

Analisi Spettroscopica Della Stabilità Termica Di Sequenze Dimeriche Di G-Quadruplex In Presenza Di Ligandi



A.D. 1308
unipg

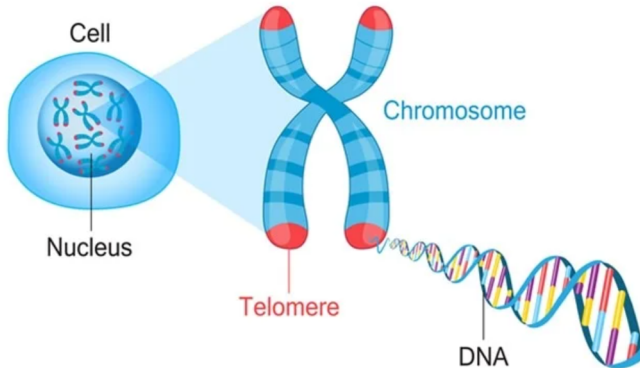
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DI PERUGIA

CANDIDATO:
Leonardo Suvieri

RELATORI:
Prof. Alessandro Paciaroni
Dott.ssa Valeria Libera

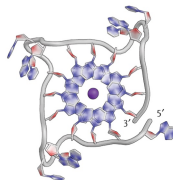
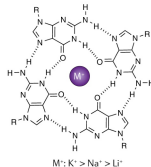
TELOMERI

- Sequenze di DNA non codificanti
- Regioni terminali dei cromosomi
- La sequenza di riferimento è TTAGGG
- Telomerasi (enzima)

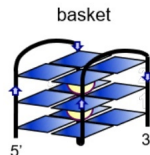
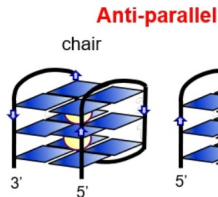
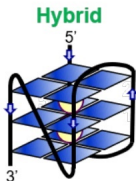
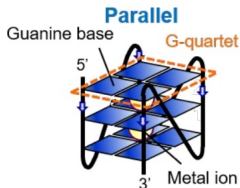


G-QUADRUPLEX TELOMERICI

I **G-Quadruplex** sono complessi che si formano in regioni ad alta concentrazione guaninica



Si dividono in **paralleli**, **ibridi** e **antiparalleli**



Monomero

- G-Staking
- esempio: Tel22

Multimeri

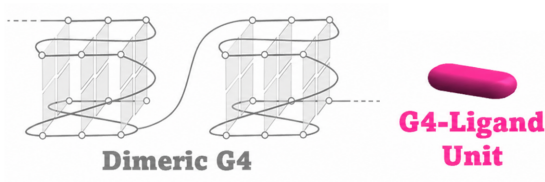
- struttura a “perle su filo”
- si aggiungono gradi di libertà
- esempio: Tel50



G-QUADRUPLEX

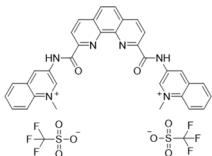
La stabilità dei G-Quadruplex è legata:

- alla sequenza di DNA
- al pH
- al catione
- ambiente cellulare
 - ↳ PEG200
 - macromolecular crowder
 - polimero inerte
- ligandi → Phen-DC3
 - SYUIQ-5



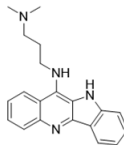
Phen-DC3

- nucleo rigido di fenantrilina a cui sono legati due gruppi quinolinio
- fornisce molta stabilità e si lega indipendentemente dalla configurazione assunta dai G4



SYUIQ-5

- nucleo aromatico a cui è legata una catena laterale amminica dimetilata
- molecola planare



Entrambi i ligandi:

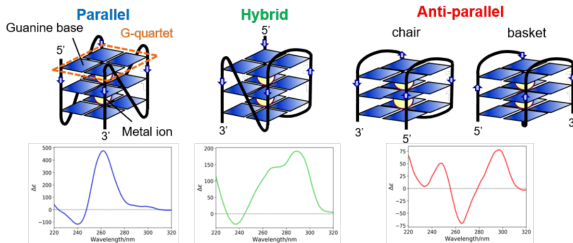
- si legano per π – *stacking*
- stabilizzano i G4 e riducono l'azione della telomerasi

