

**SONDY FLUORESCENCYJNE TYPU „LIGHT UP”  
DO DETEKЦИИ I BIOOBRAZOWANIA  
G-KWADRUPLEKSÓW *IN VITRO* I *IN VIVO*  
(CZĘŚĆ 1 I 2)**

**LIGHT UP FLUORESCENT PROBES FOR  
DETECTION AND VISUALIZING  
THE G-QUADRUPLEXES *IN VITRO* AND *IN VIVO*  
(PART 1 AND 2)**

**Daniel Baranowski**

*Zakład Biomolekularnego NMR, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN  
Ul. Z. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań  
\*e-mail: daniel.baranowski@ibch.poznan.pl*

---

Abstract

Wykaz stosowanych skrótów

Wprowadzenie

1. Mechanizmy oddziaływania liganda z G-kwadrupleksem
2. Rodzaje sond fluorescencyjnych
3. Sondy fluorescencyjne typu „light up”
  - 3.1. Barwniki polimetinowe (1-13)
  - 3.2. Pochodne benzotiazolu (14-17)
  - 3.3. Pochodne bis-benzimidazolu (18-19)
  - 3.4. Pochodne etydyny (20)
  - 3.5. Pochodne karbazolu (21-33)
  - 3.6. Pochodna fenantroliny (34)
  - 3.7. Pochodna bis(4-aminobenzylideno)acetonu (35)

- 3.8. Pochodne bis-indolu (36-37)
- 3.9. Pochodne styrylo-n-alkilochinoliny (38-40)
- 3.10. Pochodne 3,6-diaminoakrydyny (41)
- 3.11. Pochodne tetrafenylotenu (42-43)
- 3.12. Związki pochodzenia naturalnego (44-48)
- 3.13. Pochodne trifenyloetanu i trifenyloaminy (49-56)
- 3.14. Barwniki skwarynowe (57-60)
- 3.15. Pochodne naftalenodiimidu (61-63)
- 3.16. Pochodne triangulenu (64)
- 3.17. Organiczne związki boru (65)
- 3.18. Pochodne N-metyloimidazol-5-onu (66)
- 3.19. Koniugaty kumaryny i chinazoliny (67)
- 3.20. Pochodne triaryloimidazolu (68-72)
- 3.21. Pochodne porfiryn i ftalocyjanin (73-78)
- 3.22. Kompleksy platyny (II) i rutenu (II) (79-87)
- 3.23. Ligandy fluorescencyjne wiążące się do G-kwadrupeksów RNA (88-92)

Tabela 1. Podsumowanie właściwości sond fluorescencyjnych wiążących się do G-kwadrupeksów DNA/RNA


Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane

---

**Dr Daniel Baranowski** od roku 1997 pracuje w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu gdzie w 2007 roku uzyskał stopień doktora nauk chemicznych pod kierunkiem profesor Bożenny Golankiewicz. W roku 2001 odbył dwa trzymiesięczne staże naukowe w Słoweńskim Centrum NMR w Ljubljanie pod kierunkiem profesora Janeza Plavec, natomiast roku 2009-2010 odbył roczny staż podoktorski w grupie profesora Akiry Matsudy w Uniwersytecie Hokkaido w Sapporo. Obecnie zainteresowania naukowe dotyczą zagadnień związanych z oddziaływaniem G-kwadrupeksów z 3,6,9-tripodstawionymi pochodnymi 9H-karbazolu a także zastosowaniem spektroskopii NMR do badań strukturalnych modyfikowanych nukleozydów oraz związków pochodzenia naturalnego.



 <https://orcid.org/0000-0002-4346-4804>

**ABSTRACT**

G-quadruplexes are non-canonical guanosine rich four stranded nucleic acids structures consisting of at least two or more G-tetrads stabilized by an array of Hoogsteen hydrogen bonds and monovalent cations. The distinguishing feature of the G-quadruplexes is their high thermal stability and structural polymorphism in aqueous media. In parallel, a great number of GQ structures have been extensively surveyed *ex vivo* by means of biophysical techniques such as nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, circular dichroism (CD) spectroscopy, and X-ray crystallography. Accumulating evidence suggesting that G-quadruplexes play essential role in a numerous biological processes *in vivo*, including DNA replication and transcription, RNA translation as well as genomic maintenance. Consequently, G-quadruplexes has attracted attention as therapeutic targets in cancer or hereditary diseases as well as molecular target in cellular biology. Study on G-quadruplexes:ligand interaction by NMR, CD, UV and fluorescence spectroscopy *in vitro* or *in vivo* has become an intensive research work area of many groups in recent years. Nowadays, there are available large amount of organic compounds that selectively bind to G-quadruplexes and their photophysical and kinetic properties were comprehensively characterized but only few of them are endowed with fluorescence properties that could be applicable as fluorescent probes in cellular biology or *in vitro* detection. Interestingly, the group of these fluorescent probes is characterized by a vast structural diversity resulting from the different way of interaction with G-quadruplexes as well as G-quadruplex polymorphism. This review focuses on the G-quadruplex-selective light up fluorescent probes that have been employed for *in vitro* detection as well as cellular imaging along with a summary of the key photophysical, biophysical, and biological properties of reported examples.

Keywords: G-quadruplexes, fluorescence, G-quadruplex binding ligand, fluorescent probes, cellular imaging, *in vitro* detection

Słowa kluczowe: G-kwadrupeksy, fluorescencja, ligandy wiążące się do G-kwadrupeksu, sondy fluorescencyjne, obrazowanie komórkowe, detekcja *in vitro*

---

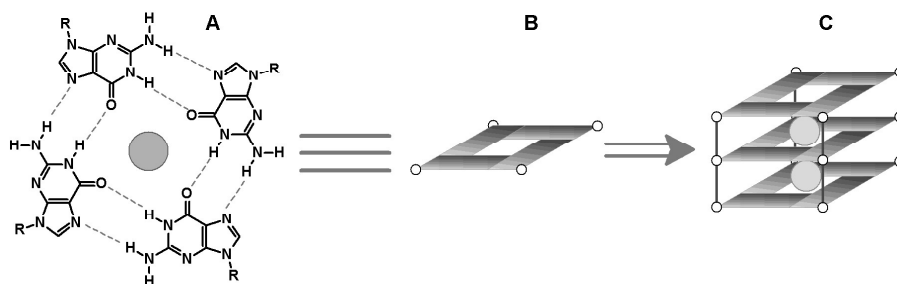
---

**WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW**

FLIM	– (ang. <i>Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy</i> ) – mikroskopia obrazowania czasów życia fluorescencji
FRET	– (ang. <i>Förster Resonance Energy Transfer</i> ) – bezpromienisty rezonansowy transfer energii
NMR	– (ang. <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> ) – magnetyczny rezonans jądrowy
CD	– (ang. <i>Circular Dichroism</i> ) – dichroizm kołowy
FID	– (ang. <i>fluorescence intercalator displacement</i> ) test wypierania interkalatora fluorescencyjnego
LOD	– (ang. <i>limit of detection</i> ) granica wykrywalności

## WPROWADZENIE

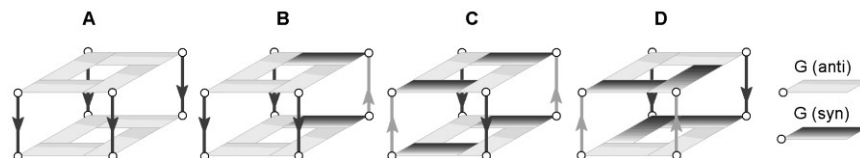
G-kwadrupleksy są to struktury stabilizowane wiązaniami wodorowymi typu Hoogstena o całkowicie odmiennej geometrii od powszechnie występujących typu Watsona-Cricka. (Rys 1) Cechą szczególną wiązania wodorowego typu Hoogstena jest uczestnictwo w nim atomu azotu  $N^7$  puryny jako akceptora wiązania wodorowego. Dodatkowo w wiązaniu typu Hoogstena mogą uczestniczyć atomy tlenu  $O^6$  jako akceptor lub atom azotu  $N^6$  jako donor odpowiednio w reszcie guaniny lub adeniny. W przypadku G-kwadrupleksów osiem wiązań wodorowych tworzących się wzdłuż krawędzi Hoogstena jak i Watsona-Cricka pomiędzy atomami  $N^1H-O^6$  i  $N^2H-N^7$  każdej z reszty guaniny prowadzą do planarnej aranżacji czterech reszt guaniny i utworzenia się podstawowej jednostki G-kwadrupleksu zwanej G-tetradą. [1] (Rys 1) Układ składający się z co najmniej dwóch i więcej G-tetrad usytuowanych jedna nad drugą tworzy G-kwadrupleks. Oddziaływania warstwowe pomiędzy G-tetradami oraz obecność kationów sodu, potasu lub amonu w centrum G-kwadrupleksu są odpowiedzialne za trwałość czteroniciowej formy. Cechą charakterystyczną G-kwadrupleksów jest polimorfizm strukturalny, który wynika z różnorodności sposobów zwinienia się nici DNA lub RNA bogatych odpowiednio w reszty dG lub rG.



Rysunek 1. G-tetrad stabilizowana przez osiem wiązań wodorowych i centralnie umieszczony kation sodu lub potasu (A). Pojedyncza G-tetrad (B). Schematyczny model czteroniciowego G-kwadrupleksu zbudowanego z trzech oddziałujących warstwowo G-tetrad (C)

Figure 1. G-tetrad stabilized by an array of Hoogsteen hydrogen bonds and centrally localized sodium or potassium cation (A). Single G-tetrad (B). Schematic diagram of four stranded G-quadruplex consisting of three G-tetrads stabilized by stacking interaction (C)

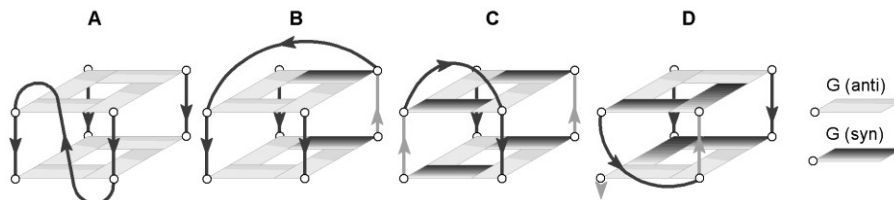
Wprowadzono podział G-kwadrupleksów na podgrupy stosując dwa kryteria klasyfikacji: liczbę nici tworzących wyżej wymienioną formę oraz ich kierunkowość. (Rys. 2)



Rysunek 2. Typy kwadrupleksów: równoległy (A), typu hybryda 3+1 (B), antyrównoległy typu anti-syn-anti-syn (C), antyrównoległy typu anti-anti-syn-syn (D)

Figure 2. Types of G-quadruplexes: parallel (A), hybrid-type 3+1 (B), antiparallel anti-syn-anti-syn (C), antiparallel anti-anti-syn-syn (D)

Pierwsze kryterium pozwala wyróżnić G-kwadrupleksy jednocząsteczkowe, dwucząsteczkowe lub czterocząsteczkowe. Kierunkowość nici określa sposób ich aranżacji względem siebie w obrębie G-kwadrupleksu. Ułożenie wszystkich nici w tym samym kierunku prowadzi do utworzenia G-kwadrupleksu równoległego, który uwzględniając pierwsze kryterium, może być jedno- dwu- lub czterocząsteczkowy. G-kwadrupleksy antyrównoległe powstają gdy jedna lub dwie nici przyjmują kierunkowość przeciwną do pozostałych co w rezultacie prowadzi do trzech możliwych podtypów antyrównoległej aranżacji nici. Pierwsze dwa podtypy obejmują kwadrupleksy, w których dwie nici mają kierunkowość przeciwną do pozostałych (2+2). Różnica między dwoma podtypami jest subtelna i polega na tym, że dwie przekątne nici mogą przyjąć tę samą kierunkowość nici lub przeciwną. (Rys 3) Trzecim podtypem antyrównoległego G-kwadrupleksu jest układ hybrydowy (3+1), w którym trzy nici są ułożone w tym samym kierunku a czwarta w przeciwnym. Ponadto, w G-kwadrupleksach występują pętle czyli fragmenty nici nie uczestniczące w tworzeniu się G-tetrad. Charakter pętli jest zdeterminowany kierunkowością nici. W przypadku antyrównoległych G-kwadrupleksów występują pętle boczne, przekątne lub zewnętrzne, natomiast w równoległych tylko pętle zewnętrzne. Kierunkowość nici jest wzajemnie zależna z orientacją *syn/anti* wokół wiązania glikozydowego guanozyn biorących udział w G-tetrady. W równoległych G-kwadrupleksach wszystkie reszty guaninowe tworzące G-tetradę muszą mieć tę samą orientację względem reszty cukrowej (*anti* lub *syn*), natomiast dla antyrównoległego ułożenia się nici konieczne jest występowanie mieszanych orientacji *syn/anti* w obrębie każdej G-tetrady.



Rysunek 3. Cztery typy pętli w G-kwadrupleksach: pętla zewnętrzna (A), pętla przekątna (B), pętla boczna (C), pętla w kształcie litery V (D)

Figure 3. Four types of linking loops: double chain reversal (A), diagonal (B), edgewise (C), V-shaped (D)

Biologiczna funkcja G-kwadrupeksu zależy od jego lokalizacji w komórce. G-kwadrupeksy DNA występują w biologicznie istotnych dla komórki miejscach takich jak telomery, regiony promotorowe genów onkogennych, krótkie powtórzenia mikro- i minisatelitarne oraz miejsca szczególnie podatne na mutacje (ang. *hot spots*). Telomery zbudowane są z wielokrotnych powtórzeń typu  $d(TTAGGG)_n$  i znajdują się na końcach chromosomów. G-kwadrupeksy telomerowe hamują aktywność telomerazy, co próbuje się wykorzystać w terapii antynowotworowej. Z kolei G-kwadrupeksy DNA występujące w regionach promotorowych mogą być zaangażowane w regulację ekspresji genów. Natomiast G-kwadrupeksy RNA mogą występować w telomerowym RNA (TERRA), w obrębie intronów oraz w różnych regionach mRNA, najczęściej jednak w regionie 5'-UTR w pobliżu miejsca startu translacji. Funkcja G-kwadrupeksów RNA w komórce jest wielopoziomowa i nadal stanowi przedmiot intensywnych badań. Zwijanie nici RNA bogatych w reszty guanozynowe w G-kwadrupeksy oraz ich rozplatanie jest procesem dynamicznym i kontrolowanym przez różnorodne białka. Złożoność interakcji białek z G-kwadrupeksami RNA wynika z częstego ich występowania w regionach kodujących i niekodujących mRNA, co przekłada się na udział w procesach translacji i metabolizmie RNA. Ponadto, stwierdzono udział G-kwadrupeksów RNA w regulacji splicingu, transporcie mRNA z miejsca transkrypcji do miejsca translacji, co jest szczególnie istotne w komórkach asymetrycznych takich jak komórki nerwowe. [2,3,4,5]

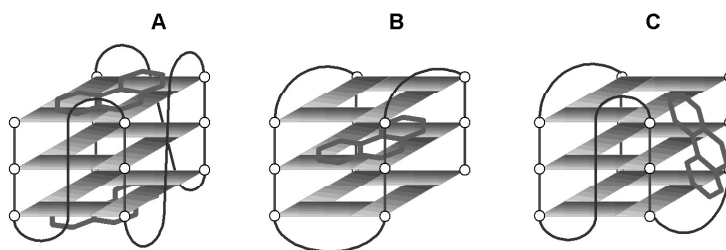
Z biegiem lat różne metody analityczne, takie jak spektroskopia absorpcyjna UV-Vis, spektroskopia dichroizmu kołowego (CD), elektroforeza żelowa, kalorymetria izotermiczna (ITC), analiza spektrometrii mas, krystalografia rentgenowska i spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) znalazły zastosowanie do badań struktur G-kwadrupeksów DNA/RNA i ich interakcji z małymi cząsteczkami. [6,7,8] Jednak większość z tych molekularnych narzędzi działa tylko *in vitro* i jest nieodpowiednia w warunkach *in vivo*. Aby zbadać strukturalne i funkcjonalne aspekty G-kwadrupeksów w komórce, konieczne jest zaprojektowanie i otrzymanie sond, których własności spektroskopowe ulegałyby zmianie po interakcji z docelową strukturą G-kwadrupeksu. Pod tym względem spektroskopia fluorescencyjna stała się potężnym narzędziem w biologii komórki i odgrywa istotną rolę w aktualnych badaniach, obejmujących zastosowania w obrazowaniu biologicznym i diagnostyce.

### 1. MECHANIZMY ODDZIAŁYWANIA LIGANDA Z G-KWADRUPLEKSEM

Ligandy selektywne względem G-kwadrupeksów mogą oddziaływać na dwa sposoby. Pierwszy sposób zdeterminowany jest planarną strukturą G-tetrazy i opiera się na oddziaływaniach warstwowych (ang.  *$\pi$ -stacking*) wyżej wymienionego układu ze sztywnym, aromatycznym fragmentem cząsteczki liganda lub przez interkalację pomiędzy wewnętrzną G-tetradą. (Rys. 4A, 4B)



Oddziaływanie warstwowe może być dodatkowo stabilizowane przez interakcję liganda z pętlami G-kwadupleksu lub poprzez łączenie się G-kwadupleksów w większe struktury przedzielanych cząsteczkami liganda. Drugi mechanizm polega na elektrostatycznym oddziaływaniu liganda z bruzdami lub pętlami G-kwadupleksu. (Rys 4C) W tym sposobie oddziaływania istotne jest, aby cząsteczka posiadała polarne grupy funkcyjne oraz zdolność do zmian konformacyjnych pozwalających na optymalną interakcję z grupami fosforanowymi. Wypadkowy mechanizm oddziaływania liganda z G-kwadupleksem może również mieć charakter mieszany i być rezultatem jednoczesnego wystąpienia obu rodzajów interakcji.



