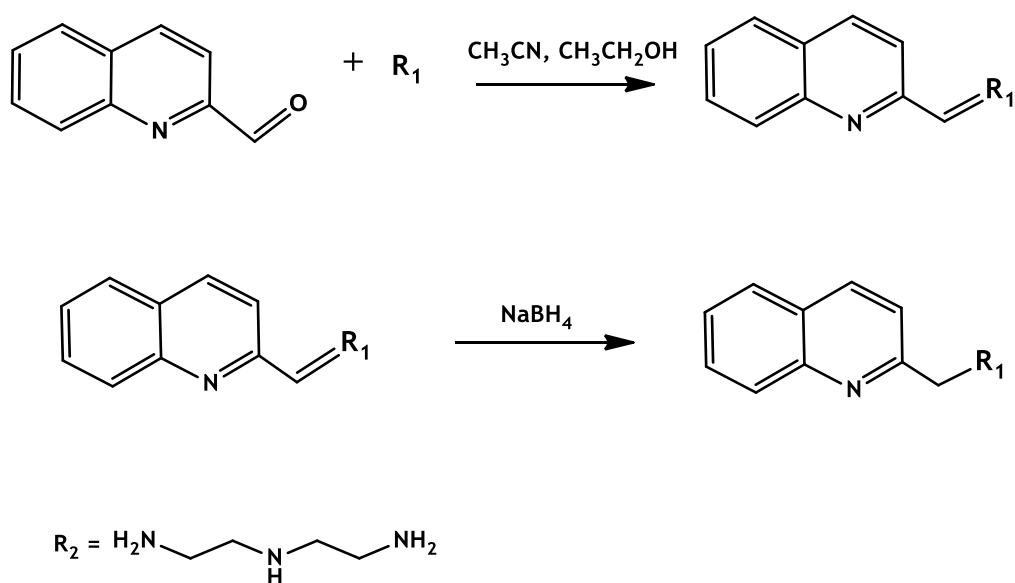


Figura 39 - Síntese do ligando L_4 .

4.1.3 Síntese de derivados de naftaleno

Tal como o ligando L_4 , derivado de quinolina, os ligandos L_5 , L_6 e L_7 foram obtidos a partir de uma reação de condensação, mas desta vez utilizando o naftaleno-1-carbaldeído com três

diferentes aminas, a dietilenotriamina, a trietilenotetramina e a tetraetilonepentamina, respectivamente. Esta reação realizou-se na presença de etanol 99,9%. Como descrito anteriormente, após condensação do monoaldeído com a respectiva amina ocorreu a formação da respectiva imina, que posteriormente foi reduzida com borohidreto de sódio em etanol 99,9% (Figura 40). Após a evaporação do solvente, o resíduo resultante foi tratado com água e foi realizada uma extração líquido-líquido com clorofórmio, de forma a remover a amina em excesso. Após a evaporação da fase orgânica, o composto resultante recristalizado com uma mistura de etanol-metanol (1:1), sendo de seguida adicionadas umas gotas de ácido clorídrico, sob agitação, de forma a precipitar um composto de cor branca. Este composto foi novamente recristalizado com metanol quente de forma a obter os ligandos L₅, L₆ e L₇ puros.

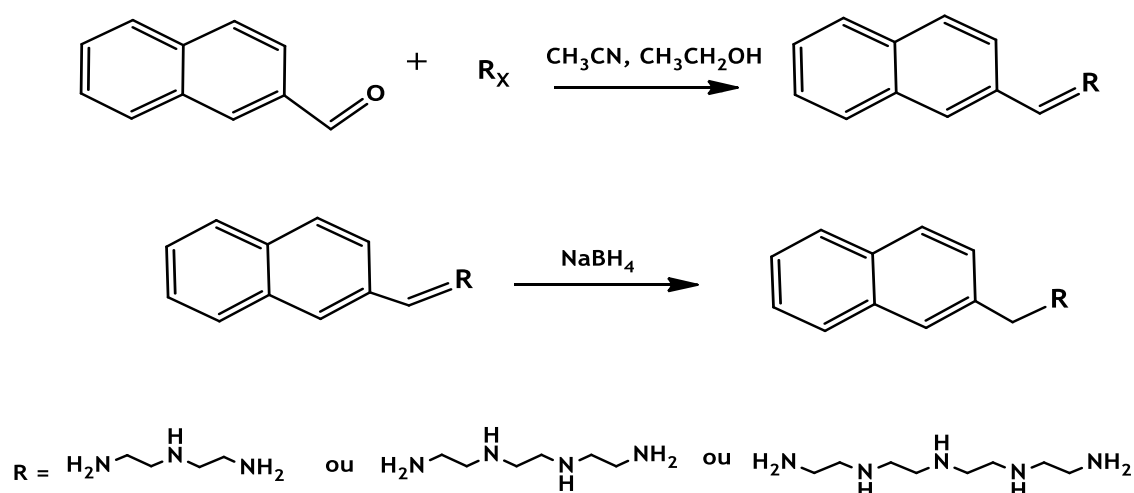


Figura 40 - Síntese dos ligandos L₅, L₆ e L₇

4.2 Estudos de interação entre os ligandos L₄, L₅, L₆ e L₇ e a sequência 58Sy3 formadora de G-quadruplex

4.2.1 Dicroísmo circular

A espectroscopia de dicroísmo circular permitiu avaliar que a sequência de DNA 58Sy3 forma uma estrutura de G-quadruplex na presença de 100 mM de KCl. Analisando o espectro obtido, é possível verificar a existência de uma banda negativa a 240 nm e uma banda positiva a 265 nm (Figura 41), o que está de acordo com um espectro característico de uma estrutura G-quadruplex paralela.

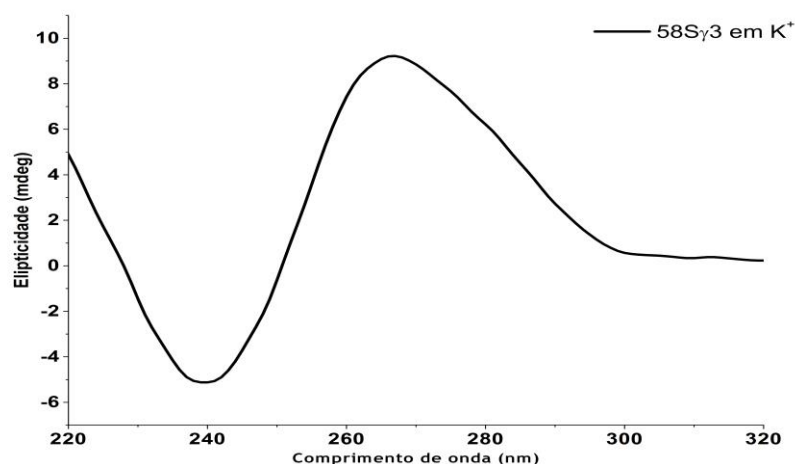


Figura 41 - Espectro da sequência 58S γ 3 a 20°C, na presença de KCl 100 mM.

Posteriormente foram realizados estudos com os ligandos de forma a analisar a interação e estabilização da estrutura de quadruplex 58S γ 3, através de titulações e estudos de temperatura de *melting*. Foi efetuada uma titulação, onde os ligandos foram adicionados à sequência 58S γ 3 com diferentes raios de ligando/DNA (de 0,1 até 8 equivalentes), em 10 mM KCl e adquiridos os respectivos espectros. Depois da adição dos ligandos verificaram-se alterações nos espectros, indicando interação entre os ligandos e o G-quadruplex. Com o aumento da concentração de ligando, verificou-se uma diminuição da elipticidade, no entanto as bandas características de uma estrutura G-quadruplex paralela mantiveram-se. Os espectros dos diferentes ligandos foram também adquiridos de forma a demonstrar que estes não apresentavam absorção no intervalo de comprimentos de onda analisado (Figura 42).

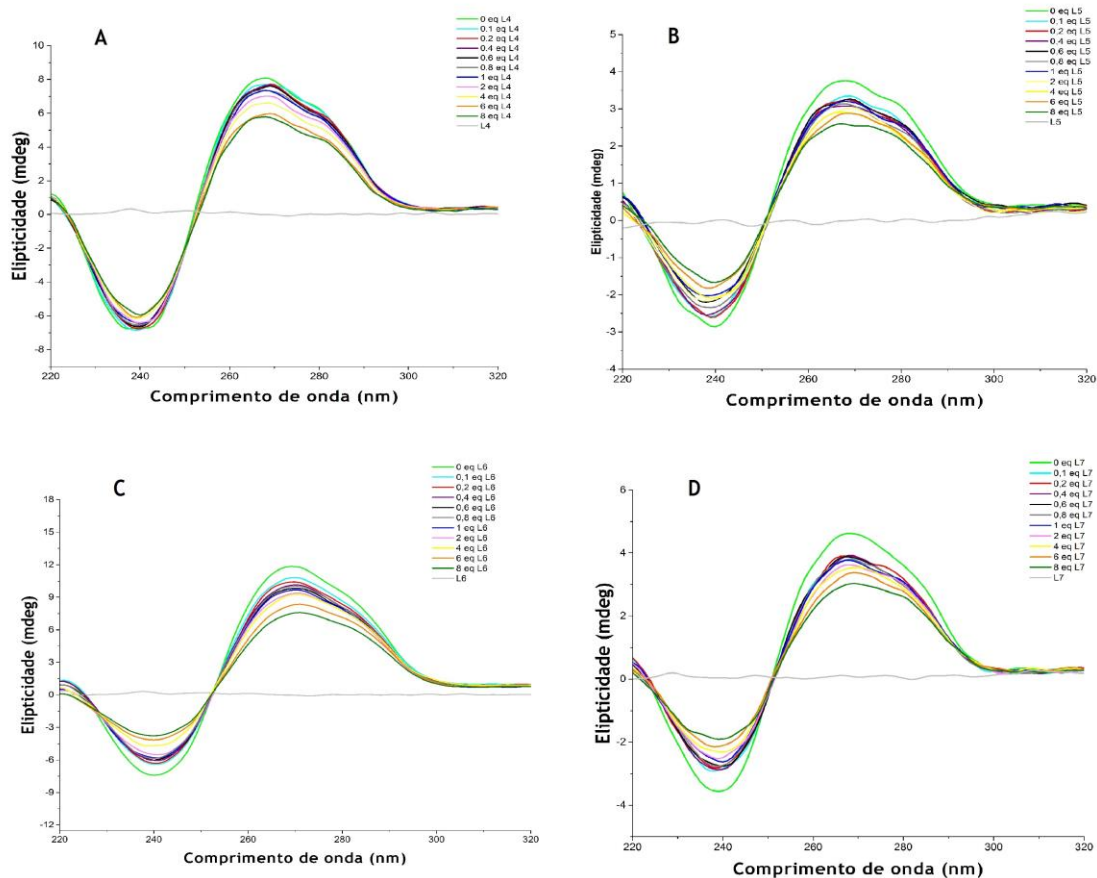


Figura 42 – Espectros de dicroísmo circular obtidos para as titulações da sequência 585y3 com os ligandos L₄, L₅, L₆ e L₇. A – Titulação com uma concentração crescente de L₄; B – Titulação com uma concentração crescente de L₅; C – Titulação com uma concentração crescente de L₆; A – Titulação com uma concentração crescente de L₇.