DICROISMO CIRCOLARE (CD)

Definizione

Fenomeno spettroscopico tale per cui, la componente destra e quella sinistra di un fascio luminoso polarizzato circolarmente, vengono assorbite in maniera diversa.

$$\theta(\text{gradi}) = 180 \cdot \ln 10 \cdot \frac{\Delta A}{4\pi} = 32.98 \cdot \Delta A \quad (1)$$



Molecola nativa \Rightarrow Molecola denaturata

- L'andamento del processo permette di definire la stabilità della molecola studiata
- Si è considerato un processo di **denaturazione a due stati**, modellizzazione che prevede:
 - che solamente lo stato nativo e quello denaturato sono indicativi del sistema
 - una *temperatura di melting*

Equazione della denaturazione a due stati

$$\text{segnale} = \frac{\alpha + \beta \exp\left[-\frac{H}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m}\right)\right]}{\exp\left[-\frac{H}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m}\right)\right] + 1} \quad (2)$$

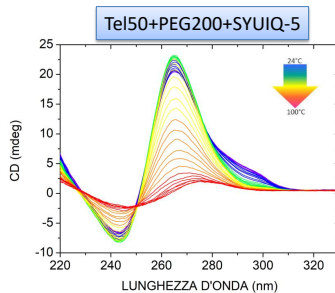
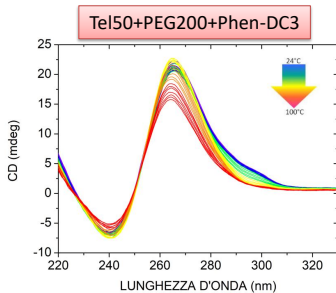
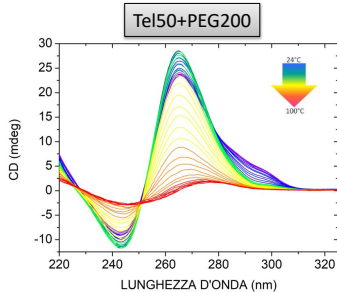
Per i campioni utilizzati:

- PEG200 al 40%
- rapporto molare [DNA:Ligando] = [1:3], con una concentrazione di Tel50 di $15\text{ }\mu\text{M}$ e una di ligando pari a $45\text{ }\mu\text{M}$

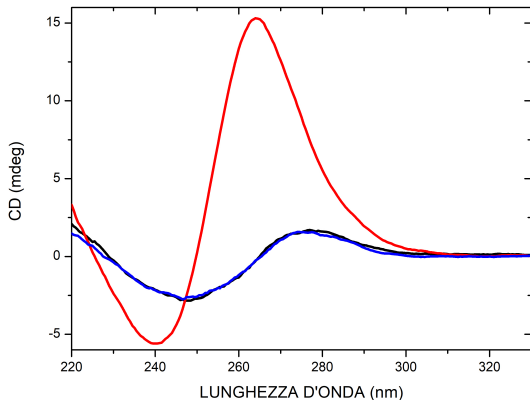
Procedura adottata:

- le misure dell'ellitticità sono state effettuate attraverso uno spettropolarimetro (Jasco V810) e ripetute incrementando la temperatura di 2°C ad ogni misura, coprendo così l'intervallo [24°C ; 100°C]
- i dati ottenuti sono poi stati utilizzati per la creazione di grafici del segnale CD in funzione di temperatura e lunghezza d'onda

CD IN FUNZIONE DELLA TEMPERATURA



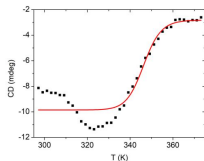
CONFRONTO AD ALTE TEMPERATURE



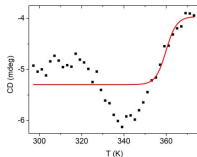
Segnale di CD in funzione della lunghezza d'onda delle soluzioni di Tel50 a 100°C. In nero il segnale di Tel50+PEG200; in rosso il segnale di Tel50+PEG200+Phen-DC3; in blu il segnale di Tel50+PEG200+SYUIQ-5.