Rysunek 4. Mechanizmy oddziaływania liganda z G-kwadupleksami: oddziaływanie warstwowe (A), interkalacja (B), oddziaływanie elektrostatyczne w rejonie bruzdy (C)

Figure 4. Mechanisms of ligand G-quadruplex interaction: stacking (A), intercalation (B), electrostatic in the groove region (C)

## 2. RODZAJE SOND FLUORESCENCYJNYCH

Związki fluorescencyjne selektywne względem G-kwadupleksów można podzielić na trzy klasy, stosując jako kryterium zmianę natężenia emisji fluorescencji liganda po przyłączeniu się do G-kwadupleksu. Ligandy typu „light up” wykazują wzrost fluorescencji, z kolei typu „light off” charakteryzują się wygaszaniem fluorescencji po wiązaniu się do G-kwadupleksu. Ostatnia grupa związków obejmuje ligandy sprzężone ze znacznikami fluorescencyjnymi. Ze względu na znacznie większą aplikowalność w obrazowaniu biologicznym i diagnostyce, w niniejszym artykule omówię jedynie sondy typu „light up” mając również na uwadze ich jak największą różnorodność strukturalną.

Efekt wzmocnienia fluorescencji sondy typu „light up” indukowany przez związanie się do G-kwadupleksu może być rezultatem następujących mechanizmów molekularnych:

- a) zahamowania rotacji wewnątrzcząsteczkowej z utworzeniem planarnego układu aromatycznego (RIR – ang. *restriction of internal rotation*, 1-40, 49-50, 52-56, 66, 68-71, 88-91)

- b) emisji indukowanej agregacją cząsteczek liganda wokół G-kwadrupleksu (AIE – ang. *aggregation induced emission*, **42-43**)
- c) emisji indukowanej rozpadem nieemisyjnych agregatów cząsteczek liganda (**57-63, 67**)
- d) dezaktywacji bezpromienistego przejścia energii indukowanego rozpuszczalnikiem (**20, 73-87**)
- e) molekularnej rearanżacji podstawników cząsteczki liganda (**92**)

Sondy fluorescencyjne do obrazowania struktur obecnych w komórce, w tym G-kwadrupleksów, muszą charakteryzować się następującymi właściwościami: (i) specyficzność rozpoznania struktury docelowej lub sekwencji, (ii) wysoka stała wiązania, (iii) przenikalność przez błony komórkowe, (iv) dobra rozpuszczalność w wodzie, (v) wzrost emisji fluorescencji (vi) wysoka wydajność kwantowa, (vii) wysoka fotostabilność (viii) niska cytotoxyczność.

### 3. SONDY FLUORESCENCYJNE TYPU „LIGHT UP”

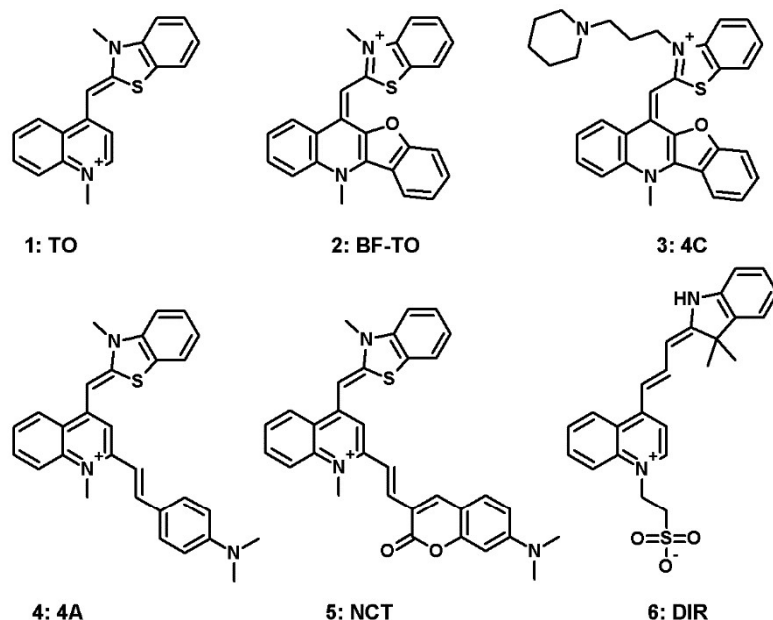
Ze względu na bardzo dużą różnorodność strukturalną sondy fluorescencyjne typu „light up” można podzielić na kilkanaście grup, stosując jako kryterium obecność wspólnego elementu strukturalnego. Wyjątkiem w tym podziale jest grupa ligandów selektywnych względem G-kwadrupleksów RNA, którą została wyodrębniona ze względu na małą ilość przykładów. Podsumowanie najważniejszych właściwości wszystkich związków omówionych w niniejszym artykule zostały zebrane w tabeli 1.

- barwniki polimetinowe (cyjaninowe) (**1-13**)
- pochodne benzotiazolu (**14-17**)
- pochodne bis-benzimidazolu (**18-19**)
- pochodna etydyny (**20**)
- pochodne karbazolu: mono-, di- lub tripodstawione w pozycjach 3,6,9 (**21-33**)
- pochodna fenantroliny (**34**)
- pochodna bis(4-aminobenzylideno)acetonu (**35**)
- pochodne bis-indolu (**36-37**)
- pochodne styrylo-N-alkilochinolin (**38-40**)
- pochodne 3,6-diaminoakrydyny (**41**)
- pochodne tetrafenylotenu (**42-43**)
- związki pochodzenia naturalnego (**44-48**)
- pochodne trifenylometanu i trifenylaminy (**49-56**)
- barwniki skwarynowe (**57-60**)
- pochodne naftalenodiimidu (**61-63**)

- pochodne triangulenu (64)
- organiczne związki boru (65)
- pochodne N-metyloimidazol-5-onu (66)
- koniugaty kumaryny i chinazoliny (67)
- pochodne triaryloimidazolu (68-72)
- pochodne porfiryn i ftalocyjanin (73-78)
- kompleksy platyny(II) i rutenu(II) (79-87)
- ligandy fluorescencyjne wiążące się do G-kwadrupeksów RNA (88-92)

### 3.1. BARWNIKI POLIMETINOWE (1-13)

Barwniki polimetinowe składają się ze sprzężonego układu opartego na łańcuchu polimetinowym łączącym dwa układy heterocykliczne zawierające atom azotu. Długość łańcucha polimetinowego i charakter heterocykli determinują właściwości spektroskopowe tych barwników. (Rys 5 i 6) Oranż tiazolowy (TO, **1**) jeden z powszechnie stosowanych barwników polimetinowych charakteryzuje się szerokim zakresem powinowactwa do większości form kwasów nukleinowych wykazując 50-3000 krotne wzmocnienie fluorescencji ( $\lambda_{em}=540$  nm) w zależności od konformacji i sekwencji kwasów nukleinowych.[9] W swojej strukturze zawiera N-metylobenzotiazol sprzęgnięty pojedynczym mostkiem metinowym z N-metylochinolimą. W przypadku jednocząsteczkowych G-kwadrupeksów (c-myc, c-kit, CEB1) obserwowano 500-3000 krotne wzmocnienie fluorescencji TO, z kolei dla oddziaływania TO z czteroniciowymi równoległymi G-kwadrupeksami uzyskano znacznie słabsze, 60-70 krotne wzmocnienie fluorescencji. Własności fluorescencyjne TO znalazły zastosowanie w badaniu konformacji G-kwadrupeksów z użyciem eksperymentu FRET (ang. *Förster Resonance Energy Transfer*) oraz badaniu mechanizmu interakcji ligand:G-kwadrupeks w eksperymentach FID (FID – ang. *fluorescence intercalator displacement*). Zbliżone wartości powinowactwa TO do dupleksów DNA i G-kwadrupeksów stanowią istotne ograniczenia stosowania TO do selektywnej wizualizacji G-kwadrupeksów w komórkach. Wprowadzenie różnego rodzaju modyfikacji do układu oranżu tiazolowego w sposób znaczący przesunęło powinowactwo szkieletu TO w stronę G-kwadrupeksów przy zachowaniu własności fluorescencyjnych. Zwiększenie powierzchni aromatycznego układu N-metylochinoliny poprzez sprzężenie z benzofuranem w **2** zwiększyło selektywność związku wobec G-kwadrupeksów (c-myc i telo21) oraz zaobserwowano wzrost wydajności kwantowej (150 i 208 krotny).[10] Ligand ten barwił G-kwadrupeksy RNA i DNA w utrwalonych komórkach MCF7. Zdecydowanie lepsze własności selektywności i powinowactwa w porównaniu z **2** uzyskano dla **3**, związku zawierającego



Rysunek 5. Barwniki polimetinowe (1-6)

Figure 5. Polymethine dyes (1-6)

podstawnik (piperdyn-1-ylo)propyłu w miejsce grupy metylowej. W obecności antyrównoległego G-kwadrupeksu HRAS, związek **3** wykazywał 380-krotne wzmocnienie fluorescencji, silny efekt stabilizujący HRAS ( $\Delta T_m = 25^\circ\text{C}$ ) oraz stałą wiązania  $K_D \sim 0.89 \mu\text{M}$ . Niska wartość granicy wykrywalności (0.18 nM; LOD – ang. *limit of detection*) oraz dobra przenikalność przez błony komórkowe związku **3** pozwoliła na wizualizację G-kwadrupeksów DNA w linii komórkowej PC3.[11] Wprowadzenie elastycznego podstawnika p-dimetyloaminostyrylu w pozycji orto N-metylocholinoliny (**4**) nieznacznie poprawiło stałą wiązania do G-kwadrupeksu telo21 ( $K_D \sim 1.0 \mu\text{M}$ ) w porównaniu z **2**. Ponadto, stwierdzono silny efekt stabilizujący telo21 ( $\Delta T_m = 8-30^\circ\text{C}$ , w zależności od stosunku stężeń telo21 do **4**) oraz 270-krotne wzmocnienie fluorescencji.[12] Obraz z mikroskopu konfokalnego komórek PC3 po traktowaniu związkiem **4** wykazał silne wzmocnienie fluorescencji tylko w jąderku, sugerując obecność G-kwadrupeksów w trakcie procesu transkrypcji. Związek **5** będący koniugatem TO i kumaryny podstawionej w pozycji 7 charakteryzował się największym przesunięciem  $\lambda_{em}$  względem TO (650 nm vs 540 nm) oraz 110-250-krotnym wzmocnieniem fluorescencji w obecności G-kwadrupeksów o różnej topologii. Obserwacja linii komórkowych HeLa potraktowanych **5**, wykazała zdecydowaną preferencję tego liganda do G-kwadrupeksów zlokalizowanych w mitochondriach.[13] Z kolei w cząsteczce **6** wydłużono linker metinowy do trzech reszt, który sprzęga układ dimetyloindolu

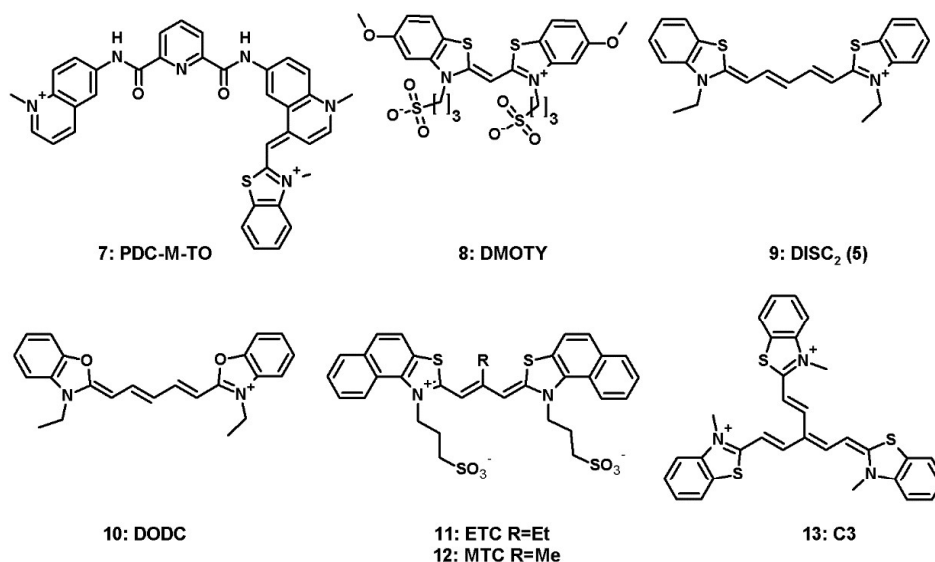
(w miejsce benzotiazolu) z N-propylosulfonianem chinoliny. Związek ten wykazywał silne powinowactwo do G-kwadrupeksu równoległego c-myc ( $K_D \sim 0.09 \mu\text{M}$ ) oraz obserwowano 36-krotne wzmocnienie fluorescencji ( $\lambda_{em} = 651 \text{ nm}$ ). Dwukrotnie słabsze wzmocnienie (16 krotne) zaobserwowano dla G-kwadrupeksu hybrydowego HT22.[14]

Ciekawym przykładem strategii projektowania fluorescencyjnego i selektywnego liganda jest **7** będący koniugatem dwóch związków: pirydodikarboksamidu bis-chinoliny (PDC-360A) oraz oranżu tiazolowego (TO). Związek PDC-360A w przeciwieństwie do TO jest selektywny względem G-kwadrupeksów jednak wykazuje niską emisję fluorescencji. Zaobserwowano silną stabilizację G-kwadrupeksów w obecności **7** ( $\Delta T_m = 18.4 \text{ }^\circ\text{C}$  i  $25.2 \text{ }^\circ\text{C}$ , odpowiednio dla kationów  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$ ), jakkolwiek dla PDC-360A wartość  $\Delta T_m$  w obecności kationów  $\text{Na}^+$  była nieznacznie wyższa  $\Delta T_m = 22.9 \text{ }^\circ\text{C}$ . Największe wzmocnienie fluorescencji **7** stwierdzono w obecności G-kwadrupeksów 22AG, c-kit2 i c-myc.[15]

Związek **8** otrzymany w wyniku sprzężenia mostkiem metinowym dwóch układów N-propanosulfoniano-5-metoksybenzotiazolu wykorzystano do fluorescencyjnego monitorowania G-kwadrupeksów w lizosomach żywych komórek HeLa i MCF7 podczas autofagii mitochondriów. W testach *in vitro* wykazano 150-270 krotne wzmocnienie fluorescencji dla liganda **8** w obecności mitochondrialnych G-kwadrupeksów DNA.[16]

Pozostałe pochodne cyjaninowe zawierają trzy lub pięć mostków metinowych łączących dwa lub trzy układy heteroaromatyczne. Związek **9** zawierający dwa układy N-etylobenzotiazolu sprzężone pięcioma mostkami metinowymi wiązał się do krańcowych G-tetrad równoległego G-kwadrupeksu c-myc z umiarkowanym stałą  $K_D \sim 2.1 \mu\text{M}$ . [17] Z kolei dla **10**, zawierającego atom tlenu w miejscu atomu siarki, zaobserwowano jego wiązanie do bruzd dwucząsteczkowych antyrównoległych G-kwadrupeksów oraz osłabienie intensywności fluorescencji. Niewielkie wzmocnienie (18%) stwierdzono natomiast w obecności równoległego czteroniciowego G-kwadrupeksu TG<sub>4</sub>T. [18] Wysoką selektywnością względem G-kwadrupeksów charakteryzują się pochodne dibenzotiakarbocyjaniny (**11** i **12**), związki zawierające mostek trimetinowy łączący dwie reszty nafto[1,2-d][1,3]tiazolu. Związki **11** i **12** w wodnych roztworach tworzą agregaty, które w obecności G-kwadrupeksów o różnej topologii (HT, c-kit1, c-myc, bcl-2) ulegają dysocjacji do monomerów prowadząc do wzrostu emisji fluorescencji (70 krotny dla **11** oraz 1000 krotny dla **12**,  $\lambda_{em} = 600 \text{ nm}$ ).[ 19, 20, 21 ] Dla pozostałych rozbudowanych strukturalnie analogów barwników cyjaninowych nie stwierdzono jednoznacznych wyników wskazujących na istotny wzrost selektywności względem G-kwadrupeksów. W omawianej grupie warto wspomnieć o ciekawym przykładzie struktury związku **13** zawierającego trimer polimetinowy N-metylobenzotiazolu.

Chociaż ligand ten wiąże się do G-kwadrupleksu 22AG z umiarkowaną stałą  $K_D \sim 1.2 \mu\text{M}$  to jego fluorescencja ulega 106-krotnemu wzmocnieniu w obecności 22AG.[22]



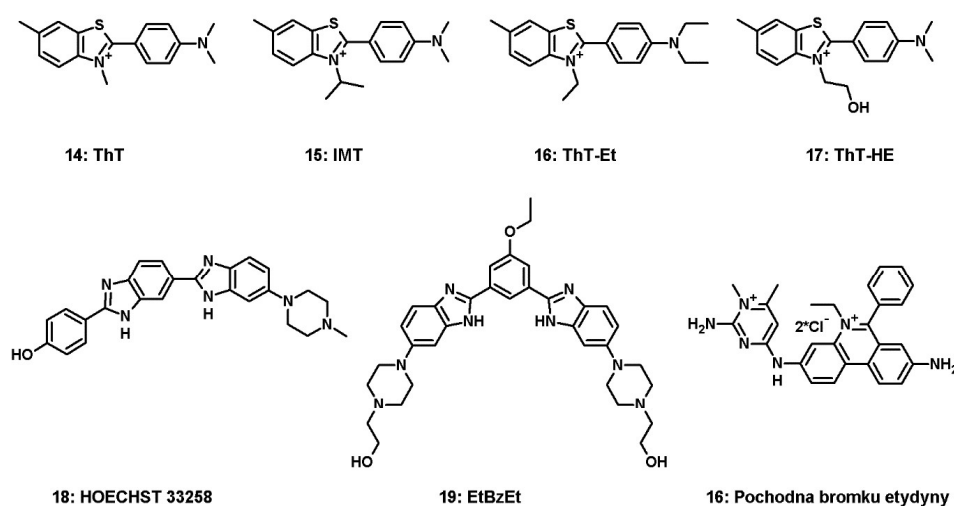
Rysunek 6. Barwniki polimetinowe (7-13)

Figure 6. Polymethine dyes (7-13)

### 3.2. POCHODNE BENZOTIAZOLU (14-17)

Tioflawina T (ThT, **14**), to barwnik z grupy benzotiazoli o szerokim zastosowaniu w histologii. (Rys 7) Strukturalnie jest najmniejszym związkiem fluorescencyjnym wykazującym umiarkowaną stałą wiązania ( $K_D \sim 0.77\text{-}3.51 \mu\text{M}$ ) do telomerowego G-kwadrupleksu 22AG. W zależności od topologii 22AG obserwowano 1200-2100-krotny wzrost emisji fluorescencji oraz efekt stabilizujący topologię antyrównoległą rzędu  $\Delta T_m = 11 \text{ }^\circ\text{C}$ . [23] Ligand ten wiązał się słabiej ( $K_D \sim 3.41\text{-}16.1 \mu\text{M}$ ) do G-kwadrupleksów RNA wykazując 366-610-krotne wzmocnienie fluorescencji w zależności od badanej sekwencji RNA. [24] Ponadto, tioflawina T znalazła zastosowanie jako sonda fluorescencyjna do detekcji G-kwadrupleksów w drobnoustrojach takich jak: wirusy *Zika* [25], *Papilloma* [26] oraz bakterii *Chlamydomonas reinhardtii*. [27] Mając na uwadze obiecujące właściwości ThT, otrzymano szereg pochodnych ThT poprzez wprowadzenie nieznacznych modyfikacji podstawników na obu atomach azotu. Związek **15** zawierający izopropyl w pozycji N3 układu benzotiazolu wykazywał powinowactwo rzędu  $6.25\text{-}13.0 \mu\text{M}$  do szeregu G-kwadrupleksów o topologii równoległej lub hybrydowej oraz 487-630-krotne wzmocnienie fluorescencji.