A estabilização do G-quadruplex foi estudada avaliando a diferença da temperatura de *melting* (ΔT_m) promovida pela adição dos ligandos. Assim, avaliou-se a desnaturação térmica do G-quadruplex com uma monitorização da elipticidade a 265 nm. Verificou-se que o quadruplex apresentava uma temperatura de *melting* de 42,2°C na presença de iões K⁺. Após a adição dos ligandos L₄, L₅, L₆ e L₇, a temperatura de *melting* aumentou, indicando estabilização do quadruplex (Tabela 1). A diferença de temperatura foi calculada através da seguinte fórmula:

$$\Delta T_m = T_m(\text{DNA} + 16 \text{ equivalentes de ligando}) - T_m(\text{DNA})$$

Tabela 1 - Estabilidade térmica do G-quadruplex com os diferentes ligandos.

ΔT_m (°C)	
Ligando	58Sγ3
L ₄	5.26 ± 0.55
L ₅	3.95 ± 0.27
L ₆	6.41 ± 0.41
L ₇	7.66 ± 0.49

Todos os ligandos promoveram a estabilização do G-quadruplex, sendo que L₄ aumentou a temperatura de *melting* em cerca de 5°C, enquanto os ligandos L₅, L₆ e L₇ aumentaram em 4°C, 6°C e 7°C respetivamente. De acordo com os resultados obtidos é de salientar a importância da poliamina na estabilização da estrutura quadruplex, uma vez que se verifica um maior aumento da temperatura de *melting* no ligando que possui a maior cadeia de poliamina. Assim, é possível afirmar que o tamanho da cadeia é importante na estabilização de estruturas G-quadruplexes paralelas, uma vez que existe uma relação entre o tamanho da poliamina e o grau de estabilização do G-quadruplex. Uma vez que a diferença dos valores de estabilização entre os ligandos derivados de quinolina e naftaleno é pouca, é possível concluir que as interações ocorrem principalmente entre a poliamina e as *grooves* do DNA, verificando-se que os diferentes anéis aromáticos que constituem os ligandos, têm pouca influencia na estabilização da estrutura de G-quadruplex.

4.3 Síntese dos suportes cromatográficos

O ligando L₅ foi o selecionado para ser utilizado na preparação dos suportes cromatográficos. Apesar deste ligando ter apresentado resultados ligeiramente mais baixos nos estudos de interação e estabilização do G-quadruplex, a sua síntese apresentou um rendimento muito superior (79%) aos ligandos L₄, L₆ e L₇ (40%; 26% e 11%, respetivamente). Assim, uma vez que a produção dos suportes cromatográficos requer quantidades elevadas de ligando de forma a tentar aumentar a densidade de ligandos, optou-se por escolher o ligando L₅.

Após a reação do CNBr com os grupos hidroxilo da Sefarose, formaram-se grupos éster de cianato ativados sendo de seguida adicionado o ligando L₅ e imobilizado através do grupo amina.

No fim do processo de imobilização verificou-se que a Sefarose manteve a cor branca, sugerindo a não imobilização do ligando.

4.4 Screening dos suportes sintetizados

Ambos os suportes sintetizados foram empacotados em mini-colunas de bancada, para a realização de testes de cromatografia de afinidade, pretendendo-se verificar a existência de interações entre o pDNA e os ligandos.

Foram também preparadas duas colunas, uma contendo Sefarose e outra contendo Sefarose ativada via epóxido, sem imobilização do ligando, de forma a serem utilizados como controlos. Assim foi possível avaliar o tipo de interações não específicas que ocorreram entre o pDNA, o braço espaçador e a Sefarose, utilizando condições idênticas às utilizadas nos estudos com os suportes sintetizados.

Todos os ensaios foram realizados com o plasmídeo pVAX-LacZ.

4.4.1 Suporte A

4.4.1.1 Condições hidrofóbicas

Os ensaios iniciaram-se em condições que promovem essencialmente interações hidrofóbicas. Deste modo, a coluna foi equilibrada com uma solução de (NH₄)₂SO₄ 3M em Tris-HCl 10mM (pH 8) e posteriormente adicionaram-se 100 µL de amostra contendo o pDNA. De seguida foi adicionada novamente a solução de (NH₄)₂SO₄ 3M em Tris-HCl 10 mM, para eluição das espécies não ligadas, iniciando-se a recolha das frações. Por fim foi adicionada solução Tris-HCl 10 mM (pH 8) de forma a eluir as espécies ligadas.

Através da medição da absorvância das frações, constatou-se que não ocorreu a eluição do pDNA, concluindo-se que existiu forte interação entre o suporte A e o pDNA, nas condições usadas.

Sendo assim procedeu-se à realização de ensaios com concentrações de (NH₄)₂SO₄ mais baixas. Foram testadas concentrações a variar entre 1,5M e 0,5M, verificando-se que 1M era a concentração mais baixa em que ocorria interação.

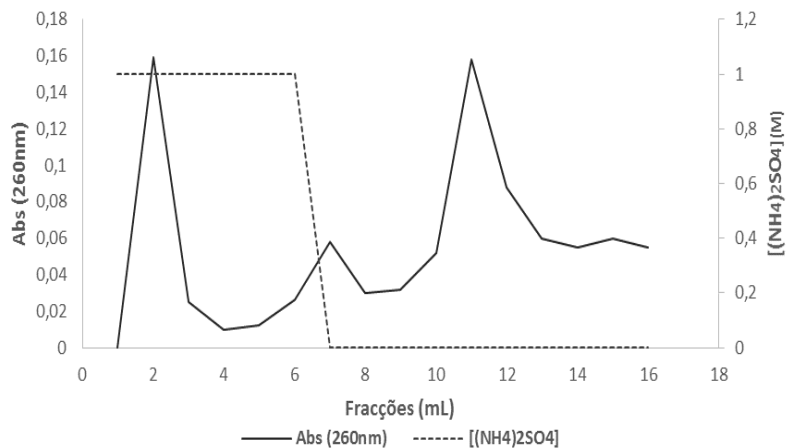


Figura 45 - Perfil cromatográfico obtido após injeção da amostra de pDNA no suporte A, utilizando um gradiente decrescente de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, representado pela linha tracejada: Primeiro passo 1 M de sal, e segundo passo 0 M.

Como é possível verificar pela figura 45, a realização de um ensaio com uma menor concentração de sal (1M) promoveu a eluição imediata de uma parte do pDNA, enquanto outra parte ficou retida na coluna e apenas eluiu com a passagem de Tris-HCl 10 mM.

De seguida foi realizado um ensaio com o suporte de controlo (sefrose com braço espaçador) utilizando as mesmas condições, de forma a perceber se existiam mais interações para além de interação pDNA-ligando, nomeadamente envolvendo o braço espaçador.

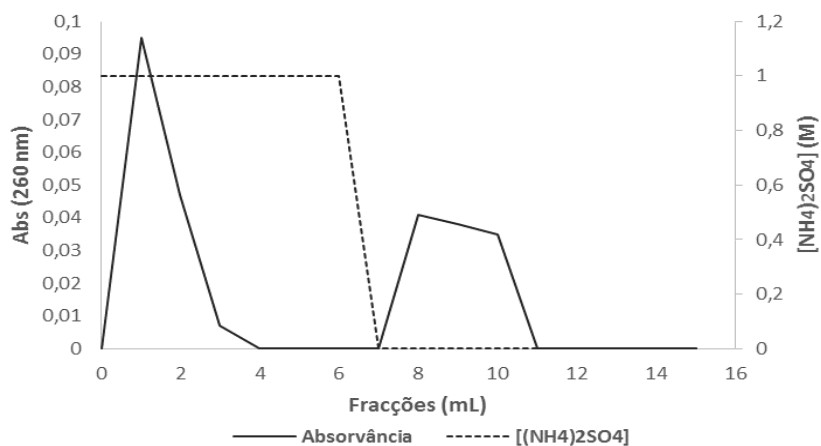


Figura 46 - Perfil cromatográfico obtido após injeção da amostra de pDNA no suporte de Sefarose com braço espaçador sem ligando imobilizado (branco), utilizando um gradiente decrescente de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, representado pela linha tracejada: Primeiro passo 1 M de sal, e segundo passo 0 M.

Como é possível verificar pela figura 46, o pDNA apresentou uma ligeira interação com o suporte, corroborando-se assim a existência de interações não específicas. Verifica-se que parte do pDNA permanece retido na coluna, eluindo apenas aquando da passagem de Tris-HCl

10 mM. Este facto pode ser explicado pela presença de um longo braço espaçador altamente hidrofóbico, composto por dez carbonos, que interage com o pDNA quando são utilizadas condições que provem interações hidrofóbicas.

4.4.1.2 Condições iónicas

Nos ensaios realizados em condições que favorecem essencialmente as interações iónicas, a coluna foi inicialmente equilibrada com Tris-HCl 10 mM (pH 8), sendo de seguida adicionados 100 μ L de amostra. Posteriormente foi adicionada a solução de Tris-HCl para promover a ligação do pDNA. Por fim foi adicionada uma solução de NaCl 2,5M em Tris-HCl 10 mM (pH 8) de forma a promover a eluição das espécies retidas. A leitura da absorvância das frações recolhidas permitiu traçar o respetivo cromatograma, tal como representado na figura 47.