SEGNALE CD A LUNGHEZZA D'ONDA FISSATA

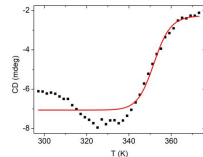
Tel50+PEG200



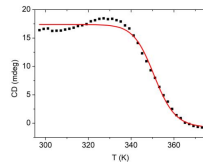
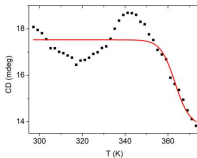
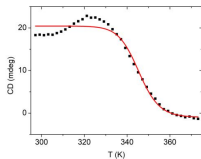
Tel50+PEG200+Phen-DC3



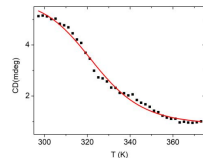
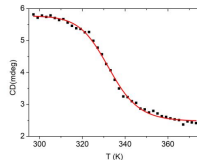
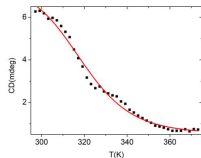
Tel50+PEG200+SYUIQ-5



$\lambda=245\text{nm}$



$\lambda=260\text{nm}$



$\lambda=290\text{nm}$

DATI ESTRAPOLATI DAI FIT

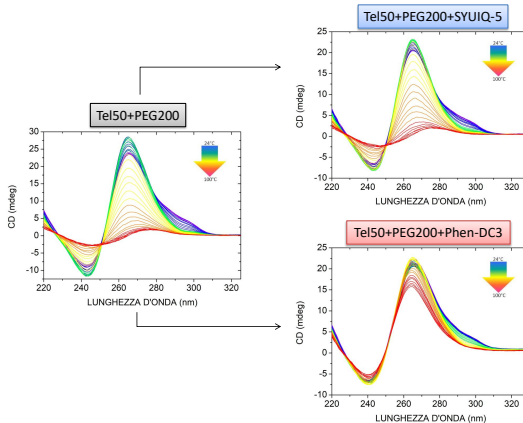
	$\lambda (nm)$	$T_m (K)$
Tel50+PEG200	$\lambda = 245$	346 ± 1
	$\lambda = 260$	345 ± 1
	$\lambda = 290$	319 ± 1
Tel50+PEG200+Phen-DC3	$\lambda = 245$	360 ± 2
	$\lambda = 260$	363 ± 2
	$\lambda = 290$	333 ± 1
Tel50+PEG200+SYUIQ-5	$\lambda = 245$	352 ± 1
	$\lambda = 260$	351 ± 1
	$\lambda = 290$	323 ± 1

CONCLUSIONI

1. Il processo di denaturazione avviene per **stati intermedi**.
2. L'andamento del segnale dicroico in funzione della temperatura, osservato a due diverse lunghezze d'onda (245 nm e 260 nm), suggerisce che il processo possa essere descritto con buona approssimazione mediante un **modello a due stati**, consentendo così una stima affidabile delle temperature di melting.

Campione	$T_m(K)$
Tel50+PEG200	346 ± 1
Tel50+PEG200+Phen-DC3	362 ± 2
Tel50+PEG200+SYUIQ-5	352 ± 1

3. I ligandi ricoprono un **ruolo centrale** nella stabilità delle molecole di G-Quadruplex e di conseguenza nella ricerca contro i tumori.



GRAZIE PER L'ATTENZIONE



A.D. 1308
unipg

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI
DI PERUGIA

	$\lambda (nm)$	$T_m (K)$	$\Delta H (kcal \cdot mol^{-1})$	χ^2
Tel50+PEG200	$\lambda = 245$	346 ± 1	$29,7 \pm 7.1$	0.8
	$\lambda = 260$	345 ± 1	$25,0 \pm 2.7$	1.7
	$\lambda = 290$	319 ± 1	$8,6 \pm 0.8$	0.1
Tel50+PEG200+Phen-DC3	$\lambda = 245$	360 ± 2	$52,3 \pm 38,2$	0.17
	$\lambda = 260$	363 ± 2	$38,7 \pm 17,1$	0.40
	$\lambda = 290$	333 ± 1	$15,8 \pm 0.6$	0.01
Tel50+PEG200+SYUIQ-5	$\lambda = 245$	352 ± 1	$31,5 \pm 6,9$	0.28
	$\lambda = 260$	351 ± 1	$25,2 \pm 2,0$	0.57
	$\lambda = 290$	323 ± 1	$8,885 \pm 0.8$	0.02