Ponadto, ligand **15** również wykazywał 320-439-krotne wzmocnienie fluorescencji w obecności równoległych G-kwadrupleksów RNA. Na podstawie mikroskopowej obserwacji zmian fluorescencji w liniach komórkowych HeLa, SMMC-7721, HUVEC HT1080 poddanych działaniu **15** wykazano jego gromadzenie się w jądrach komórkowych. [28] Intensywność fluorescencji ulegała zmniejszeniu w obecności pirydestatyny lub po podaniu inhibitora polimerazy  $\alpha$ , co było dowodem wskazującym na wiązanie się **15** do G-kwadrupleksów. Natomiast dwa pozostałe analogi ThT, związki **16** i **17**, podstawione odpowiednio trzema grupami etylowymi lub 2-hydroksyetylem wykazywały słabsze wzmocnienie fluorescencji i niższe wiązanie do G-kwadrupleksów równoległych lub hybrydowych. [29,30] Omówione przykłady pochodnych tioflawiny T, pokazują, jak niewielka modyfikacja struktury może wpłynąć na własności emisyjne i powinowactwo sondy do G-kwadrupleksów.



Rysunek 7. Pochodne: benzotiazolu (**14-17**), bis-benzimidazolu (**18-19**), etydyny (**20**)

Figure 7. Derivatives of: benzothiazole (**14-17**), bis-benzimidazole (**18-19**), ethidium (**20**)

### 3.3. POCHODNE BIS-BENZIMIDAZOLU (**18-19**)

W obrębie grupy pochodnych benzimidazolu najbardziej znanym związkiem jest barwnik Hoechst 33258 wykazujący silne powinowactwo do bruzdy mniejszej dupletu DNA bogatej w 4-5 powtórzeń AT. (Rys 7) Badania wykazały, że Hoechst 33258 (**18**) wiąże się także do G-kwadrupleksów (c-myc, pu24, c-kit2) oddziałując warstwowo z krańcowymi G-tetradami. [31] Modyfikacje struktury tego barwnika, takie jak wprowadzenie trzeciego układu benzimidazolu (pochodne terbenzimidazolu) lub zmiany izomerii podstawienia skutkowały jedynie modulacją

powinowactwa do dupleksów DNA bogatych w AT. [32] Zdecydowany wzrost selektywności względem G-kwadrupleksów uzyskano dla symetrycznych, w kształcie litery V pochodnych bis(piperazylo benzimidazolu) połączonych centralnie pierścieniem pirydyny lub fenylu w pozycjach 1,3 (**19**). Natomiast liniowa aranżacja obu układów benzimidazolu w pozycjach 1,4 centralnego pierścienia benzenu znacząco obniżała powinowactwo związku do G-kwadrupleksów. Na podstawie symulacji obliczeniowych układów liganda z G-kwadrupleksem wykazano, że izomer 1,3 oddziałuje warstwowo z trzema resztami guaniny G-tetrazy natomiast liniowy izomer 1,4 tylko z dwoma. Związki z grupy 1,3-bis podstawionych wiązały się do G-kwadrupleksu  $(T_2G_4)_4$  z umiarkowanym powinowactwem ( $K_d \sim 1.88-14.3 \mu M$ ). Najsilniejsze, 50-krotne wzmocnienie fluorescencji zaobserwowano dla **19** ( $K_d \sim 1.88 \mu M$ ). [33] Reasumując, wydaje się, że dla zaistnienia selektywnego oddziaływania pochodnych bis-benzimidazolu z G-kwadrupleksem konieczne jest obecność podstawienia 1,3 układu heteroaromatycznego wraz z terminalnymi podstawnikami alifatycznymi zawierającymi grupy aminowe zdolne do oddziaływania z bruzdami lub pętlami G-kwadrupleksu.

### 3.4 POCHODNE ETYDINY (**20**)

Bromek etydyny (EtBr) jest kolejnym, powszechnie stosowanym, barwnikiem do wizualizacji kwasów nukleinowych, oddziałujący poprzez interkalację do dupleksu DNA a także wiąże się z trypleksami. (Rys 7) Słabiej wiąże się do G-kwadrupleksów oddziałując warstwowo z zewnętrznymi G-tetradami. Wprowadzenie do EtBr podstawnika aromatycznego (**20**) pozwoliło na uzyskanie pochodnych o dużym powinowactwie ( $K_D \sim 90-120 \text{ nM}$ ) do G-kwadrupleksów i umiarkowanym wzmocnieniu fluorescencji. [34]

### 3.5 POCHODNE KARBAZOLU (**21-33**)

Pochodne karbazolu symetrycznie podstawione w pozycjach 3,6 układami heteroaromatycznymi bezpośrednio lub za pośrednictwem podwójnego mostka metinowego stanowią grupę fluorescencyjnych ligandów selektywnie wiążących się do G-kwadrupleksów DNA. (Rys 8) Związki **21** (o-BMVC) i **22** (p-BMVC), zawierające w strukturze odpowiednio jodek 1-metylo-2-winylopirydyniowy i 1-metylo-4-winylopirydyniowy, wykazują bardzo silne powinowactwo (odpowiednio  $K_D \sim 33.3 \text{ nM}$  i  $0.89 \text{ nM}$ ) do G-kwadrupleksu HT24 oraz 80-120-krotny wzrost fluorescencji przy  $\lambda_{em} 560-570 \text{ nm}$ . [35,36,37] Ligand **22** wykazuje niską cytotoksyczność i jest zdolny do hamowania aktywności telomerazy w niskich stężeniach ( $\sim 50 \text{ nM}$ ). Wykazano silną fluorescencję **22** w jądrach komórek nowotworów płuc i jamy ustnej (odpowiednio, H1299 i Ca9-22)



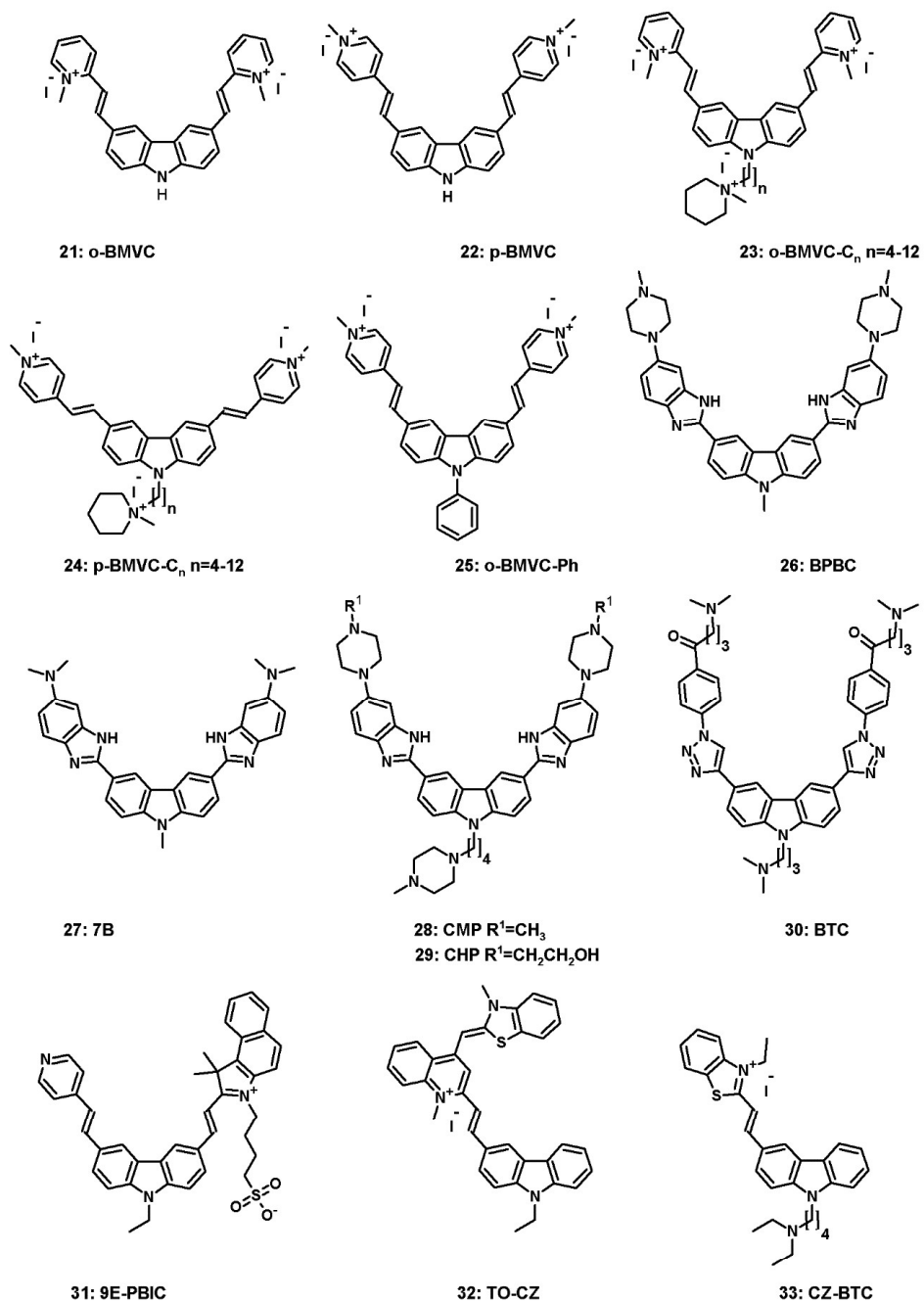
w przeciwieństwie do komórek zdrowych (Detroit-551, IMR-90).[38] Wizualizacja komórek raka jamy nosowo-gardłowej (KJ-1) traktowanych **22**, za pomocą dwufotonowej fluorescencyjnej mikroskopii czasowo-rozdzielczej, wykazała gromadzenie się **22** w rejonach telomerowych chromosomów w stadium metafazy.[39] Na podstawie badań temperatury topnienia wykazano znaczną stabilizację G-struktury HT24 ( $\Delta T_m=13$  °C) przez **22**, z kolei **21** wiązał się około 90 razy silniej do HT24 aniżeli do dupleksu ( $K_D\sim 2.91$   $\mu$ M). Oba związki w obecności G-kwadrupeksu wykazywały około 2-4 krotne wydłużenie czasu zaniku fluorescencji w porównaniu z dupleksami DNA. Powyższa właściwość umożliwiła odróżnienie komórek nowotworowych (MCF-7/ADR, CL1-0, H1299, HeLA, MCF-7, SAS) od zdrowych na podstawie bioobrazowania interakcji **21** z G-kwadrupeksami za pomocą fluorescencyjnej mikroskopii czasowo-rozdzielczej. (FLIM – ang. *fluorescence lifetime imaging microscopy*). Stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy liczbą fluorescencyjnych ognisk G-kwadrupeksu:**21** a stadium zaawansowania nowotworu. Badania biopsji tkanek wykazały, że test z **21** może stanowić kolejną metodę klinicznego wykrywania nowotworów głowy i szyi.[40] Pochodne o-BMVC (**23**) i p-BMVC (**24**) podstawione w pozycji N9 długim łańcuchem alifatycznym (4-12 reszt metylenowych) zakończonym kationem N-metylopiperydyny wykorzystano do wizualizacji za pomocą techniki FLIM mitochondrialnych G-kwadrupeksów DNA w liniach komórkowych CL1-0 i MRC-5.[41,42] Dodatkowo dla serii związków z grupy **23** określono zależność pomiędzy lipofilowością liganda a jego dystrybucją w mitochondrium i jądrze komórkowym komórek nowotworowych oraz wyjaśniono mechanizm leżący u podstaw wysokiej selektywności fluorescencyjnego znakowania komórek nowotworowych. Natomiast podstawienie p-BMVC w pozycji N9 grupą fenylową (**25**) lub podstawnikami alkilowymi (etyl, metyl) nie wykazywało istotnej różnicy w stałej wiązania do G-kwadrupeksów oraz dupleksów.[43] Mechanizm oddziaływania omówionej serii ligandów z G-kwadrupeksami nie jest jednoznaczny i zależy od ich topologii jak i cząsteczkowości – stwierdzono zarówno oddziaływania warstwowe z krańcowymi G-tetradami jak i wiązanie do bruzd.[44]

Bezpośrednie przyłączenie układów heteroaromatycznych w pozycjach 3,6 karbazolu skutkowało otrzymaniem kolejnej serii ligandów o pożądanym właściwościach spektroskopowych i kinetycznych względem G-kwadrupeksów. W tej serii, związki **26** i **27**, zawierające układ benzimidazolu podstawiony dialkiloaminą oraz dodatkowo w pozycji N9 grupę metylową, wykazywały najsilniejsze powinowactwo ( $K_D\sim 0.28-0.84$   $\mu$ M) i wysoką selektywność do G-kwadrupeksów równoległych (c-myc, EAD, Pu22). [45,46] Obserwowane silne wzmocnienie fluorescencji (335-1800 razy) oraz dobra przenikalność do komórek umożliwiły wizualizację ligandów w linii komórkowej MCF-7. Jednak na

podstawie słabej fluorescencji związku **26** w komórkach wyciągnięto wniosek że gromadzi się on w cytoplazmie i nie wnika do jądra komórkowego.[45] Z kolei dla **28** i **29**, związków podstawionych w pozycji N9 piperazynylobutylem, zaobserwowano silne powinowactwo do G-kwadrupleksów telomerowych niezależnie od ich topologii ( $K_D \sim 0.03-0.33 \mu\text{M}$ ) oraz silne wzmocnienie fluorescencji. Dodatkowo wykazano efekt stabilizujący ( $\Delta T_m = 16-19 \text{ }^\circ\text{C}$ ), oraz wysoki indeks selektywności (500-576) wobec G-kwadrupleksów w porównaniu do dupleksów DNA.[47] Kolejną grupą związków w omawianej serii są pochodne bis-triazolilokarbazolu (BTC) podstawione 3-(dimetyloamino)propylem w pozycji N9. Związek zawierający w pozycjach 3,6 układy 1-fenyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-ilu terminalnie podstawione alifatyczną diamina (**30**) najmocniej wiązał się do G-kwadrupleksu równoległego c-myc oraz znacząco go stabilizował ( $K_D \sim 0.3 \mu\text{M}$ ;  $\Delta T_m = 22.7 \pm 1.7 \text{ }^\circ\text{C}$ ) przy niewielkim, 5.5 krotnym przyroście fluorescencji. [48] Ponadto, związek **30** powodował zahamowanie ekspresji białka MYC i w rezultacie apoptozę komórek HepG2 wskutek zatrzymania cyklu podziału komórki. Bioobrazowanie żywych komórek HepG2 poddanych działaniu **30** wykazało gromadzenie się tego związku w obszarze jądra komórkowego.

Związek **31** jest przykładem niesymetrycznego podstawienia w pozycjach 3 i 6 dwoma różnymi podstawnikami heteroaromatycznymi za pośrednictwem podwójnego mostka metinowego. Dla tego liganda uzyskano 100 krotny wzrost fluorescencji **31** przy  $\lambda_{em} = 600 \text{ nm}$  w obecności G-kwadrupleksu równoległego (c-myc,  $K_D \sim 10 \mu\text{M}$ ) i 10-30 krotny wzrost wobec pozostałych typów G-kwadrupleksów.[49] Na podstawie dokowania molekularnego zaproponowano mechanizm oddziaływania warstwowego pomiędzy krańcową G-tetradą a planarną strukturą **31**. Cechą wspólną struktury wyżej omówionych 3,6 dwupodstawionych ligandów jest układ aromatyczny w kształcie litery V odpowiedzialny za interakcję z G-tetradami, cecha ta nie jest wyjątkiem i występuje także w strukturach innych grup ligandów.

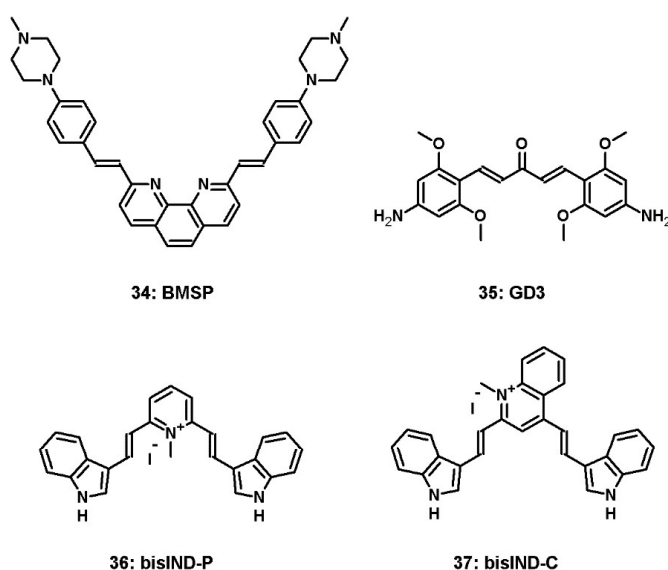
Warto również wspomnieć o monopodstawionych w pozycji 3 układem aromatycznym N9 alkilowych pochodnych karbazolu tj. **32** i **33**, które z powodzeniem wykorzystano do wizualizacji G-kwadrupleksów w liniach komórkowych MCF-7, COS7 i SiHa.[ 50, 51 ] Oba związki, pomimo braku symetryczności w swojej strukturze, w przybliżeniu spełniają strukturalny wymóg kształtu V cząsteczki koniecznego dla zaistnienia silnej interakcji z G-kwadrupleksami.