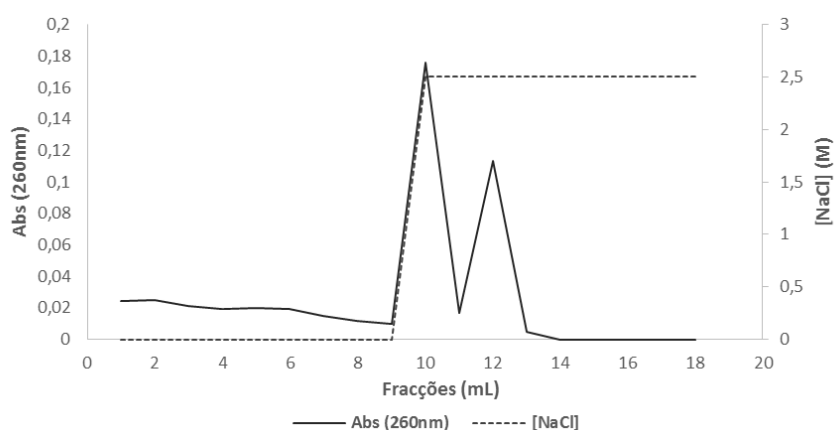


Figura 47 - Perfil cromatográfico obtido após injeção da amostra de pDNA no suporte A, utilizando um gradiente crescente de NaCl, representado pela linha tracejada: Primeiro passo 0 M de sal, e segundo passo 2,5 M.

Analisando o cromatograma é possível observar que ocorreu retenção total do pDNA a 10 mM de Tris-HCl, sugerindo interação entre o pDNA e o suporte A, ao promover interações iónicas. Ao aumentar a concentração de NaCl para 2,5M ocorreu a eluição do pDNA, sendo visualizado no cromatograma (figura 47) a presença de dois picos. A análise posterior das frações correspondentes aos dois picos demonstrou que ambos apresentavam as isoformas oc e sc, não tendo sido obtida seletividade.

Foi realizado um ensaio com o branco (Sefarose com braço espaçador), utilizando as mesmas condições. De acordo com o cromatograma da Figura 48 constatou-se que o pDNA eluiu imediatamente com a solução de Tris-HCl 10 mM, indicando que não existem interações do pDNA com o braço espaçador nem com a Sefarose. É assim concluir que qualquer interação

que ocorra entre o pDNA e o suporte A, em condições iônicas, resulta da interação específica com o ligando imobilizado.

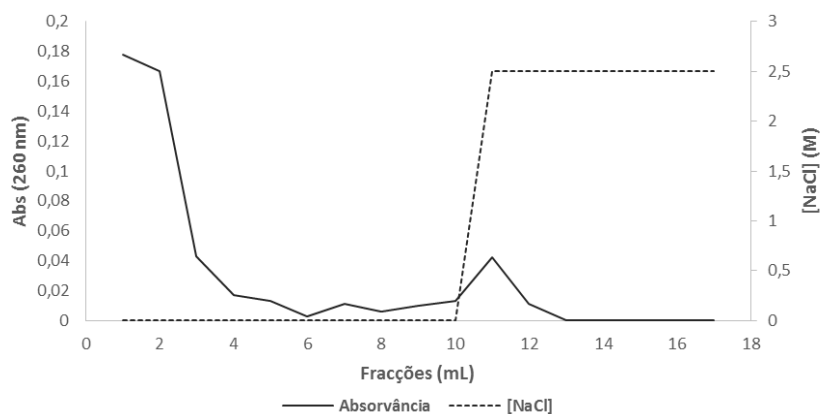


Figura 48 - Perfil cromatográfico obtido após injeção da amostra de pDNA no suporte de Sefarose com braço espaçador sem ligando imobilizado (branco), utilizando um gradiente crescente de NaCl, representado pela linha tracejada: Primeiro passo 0 M de sal, e segundo passo 2,5 M.

4.4.2 Suporte B

4.4.2.1 Condições hidrofóbicas

Os ensaios realizados com o suporte B, foram efetuados seguindo a mesma estratégia descrita em 4.4.1.1. Foram utilizadas várias concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ variando entre 3M e 1,5M para favorecer a ligação do pDNA ao suporte, verificando-se que 1,8M era a concentração mais baixa que promovia interação entre o pDNA e o suporte B.

Comparando os perfis cromatográficos obtidos com o suporte A e o suporte B (Figura 49), utilizando a solução de 3M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, é possível concluir que existem interações mais fortes no suporte A, uma vez que se verifica a retenção do pDNA na coluna mesmo quando se tenta a sua eluição com Tris-HCl 10 mM, facto que não se verifica no suporte B.

Para além dos anéis aromáticos presentes nos ligandos imobilizados em ambos os suportes, o suporte A possui um longo grupo espaçador que permite que o ligando esteja mais acessível ao pDNA e que aumenta a hidrofobicidade na superfície do suporte, favorecendo também interação. Este aumento de hidrofobicidade promove uma interação mais forte com o pDNA, mas pode levar a uma diminuição da seletividade (Hage & Cazes, 2005).

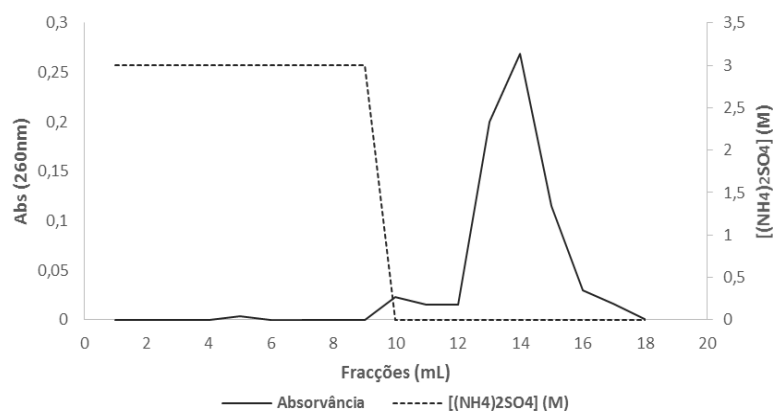


Figura 49 - Perfil cromatográfico obtido após injeção da amostra de pDNA no suporte B, utilizando um gradiente decrescente de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, representado pela linha tracejada: Primeiro passo 3 M de sal, e segundo passo 0 M.

Comparando os cromatogramas obtidos com o branco (Sefarose) (Figura 50) e o suporte B (Figura 51), utilizando uma solução de 1,8M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, verificou-se que os perfis são bastante idênticos. Em ambos os ensaios ocorreu eluição de parte do pDNA na presença da solução de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, sendo o restante pDNA eluído após a diminuição da concentração de sal. Assim é possível concluir que a imobilização do ligando L_5 no suporte B, através do método de ativação da Sefarose com CNBr, não foi bem sucedida.

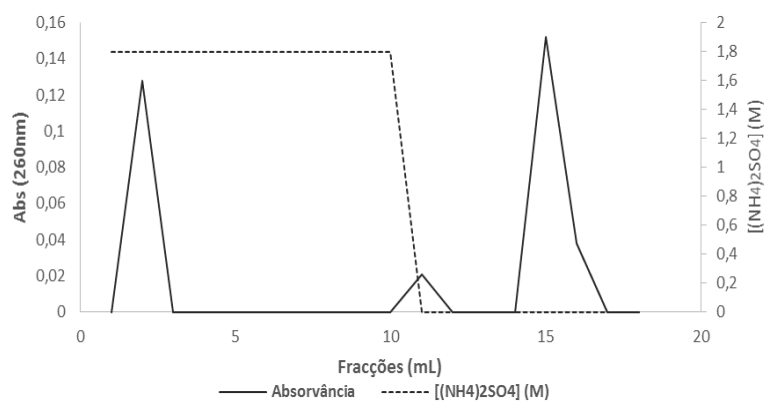


Figura 50 - - Perfil cromatográfico obtido após injeção da amostra de pDNA no suporte de Sefarose (branco), utilizando um gradiente decrescente de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, representado pela linha tracejada: Primeiro passo 1,8 M de sal, e segundo passo 0 M.

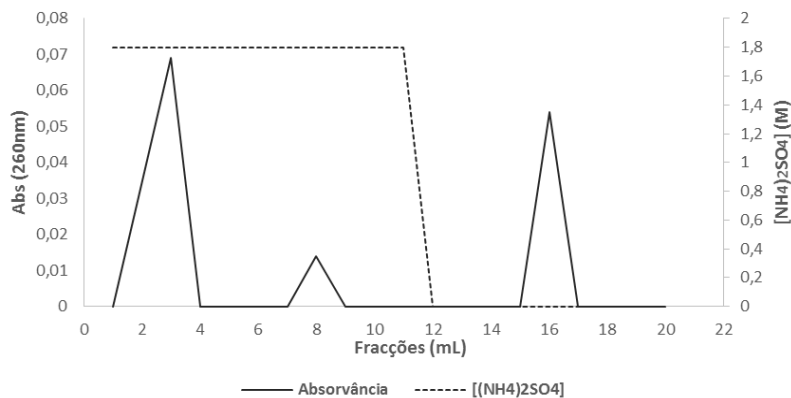


Figura 51 - Perfil cromatográfico obtido após injeção da amostra de pDNA no suporte B, utilizando um gradiente decrescente de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, representado pela linha tracejada: Primeiro passo 1,8 M de sal, e segundo passo 0 M.

4.4.2.2 Condições iônicas

Com os resultados obtidos previamente com o suporte B (ausência da mudança de cor da Sefarose após imobilização do ligando e perfil cromatográfico semelhante ao controlo), foi possível presumir que a imobilização do ligando não tinha ocorrido com sucesso. Assim, nos ensaios cromatográficos usando condições que favorecem as interações electrostáticas era de esperar que não se verificasse a existência de interação entre o pDNA e o suporte, uma vez que este tipo de interações apenas ocorreria através da poliamina do ligando parcialmente carregada positivamente. De acordo com o cromatograma da figura 52, é possível observar que o pDNA eluiu imediatamente na presença da solução Tris-HCl 10 mM, confirmando-se assim a ausência de interações entre o pDNA e o suporte.