Rysunek 8. Pochodne karbazolu (21-33)  
Figure 8. Derivatives of carbazole (21-33)

### 3.6. POCHODNA FENANTROLINY (34)

Symetrycznie podstawiona w pozycjach 2,9 4(4-metylopiperazyn-1-ylo)styrylem pochodna fenantroliny (**34**) jest kolejnym dobrym przykładem istnienia korelacji pomiędzy kształtem V cząsteczki liganda a powinowactwem do G-kwadrupeksu. (Rys 9) Zaobserwowano 150-krotny wzrost fluorescencji **34** w obecności antyrównoległego G-kwadrupeksu Hum24 a wyznaczona  $K_D$  wynosi 0.13  $\mu\text{M}$ . Mikroskopia fluorescencyjna komórek MCF-7 po inkubacji BMSP wykazała równomierną dystrybucję liganda w całej cytoplazmie.[52]



Rysunek 9. Pochodne fenantroliny (**34**), bis(4-aminobenzylideno)acetonu (**35**), bis-indolu (**36-37**)  
 Figure 9. Derivatives of: phenanthroline (**34**), bis(4-aminobenzylidene)acetone (**35**), bis-indole (**36-37**)

### 3.7. POCHODNA BIS(4-AMINOBENZYLIDENO)ACETONU (35)

Kolejnym przykładem symetrycznie podstawionego liganda jest układ bis(4-aminobenzylideno)acetonu, w którym rolę akceptora elektronów pełni centralnie położona spolaryzowana grupa karbonylowa. Spośród przebadanych analogów tej grupy, związek **35** podstawiony czterema podstawnikami metoksyłowymi wykazywał pożądane własności absorpcyjno-emisyjne i najlepsze powinowactwo ( $K_d \sim 3.03\text{-}3.65 \mu\text{M}$ ) do G-kwadrupeksów równoległych (c-myc, c-kit2, VEGF, ADAM10). (Rys 9) Obserwacja linii komórkowych ARPE-19 potraktowanych **35** wykazała emisję fluorescencji tego liganda przy  $\lambda_{em} = 590 \text{ nm}$  w obszarze odpowiadającym lokalizacji jąderka, jak i w cytoplazmie w bezpośrednim sąsiedztwie jądra.[53]

### 3.8. POCHODNE BIS-INDOLU (36-37)

Grupa pochodnych zawierających układ bis-indolu (donor) sprzężonego za pośrednictwem wiązań winylowych, z pełniącym rolę akceptora elektronów centralnym układem heteroaromatycznym okazały się mieć korzystne własności spektroskopowe jak i wysokie powinowactwo do G-kwadrupeksów DNA. Podobnie jak w serii analogów karbazolu niska fluorescencja pochodnych bis-indolu ulega wzmocnieniu wskutek przyłączenia się do G-kwadrupeksu. Związek **36** zawierający w centrum kation N-metylopirydyniowy wiązał się selektywnie do kwadrupeksu telomerowego ( $K_D \sim 1.99 \mu\text{M}$ ) wywołując 50-krotny wzrost fluorescencji oraz zmianę jego topologii z hybrydowej na antyrównoległą.[54] (Rys 9) Traktowanie komórek raka trzustki (PC3) związkiem **36** wykazało tendencję do gromadzenia się liganda w jąderku. Z kolei dla związku **37** zawierającego układ 1-metylochinoliny zaobserwowano 150-290-krotny wzrost emisji fluorescencji przy  $\lambda_{em} = 617 \text{ nm}$  w obecności G-kwadrupeksów DNA o różnej topologii (telo21, htg22, oxy28, ckit1, ckit2, bcl2, pu22) a wyznaczona stała  $K_D$  przyjmowała wartości 1.43-3.70  $\mu\text{M}$ . Pomimo dobrej selektywności w stosunku do G-kwadrupeksów, ligand nie wykazywał zdolności rozróżnienia poszczególnych topologii.[55]

### 3.9. POCHODNE STYRYLO-N-ALKILOCHINOLINY (38-40)

Barwniki zawierające układ styrylo-N-alkilochinoliny podstawiony alifatyczną aminą w jednej lub dwóch pozycjach są kolejną grupą ligandów, których bardzo niska fluorescencja ulega wzmocnieniu w obecności G-kwadrupeksu w zakresie 590-650 nm oraz następuje przesunięcie batochromowe maksimum absorpcji w widmie UV. Obecność dodatnio naładowanego układu N-alkilochinoliny umożliwia dwojaki mechanizm oddziaływania z G-kwadrupeksem: warstwowe z G-tetradą lub elektrostatyczne z łańcuchem fosforanowym. Dla związku **38**, w zależności od struktury G-kwadrupeksu (Htg-21, 22Ag, C-myc, CM22, C-kit1, G3T3, Hras) zaobserwowano 200-300-krotne wzmocnienie fluorescencji oraz umiarkowane do silnego powinowactwo ( $K_D \sim 0.30-10 \mu\text{M}$ , Rys 10). Ponadto związek **38** cechował się niską wartością granicy wykrywalności (0.36-0.85 nM), co pozwala na wykrywanie G-kwadrupeksów DNA w stężeniu nanomolarnym. [56] Związek **39** podstawiony na atomie azotu chinoliny ujemnie naładowaną grupą butanosulfonianu najsilniej wiązał się do G-kwadrupeksów równoległych c-myc i CM22 ( $K_D \sim 0.45$  i  $0.55 \mu\text{M}$ ) oraz wykazywał 118 i 145-krotny przyrost fluorescencji. W stosunku do G-kwadrupeksów hybrydowych i antyrównoległych (Htg-21, 22Ag, G3T3, Hras) związek **39** wykazywał nieco słabsze powinowactwo ( $K_D \sim 0.87-2.44 \mu\text{M}$ ). [57] Niska cytotoksyczność i dobra przepuszczalność przez błony komórkowe związku **39** umożliwiła obrazowanie fluorescencyjne G-kwadrupeksów w żywych oraz utrwalonych komórkach raka wątroby Hep-G2,

które wykazało gromadzenie się **39** w cytoplazmie. Preferowany mechanizm wiązania się **39** do G-kwadrupeksu polega na oddziaływaniu liganda z bruzdami i pętlami. Z kolei, związek **40** zawierający rozszerzony układ chromoforu tj. benzo(f)chinoliny podstawiony 4-[N-(2-hydroksyetylo)piperazylo]styrylem wykazywał silne powinowactwo do G-kwadrupeksu c-myc ( $K_D \sim 0.53 \mu\text{M}$ ) i 590-krotne wzmocnienie fluorescencji przy  $\lambda_{em} = 590 \text{ nm}$ . Mechanizm wiązania **40** do G-kwadrupeksu c-myc polega na oddziaływaniu warstwowym układu aromatycznego benzo(f)chinoliny z krańcową G-tetradą oraz stabilizującym wpływie wiązań wodorowych pomiędzy podstawnikiem 2-hydroksyetylowym a grupami fosforanowymi.[58]

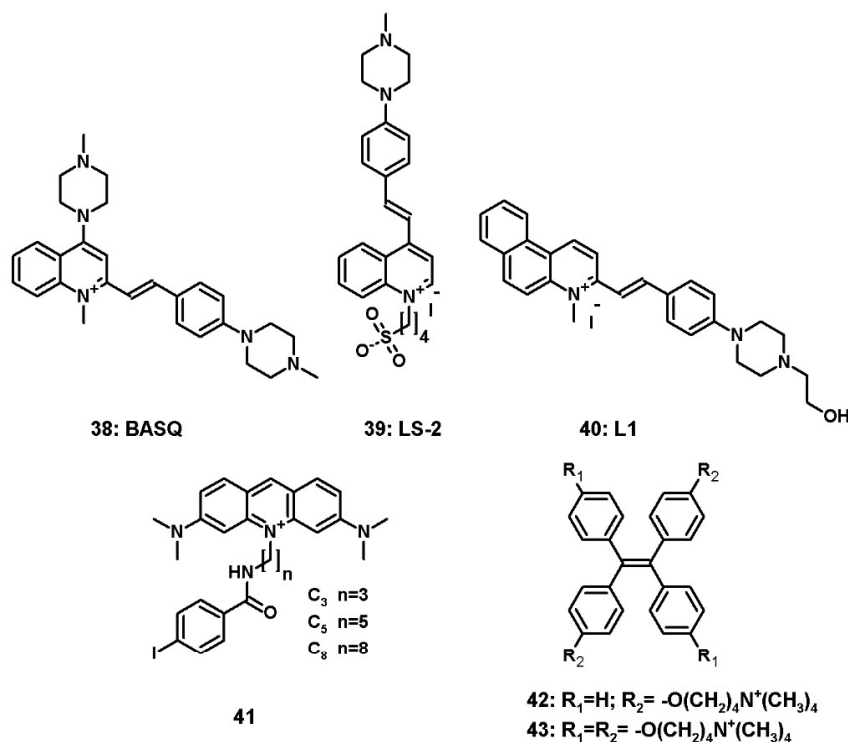
### 3.10. POCHODNE 3,6-DIAMINOAKRYDINY (41)

Pochodne 3,6-diaminoakrydiny (**41**) zawierające w pozycji 10 alifatyczny łańcuch o różnej długości (3-8) terminalnie podstawiony amidem kwasu 4-jodobenzoowego silnie stabilizowały strukturę równoległego G-kwadrupeksu KRAS-22RT ( $\Delta T_m = 17.8-40.7 \text{ }^\circ\text{C}$ ) oraz wykazywały do niego wysokie powinowactwo ( $K_D \sim 0.44-0.55 \mu\text{M}$ , Rys 10). Nieco słabszą stabilizację struktury i porównywalną stałą wiązania omawianych związków zaobserwowano względem G-kwadrupeksu c-myc ( $\Delta T_m = 18.5-33.9 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $K_D \sim 0.18-0.74 \mu\text{M}$ ).[59] Wydłużenie łańcucha alifatycznego w poszczególnych związkach znacząco wpływało na wzrost stabilności ich kompleksów z G-kwadrupeksami jak i wzrost cytotoksyczności ligandów wobec linii HeLa ( $IC_{50} = 0.9-5.7 \mu\text{M}$ ). Obserwacja komórek HeLa poddanych działaniu pochodnej z najdłuższym łańcuchem wykazała silną fluorescencję w rejonie jądra komórkowego i nieco słabszą w cytoplazmie. Niekorzystnymi cechami tej serii związków są ich zaledwie 10-krotne wzmocnienie fluorescencji w obecności G-kwadrupeksów oraz umiarkowane wiązanie do dupleksu ds26 ( $K_D \sim 1.4-1.9 \mu\text{M}$ ).

### 3.11. POCHODNE TETRAFENYLOETENU (42-43)

Barwniki z grupy tetrafenyloetenu (TFE) charakteryzują się zdolnością wzrostu fluorescencji indukowanym tworzeniem się agregatów w zależności od wzrostu stężenia G-kwadrupeksu. Budowa układu TFE eliminuje możliwość planarnego ustawienia się wszystkich czterech grup fenyłowych wzdłuż wiązania winylowego ze względu na zawadę steryczną. W niskim stężeniu związki TFE wykazują dynamiczną rotację pierścieni fenyłowych i niską emisję fluorescencji, która wzrasta wskutek zahamowania rotacji i tworzenia się agregatów wraz ze wzrostem stężenia związku. Związki **42** i **43** podstawione odpowiednio dwoma lub czterema dodatkowo naładowanymi podstawnikami 4-(trimetyloamonio)butoksyłu w pozycji *para* grupy fenyłowej wykazywały wzrost emisji fluorescencji oraz silne

powinowactwo ( $K_d \sim 0.138\text{--}0.367 \mu\text{M}$  i  $0.048\text{--}0.169 \mu\text{M}$ ) do multimerycznych form G-kwadrupleksów telomerowych o długości sekwencji od 45 do 69 zasad. [60] (Rys 10) Związek **42** w porównaniu z **43** cechował się 2-3 krotnie słabszym wiązaniem się do G-kwadrupleksów telomerowych oraz zdecydowanie lepszą selektywnością w odniesieniu do dupleksu. Z kolei **43**, pomimo umiarkowanego wiązania się do dupleksów ( $K_d \sim 2.56 \mu\text{M}$ ) lepiej niż **42** stabilizował G-kwadrupleksy o dłuższych sekwencjach ( $\Delta T_m = 6.9 - 9.4 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Różnice w powinowactwie do kwasów nukleinowych obu związków wynikają z liczby dodatnio naładowanych ładunków na końcach podstawników. W przypadku **43** obecność czterech dodatnich ładunków poprawia stałą wiązania związku do multimerów G-kwadrupleksów telomerowych obniżając jednak ich selektywność w odniesieniu do dupleksów.



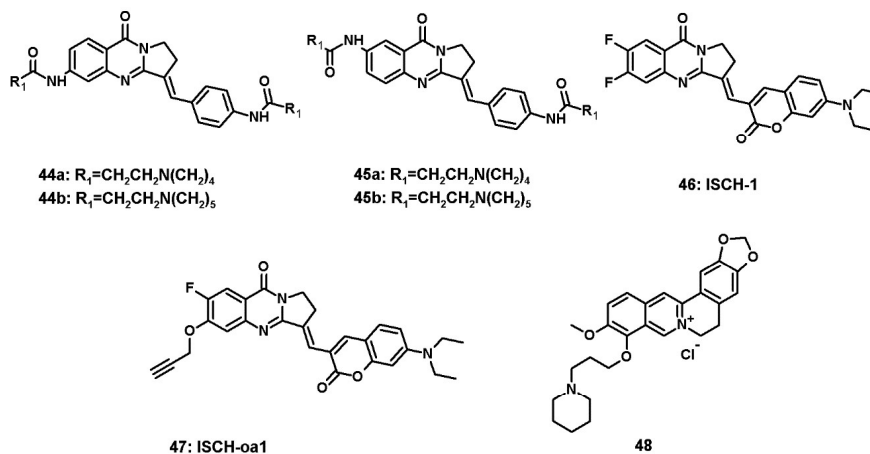
Rysunek 10. Pochodne: styrylo-N-alkilochinoliny (38-40), 3,6-diaminoakrydiny (41), tetrafenyletenu (42-43)  
 Figure 10. Derivatives of: styryl-N-alkylquinoline (38-40), 3,6-diaminoacridine (41), tetraphenylethene (42-43)

### 3.12. ZWIĄZKI POCHODZENIA NATURALNEGO (44-48)

Istnieje spora grupa związków aromatycznych pochodzenia naturalnego wykazujących słabą fluorescencję w wodnych roztworach, która ulega

wzmocnieniu w obecności G-kwadrupleksów DNA. Spośród nich należy wymienić alkaloidy chinazolinowe (pochodne izaindigotonu), alkaloidy izochinolinowe (berberyna, palmityna i pochodne). Izaindigoton jest alkaloidem naturalnie występującym w korzeniu *Isatis indigotica* Fort, rośliny stosowanej w tradycyjnej medycynie chińskiej w leczeniu grypy, zapalenie wątroby i mózgu. W swojej strukturze izaindigoton zawiera układ pirolo[2,1-b]chinazolinu sprzężonej z grupą benzyldenową. Związek ten nie wykazuje powinowactwa do G-kwadrupleksów. Natomiast pochodne izaindigotonu zawierają modyfikację w układzie benzylidenu (**44**, **45**) albo obecność dodatkowych atomów fluoru i alifatycznych podstawników w części kumaryny (**46**, **47**) wykazując silne powinowactwo względem G-kwadrupleksów oraz znaczące wzmocnienie fluorescencji. (Rys 11) Związek **46** zawiera układ izaindigotonu, pełniący rolę akceptora podstawiony dwoma atomami fluoru i grupą metylową na atomie azotu, który sprzężony kumaryną (donor) wykazuje umiarkowane wzmocnienie fluorescencji przy  $\lambda_{em}=640$  nm oraz zmianę barwy z różowej na błękitną w obecności G-kwadrupleksów pu22 i htg21. Ligand **46** z powodzeniem wykorzystano do barwienia utrwalonych i żywych linii komórkowych HeLa, gdzie w jąderkach stwierdzono największe jego stężenie.[61] Związek **47** (monofluorowa pochodna ISCH-1) wykorzystano do otrzymania koniugatu z antysensową sekwencją RNA (ISCH-nras1) za pośrednictwem łącznika triazolowego (ang. *click chemistry*). Hybrydyzacja koniugatu ISCH-nras1 do docelowej nici NRAS RNA powodował wzrost emisji fluorescencji **47** wskutek oddziaływania z kwadrupleksem. [62] Autorzy zaobserwowali wzrost emisji fluorescencji po podaniu ISCH-nras1 w rejonie cytoplazmy komórek SiHa, uprzednio transfekowanych docelową sekwencją NRAS RNA. Identyčną strategię wizualizacji G-kwadrupleksów RNA w komórkach HEK293T oraz HeLa zastosowano wobec rejonu 3'UTR transkryptu APP (ang. *amyloid precursor protein*). [63] Pozostałe dwa analogi izaindigotonu, **44** oraz **45**, wykazują silne powinowactwo do G-kwadrupleksów telomerowych ( $K_D \sim 0.1$   $\mu$ M) oraz efekt stabilizujący ( $\Delta T_m = 17.6-21.9$   $^{\circ}$ C) przy stosunkowo niewielkim 2.6 krotnym wzmocnieniu fluorescencji.[64] Berberyna i palmityna (alkaloidy izochinolinowe) obok zdolności inhibicji topoizomerazy I i II posiadają zdolność do warstwowego oddziaływania z G-tetradami ze względu na zagiętą strukturę cząsteczki oraz obecność czwartorzędowego atom azotu. Oba związki wykazują umiarkowane do silnego powinowactwo do G-kwadrupleksów telomerowych ( $K_D \sim 0.83-2.38$   $\mu$ M) oraz około 50 krotne wzmocnienie emisji fluorescencji przy  $\lambda_{em}=522$  nm. Podstawienie 3-(1-piperydino)propylem w pozycji 9 berberyny (**48**) wzmacnia kilkukrotnie powinowactwo do G-kwadrupleksów telomerowych ( $K_D \sim 0.284$   $\mu$ M) oraz wywiera silny wpływ stabilizujący na G-kwadrupleks ( $\Delta T_m = 28.2$   $^{\circ}$ C).[65]





Rysunek 11. Związki pochodzenia naturalnego (44-48)  
 Figure 11. Natural products (44-48)