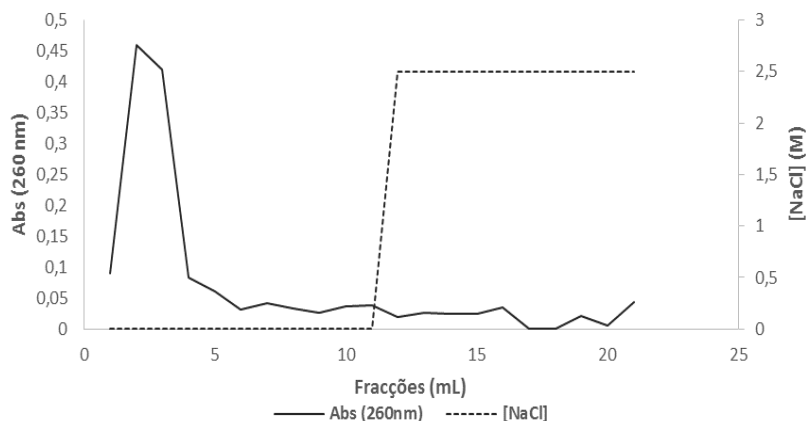


Figura 52 - Perfil cromatográfico obtido após injeção da amostra de pDNA no suporte B, utilizando um gradiente crescente de NaCl, representado pela linha tracejada: Primeiro passo 0 M de sal, e segundo passo 2,5 M.

Tendo em conta os resultados obtidos durante os ensaios de *screening*, o suporte A foi o selecionado para efetuar a purificação da isoforma sc dos dois plasmídeos (pVAX-LacZ e pVAX-G4). Este suporte apresentou potencial para a purificação do pDNA, explorando a combinação de múltiplas interações não-covalentes, nomeadamente interações eletroestáticas e/ou hidrofóbicas. Ao promover interações eletroestáticas verificou-se que não existiam interações não específicas entre o pDNA e a Sefarose com o braço espaçador. Para além disso, a utilização de NaCl apresenta vantagens como o baixo custo e um menor impacto ambiental, quando comparado com a utilização do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

4.5 Purificação da isoforma sc dos plasmídeos pVAX-LacZ e pVAX-G4

Pequenas moléculas que se ligam com alta afinidade e especificidade ao DNA podem ser bons candidatos a ligandos cromatográficos para a purificação de pDNA. Em trabalhos anteriores constatou-se ser possível separação da isoforma sc do pDNA das restantes impurezas ao utilizar ligandos derivados de compostos heterocíclicos. Caramelo-Nunes e colaboradores, desenvolveram um novo suporte cromatográfico através da imobilização do intercalador de DNA, o DAPP, capaz de purificar a isoforma sc utilizando baixas concentrações de sal (NaCl 0,55M) no eluente (Caramelo-Nunes, Almeida, Marcos, & Tomaz, 2013).

A purificação da isoforma sc depende de vários fatores, tais como o tipo de sal, força iónica, temperatura e pH (Pfaunmiller et al., 2013). Na realização deste trabalho o tipo de sal escolhido para o isolamento da isoforma sc dos plasmídeos pVAX-LacZ e pVAX-G4, foi o NaCl. Esta escolha baseou-se nos resultados obtidos previamente durante o *screening* dos suportes (ponto 4.4). A força iónica e a temperatura foram ajustadas de forma a obter separação eficiente das isoformas. Todos os ensaios foram realizados no sistema AKTA Avant, utilizando uma coluna onde foram empacotados 4 mL do suporte A. A coluna estava ligada a um sistema de refrigeração que permitiu a realização de ensaios a 4°C, 10°C, 15°C e 25°C. Foi utilizado um *loop* de 200 µL para a injeção da amostra na coluna.

4.5.1 sc pVAX-LacZ

Inicialmente os ensaios foram realizado à temperatura de 25°C, utilizando tampão Tris-HCl 10 mM a pH 8, no passo de ligação. Através da análise do cromatograma (Figura 53) é possível verificar que existe a retenção do pDNA (oc + sc), confirmando a existência de interações entre o pDNA e o suporte. O aumento da força iónica na fase móvel com a adição de NaCl 1,5 M em Tris-HCl 10 mM (pH 8) permite a eluição do pDNA, verificando-se a presença de um único pico no cromatograma. Estes resultados vão de encontro aos resultados obtidos nos ensaios nas mini-colunas de bancada (ponto 4.4.1.2).

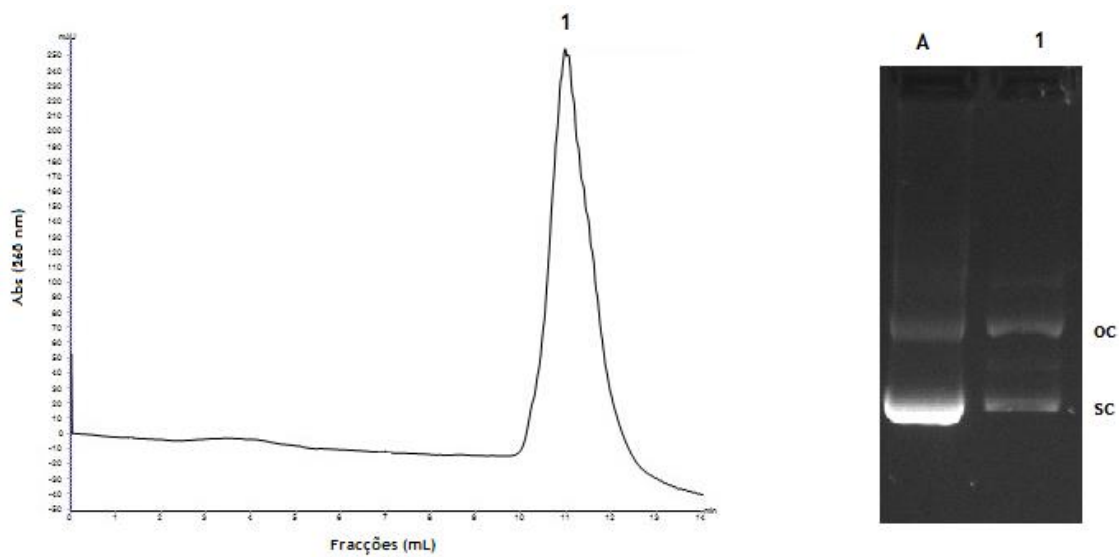


Figura 53 - Perfil cromatográfico obtido após a injeção da amostra de pVAX-LacZ e respetiva eletroforese em gel agarose a 1%. A - Amostra de pDNA injetado na coluna; 1 - Fração recolhida utilizando 1,5 M de NaCl.

A amostra eluída no pico 1 foi recolhida e analisada em gel de agarose 1%, verificando-se a presença das isoformas oc e sc do pDNA. Sendo assim, são necessários estudos de ligação/eluição para determinar as condições necessárias para se obter a separação das isoformas.

Foram estudadas várias condições usando diferentes concentrações de NaCl em Tris-HCl 10 mM, de forma a avaliar os perfis de eluição de ambas as isoformas (sc e oc) (Tabela 2).

Tabela 2 - Resumo dos gradientes de ligação/eluição testadas para a separação das isoformas do plasmídeo pVAX-LacZ a 25°C, com diferentes concentrações de NaCl.

Isoformas	Perfil de ligação/eluição			
	0,1 M	0,3 M	0,5 M	1,5 M
oc	Retenção	Ligação/Eluição	Ligação/Eluição	Ligação/Eluição
sc	Retenção	Ligação/Eluição	Ligação/Eluição	Ligação/Eluição

Os resultados da Tabela 2 mostram que a retenção de ambas as isoformas é obtida com NaCl 0,1 M em Tris-HCl 10 mM (pH 8), e para as restantes concentrações de NaCl (0,3 M; 0,5 M e 1,5 M) ocorre eluição parcial de ambas as isoformas. Estes resultados sugerem uma baixa seletividade do suporte quando o processo é efetuado à temperatura de 25°C. Em trabalhos

anteriormente publicados, Sousa e colaboradores reportaram que a temperatura influenciava as interações do pDNA com o suporte, alterando assim o modo de retenção das diferentes isoformas, sendo que temperaturas mais altas aumentavam a retenção das mesmas, uma vez que promoviam interações hidrofóbicas (F. Sousa, Matos, Prazeres, & Queiroz, 2008).

Desta forma, foram realizados ensaios a diferentes temperaturas (4°C, 10°C e 15°C), de forma a avaliar o efeito desta alteração nos perfis de retenção do pDNA.

De facto a alteração da temperatura teve um impacto na seletividade do suporte, verificando-se que ao diminuir a temperatura para 4°C, a seletividade aumentava, tal como indicado na Tabela 3.

Tabela 3 - Resumo dos perfis de ligação/eluição das isoformas do plasmídeo pVAX-LacZ a 4°C, com diferentes concentrações de NaCl.

Isoformas	Perfis de ligação/eluição			
	0,1 M	0,15 M	0,2 M	1,5 M
oc	Retenção	Eluição	Eluição	Eluição
sc	Retenção	Ligação/Eluição	Ligação/Eluição	Eluição

De acordo com os resultados da Tabela 3, é possível concluir que ambas as isoformas são retidas ao utilizar NaCl 0,1 M em Tris-HCl 10 mM, mas ao aumentar a concentração para 0,15 M e 0,2 M, verifica-se a eluição total da isoforma oc e uma eluição parcial da isoforma sc, ficando parte desta isoforma retida na coluna.

O ensaio cromatográfico realizado com 0,15 M de NaCl em Tris-HCl 10 mM revelou o perfil representado na figura 54.

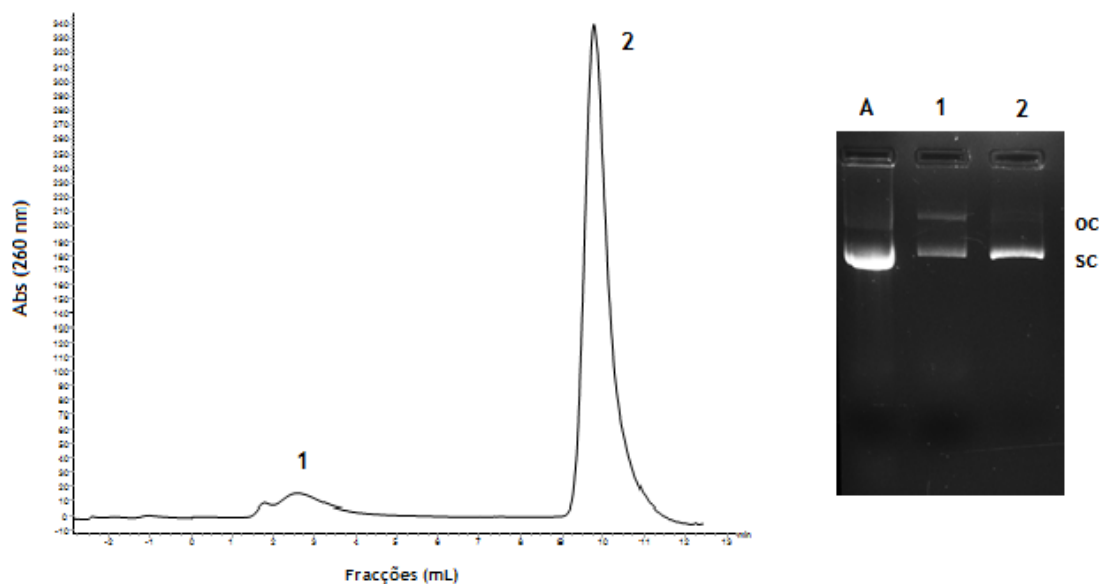


Figura 54 - Perfil cromatográfico obtido após a injeção da amostra de pVAX-*LacZ* e respetiva eletroforese em gel agarose a 1%. A - Amostra de pDNA injetado na coluna; 1 - Fração recolhida utilizando 0,15 M de NaCl. 2 - Fração recolhida utilizando 1,5 M de NaCl.