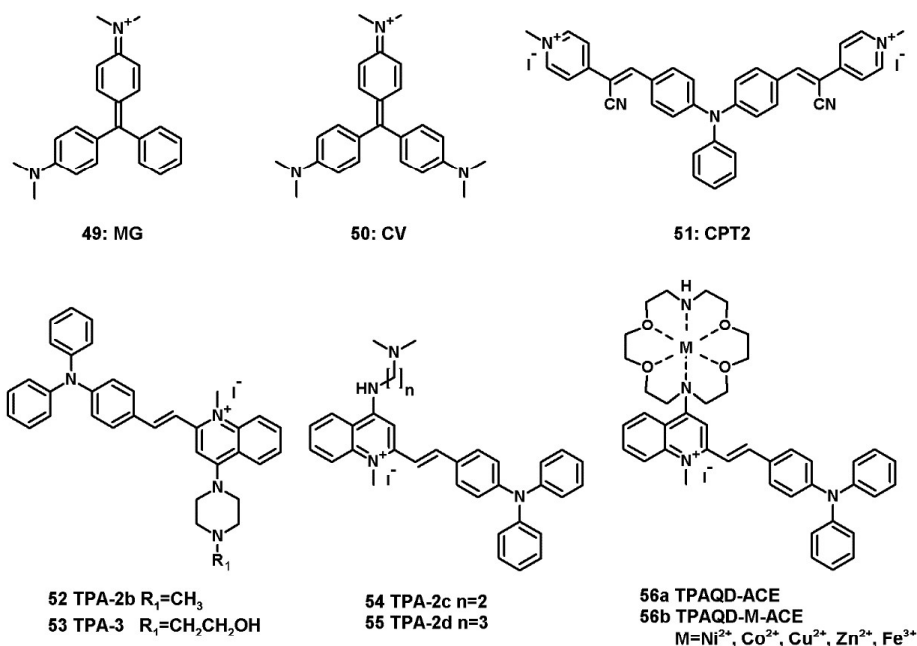
### 3.13. POCHODNE TRIFENYLOMETANU I TRIFENYLOAMINY (49-56)

Związki z grupy pochodnych trifenylometanu (TFM, zieleń malachitowa **49**, fiolet krystaliczny **50**) wykazują niską fluorescencję w roztworach wodnych i organicznych, która wzrasta wraz ze wzrostem lepkości rozpuszczalnika lub w obecności kwasów nukleinowych. Niska fluorescencja jest rezultatem niepełnego wewnątrzcząsteczkowego transferu ładunku w obrębie cząsteczki, wynikającego z występowania wzajemnej rotacji pierścieni fenylu a tym samym brakiem planarnego charakteru cząsteczki. Liczne prace wykazały na znacząca różnicę przyrostu emisji fluorescencji grupy TFM po związaniu z G-kwadrupleksami (70-100 krotny) w porównaniu z dupleksami DNA (14 krotny), jakkolwiek różnice stałych wiązania barwników TPM do obu form nie są tak znaczne.[66,67,68] Związki tej grupy nie znalazły zastosowania w obrazowaniu komórek ze względu na niską selektywność oraz stosunkowo niską wydajność kwantową w porównaniu z innymi barwnikami np. oranżem tiazolowym. (Rys 12)

Barwniki z grupy trifenyloamin (TFA) sprzężonych za pośrednictwem wiązania podwójnego z podstawionymi peryferyjnie układami heteroaromatycznymi okazały się mieć o wiele bardziej obiecujące właściwości spektralne i kinetyczne niż barwniki grupy TFM. Układ trifenyloaminy pełni rolę donora elektronów, które przez układ  $\pi$  elektronów wiązania podwójnego są transferowane do N-metylowanego układu heterocyklicznego (akceptora) uczestniczący w wiązaniu się sondy do docelowych G-kwadrupleksów. Podstawienie w pozycji para obu fenyli podstawnikiem cyjanowinylo-N-metylopirydyniowym dało serię analogów z których **51** wykazywał najlepsze właściwości fluorescencyjne i wiązanie się do G-kwadrupleksów. [69] Związek **51**

wykazywał 90-190-krotny wzrost fluorescencji przy 620 nm w obecności G-kwadrupeksów hybrydowych (22AG, G3T3, H-RAS) przy jednoczesnym indukowaniu przejścia do G-kwadrupeksów antyrównoległych. Na podstawie obliczeń metodami dynamiki molekularnej autorzy zaproponowali mechanizm oddziaływania **51** z bruzdą za pośrednictwem wiązań wodorowych. (Rys 12)

Seria monpodstawionych analogów trifenyloaminy za pośrednictwem wiązania winylowego w pozycji para fenylu układem N-metylochinoliny (**52-56**) wykazywała silne powinowactwo do G-kwadrupeksów oraz brak istotnej zdolności rozróżniania poszczególnych topologii. (Rys 12) Obecność alifatycznej diaminy w pozycji 4 układu N-metylochinoliny okazała się być kluczowa dla wartości stałej wiązania, jakkolwiek obserwowano wpływ struktury aminy na preferencję do określonych topologii G-kwadrupeksów. Związek **52** podstawiony N-metylopiperazyną najsilniej wiązał się z G-kwadrupeksem równoległym c-kit1 ( $K_D \sim 70.7$  nM), którego w obecności wzrastającego stężenia kwadrupeksu c-kit cechowała hipochromowa zmiana widma absorpcyjnego wraz z batochromowym przesunięciem maksimum o 45 nm, co stworzyło dodatkową możliwość detekcji interakcji **52** z c-kit1 w świetle widzialnym. [70] Widmo emisyjne kompleksu **52**/c-kit wykazało maksimum przy 627 nm i 32-krotny wzrost intensywności fluorescencji. W przypadku **53**, posiadającego na azocie piperazyny bardziej polarny podstawnik hydroksyetylu zamiast metylu, zaobserwowano największe powinowactwo do G-kwadrupeksu 22AG o topologii hybrydowej ( $K_D \sim 0.83$   $\mu$ M) oraz około 50 krotny wzrost emisji fluorescencji. [71] Zamiana cyklicznego układu piperazyny w pozycji 4 N-metylochinoliny na alifatyczny łańcuch diaminy (etyl, propyl, **54**, **55**) lub eter azakoronowy (**56a-b**), znacząco poprawiło właściwości otrzymanych pochodnych względem G-kwadrupeksów. Dla **54** i **55** zaobserwowano 200 i 180 krotne wzmocnienie fluorescencji oraz silne powinowactwo do G-kwadrupeksu hybrydowego i antyrównoległego, odpowiednio HTG21 ( $K_D \sim 110.1$  nM) i HRAS ( $K_D \sim 27.8$  nM). Ponadto ze względu na ich niską granicę wykrywalności związki te wykorzystano do wizualizacji G-kwadrupeksów w liniach komórkowych Hep-G2, gdzie największą kumulację kompleksu ligandu z G-kwadrupeksem stwierdzono w obrębie jąderka. [72, 73] Związek **56a** wykazywał 7-10 krotne wzmocnienie fluorescencji w obecności kwadrupeksów o różnorodnej topologii, z kolei dodanie kationów metali przejściowych (nikiel(II), kobalt(II), miedź(II), cynk(II), żelazo(III)) kompleksowanych przez układ eteru azakoronowego (**56b**) poprawiło ok 3-4 krotnie emisję fluorescencji w porównaniu z **56a**. Największe wzmocnienie emisji fluorescencji (80 krotne) zaobserwowano dla kwadrupeksu c-myc w obecności kationów niklu(II) oraz stwierdzono gromadzenie tych związków w rejonie jądra komórek nowotworowych HepG2. [74]



Rysunek 12. Pochodne tryfenylometanu i tryfenyloaminy (49-56)

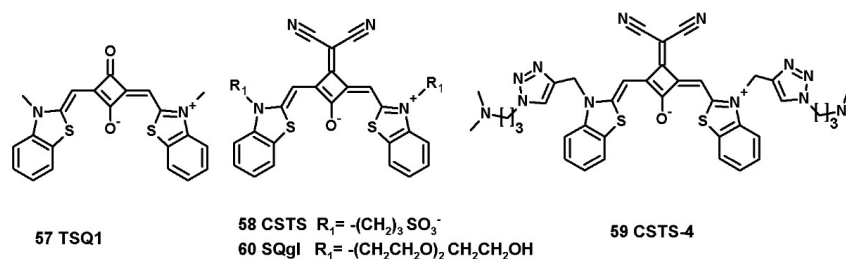
Figure 12. Derivatives of triphenylmethane and triphenylamine (49-56)

### 3.14. BARWNIKI SKWARYNOWE (57-60)

Barwniki skwarynowe (pochodne kwasu skwarynowego) to grupa związków z czterowęglowym pierścieniem w centrum pełniącym rolę akceptora elektronów sprzężony z dwoma układami benzotiazolu (donory elektronów) za pośrednictwem grup metinowych. Skwaryny wykazują pożądane własności spektralne w zakresie widzialnym (650-850 nm) oraz cechują się znaczną fotostabilnością. (Rys 13) Najprostszym przedstawicielem barwników skwarynowych jest **57**, zawierający w centrum anion skwaryliowy dwupodstawiony N-metylobenzotiazolem. Dla **57** zaobserwowano 40 - 70 krotny wzrost emisji fluorescencji przy 668 nm ( $\lambda_{\text{ex}} = 620$  nm) w obecności równoległego G-kwadrupleksu c-src oraz antyrównoległych i hybrydowych topologii, natomiast wobec dupleksu i pojedynczych nici DNA obserwowano zdecydowanie słabszy efekt wzmocnienia. Ze względu na brak selektywności **57** wobec różnych topologii G-kwadrupleksów oraz słabe rezultaty w obrazowaniu komórkowym, związek nie znalazł zastosowania.[75]

Modyfikacja **57** w obrębie centralnego pierścienia grupą dicyjanometylenową w miejscu tlenu oraz 1-propanosulfonianem na atomach azotu w obu układach benzotiazolu skutkowało otrzymaniem **58**, związku wysoce selektywnego względem G-kwadrupleksów równoległych (EAD, c-kit2, pu22) z umiarkowanym

powinowactwem ( $K_D \sim 6.57\text{-}21.6 \mu\text{M}$ ). [76] Związek **58** w wodnych roztworach występuje w formie H-agregatów, które w obecności równoległego G-kwadrupleksu ulegają dysocjacji do monomerów co w rezultacie skutkuje wzrostem emisji fluorescencji jak i przesunięciem maksimum absorpcji w stronę dłuższych fal (z 613 do 685nm). Proponowany mechanizm wiązania się **58** do G-kwadrupleksu polega na warstwowym oddziaływaniu związku do obu krańcowych G-tetrad. Wysoka selektywność, bardzo niska fluorescencja tła, duży współczynnik absorpcji i wysoka wydajność kwantowa fluorescencji sprawiają, że **58** jest bardzo obiecującą sondą do detekcji równoległych G-kwadrupleksów. Jednakże obecność ujemnie naładowanych sulfonianów ogranicza zdolność wnikania **58** do komórek, eliminując zastosowanie tego związku w badaniach *in cellulo*.



Rysunek 13. Barwniki skwarynowe (**57-60**)

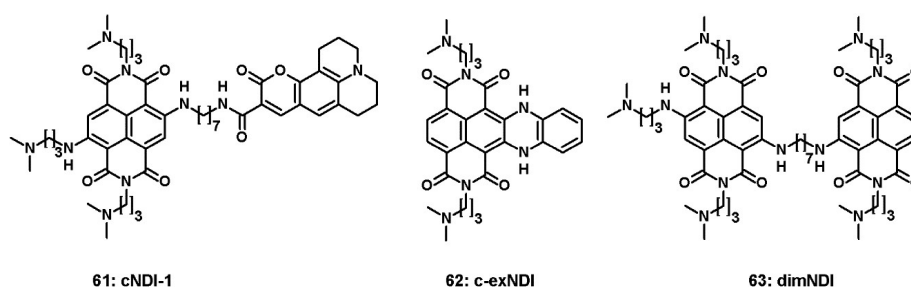
Figure 13. Squaraine dyes (**57-60**)

Zamiana propanosulfonianów w obu benzotiazolach na bardziej rozbudowany i zasadowy podstawnik 1,2,3-triazolu podstawiony grupą dimetyloaminopropylową znacznie zwiększyło powinowactwo nowej pochodnej **59** do równoległych G-kwadrupleksów (c-kit2,  $K_D \sim 44 \text{ nM}$ ). Znaczny wzrost fluorescencji przy 710 nm, wysoka wydajność kwantowa oraz lepsza przenikalność przez błony komórkowe umożliwiło wykorzystanie **59** do obrazowania komórkowego w linii MCF7.[77] Znacznie gorsze powinowactwo ( $K_D \sim 10 \mu\text{M}$ ) do równoległych G-kwadrupleksów wykazywał **60**, związek o amfifilowych własnościach, podstawiony łańcuchami polieterowymi, jakkolwiek o istotnej selektywności i silnym wzmocnieniu fluorescencji w obecności równoległych G-kwadrupleksów.[78]

### 3.15. POCHODNE NAFTALENODIIMIDU (61-63)

Związki aromatyczne zawierające układ naftalenodiimidu (NDI) ze względu na planarną strukturę oraz korzystne własności absorpcyjno-emisyjne okazały się być obiecującymi kandydatami do zaprojektowania sond fluorescencyjnych

selektywnych względem G-kwadrupeksów. (Rys 14) W związku **61** uzyskano połączenie układu elektronodonorowego kumaryny z elektronoakceptorowym NDI za pośrednictwem elastycznego linkera alifatycznego. W stanie niezwiązanym długi linker umożliwia interakcję obu aromatycznych układów i wskutek wewnątrzcząsteczkowego transferu elektronów pomiędzy kumaryną (donor) a NDI (akceptor) następuje wygaszenie fluorescencji. W obecności G-kwadrupeksu wiążącego fragment NDI obserwowano odzyskanie fluorescencji obu fluoroforów. Stwierdzono wyraźne wzmocnienie fluorescencji **61** w obecności G-kwadrupeksu równoległego (c-kit2) jak i antyrównoległego (HRAS) w porównaniu do dupleksu, pojedynczej nici DNA czy nawet kwadrupeksów RNA, dla których wzmocnienie fluorescencji było zanedbywalne.[ 79 , 80 ] Ze względu na brak zdolności rozróżniania odmiennych topologii G-kwadrupeksów a także niską wydajność kwantową zastosowanie **61** do badań komórkowych może okazać się nieefektywne.



Rysunek 14. Pochodne naftalenodiimidu (**61-63**)  
Figure 14. Derivatives of naphthalene diimide (**61-63**)

Bardziej obiecującą pochodną NDI okazał się **62**, związek zawierający 1,2-fenylenodiaminę skoniugowaną z układem aromatycznym naftalenodiimidu. Związek ten wykazywał aktywność przeciwko wirusowi HIV-1 wskutek wiązania się z wysokim powinowactwem do struktur kwadrupeksowych.[ 81 ] Spośród przebadanych G-kwadrupeksów o różnorodnej topologii największe wzmocnienie fluorescencji przy  $\lambda_{em}=617$  nm zaobserwowano dla G-kwadrupeksu hybrydowego hTEL w obecności  $K^+$ . Wyznaczona stała  $K_D$  dla **62** do hTEL wynosiła  $0.18 \mu M$ , jakkolwiek w obecności kationów  $Na^+$  G-kwadrupeks hTEL przyjmował topologię antyrównoległą, względem którego zaobserwowano bardzo silny wzrost powinowactwa związku **62** ( $K_D=3.3$  pM).[82] Badania na linii komórkowej HEK-293T wykazały preferencyjne gromadzenie się **62** w jądrze komórkowym, co zostało potwierdzone dodatkowymi testami na przeciwciała 1H6 specyficznymi wobec G-kwadrupeksów oraz zastosowaniem testu wypierania nukleoliny, białka wiążącego G-kwadrupeksy (*nucleolin displacement assay*). Bardzo zbliżonymi wartościami powinowactwa do G-kwadrupeksów charakteryzował się dimer NDI

(**63**), w którym oba układy naftalenodiimidu połączono łańcuchem heptylowym. Związek **63** w obecności hTEL wykazywał 89-krotne wzmocnienie fluorescencji oraz 2.5-krotne wydłużenie czasu życia fluorescencji w porównaniu z dupleksem (26mer).[83]

### 3.16. POCHODNE TRIANGULENU (**64**)

Modyfikowany atomami azotu i tlenu planarny układ karbokationu triangulenu **64** w obecności kwadrupleksów cechował się znacznym wydłużeniem czasu życia fluorescencji, co z powodzeniem wykorzystano do wizualizacji oddziaływania z G-kwadrupleksami w komórce U2OS z pomocą fluorescencyjnej mikroskopii czasowo-rozdzielczej (FLIM). Ze względu na niewielką różnicę pomiędzy powinowactwem **64** do G-kwadrupleksów a innymi formami kwasów nukleinowych, związek ten nie jest przydatnym ligandem do detekcji G-kwadrupleksów *in vitro*. [84] (Rys 15)

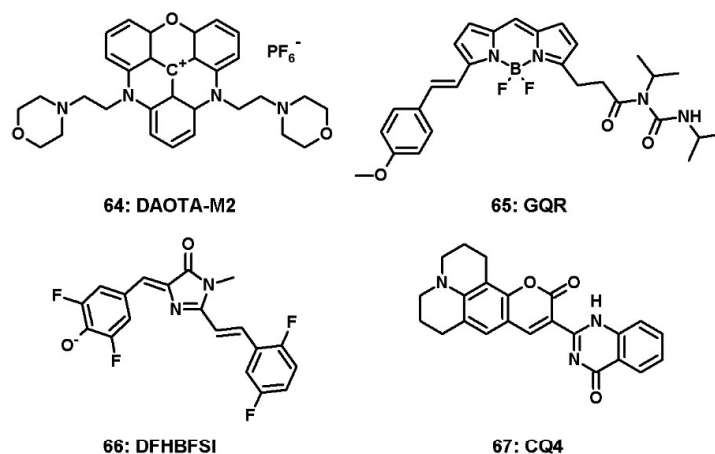
### 3.17. ORGANICZNE ZWIĄZKI BORU (**65**)

Otrzymanie selektywnej sondy fluorescencyjnej względem określonej topologii G-kwadrupleksu nadal jest wyzwaniem natomiast opracowanie liganda naceLOWanego na ściśle zdefiniowany G-kwadrupleks wydaje się być jeszcze trudniejsze. Grupa prof. Changa na podstawie badań przesiewowych biblioteki 5000 związków fluorescencyjnych uzyskali ligand **65** o wysokiej selektywności do G-kwadrupleksu 93del przyjmującego topologię równoległą. (Rys 15) Związek **65**, pochodna fluorescencyjnego układu BODIPY należy do grupy organicznych związków boru, wiąże się w bruzdzie G-kwadrupleksu 93del ( $K_D \sim 25.18 \mu\text{M}$ ) za pośrednictwem wiązań wodorowych bocznego łańcucha karboksamidowego i wykazuje największe wzmocnienie fluorescencji w porównaniu z innymi kwadrupleksami o tej samej topologii.[85]

### 3.18. POCHODNE N-METYLOIMIDAZOL-5-ONU (**66**)

Kolejnym przykładem fluorescencyjnych ligandów, selektywnych względem równoległych G-kwadrupleksów, są pochodne N-metyloimidazol-5-onu podstawionego w pozycjach 2 i 4 fluorowanymi układami aromatycznymi (styryl i benzyliden, Rys 15). Związki te są analogami chromoforu naturalnie występującego w białku czerwonej fluorescencji i wykazują znakomite dopasowanie do G-tetrad oraz emisję fluorescencji w zakresie dalekiej czerwieni. Największe powinowactwo ( $K_D \sim 1.27 \mu\text{M}$ ) oraz selektywność względem równoległych G-kwadrupleksów zaobserwowano dla **66**, związku wykorzystanego

w obrazowaniu G-kwadrupleksów w liniach komórkowych ostrej białaczki limfoblastycznej CCRF-CEM.[86]



Rysunek 15. Pochodne: triangulenu (**64**), organiczne związki boru (**65**), N-metyloimidazol-5-onu (**66**), koniugaty kumaryny i chinazoliny (**67**)

Figure 15. Derivatives of: triangulene (**64**), boron organic compounds (**65**), N-methylimidazole-5-one (**66**), conjugates of coumarin-quinazoline (**67**)

### 3.19. KONIUGATY KUMARYNY I CHINAZOLINY (**67**)

Spośród otrzymanych koniugatów kumaryny i chinazoliny, związek **67** wykazywał silne powinowactwo do G-kwadrupleksów równoległych ( $K_D \sim 28.6-71.4$  nM) i wiązał się 200-1000 krotnie silniej aniżeli do G-kwadrupleksów antyrównoległych. Najsilniejszy przyrost emisji fluorescencji **67** zaobserwowano w obecności G-kwadrupleksów c-MYC oraz Ceb25. Efekt wzrostu emisji fluorescencji **67** indukowany jest deagregacją liganda w obecności G-kwadrupleksu.[87] (Rys 15)

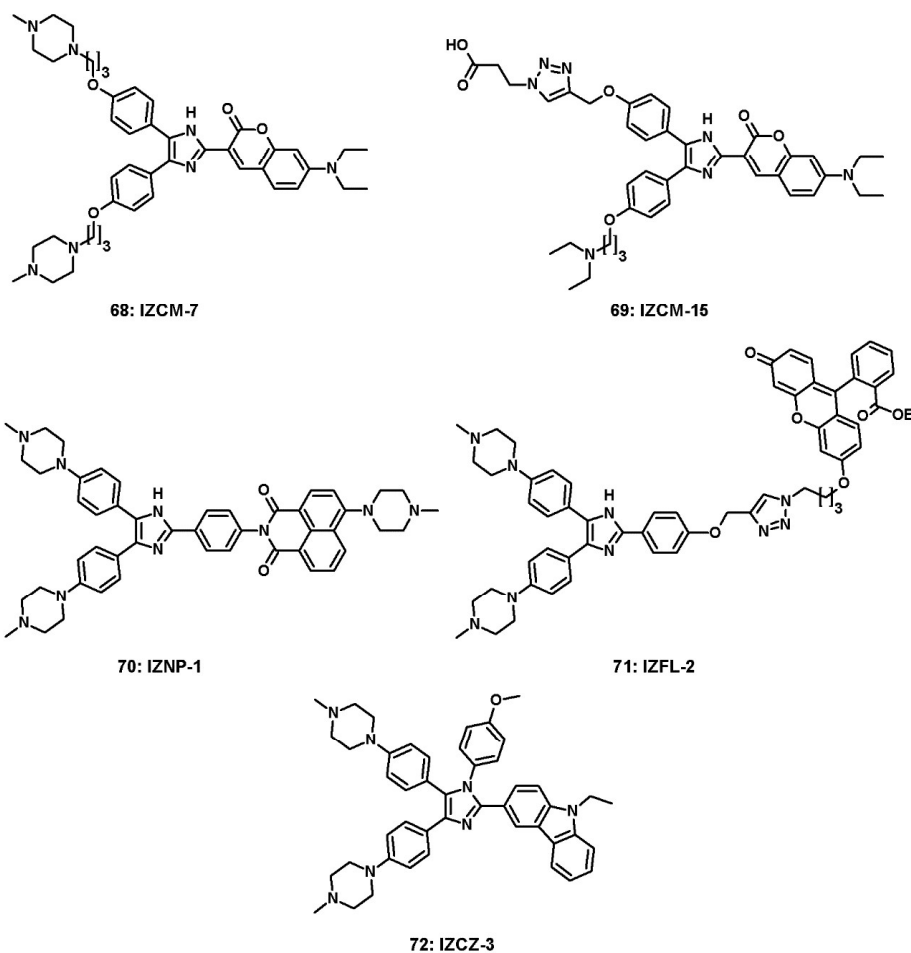
### 3.20. POCHODNE TRIARYLOIMIDAZOLU (**68-72**)

Grupa pochodnych triaryloimidazolu to związki zawierające układ imidazolu podstawiony trzema podstawnikami aromatycznymi (fenył, kumaryna lub karbazol), które stanowią kolejną obiecującą grupę fluorescencyjnych ligandów umiarkowanie selektywnych względem G-kwadrupleksów równoległych. (Rys 16) W tej serii, związek **68** podstawiony w pozycji para obu fenyli (4-metylopiperazyń-1-yl) propoksylem wykazywał silne powinowactwo do G-kwadrupleksów Pu22 i KRAS ( $K_D \sim 0.26$  i  $0.15$   $\mu\text{M}$ ) oraz nieco słabsze do G-kwadrupleksu antyrównoległego i hybrydowego tj. c-kit3 i htg22 ( $K_D \sim 1.10$  i  $1.30$   $\mu\text{M}$ ).[88]

Modelowanie molekularne oddziaływania **68** z Pu22 jednoznacznie potwierdziło warstwowy charakter interakcji pomiędzy G-tetradą a planarnie ułożonymi układami kumaryny i imidazolu. Pierścienie fenyli były skrzyżowane względem imidazolu umożliwiając efektywniejsze oddziaływanie elektrostatyczne pomiędzy dodatnio naładowanymi grupami aminowymi bocznych łańcuchów alifatycznych a ujemnie naładowanymi grupami fosforanowymi. Obserwowany wzrost wydajności kwantowej fluorescencji **68** w obecności G-kwadrupeksów równoległych wynosił 40-50, z kolei dla pozostałych topologii: 34-38. Zdecydowanie lepszą selektywnością w stosunku do kwadrupeksów równoległych cechował się **69** podstawiony triazolem, dodatkowo funkcjonalizowanym resztą kwasu propanokarboksylowego. Dla G-kwadrupeksów równoległych tj. KRAS, pu22 c-kit2 oraz bcl-2 zaobserwowano 47-58 krotny wzrost wydajności kwantowej fluorescencji w porównaniu z 5-8 krotnym wzrostem obserwowanym dla G-kwadrupeksów antyrównoległych lub hybrydowych (HRAS, c-kit3, htg22). Stała wiązania **69** do c-kit2 wynosiła  $K_D \sim 6.1 \mu\text{M}$ . [89] Kolejne związki serii triaryloimidazolu tj. **70** oraz **71**, w odróżnieniu do wyżej omówionych zawierają trzy grupy fenylowe bezpośrednio przyłączone do imidazolu. Związek **70** podstawiony w pozycjach *para* fenyli układem naftalenoimidu oraz dwoma grupami 4-metylopiperazyny cechował się znacznym powinowactwem ( $K_D \sim 7.8-13.3 \mu\text{M}$ ), wzrostem fluorescencji i silną stabilizacją długich sekwencji telomerowych (45-69 par zasad) tworzących multimeryczne formy G-kwadrupeksów ( $\Delta T_m = 20-33 \text{ }^\circ\text{C}$ ). [90] Mechanizm wiązania się **70** do wyżej wymienionych form określono jako interkalację w przestrzeni utworzonej pomiędzy krańcowymi G-tetradami sąsiadujących ze sobą podjednostek G-kwadrupeksów. Jakkolwiek modelowanie molekularne wykazało, że cząsteczka liganda nie jest planarna i oddziałuje także warstwowo z zasadami pętli oraz elektrostatycznie z łańcuchem fosforanowym. Natomiast **71**, koniugat fluoresceiny (wygaszacz fluorescencji) połączonej linkerem triazolopropylowym z pochodną trifenyloimidazolu wiąże się do G-kwadrupeksu i stanowi interesujący przykład modulowania fluorescencji za pomocą inhibicji fotoindukowanego przeniesienia elektronu. Autorzy pracy zaobserwowali silne powinowactwo ( $K_D \sim 0.53-0.63 \mu\text{M}$ ) i wyjątkową selektywność **71** do G-kwadrupeksu c-MYC, oraz 14-krotne wzmocnienie fluorescencji. [91] Podobnie jak **70**, w mechanizmie oddziaływania **71** z c-Myc nie biorą udziału G-tetrazy, stwierdzono natomiast oddziaływanie warstwowe z zasadami w pętlach oraz elektrostatyczne z łańcuchem fosforanowym. Ostatnim związkiem tej grupy jest **72**, zawierający dodatkową grupę p-metoksyfenylową na atomie azotu układu triaryloimidazolu. Spośród przebadanych G-kwadrupeksów o różnej topologii, ligand **72** wiązał się najsilniej do G-kwadrupeksu równoległego c-myc ( $K_D \sim 0.1-0.5 \mu\text{M}$ ), przy około 10-krotnym



wzmocnieniu fluorescencji oraz silnym efekcie stabilizującym strukturę c-myc ( $\Delta T_m = 20\text{ }^\circ\text{C}$ ). [92]



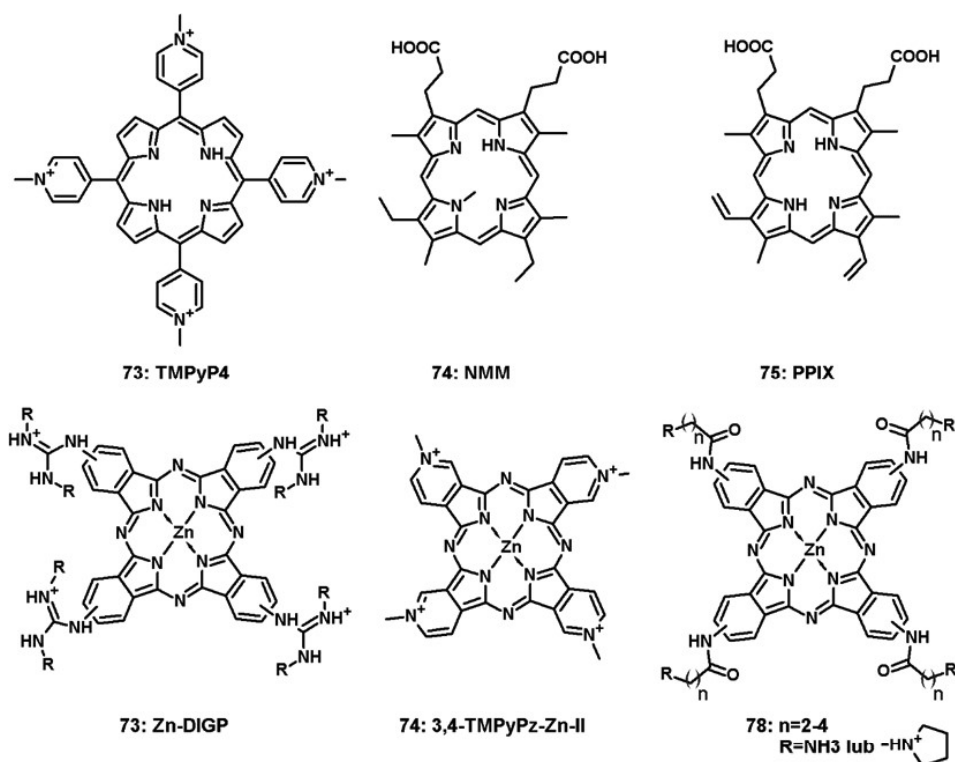
Rysunek 16. Pochodne triaryloimidazolu (68-72)

Figure 16. Derivatives of triaryl imidazole (68-72)

### 3.21. POCHODNE PORFIRYN I FTALOCYJANIN (73-78)

Porfiryny i ftalocyjaniny są planarnymi makrocyklami z układem sprzężonych  $\pi$ -elektronów, które wykazują intensywne pasma absorpcji i fluorescencji w obszarze widzialnym. Cechą wspólną obu grup jest obecność czterech 1H-pirolu sprzężonych mostkami metinowymi lub iminowymi. Grupa porfiryń obejmuje związki z peryferyjnie zlokalizowanymi podstawnikami o przeciwstawnych ładunkach takich jak dodatnio naładowane grupy metylopirydyniowe (73 i analogi)

lub ujemnie naładowane grupy kwasu karboksylowego (**74**, **75**, Rys 17). Ftalocyjaniny zawierają cztery pierścienie izoindolu połączone mostkami iminowymi peryferyjnie podstawione dodatnio naładowanymi grupami, tworząc większą powierzchnię  $\pi$ -elektronów w porównaniu z porfirynami. Molekularny mechanizm oddziaływania obu grup z G-kwadrupeksami polega na oddziaływaniu warstwowym z G-tetradą. Spośród pochodnych porfiryn, oddziaływanie **73** z różnorodnymi motywami DNA (G-kwadrupeksy, dupleksy, trypleksy, pojedyncze nici) zostało najszerzej opisane w literaturze, i wykazano podobne powinowactwo do wszystkich motywów DNA ( $K_D \sim 50\text{-}300$  nM).[93,94,95,96] Z kolei **74** i **75** wykazywały zdecydowanie wyższą selektywność do równoległych G-kwadrupeksów, aczkolwiek z niższą stałą wiązania ( $K_D \sim 2$   $\mu\text{M}$ ).[97, 98] Tak znaczną różnicę w wartości  $K_D$  **73** vs **74/75** można prawdopodobnie przypisać przeciwstawnym ładunkom na zlokalizowanych na peryferyjnych podstawnikach.



Rysunek 17. Pochodne porfiryn i ftalocyjanin (73-78)

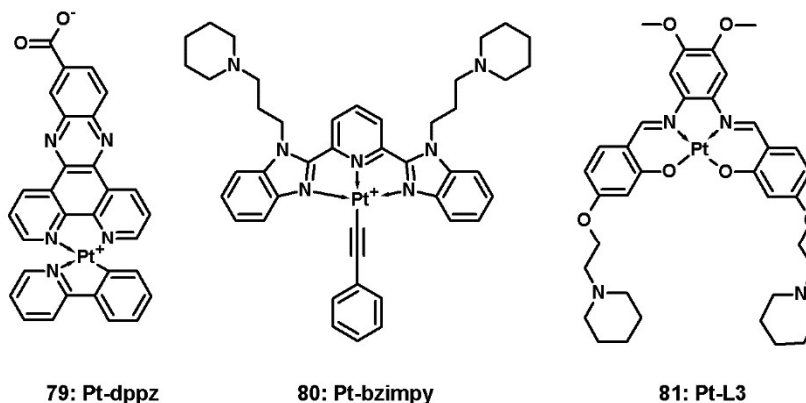
Figure 17. Derivatives of porphyrins and phthalocyanines (73-78)

Wprowadzenie kationu metalu (cynk(II), miedź(II), nikiel(II)) do centrum porfiryny czy ftalocyjaniny pozwoliło na uzyskanie nowych sond fluorescencyjnych o wysokim powinowactwie i selektywnych względem

G-kwadrupleksów. Z grupy ftalocyjanin z kationem cynku(II), związek **76** zawierający peryferyjnie zlokalizowane cztery dodatnio naładowane fragmenty guanidynowe wykazywał wysokie powinowactwo ( $K_D \sim 2$  nM) i selektywność względem G-kwadrupleksów (c-myc, h-telo).[99, 98] Znaczny wzrost emisji fluorescencji (200-krotny) **76** w obecności G-kwadrupleksów pozwolił na obrazowanie zależności pomiędzy kontrolą transkrypcji a związaniem i rozplataniem G-kwadrupleksu w żywych i utrwalonych komórkach. Związek **76** wykorzystano do obrazowania G-kwadrupleksów w żywych komórkach czerniaka SK-Mel-28 [100] lub mysich komórkach fibroblastów zarodka NIH 3T3 [101], w których skupiska kompleksów G-kwadrupleks:**76** zlokalizowane były wokół jądra, podczas gdy odpowiednik bez kationu cynku(II) występował w jądrach. Pozostałe związki grupy ftalocyjanin- cynk(II) (**77**, **78**) charakteryzowały się nieznacznie słabszym powinowactwem i selektywnością do G-kwadrupleksów, jakkolwiek potwierdzając ich strukturalne podobieństwo do **76** (obecność czterech dodatnio naładowanych alifatycznych amin).[102,103]