A amostra injetada e as amostras eluídas no primeiro e segundo picos foram analisadas através de eletroforese. Como é possível verificar o primeiro pico, correspondente à eluição com 0,15 M de NaCl apresenta duas bandas que correspondem às duas isoformas do pDNA. No segundo pico apenas está presente a banda correspondente à isoforma sc do pDNA. Assim, é possível concluir que esta isoforma apresenta interações mais fortes com o suporte, do que a isoforma oc. Esta diferença pode ser explicada pelo facto do super enrolamento das duas cadeias antiparalelas do DNA, na isoforma sc, expor regiões hidrofóbicas ficando desta forma mais acessíveis ao ligando e ao solvente (Ferreira, 2005). Sendo assim, é possível que existam interações de outro tipo, como por exemplo interações hidrofóbicas e interações por empilhamento π - π entre as regiões hidrofóbicas do pDNA e os anéis aromáticos do ligando. Através na figura 55 foi possível ainda verificar que existe alguma perda da isoforma sc no primeiro passo do gradiente, o que poderá comprometer um pouco o rendimento de recuperação. Deste modo, de forma a melhorar este resultado, foi realizado um novo ensaio com uma concentração de NaCl ligeiramente inferior (0,145 M), de forma a eluir apenas a isoforma oc no primeiro pico e a isoforma sc no segundo apenas. Como se pode visualizar pela figura 55, apesar de ter ficado retida a maior parte da isoforma sc, ambos os picos apresentam as duas isoformas do pDNA, não se verificando assim uma separação diferenciada destas.

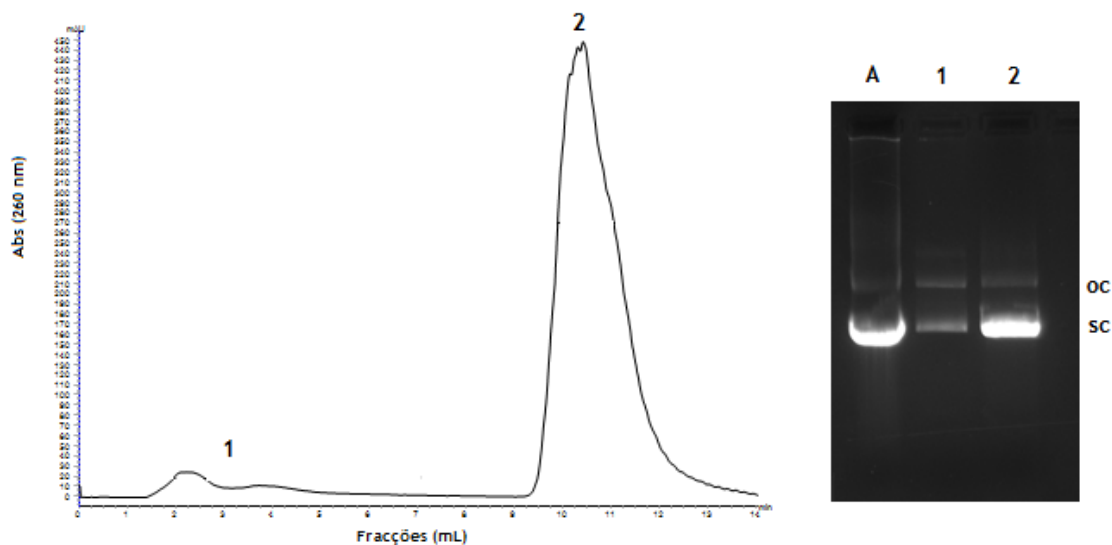


Figura 55 - Perfil cromatográfico obtido após a injeção da amostra de pVAX-LacZ e respetiva eletroforese em gel agarose a 1%. A - Amostra de pDNA injetado na coluna; 1 - Fração recolhida utilizando 0,145 M de NaCl. 2 - Fração recolhida utilizando 1,5 M de NaCl.

4.5.2 sc pVAX-G4

Para a purificação da isoforma sc do plasmídeo pVAX-G4 foi realizado um ensaio utilizando as mesmas condições em que se obteve a purificação da isoforma sc do plasmídeo pVAX-LacZ. Foi utilizada uma solução de NaCl 0,15 M em Tris-HCl 10 mM no primeiro passo do gradiente e no segundo passo aumentou-se a concentração de NaCl para 1,5 M, para eluir as espécies mais fortemente ligadas à coluna. O ensaio foi realizado a 4°C.

Pela análise da figura 56 é possível verificar que o perfil cromatográfico apresentado é bastante semelhante ao da figura 54, onde se verifica a presença de um pequeno pico, que resulta da eluição da isoforma oc e uma parte da isoforma sc, a 0,15 M de NaCl na coluna, que apresenta bandas características de ambas as isoformas (oc + sc) após análise por eletroforese. Ao aumentar a concentração para 1,5 M, surge um pico de maior intensidade, que pela análise da electroforese se verificou corresponder apenas à eluição da isoforma sc. Analisando as amostras recolhidas correspondentes a este pico verifica-se que este apenas apresenta a isoforma sc.

Assim, é possível concluir que a introdução da sequência de 58 nucleótidos formadora de G-quadruplex, 58Sy3, no plasmídeo pVAX-LacZ (dando origem ao pVAX-G4), não tem qualquer influência no processo de purificação.

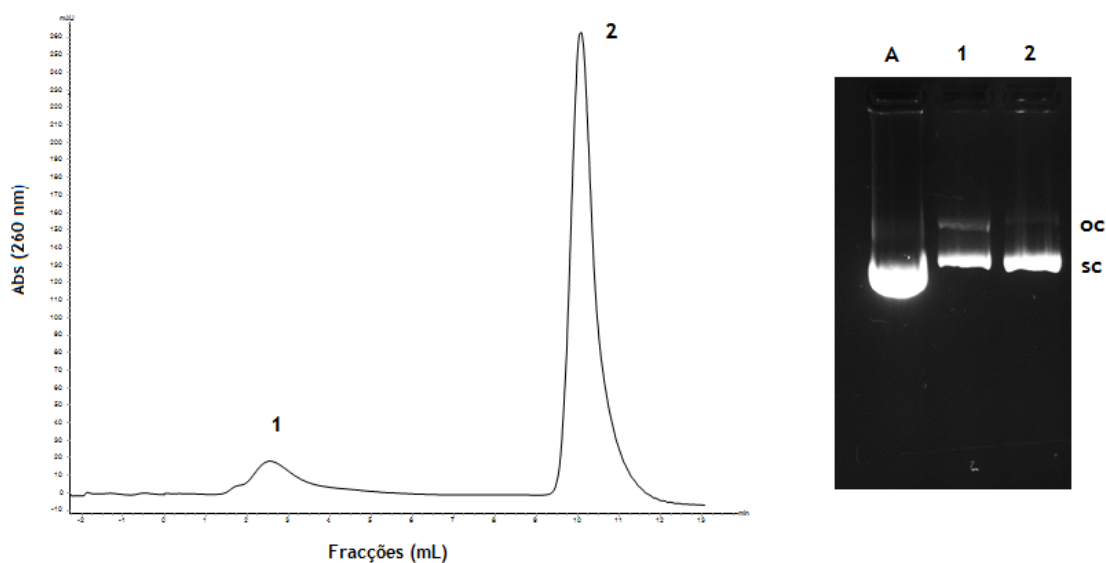


Figura 56 - Perfil cromatográfico obtido após a injeção da amostra de pVAX-G4 e respetiva eletroforese em gel agarose a 1%. A - Amostra de pDNA injetado na coluna; 1 - Fração recolhida utilizando 0,15 M de NaCl. 2 - Fração recolhida utilizando 1,5 M de NaCl.

4.6 Transcrição *in vitro* da isoforma sc do plasmídeo pVAX-G4

A transcrição consiste no primeiro passo na expressão de genes, onde um molde de DNA dá origem a uma cópia de RNA através da ação da enzima RNA polimerase. Em trabalhos anteriores verificou-se que durante a realização da transcrição *in vitro* eram formadas estruturas de G-quadruplexes denominadas por DNA:RNA híbridos. Constatou-se que este tipo de estruturas se formavam não só na cadeia de DNA que não servia de molde, mas também no próprio transcrito de RNA (Zheng et al., 2013).

Assim, de forma a corroborar a formação destas estruturas na isoforma sc do plasmídeo pVAX-G4, foi realizada a transcrição *in vitro* após a sua purificação, sendo posteriormente as amostras resultantes analisadas por espectroscopia de dicroísmo circular.

Após a transcrição uma das amostras foi digerida com DNase, de forma a eliminar o DNA presente e avaliar a estrutura do transcrito de RNA (Figura 57).

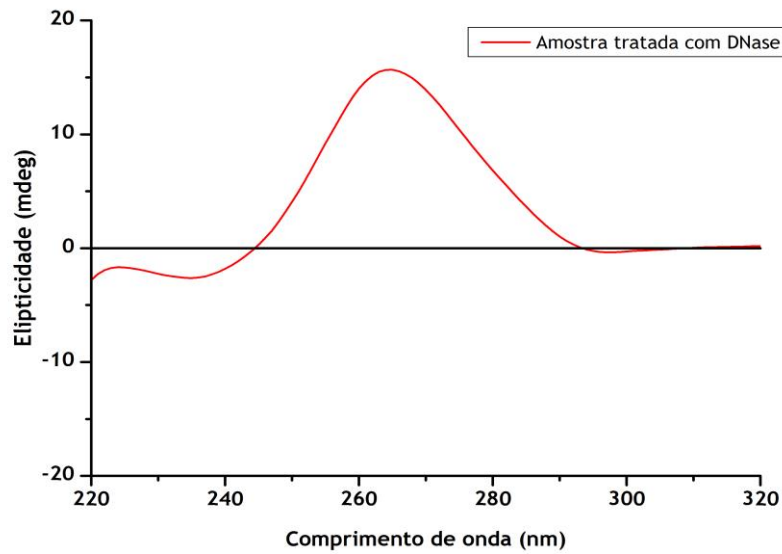


Figura 57 - Espectro de dicroísmo circular obtido para a amostra tratada com DNase.

O espectro obtido, apresentado na figura 57, mostra a existência de uma banda negativa a 240 nm e uma positiva a 265 nm, o que corresponde a um espectro típico de uma estrutura G-quadruplex paralela.

Para verificar a formação desta estrutura no DNA, foi realizada a digestão de outra amostra com RNase, desta forma o RNA foi eliminado não interferindo na análise da estrutura do DNA. Para esta amostra foi obtido espectro representado na figura 58.

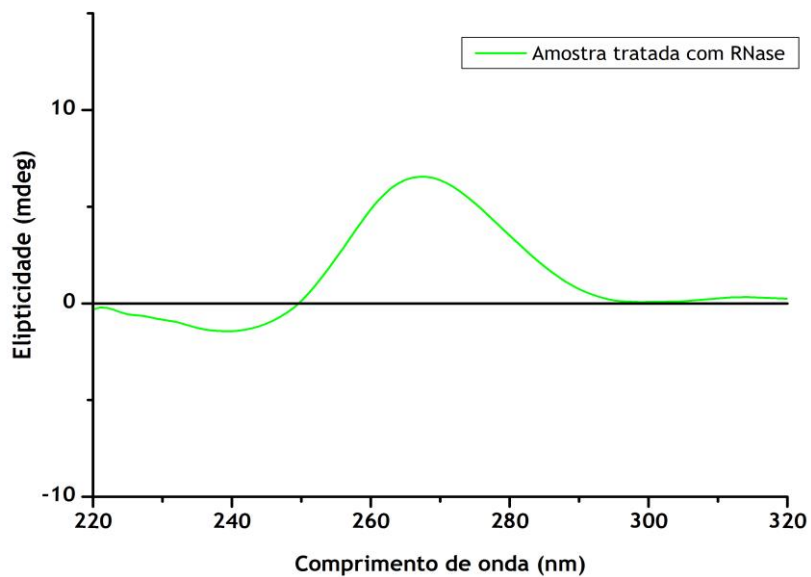


Figura 58 - Espectro de dicroísmo circular obtido para a amostra tratada com RNase.

O espectro apresentado na figura 58 é semelhante ao obtido anteriormente na análise do transcrito (Figura 57), apresentando uma banda negativa a 240 nm e uma positiva a 265 nm, sendo possível concluir que também esse formou estrutura de G-quadruplexe paralela nesta amostra.

De forma a confirmar que a digestão das amostras com RNase e DNase foi bem sucedida, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 59).

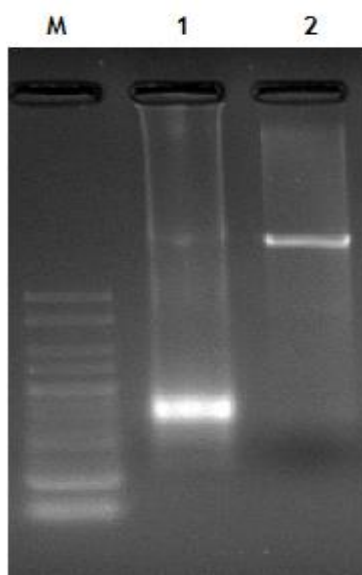


Figura 59 - Eletroforese em gel agarose 1% das amostras após digestão. M - Marcador de peso molecular. 1 - Amostra tratada com DNase. 2 - Amostra tratada com RNase.

O espectro da isoforma sc do plasmídeo pVAX-G4 foi também traçado e comparado com os espectros das amostras após transcrição (Figura 60).

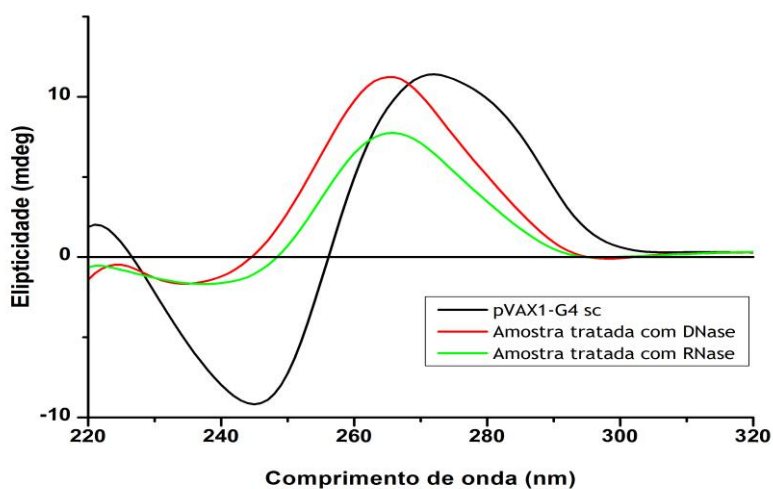


Figura 60 - Espectro de dicroísmo circular das diferentes amostras (pVAX-G4 sc; amostra tratada com DNase e amostra tratada com RNase).

Através da análise da figura 60 é possível verificar que a isoforma sc do plasmídeo pVAX-G4 apresenta um espectro característico da forma B do DNA, apresentando uma banda negativa a 245 nm e uma banda positiva a 275 nm. Após a transcrição verifica-se um deslocamento da banda negativa de 245 nm para 240 e da positiva de 275 nm para 265 nm, confirmando-se assim a alteração da estrutura do DNA.

Capítulo 5

5 Conclusões

Os G-quadruplexes estão presentes em várias regiões importantes do genoma, tais como os telômeros e os promotores de oncogenes e estão envolvidos em importantes processos celulares como a transcrição, replicação e recombinação. A formação e estabilização destas estruturas nas extremidades dos telômeros promove a inibição da telomerase em células cancerígenas, o que irá levar a que as células percam a sua capacidade de divisão celular e sejam eliminadas. Nos promotores de oncogene atuam como repressores da transcrição. Desta forma, a síntese de ligandos específicos para as estruturas de G-quadruplex é de elevada importância, uma vez que podem funcionar como agentes anticancerígenos. Neste trabalho foi apresentada a síntese de ligandos derivados de quinolina (L₄) e naftaleno (L₅, L₆ e L₇). Através dos estudos de dicroísmo circular verificou-se que a sequência de DNA 58Sγ3, forma uma estrutura de G-quadruplex paralela na presença de K⁺. Os espectros de dicroísmo circular obtidos pela realização de titulações com diferentes rácios de ligando/DNA, evidenciaram interação entre os ligandos L₄, L₅, L₆ e L₇ e a estrutura de G-quadruplex e conservação da sua topologia paralela. A estabilização do G-quadruplex foi estudada avaliando a diferença da temperatura de *melting* (ΔT_m) promovida pelos ligandos, verificando-se que estes promoviam um aumento da estabilidade térmica entre 4°C e 7°C. Concluiu-se que a cadeia lateral de poliamina desempenha um papel importante na estabilização, sendo que o aumento do tamanho desta leva a um aumento da estabilização do G-quadruplex.

Estudos recentes demonstraram que as estruturas G-quadruplexes são mais abundantes na isoforma sc de plasmídeos que contêm sequências ricas em guaninas, como é o caso da 58Sγ3. Assim, a purificação desta isoforma é essencial para posteriormente se realizarem estudos *in vitro* de estabilização do G-quadruplex. O ligando L₅ foi selecionado para a síntese de dois suportes cromatográficos através da imobilização na Sefarose através do braço espaçador 1,4-butanediol diglicidil éter, originando o suporte A, e na Sefarose ativada com CNBr sem braço espaçador, dando origem ao suporte B.

Através de testes cromatográficos realizados em mini-colunas de bancada, foi possível concluir que o suporte A apresentava interação com o plasmídeo pVAX-*LacZ* em condições em que são favorecidas as interações iônicas e hidrofóbicas, tendo assim potencial para a purificação da isoforma sc dos plasmídeos. Já no suporte B, foi possível concluir que a imobilização do ligando não ocorreu uma vez que este apresentava um perfil cromatográfico muito semelhante ao branco (Sefarose). A purificação da isoforma sc dos pVAX-*LacZ* e pVAX-G4 foi realizada com o suporte A no sistema AKTA Avant, realizando-se vários ensaios de forma a comparar as condições de ligação/eluição dos plasmídeos. A purificação foi conseguida utilizando um gradiente por passos crescente, onde no primeiro passo foi usada

uma solução de 0,15 M NaCl em Tris-HCl 10 mM (pH 8) e no segundo uma solução de 1,5 M NaCl em Tris-HCl 10 mM (pH 8) à temperatura de 4°C. A purificação da isoforma sc do pVAX-G4 ocorreu utilizando as mesmas condições, concluindo-se assim que a sequência 585y3 inserida no plasmídeo não altera as condições de purificação. Apesar da isoforma sc ter sido purificada, esta não foi completamente recuperada.

A formação da estrutura G-quadruplex depois da transcrição da isoforma sc do pVAX-G4 foi confirmada por dicroísmo circular, onde foi obtido um espectro com uma banda negativa a 240 nm e uma positiva a 265 nm, o que corresponde a uma estrutura de G-quadruplex paralela. Foi ainda possível verificar que estas estruturas se formavam tanto no DNA como no transcrito de RNA.

Capítulo 6

6 Perspetivas futuras

Neste trabalho foi demonstrado que os ligandos derivados de naftaleno (L_5 , L_6 e L_7) e quinolina (L_4) estabilizam a estrutura de G-quadruplex paralela formada pela sequência 58Sy3. Estes ligandos podem ainda ser melhorados, por exemplo, a adição de mais cadeias laterais protonadas que iria aumentar as interações electroestáticas nas *grooves* do G-quadruplex, enquanto a introdução de mais anéis aromáticos iriam aumentar as interações por empilhamento π - π com os anéis das tétradas de guaninas. Posteriormente, estes ligandos poderão ser avaliados em termos de citotoxicidade, internalização e localização celular.