### 3.22. KOMPLEKSY PLATYNY(II) I RUTENU(II) (79-87)

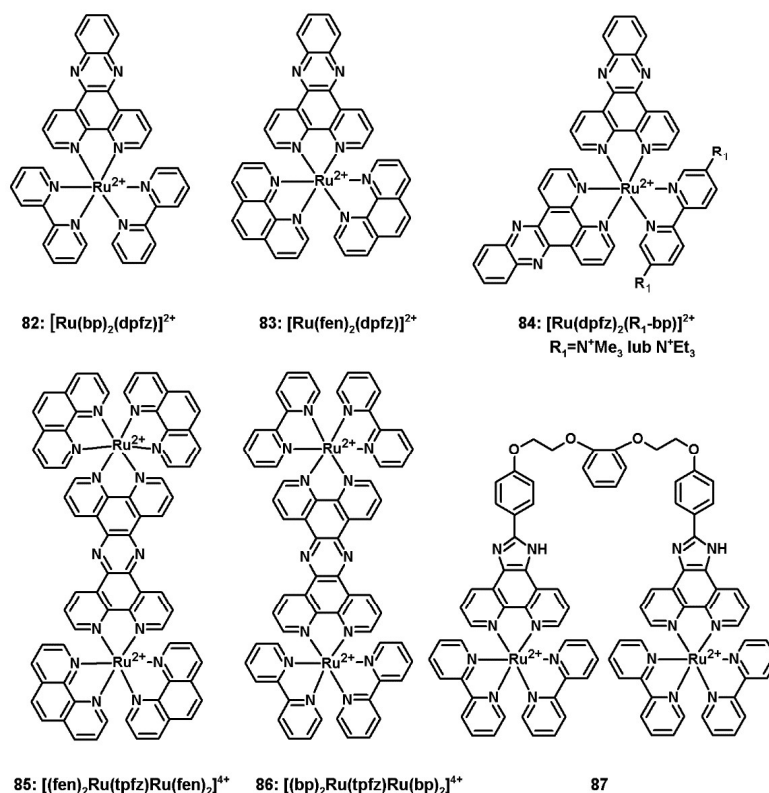
Związki kompleksów metali przejściowych (platyna(II), ruten(II)) z heteroaromatycznymi ligandami, ze względu na pożądane własności spektralne w zakresie widzialnym oraz duże przesunięcie Stokesa stanowiły przedmiot licznych badań jako fluorescencyjne sondy kwasów nukleinowych. Spośród przebadanych kompleksów platyny(II) umiarkowanym powinowactwem i selektywnością w stosunku G-kwadrupleksów charakteryzowały się pochodne dipirydofenazyny (**79**), bis(benzimidazolo) pirydyny (**80**) czy kompleksy aromatycznych zasad Schiffa (**81**). (Rys 18) Związek **79** wiąże się do krańcowych G-tetrad poprzez oddziaływania warstwowe ( $K_D \sim 0.1-1$   $\mu$ M) wykazując 293-krotny wzrost emisji fluorescencji po związaniu się do G-kwadrupleksu telomerowego, natomiast dla dupleksów DNA obserwowano zdecydowanie niższy przyrost emisji.[104] Efekt wzmocnienia fluorescencji przypisano zjawisku transferu ładunku metal-ligand, który ma miejsce gdy kompleks **79** wiążąc się do G-tetrydy przestaje być solwatowany przez cząsteczki wody. Pozostałe dwa przykłady tj. **80** i **81** charakteryzowały się, w porównaniu z **79**, słabszym przyrostem emisji fluorescencji odpowiednio 38 i 8-krotnym i nieznacznie mniejszym powinowactwem do G-kwadrupleksów.[105,106]



Rysunek 18. Kompleksy platyny(II) (79-81)  
 Figure 18. Platinum(II) complexes (79-81)

Kompleksy rutenu(II) stanowią obszerną grupę związków intensywnie badanych jako potencjalne związki przeciwnowotworowe oraz co ważniejsze, jako ligandy kwasów nukleinowych. (Rys 19) Związki tej grupy są przeważnie nieplanarne przyjmując geometrię oktaedryczną lub pseudooktaedryczną, co w kontekście jednoznacznego określenia mechanizmu oddziaływania z G-kwadrupleksami może stanowić intrygujący problem badawczy. Kompleksy rutenu (II) zawierające dipirydofenazynę (dpfz) i bipirydynę (bp) lub fenantrolinę (fen) jako ligandy (odpowiednio **82**, **83**) wykazują powinowactwo do G-kwadrupleksów telomerowych w zakresie 0.2-0.7  $\mu\text{M}$  i ok 4-5 krotny wzrost emisji fluorescencji.[ 107 , 108 ] Obecność podstawników alkiloamoniowych w fragmencie bipirydyny związku **84** poprawiło powinowactwo do G-kwadrupleksów telomerowych 10-70 krotnie, jakkolwiek obserwowano zaledwie 8-krotny przyrost fluorescencji.[ 109 ] Kompleksy zawierające dwa kationy rutenu(II) z centralnie położonym wielopierścieniowym układem aromatycznym tetrapirydofenazyny (tpfz) oraz peryferyjnie zlokalizowanymi układami fenantroliny lub bipirydyny tj. **85** i **86** wykazały 150 krotny przyrost emisji fluorescencji w obecności G-kwadrupleksów telomerowych oraz 2.5 krotnie słabszy przyrost emisji w obecności dupleksów (60 krotny).[ 110 ] Rozróżnienie oddziaływania wspomnianych wyżej kompleksów rutenu(II) z G-kwadrupleksem od kompleksów z dupleksem określono na podstawie hipsokromowego przesunięcia (około 30 nm) maksimum emisji fluorescencji oraz dłuższego czasu zaniku fluorescencji ( $126 \pm 3$  ns vs  $88 \pm 4$  ns). Tak znaczną zmianę fotofizycznych własności autorzy tłumaczą lepszym dopasowaniem aromatycznego układu

dikompleksów rutenu(II) z układem G-tetrazy i lepszą izolacją cząsteczek wody od cząsteczki liganda. Ponadto, na podstawie pomiarów kalorymetrycznych autorzy stwierdzili, że dla **85** oddziaływanie z krańcową G-tetradą G-kwadrupeksu jest stabilniejsze niż interkalacja (5 kJ/mol), jakkolwiek biorąc pod uwagę duży rozmiar i złożoną strukturę trójwymiarową dikompleksu rutenu(II), proponowany mechanizm oddziaływania jest nadal kwestionowany. Związek **85** został wykorzystany do obrazowania G-kwadrupeksów i dupleksów w jądrach, wykorzystując różnice w długości fali emisji w obecności obu struktur, odpowiednio 630-640 nm oraz 670-700 nm.[111] Innym przykładem podwójnego kompleksu jest **87**, w którym każdy z kationów rutenu(II) kompleksowany jest dwoma układami bipirydyny i jednym układem 2-fenyl-1H-imidazo[4,5-f][1,10]fenantroliny.[112] Oba kompleksy są połączone elastycznym łańcuchem glikolu polietylenowego. Stwierdzono około 15-krotne wzmocnienie emisji fluorescencji w obecności G-kwadrupeksów równoległych, do których **87** wiązał się z umiarkowaną stałą ( $K_D \sim 3.29 \mu\text{M}$ ) w stosunku 2:1. Ponadto zaobserwowano umiarkowaną stabilizację struktury G-kwadrupeksu ( $\Delta T_m = 12.7 \text{ }^\circ\text{C}$ ) w obecności **87**.

Rysunek 19. Kompleksy rutenu(II) (**82-87**)Figure 19. Ruthenium(II) complexes (**82-87**)

### 3.23. LIGANDY FLUORESCENCYJNE WIĄŻĄCE SIĘ DO G-KWADRUPLEKSÓW RNA (88-92)

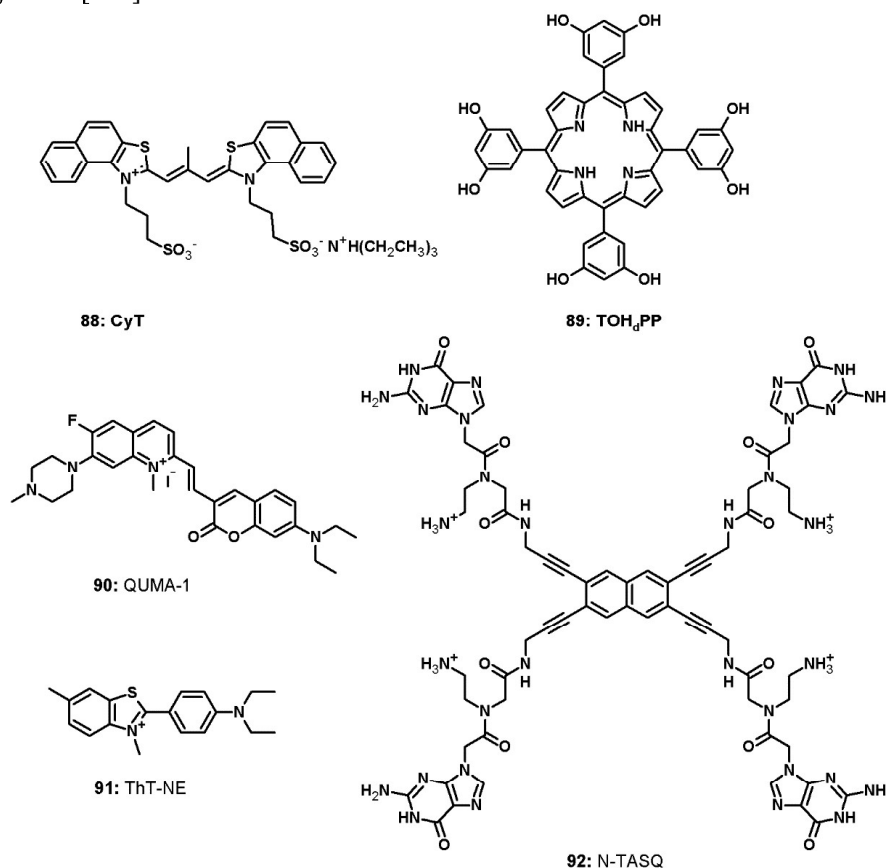
Spośród fluorescencyjnych ligandów wykazujących powinowactwo do G-kwadrupleksów RNA, **88-92**, cztery z nich, poza **89**, znalazło zastosowanie w fluorescencyjnym bioobrazowaniu G-kwadrupleksów RNA w komórkach. (Rys 20) Należy zaznaczyć, że pomimo uzyskania interesujących wyników, większa część z tych ligandów wykazuje emisję fluorescencji także w obecności G-kwadrupleksów DNA, stąd za selektywne względem RNA należałoby uznać jedynie dwa związki: **89** i **90**. Związek **88** należy do grupy barwników cyjaninowych i zawiera łańcuch polimetinowy sprzęgający dwa układy heterocykliczne podstawione resztami propanosulfonianu i cechuje się niską fluorescencją w stanie wolnym. Badania wykazały ponad 1000-krotny wzrost fluorescencji **88** ( $\lambda_{em}=595\text{nm}$ ) w obecności G-kwadrupleksów RNA ( $K_D$  2.86-8.54  $\mu\text{M}$ ) i tylko 25-krotny w obecności dupleksu lub pojedynczej nici RNA ( $K_D$  15.75-41.32  $\mu\text{M}$ ).[113] Tak znaczna różnica wzrostu emisji fluorescencji w zależności od motywu strukturalnego RNA wynika z zahamowania rotacji wokół łańcucha polimetinowego oraz znacznego wzrostu wydajności kwantowej fluorescencji w obecności G-tetrad ( $\Phi_F=0.74-0.95$ ). Sonda **88** została z powodzeniem wykorzystana do detekcji kwadrupleksów RNA w cytoplazmie, zarówno w utrwalonych jak i żywych liniach komórkowych (A549).

Selektywne wiązanie do G-kwadrupleksów telomerowych RNA (TERRA) wykazano dla **89**, związku zawierającego porfirynewy układ makrocykliczny. Zaobserwowano 60-krotny wzrost emisji fluorescencji ( $\lambda_{em}=732\text{ nm}$ ) liganda **89** w obecności TERRA. Selektywność oddziaływania **89** względem TERRA przypisano oddziaływaniom wodorowym grup hydroksylowych liganda z resztami fosforanowymi lub/i rybozą urydyny a także umożliwieniu przejścia do stanu hiperporfirynewego, która to transformacja nie jest uprzywilejowana dla G-kwadrupleksów równoległych DNA.[114]

Związek **90** w swojej strukturze zbliżony do izaindigotonu, zawiera szkielet N-metylowanej 6-fluorochinoliny podstawionej sprzężonym wiązaniem winylowym z kumaryną. Autorzy pracy wykazali silne wiązanie **90** do G-kwadrupleksów RNA (TERRA  $K_D \sim 0.56\ \mu\text{M}$  a także FMR1, TB1, MT3) oraz znaczący wzrost emisji fluorescencji przy  $\lambda_{em}=660\text{ nm}$ . Ponadto, na podstawie analizy zmian intensywności fluorescencji **90** zademonstrowano jego zastosowanie do wizualizacji w czasie rzeczywistym zwijania i rozplatania G-kwadrupleksu RNA w żywych komórkach HeLa.[115]

Pochodna tioflawiny T podstawiona dwoma grupami etylowymi w miejscu obu grup metyloowych (**91**), wykazała wysokie powinowactwo do sekwencji CG2a

( $K_D \sim 1.77 \pm 0.19 \mu\text{M}$ ), stanowiącej fragment cząsteczki RNA wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV), przyjmującej strukturę G-kwadrupleksu. Autorzy pracy wykazali najwyższą skuteczność **91** w fluorescencyjnym bioobrazowaniu RNA HCV w liniach komórkowych oraz udowodnili jego kliniczną przydatność w monitorowaniu HCV w komórkach pobranych od zainfekowanych pacjentów.[116]



Rysunek 20. Ligandy fluorescencyjne wiążące się do G-kwadrupleksów RNA (**88-92**)

Figure 20. Fluorescent ligands binding to RNA G-quadruplexes (**88-92**)

Związek **92** może być przykładem projektowania „inteligentnego” liganda, w którym cztery reszty guaninowe przyłączone do naftalenu, w obecności G-kwadrupleksu RNA składają się do G-tetrazy (konformacja zamknięta) wywołując 22-krotny wzrost emisji fluorescencji. W stanie niezwiązanym, **92** wykazuje niską fluorescencję przyjmując konformację otwartą. Nieco słabszą emisję fluorescencji **92** zaobserwowano również w obecności G-kwadrupleksów

DNA. Obserwacja linii komórkowych (MCF7, U2OS, B16F10 ) barwionych **92** wykazała pojawienie się licznych skupisk fluorescencji w rejonie cytoplazmy, których pojawienie się autorzy przypisali tworzeniu połączeń **92**:kwadrupeks RNA. [117]

### UWAGI KOŃCOWE

Przedstawione w niniejszym artykule wybrane przykłady związków fluorescencyjnych typu „light-up”, selektywnych względem G-kwadrupeksów, obrazują znaczny wzrost zainteresowania badaczy tematyką oddziaływania G-kwadrupeksów z ligandami oraz metodami ich wizualizacji opartymi na fluorescencji. Różnorodność strukturalna przebadanych związków z jednej strony pozwala na wstępne określenie ogólnych cech strukturalnych charakteryzujących fluorescencyjny ligand selektywny względem G-kwadrupeksów. Z drugiej strony, wyniki prac pokazują, że otrzymanie liganda wysoce selektywnego względem określonej topologii G-kwadrupeksu DNA/RNA stanowi nadal spore wyzwanie. Niemniej jednak, biorąc pod uwagę znaczną ilość przebadanych sond fluorescencyjnych, perspektywy rozwoju tej grupy związków i ich zastosowań w bioobrazowaniu G-kwadrupeksów w komórce można ocenić jako obiecujące. Pod tym względem, wielopierścieniowe związki heteroaromatyczne umożliwiają precyzyjne dostrojenie właściwości biochemicznych, kinetycznych i fotofizycznych poprzez funkcjonalizację układu heteroaromatycznego grupami o charakterze donorowym lub akceptorowym. Wybór sondy właściwej do realizacji określonego zastosowania powinien uwzględniać zarówno parametry fotofizyczne związku jak i jego zdolność do przenikania przez błony komórkowe oraz niską cytotoksyczność.

W niniejszym artykule zebrano przykłady sond mających zarówno znaczenie poznawcze jak i te co do których istnieje spora szansa na ich praktyczne zastosowanie. Wiele obiecujących sond, wykazujących duże powinowactwo i selektywność względem kwadrupeksów *in vitro*, nie przenikała do komórek pozwalając jedynie na wyznaczenie parametrów kinetycznych i uzyskanie strukturalnych danych dotyczących mechanizmu oddziaływania liganda z G-kwadrupeksem. Z drugiej strony, istnieje ograniczona pula ligandów charakteryzujących się akceptowalną zdolnością do penetracji do komórek, która umożliwiła wizualizację kwadrupeksów *in vivo*. Wartą podkreślenia cechą niektórych sond jest ich, zależna od kwadrupeksu, zdolność do zmiany własności fotofizycznych takich jak długość fali absorpcji i emisji lub wydłużenie czasu życia fluorescencji. Związki te mogą być wykorzystane jako fluorescencyjny znacznik do mapowania domen kwadrupeksowych co ma istotne znaczenie w świetle rozwoju ultraczułego oprzyrządowania do obrazowania lokalizacji określonych substruktur w żywych komórkach. Ponadto, związki te mogą być stosowane w wysokoprzepustowych badaniach przesiewowych w kierunku odkrywania nowych leków przeciwnowotworowych zdolnych do specyficznego wiązania się do określonych topologii kwadrupeksów.