Relativamente à purificação da isoforma sc dos plasmídeos pVAX-*LacZ* e pVAX-G4 é ainda necessária uma otimização das condições de maneira a alcançar a recuperação total desta isoforma. Posteriormente deverá ser realizada a purificação a partir de uma mistura complexa de lisado de *E. coli* de forma a estudar o comportamento do suporte A na presença de outras impurezas.

Deverão ainda ser realizados ensaios cromatográficos utilizando DNA na sua forma de dupla hélice e na forma de G-quadruplex, de forma a comparar os tempos de retenção de cada um e avaliar assim a seletividade do suporte para a estrutura G-quadruplex.

7 Referências

- Afzal, O., Kumar, S., Haider, M. R., Ali, M. R., Kumar, R., Jaggi, M., & Bawa, S. (2015). A review on anticancer potential of bioactive heterocycle quinoline. *Eur J Med Chem*, 97, 871-910.
- Alberts B, J. A., Lewis J, et al. Molecular (2007). *Molecular Biology of the Cell* (5th edition ed.). New York: Garland Science. pp.197-199.
- Ambrus, A., Chen, D., Dai, J., Bialis, T., Jones, R. A., & Yang, D. (2006). Human telomeric sequence forms a hybrid-type intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel strands in potassium solution. *Nucleic Acids Res*, 34(9), 2723-2735.
- Ambrus, A., Chen, D., Dai, J., Jones, R. A., & Yang, D. (2005). Solution structure of the biologically relevant G-quadruplex element in the human c-MYC promoter. Implications for G-quadruplex stabilization. *Biochemistry*, 44(6), 2048-2058.
- Amrane, S., Kerkour, A., Bedrat, A., Vialet, B., Andreola, M. L., & Mergny, J. L. (2014). Topology of a DNA G-quadruplex structure formed in the HIV-1 promoter: a potential target for anti-HIV drug development. *J Am Chem Soc*, 136(14), 5249-5252.
- Bartoli, S., Bazzicalupi, C., Biagini, S., Borsari, L., Bencini, A., Faggi, E., Valtancoli, B. (2009). Cu (II) complexation with an acridine-containing macrocycle. Assembly of water cluster chains within the cavity of tetranuclear metallomacrocycles. *Dalton Transactions*(7), 1223-1230.
- Bencini, A., Bianchi, A., Garcia-Espana, E., Giusti, M., Micheloni, M., & Paoletti, P. (1987). Solution chemistry of macrocycles. 5. Synthesis and ligational behavior toward hydrogen and copper (II) ions of the large polyazacycloalkane 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25-nonaazacycloheptacosane ([27] aneN₉). *Inorganic Chemistry*, 26(5), 681-684.
- Bidzinska, J., Cimino-Reale, G., Zaffaroni, N., & Folini, M. (2013). G-quadruplex structures in the human genome as novel therapeutic targets. *Molecules*, 18(10), 12368-12395.
- Bochman, M. L., Paeschke, K., & Zakian, V. A. (2012). DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures. *Nat Rev Genet*, 13(11), 770-780.
- Burge, S., Parkinson, G. N., Hazel, P., Todd, A. K., & Neidle, S. (2006). Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Res*, 34(19), 5402-5415.
- Caprio, V., Guyen, B., Opoku-Boahen, Y., Mann, J., Gowan, S. M., Kelland, L. M., . . . Neidle, S. (2000). A novel inhibitor of human telomerase derived from 10H-indolo [3, 2-b] quinoline. *Bioorg Med Chem Lett*, 10(18), 2063-2066.
- Caramelo-Nunes, C., Almeida, P., Marcos, J. C., & Tomaz, C. T. (2013). Specific recognition of supercoiled plasmid DNA by affinity chromatography using the intercalator DAPP as ligand. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 928, 121-124.

- Carbonell, E., Delgado-Pinar, E., Pitarch-Jarque, J., Alarcón, J., & García-España, E. (2013). Boehmite Supported Pyrene Polyamine Systems as Probes for Iodide Recognition. *The Journal of Physical Chemistry C*, 117(27), 14325-14331.
- Chang, T., Liu, X., Cheng, X., Qi, C., Mei, H., & Shangguan, D. (2012). Selective isolation of G-quadruplexes by affinity chromatography. *J Chromatogr A*, 1246, 62-68.
- Chang, Y. M., Chen, C. K., & Hou, M. H. (2012). Conformational changes in DNA upon ligand binding monitored by circular dichroism. *Int J Mol Sci*, 13(3), 3394-3413.
- Charmantray, F., & Martelli, A. (2001). Interest of acridine derivatives in the anticancer chemotherapy. *Current pharmaceutical design*, 7(17), 1703-1724.
- Chiron, J., & Galy, J.-P. (2003). Reactivity of the acridine ring: One-pot regioselective single and double bromomethylation of acridine and some derivatives. *Synlett*(15), 2349-2350.
- Cholewiński, G., Dzierzbicka, K., & Kołodziejczyk, A. M. (2011). Natural and synthetic acridines/acridones as antitumor agents: their biological activities and methods of synthesis. *Pharmacological Reports*, 63(2), 305-336.
- Clares, M. P., Aguilar, J., Aucejo, R., Lodeiro, C., Albelda, M. T., Pina, F., Seixas de Melo, J. (2004). Synthesis and H⁺, Cu²⁺, and Zn²⁺ coordination behavior of a bis (fluorophoric) bibrachial lariat aza-crown. *Inorganic Chemistry*, 43(19), 6114-6122.
- Cogoi, S., & Xodo, L. E. (2006). G-quadruplex formation within the promoter of the KRAS proto-oncogene and its effect on transcription. *Nucleic Acids Res*, 34(9), 2536-2549.
- Cuenca, F., Greciano, O., Gunaratnam, M., Haider, S., Munnur, D., Nanjunda, R., Neidle, S. (2008). Tri- and tetra-substituted naphthalene diimides as potent G-quadruplex ligands. *Bioorg Med Chem Lett*, 18(5), 1668-1673. doi: 10.1016/j.bmcl.2008.01.050
- Diogo, M., Queiroz, J., & Prazeres, D. (2001). Studies on the retention of plasmid DNA and Escherichia coli nucleic acids by hydrophobic interaction chromatography. *Bioseparation*, 10(4-5), 211-220.
- Diogo, M. M., Queiroz, J. A., & Prazeres, D. M. F. (2005). Chromatography of plasmid DNA. *Journal of Chromatography A*, 1069(1), 3-22.
- Dorman, C. J. (2006). DNA supercoiling and bacterial gene expression. *Science progress*, 89(3-4), 151-166.
- Ettre, L. S. (2003). MS Tswett and the invention of chromatography. *LC GC North America*, 21(5), 458-467.
- Ferguson, L. R., & Denny, W. A. (1991). The genetic toxicology of acridines. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 258(2), 123-160.
- Ferreira, G. N. (2005). Chromatographic approaches in the purification of plasmid DNA for therapy and vaccination. *Chemical engineering & technology*, 28(11), 1285-1294.
- Gellert, M., Lipsett, M. N., & Davies, D. R. (1962). Helix formation by guanylic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 48(12), 2013.

- Ghanem, A., Healey, R., & Adly, F. G. (2013). Current trends in separation of plasmid DNA vaccines: a review. *Anal Chim Acta*, *760*, 1-15.
- Ghosh, S., & Dasgupta, D. (2015). Quadruplex forming promoter region of c-myc oncogene as a potential target for a telomerase inhibitory plant alkaloid, chelerythrine. *Biochemical and biophysical research communications*, *459*(1), 75-80.
- Gonzalez, V., & Hurley, L. H. (2010). The c-MYC NHE III(1): function and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, *50*, 111-129.
- Hage, D. S., & Cazes, J. (2005). *Handbook of affinity chromatography*: CRC Press.
- Hampel, S. M., Sidibe, A., Gunaratnam, M., Riou, J. F., & Neidle, S. (2010). Tetrasubstituted naphthalene diimide ligands with selectivity for telomeric G-quadruplexes and cancer cells. *Bioorg Med Chem Lett*, *20*(22), 6459-6463.
- Han, H., & Hurley, L. H. (2000). G-quadruplex DNA: a potential target for anti-cancer drug design. *Trends in pharmacological sciences*, *21*(4), 136-142.
- Handbook, A. C. (2001). Principles and methods. *GE Healthcare*.
- Hardin, C. C., Watson, T., Corregan, M., & Bailey, C. (1992). Cation-dependent transition between the quadruplex and Watson-Crick hairpin forms of d (CGCG3GCG). *Biochemistry*, *31*(3), 833-841.
- Healthcare, G. (2006). *Hydrophobic interaction and reversed phase chromatography: Principles and methods*: GE Healthcare.
- Healthcare, G. (2007). Affinity chromatography principles and methods.
- Hirose, S., & Matsumoto, K. (2005). Possible roles of DNA supercoiling in transcription *DNA conformation and transcription* (pp. 138-143): Springer.
- Huber, C. G. (1998). Micropellicular stationary phases for high-performance liquid chromatography of double-stranded DNA. *Journal of Chromatography A*, *806*(1), 3-30.
- Huppert, J. L. (2008a). Four-stranded nucleic acids: structure, function and targeting of G-quadruplexes. *Chem Soc Rev*, *37*(7), 1375-1384.
- Huppert, J. L. (2008b). Hunting G-quadruplexes. *Biochimie*, *90*(8), 1140-1148.
- Huppert, J. L., & Balasubramanian, S. (2005). Prevalence of quadruplexes in the human genome. *Nucleic Acids Res*, *33*(9), 2908-2916.
- Kohn, J., & Wilchek, M. (1984). The use of cyanogen bromide and other novel cyanylating agents for the activation of polysaccharide resins. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *9*(3), 285-305.
- Lipps, H. J., & Rhodes, D. (2009). G-quadruplex structures: in vivo evidence and function. *Trends Cell Biol*, *19*(8), 414-422.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2000). DNA cloning with plasmid vectors.
- Luedtke, N. W. (2009). Targeting G-Quadruplex DNA with Small Molecules. *CHIMIA International Journal for Chemistry*, *63*(3), 134-139.
- Ma, D. L., Zhang, Z., Wang, M., Lu, L., Zhong, H. J., & Leung, C. H. (2015). Recent Developments in G-Quadruplex Probes. *Chem Biol*, *22*(7), 812-828.

- Manaye, S., Eritja, R., Avino, A., Jaumot, J., & Gargallo, R. (2012). Porphyrin binding mechanism is altered by protonation at the loops in G-quadruplex DNA formed near the transcriptional activation site of the human c-kit gene. *Biochim Biophys Acta*, 1820(12), 1987-1996.
- Martins, C., Gunaratnam, M., Stuart, J., Makwana, V., Greciano, O., Reszka, A. P., Neidle, S. (2007). Structure-based design of benzylamino-acridine compounds as G-quadruplex DNA telomere targeting agents. *Bioorg Med Chem Lett*, 17(8), 2293-2298.
- Mathad, R. I., Hatzakis, E., Dai, J., & Yang, D. (2011). c-MYC promoter G-quadruplex formed at the 5'-end of NHE III1 element: insights into biological relevance and parallel-stranded G-quadruplex stability. *Nucleic Acids Res*, 39(20), 9023-9033.
- Michaelidou, S. S., & Koutentis, P. A. (2010). Detosylation of 3-amino-1-tosylindole-2-carbonitriles using DBU and thiophenol. *Tetrahedron*, 66(16), 3016-3023.
- Miura, T., Benevides, J. M., & Thomas, G. J. (1995). A phase diagram for sodium and potassium ion control of polymorphism in telomeric DNA. *Journal of molecular biology*, 248(2), 233-238.
- Monchaud, D., & Teulade-Fichou, M. P. (2008). A hitchhiker's guide to G-quadruplex ligands. *Org Biomol Chem*, 6(4), 627-636.
- Monchaud, D., & Teulade-Fichou, M. P. (2010). G4-FID: a fluorescent DNA probe displacement assay for rapid evaluation of quadruplex ligands. *Methods Mol Biol*, 608, 257-271.
- Mountain, A. (2000). Gene therapy: the first decade. *Trends Biotechnol*, 18(3), 119-128.
- Murat, P., Singh, Y., & Defrancq, E. (2011). Methods for investigating G-quadruplex DNA/ligand interactions. *Chem Soc Rev*, 40(11), 5293-5307.
- Nagesh, N., Raju, G., Srinivas, R., Ramesh, P., Reddy, M. D., & Reddy, C. R. (2015). A dihydroindolizino indole derivative selectively stabilizes G-quadruplex DNA and down-regulates c-MYC expression in human cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1850(1), 129-140.
- Neidle, S. (2010). Human telomeric G-quadruplex: the current status of telomeric G-quadruplexes as therapeutic targets in human cancer. *FEBS J*, 277(5), 1118-1125.
- Neidle, S., & Balasubramanian, S. (2006). *Quadruplex nucleic acids* (Vol. 7): Royal Society of Chemistry.
- Pagano, B., Amato, J., Iaccarino, N., Cingolani, C., Zizza, P., Biroccio, A., Randazzo, A. (2015). Looking for efficient G-quadruplex ligands: evidence for selective stabilizing properties and telomere damage by drug-like molecules. *ChemMedChem*, 10(4), 640-649.
- Paritala, H., & Firestine, S. M. (2010). Characterization of insulin ILPR sequences for their ability to adopt a G-quadruplex structure. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 29(2), 81-90.
- Pfaunmiller, E. L., Paulemond, M. L., Dupper, C. M., & Hage, D. S. (2013). Affinity monolith chromatography: a review of principles and recent analytical applications. *Anal Bioanal Chem*, 405(7), 2133-2145.

- Phan, A. T. (2010). Human telomeric G-quadruplex: structures of DNA and RNA sequences. *FEBS J*, 277(5), 1107-1117.
- Pray, L. (2008). Discovery of DNA structure and function: Watson and Crick. *Nature Education*, 1(1), 100.
- Prazeres, D. M. F., & Ferreira, G. N. M. (2004). Design of flowsheets for the recovery and purification of plasmids for gene therapy and DNA vaccination. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 43(5), 609-624.
- Randazzo, A., Spada, G. P., & da Silva, M. W. (2013). Circular dichroism of quadruplex structures. *Top Curr Chem*, 330, 67-86.
- Riou, J. F., Guittat, L., Mailliet, P., Laoui, A., Renou, E., Petitgenet, O., Mergny, J. L. (2002). Cell senescence and telomere shortening induced by a new series of specific G-quadruplex DNA ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(5), 2672-2677.
- Rodriguez, R., Pantos, G. D., Goncalves, D. P., Sanders, J. K., & Balasubramanian, S. (2007). Ligand-driven G-quadruplex conformational switching by using an unusual mode of interaction. *Angew Chem Int Ed Engl*, 46(28), 5405-5407.
- Seenisamy, J., Rezler, E. M., Powell, T. J., Tye, D., Gokhale, V., Joshi, C. S., Hurley, L. H. (2004). The dynamic character of the G-quadruplex element in the c-MYC promoter and modification by TMPyP4. *Journal of the American Chemical Society*, 126(28), 8702-8709.
- Sousa, A., Sousa, F., & Queiroz, J. A. (2012). Advances in chromatographic supports for pharmaceutical-grade plasmid DNA purification. *J Sep Sci*, 35(22), 3046-3058.
- Sousa, F., Matos, T., Prazeres, D. M., & Queiroz, J. A. (2008). Specific recognition of supercoiled plasmid DNA in arginine affinity chromatography. *Anal Biochem*, 374(2), 432-434.
- Sousa, F., Prazeres, D. M., & Queiroz, J. A. (2008). Affinity chromatography approaches to overcome the challenges of purifying plasmid DNA. *Trends Biotechnol*, 26(9), 518-525.
- Sun, D., & Hurley, L. H. (2009). The importance of negative superhelicity in inducing the formation of G-quadruplex and i-motif structures in the c-Myc promoter: implications for drug targeting and control of gene expression. *J Med Chem*, 52(9), 2863-2874.
- Sun, H., Xiang, J., Shi, Y., Yang, Q., Guan, A., Li, Q., Xu, G. (2014). A newly identified G-quadruplex as a potential target regulating Bcl-2 expression. *Biochim Biophys Acta*, 1840(10), 3052-3057.
- Sundberg, L., & Porath, J. (1974). Preparation of adsorbents for biospecific affinity chromatography: I. Attachment of group-containing ligands to insoluble polymers by means of bifunctional oxiranes. *Journal of Chromatography A*, 90(1), 87-98.
- Svozil, D., Kalina, J., Omelka, M., & Schneider, B. (2008). DNA conformations and their sequence preferences. *Nucleic Acids Res*, 36(11), 3690-3706. doi: 10.1093/nar/gkn260
- Tran, P. L., De Cian, A., Gros, J., Moriyama, R., & Mergny, J. L. (2013). Tetramolecular quadruplex stability and assembly. *Top Curr Chem*, 330, 243-273.
- Urh, M., Simpson, D., & Zhao, K. (2009). Chapter 26 Affinity Chromatography. 463, 417-438.

- Wang, L.-X., Shang, Q., Li, Q., Xiang, J.-F., Liu, Y., Guan, A.-J., Tang, Y.-L. (2015). Pyridostatins selectively recognize two different forms of the human telomeric G-quadruplex structures and their anti-tumor activities in vitro. *Tetrahedron*, 71(30), 4982-4986.
- Wilchek, M., Oka, T., & Topper, Y. J. (1975). Structure of a soluble super-active insulin is revealed by the nature of the complex between cyanogen-bromide-activated sepharose and amines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(3), 1055-1058.
- Wolf, G. (2003). Friedrich Miescher: The man who discovered DNA. *Chemical Heritage*, 21(10-11), 37-41.
- Wong, A., & Wu, G. (2003). Selective binding of monovalent cations to the stacking G-quartet structure formed by guanosine 5'-monophosphate: a solid-state NMR study. *Journal of the American Chemical Society*, 125(45), 13895-13905.
- Wu, Y., Zan, L. P., Wang, X. D., Lu, Y. J., Ou, T. M., Lin, J., Gu, L. Q. (2014). Stabilization of VEGF G-quadruplex and inhibition of angiogenesis by quindoline derivatives. *Biochim Biophys Acta*, 1840(9), 2970-2977.
- Xiong, Y. X., Huang, Z. S., & Tan, J. H. (2015). Targeting G-quadruplex nucleic acids with heterocyclic alkaloids and their derivatives. *Eur J Med Chem*, 97, 538-551.
- Xu, Y., Noguchi, Y., & Sugiyama, H. (2006). The new models of the human telomere d[AGGG(TTAGGG)3] in K⁺ solution. *Bioorg Med Chem*, 14(16), 5584-5591.
- Xu, Y., & Sugiyama, H. (2006). Formation of the G-quadruplex and i-motif structures in retinoblastoma susceptibility genes (Rb). *Nucleic Acids Res*, 34(3), 949-954.
- Yin, F., Liu, J., Deng, X., & Wang, J. (2007). Effects of triethylene tetraamine on the G-quadruplex structure in the human c-myc promoter. *J Biochem*, 141(5), 669-674.
- Zhang, C., Liu, H. H., Zheng, K. W., Hao, Y. H., & Tan, Z. (2013). DNA G-quadruplex formation in response to remote downstream transcription activity: long-range sensing and signal transducing in DNA double helix. *Nucleic Acids Res*, 41(14), 7144-7152.
- Zhang, S., Wu, Y., & Zhang, W. (2014). G-quadruplex structures and their interaction diversity with ligands. *ChemMedChem*, 9(5), 899-911.
- Zheng, K.-w., Xiao, S., Liu, J.-q., Zhang, J.-y., Hao, Y.-h., & Tan, Z. (2013). Co-transcriptional formation of DNA: RNA hybrid G-quadruplex and potential function as constitutional cis element for transcription control. *Nucleic Acids Res*, 41(10), 5533-5541.
- Zhou, J.-L., Lu, Y.-J., Ou, T.-M., Zhou, J.-M., Huang, Z.-S., Zhu, X.-F., Gu, L.-Q. (2005). Synthesis and evaluation of quindoline derivatives as G-quadruplex inducing and stabilizing ligands and potential inhibitors of telomerase. *Journal of medicinal chemistry*, 48(23), 7315-7321.