Tabela 1. Podsumowanie właściwości sond fluorescencyjnych wiążących się do G-kwadrupleksów DNA/RNA  
Table 1. Summary of fluorescent ligands binding to DNA/RNA quadruplexes properties

Zw	$\lambda_{ex}$ (nm)	$\lambda_{em}$ (nm)	Przesunięcie Stokesa (nm)	Wzmocnienie fluorescencji	$K_D$ ( $\mu$ M)	Sposób wiązania do kwadrupleksu	Preferowana topologia kwadrupleksu	Bioobrazowanie komórek (lokalizacja)	Lit
1	485	550	65	100-1000	0.3-3	Warstwowy	Brak selektywności względem określonej topologii G-kwadrupleksu	linia utrwalonych komórek U2OS (jądro, cytoplazma)	9
2	527	573	46	260-380	1-5	Warstwowe	Równoległa : c-myc; Antyrównoległa: telo	linia utrwalonych komórek MCF7	10
3	540	585	45	260-430	0.89	Warstwowe	Antyrównoległa: HRAS; Równoległy: c-kit2, pu-22	linia żywych komórek PC3 (jądro)	11
4	475	630	155	170-270	1	Warstwowe	Antyrównoległe: telo21, hg22, Oxy28	linia utrwalonych komórek PC3 (jądro)	12
5	466	650	184	110-250	0.42-2.5	Warstwowe	Równoległa: CM22, C-kit; Antyrównoległy: HRAS, Hybrydowa: 22AG, G3T3, G4TTA	linia żywych komórek HeLa (mitochondria)	13
6	600	651	51	18-36	0.039-0.089	Warstwowe; Elektrostatische	Równoległa: c-myc; bel-2, kit-1, kras	b.d.	14
7	500	549	49	6-8	>2	Warstwowe	Równoległa: c-kit2, c-myc; Hybrydowa: 22AG	b.d.	15
8	430	490	60	150-270	b.d.	Warstwowe	Hybrydowa: mitochondrialne DNA	linia żywych komórek HeLa i MCF-7 (lizosomy)	16
9	600	680	80	20	2.1	Warstwowe	Równoległa: c-myc	b.d.	17
10	579	610	31	220-500	0.11	Warstwowe; Elektrostatische	Antyrównoległa (dimeryczna spinka)	b.d.	18
11	584	600	16	70	b.d.	Warstwowe	Hybrydowa: bel-2 2345, H24; Równoległa: c-myc 2345, c-kit1	b.d.	19-21
12	550	600	70	1000	b.d.	Warstwowe	Hybrydowa: bel-2 2345, M24; Równoległa: c-myc 2345, c-kit1	b.d.	19-21
13	560, 580	715, 660	135	110	1.2	Warstwowe	Hybrydowa: 22AG	b.d.	22
14	425	490	65	1200-2100	0.77-3.51	Warstwowe, Elektrostatische	Równoległa: 22AG (K <sup>+</sup> ); Antyrównoległa: 22AG (Na <sup>+</sup> )	b.d.	23-27
15	415	500	85	487-630 <sup>RNA</sup> 320-439 <sup>RNA</sup>	6.25-13	Warstwowe, 5'-koniec	Brak selektywności względem określonej topologii G-kwadrupleksu	linia żywych i utrwalonych komórek HeLa; linia żywych kom HUVEC, SMMC-7721 and	28
16	415	492	77	90-160	18-57	Warstwowe, 5'-koniec	Równoległy DNA i RNA; Hybrydowy DNA	b.d.	29
17	415	485	70	240	13-23	Warstwowe	Równoległa: 27myc	b.d.	30
18	343	460	117	10	0.2-0.7	Interkalacja	Równoległa: c-myc	b.d.	31, 32

19	b.d.	b.d.	b.d.	50	1.88	Wąstwowo	Hybryda=>Równoległy; (T <sub>2</sub> G <sub>4</sub> ) <sub>4</sub>	b.d.	33
20	464 <sup>a</sup> /494 <sup>b</sup>	603 <sup>a</sup> /592 <sup>b</sup>	139 <sup>a</sup> /98 <sup>b</sup>	10-12	0.09-0.12	Interkalacja	Antyrównoległy: 22A	b.d.	34
21	460	555	95	80-120	0.033	Wąstwowo	Hybrydowa:ht22; Równoległa:pu22	linia żywych komórek MCF-7/ADR, CLI-0, HI299, HeLa, MCF-7, SAS	35-37, 40
22	475	575	100	60-90	0.00089	Wąstwowo	Hybrydowa; Antyrównoległy: ht24	linia żywych komórek HI299, Cap9-22 (jądro); Detroit-551, IMR-90 (cytoplazma)	35-39
23	470	550	80	20-50	0.14	Wąstwowo	Antyrównoległa: mitochondrialne DNA mt9438, mt6363	linia żywych komórek CLI-0, HI299, HeLa, BJ-1 (mitochondria); IMR-90, MRC-5 (lizosomy)	41
24	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	Wąstwowo	b.d.	linia żywych komórek CLI-0, MCF-7, MCF7/ADR (mitochondria, jądro), MRC-5	42
25	496	649	153	40-60	0.63-0.67	Wąstwowo	Równoległa: c-kit2, c-myc	b.d.	43
26	408	462	54	335-1800	0.28-0.60	Wąstwowo	Równoległa: EAD, c-myc, and c-kit2; Hybryda: 22AG	b.d.	45
27	385	500	115	400-500	0.67-0.84	Wąstwowo	Równoległa: c-myc, Pu22	linia żywych komórek MCF-7	46
28	330	466	136	8	0.13-0.33	Wąstwowo; Elektrostatische	Hybrydowa: hum21 (K <sup>+</sup> ); Antyrównoległa: hum 21 (Na <sup>+</sup> )	linia utrwalonych komórek HeLa (jądro)	47
29	330	470	140	6	0.03-0.05	Wąstwowo; Elektrostatische	Hybrydowa: hum21 (K <sup>+</sup> ); Antyrównoległa: hum 21 (Na <sup>+</sup> )	linia utrwalonych komórek HeLa (jądro)	47
30	290	522	232	2.3-5.5	0.3-1.38	Wąstwowo	Równoległa, c-kit2, c-myc	linia żywych komórek HepG2 (jądro)	48
31	526	600	74	100-110	10	Wąstwowo	Równoległa, c-myc	b.d.	49
32	467	613	146	29-41	b.d.	Wąstwowo	Równoległa: pu22; Hybrydowa: htg21, UpsB; Antyrównoległy: HRAS	linia utrwalonych komórek SiHa (jąderko)	50
33	460	570	110	22	b.d.	Wąstwowo	Antyrównoległa: telo21	linia utrwalonych komórek COS7, MCF-7 (jąderko)	51
34	338	512	174	150	0.13-0.43	Wąstwowo	Antyrównoległa: Hum24, Oxy28, 22AG	linia żywych komórek MCF-7 (cytoplazma)	52
35	450	590	140	4	3.0-3.65	Wąstwowo, 3' koniec	Równoległa: c-myc, c-kit2, VEGF, ADAM10 (RNA)	linia utrwalonych komórek ARPE-19 (jąderko)	53
36	486	550	64	50	1.99±0.53	Wąstwowo	Antyrównoległa: telo21	linia żywych komórek PC3 (jądro)	54

37	531	617	86	150-290	1.43-3.70	Warstwowe	Brak selektywności: hras, hlg22, oxy28, telo21, 4telo, human12, bel2, ekit2, pu22, pu27, ekit1, vegh	linia żywych komórek PC3 (jądro)	55
38	456	587	131	60-100	0.3-10	Częściowo warstwowe	Brak selektywności: Hlg-21, 22A <sub>g</sub> , C-myc, CM22, C-kit1, G3T3, Hras	b.d.	56
39	441	630	189	118, 145	0.45-0.55	Elektrostatyczne	Równoległa: c-myc, CM22	linia żywych i utrwalonych komórek HepG2 (cytoplazma)	57
40	463	590	127	550	0.53	Warstwowe	Równoległa: c-myc	linia żywych komórek HepG2 (jądro)	58
41	498	568	70	10	0.14-0.74	Warstwowe	Równoległa: KRAS-22RT	linia żywych komórek HeLa (jądro)	59
42	330	475	145	10-20	0.138-0.367	Interkalacja	Hybrydowa: hum21,hum45, hum51, hum57, hum63, hum69	b.d.	60
43	330	475	145	10-20	0.048-0.169	Interkalacja	Hybrydowa: hum21,hum45, hum51, hum57, hum63, hum69	b.d.	60
44	343	448	105	2.5	0.1	Warstwowe; Elektrostatyczne	Hybrydowa: HTG21	b.d.	64
45	353	450	97	5	0.14	Warstwowe; Elektrostatyczne	Hybrydowa: HTG21	b.d.	64
46	570	653	83	20-100	0.569-1.17	b.d.	Hybrydowa: hlg21	linia żywych i utrwalonych komórek HeLa (jąderko)	61
47	630	650	20	7	b.d.	b.d.	Równoległa RNA: NRAS	linia utrwalonych komórek SiHa (cytoplazma), HEK293T, HeLa	62, 63
48	355	530	175	10	0.284	b.d.	Antyrównoległa: telo21	b.d.	65
49	636	670	34	100	3.22	Warstwowe	d(G <sub>2</sub> T) <sub>3</sub> G	b.d.	66-68
50	580	635	55	3-7	0.003-0.059	Warstwowe	Antyrównoległa>Równoległa	b.d.	66-68
51	521	620	99	90-190	b.d.	Elektrostatyczne	Antyrównoległa: 22AG, G3T3, HRAS; Równoległa: sre1, ekit, c-myc, NRAS, TERRA	b.d.	69
52	462	627	165	12-16	0.071	Warstwowe, Elektrostatyczne	Równoległa: c-kit, CM22; Hybrydowa: HTG-21	b.d.	70
53	470	550	80	20-50	0.83	Warstwowe	Hybrydowa: 22AG; Równoległa: c-kit1, c-kit3, CM22, c-myc, c-kit3; Hybrydowa: Hum45, HRAS, HTG21; Antyrównoległa: G3T3.	linia utrwalonych komórek HepG2 (cytoplazma)	71
54	470	595	125	130-240	0.11	Warstwowe, Elektrostatyczne	Hybrydowa: HTG-21, HRAS; Antyrównoległa: 22AG, G3T3; Równoległa: c-myc, c-kit, CM22	linia utrwalonych komórek HepG2 (jąderko)	72
55	470	595	125	180; 45-90	0.028	Warstwowe	Antyrównoległa: HRAS; Równoległa; Hybrydy	linia żywych komórek HepG2 (jąderko)	73

56a	445	640	195	7-10	b.d.	Warstwowe, Elektrostatyczne	Równoległa: c-myc, hum45	linia utrwalonych komórek HepG2 (jądro)	74
56b	445	640	195	20-80	b.d.	Warstwowe, Elektrostatyczne	Równoległa: c-myc, hum45	linia utrwalonych komórek HepG2 (jądro)	74
57	610	668	58	40-70	b.d.	Warstwowe	Hybrydowa: c-kit*, HRAS; Antyrównoległa: 22AG, G3T3, G4T1A, hTelo; Równoległy: c-src, c-myc	linia żywych i utrwalonych komórek A549, CHO, HeLa (jąderko)	75
58	680	710	30	20-40	6.57-21.6	Warstwowe	Równoległa: EAD, Pu22, C-kit2	b.d.	76
59	670	698	28	40-70	0.044	Warstwowe	Równoległa: c-kit2 EAD, Pu22, Pu 27, Tel22	linia żywych komórek MCF-7 (lizosomy)	77
60	661	744	83	14000-20000	10	Warstwowe	Równoległa: VEGF, 25-Ceb, VAV-1, c-myc	b.d.	78
61	452	666	214	11-34	0.14-0.71	Warstwowe	Równoległa: c-myc, c-kit1, c-kit2; Antyrównoległa: HRAS1; Hybrydowa: 22AG	b.d.	79, 80
62	600	613	13	1.5-3	0.000003-0.184	b.d.	Hybrydowa: hTel22; Antyrównoległa: hTel22;	linia utrwalonych komórek HEK-293T (jądra)	81, 82
63	525/610	610/670	85(60)	40-89	b.d.	b.d.	Równoległa: c-myc, c-kit1, c-kit2; Antyrównoległa: hTel22;	b.d.	83
64	436	581	145	3.3-4.9	0.82-0.99	bd	Brak selektywności: TBA, myc2345, BCL-2 (RNA), ckit87up, PDGF-A	linia żywych komórek U2OS (jądra)	84
65	360	597	237	20-30	2.5.18	Elektrostatyczne	Równoległa: 93del, J19, T95	bd	85
66	513	606	93	10	1.27	Warstwowe	Równoległa	linia żywych komórek CCRF-CEM	86
67	495	520	25	4-5	0.028-0.833	Warstwowe	Równoległa: c-myc, Ceb25, VAV-1, VEGF	linia żywych i utrwalonych komórek HeLa (mitochondria, cytoplazma)	87
68	450	525	75	34-50	0.15-0.26	Warstwowy	Równoległa: Pu22, KRAS	bd	88
69	450	525	75	25-30	6.1	Warstwowy, Elektrostatyczne	Równoległa: c-kit2	bd	89
70	400	510	110	4-8	7.8-13.3	Warstwowy, Elektrostatyczne	Hybrydowa: hlg45, hlg51, hlg57	linia komórek SiHA, A549	90
71	450	525	75	11-15	0.53-0.63	Warstwowy	Równoległa: c-myc	bd	91
72	350	465	115	10	0.1-0.5	Warstwowy, Elektrostatyczne	Równoległa: c-myc	bd	92
73	424	657, 722	233, 298	1.5-2.5	0.05-0.3	Warstwowe	Brak selektywności	bd	93-96
74	399	614	215	2-10	0.5-10	Warstwowe	Równoległa	bd	97
75	410	630	220	16-18	0.056-0.151	Warstwowe	Równoległa	bd	98

76	620	705	85	200	0.002-0.01	Warstwowe	Równoległa: c-myc	linia żywych i utrwalonych komórek HeLa, MCF7, B16F10, SH-SY5Y, SK-Mel-28	99
77	bd	bd	bd	bd	1	Warstwowe	Antyrównoległa: Htelo	bd	102
78	630	705	75	200-800	0.03-0.150	Warstwowe	Antyrównoległa: Htelo; Równoległa: C-myc, c-kit	bd	103
79	350	512	162	293	0.09-0.12	Warstwowy, 3' koniec	Hybrydowa: Htel	bd	104
80	350	622	272	38	0.45-0.71	Warstwowe	Równoległa: c-myc	bd	105
81	372	652	280	8	5.1-6.8	Warstwowe	Równoległa: c-myc	bd	106
82	460	620	160	27	0.71	bd	Hybrydowa: 22AG (K <sup>+</sup> ); Antyrównoległa: 22AG (Na <sup>+</sup> )	bd	107
83	460	620	160	35-50	0.19-0.33	bd	Hybrydowa: 22AG (K <sup>+</sup> ); Antyrównoległa: 22AG (Na <sup>+</sup> )	bd	108
84	457	630	173	5-8	0.01-0.02	bd	Antyrównoległa: AG <sub>3</sub> (T <sub>2</sub> AG <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	bd	109
85	450	658 (ds), 631 (GQ)	208 (ds), 181 (GQ)	150	0.23	Warstwowe	bd	linia żywych komórek MCF-7	110, 111
86	450	647 (ds), 605 (GQ)	197 (ds), 155 (GQ)	bd	0.1	Warstwowe	bd	linia utrwalonych komórek MCF-7	110
87	468	604	136	130	3.29	bd	Równoległa: c-kit, Pu18, VEGF; Hybrydowa: bc12, G4TTA	bd	112
88	532	595	63	1115-1827	2.86-8.54	Warstwowy	Równoległa RNA: Tel22, VEGF, TRF2, BCL-2, NRAS	linia utrwalonych komórek A549	113
89	467	732	265	200-400	0.35-0.89	Warstwowy, 5' koniec	Równoległa RNA; TERRA, rUAG4	bd	114
90	555	660	105	40-60	0.57	Warstwowy, elektrostatische	Równoległa RNA; TERRA, FMRI, TBI, MT3	Linia żywych i utrwalonych komórek HeLa	115
91	461	495	34	1693	bd	Warstwowy	Równoległa: CG2a	Linia żywych komórek Huh7	116
92	286	396	110	22	bd	Warstwowy	Równoległa RNA: TERRA	Linia żywych komórek MCF7, U2OS, B16F10	117

Zw 20 a=wolny; b=związany; Zw 85, 86 ds= dupleks, GQ= G-kwadrupleks

## PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] H.L. Lightfoot, T. Hagen, N.J. Tatum, J. Hall, *FEBS Letters*, 2019, **593**, 2083.
- [2] D. Rhodes, H.J. Lipps, *Nucl. Acids Res.*, 2015, **43**, 8627.
- [3] J. Spiegel, S. Adhikari, S. Balasubramanian, *Trends Chem.*, 2020, **2**, 123.
- [4] S. Millevoi, H. Moine, S. Vagner, *WIREs RNA*, 2012 **3**, 495.
- [5] M.M. Fay, S.M. Lyons, P. Ivanov, *J. Mol. Biol.*, 2017, **429**, 2127.
- [6] M. Małgowska, D. Gudanis, A. Teubert, G. Dominiak, Z. Gdaniec, *BioTechnologia*, 2012, **93**, 381.
- [7] P. Murrat, Y. Singh, E. Defrancq, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 5293.
- [8] J. Jaumot, R. Gargallo, *Curr. Pharm. Design*, 2012, **18**, 1900.
- [9] E. Largy, A. Granzhan, F. Hamon, D. Verga, M.P. Teulade-Fichou, *Top. Curr. Chem.*, 2013, **330**, 111.
- [10] Y.L. Lu, S.C. Yan, F.Z. Chan, L. Zou, W.H. Chung, W.L. Wong, B. Qiu, N. Sun, P.H. Chan, Z.S. Huang, L.Q. Gu, K.Y. Wong, *Chem Commun.*, 2011, **47**, 4971.
- [11] Y.J. Lu, Z.Y. Wang, D.P. Hu, Q. Deng, B.H. Huang, Y.X. Fang, K. Zhang, W.L. Wong, C.F. Chow, *Dyes Pigment.*, 2015, **122**, 94.
- [12] Y.L. Lu, Q. Deng, J.Q. Hou, D.P. Hu, Z.Y. Wang, K. Zhang, L.G. Luyt, W.L. Wong, C.F. Chow, *ACS Chem. Biol.*, 2016, **11**, 1019.
- [13] L.L. Li, H.R. Xu, K. Li, Q. Yang, S.L. Pan, X.Q. Yu, *Sens. Actuators B*, 2019, **252**, 575.
- [14] X. Chen, J. Wang, G. Jiang, G. Zua, M. Liua, L. Zhoua, R. Pei, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 70117.
- [15] P. Yang, A. DeCian, M.R. Teulade-Fichou, J.L. Mergny, D. Monchaud, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, **48**, 2188.
- [16] H. Chen, H. Sun, S. Zhang, W. Ya, Q. Li, A. Guan, J. Xiang, M. Liud, T. Tang, *Chem. Commun.* 2019, **55**, 5060.
- [17] B. Karg, A. Funke, A. Ficht, A. Sievers-Engler, M. Lämmerhofer, K. Weisz, *Chem. Eur. J.*, 2015, **21**, 13802.
- [18] Q. Chen, I.D. Kuntz, R.H. Shafer, *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, **93**, 2635.
- [19] Q. Yang, J. Xiang, S. Yang, Q. Zhou, Q. Li, Y. Tang, G. Xua, *Chem Commun.*, 2009, 1103.
- [20] Q. Yang, J. Xiang, S. Yang, Q. Li, Q. Zhou, A. Guan, X. Zhang, H. Zhang, Y. Tang, G. Xu, *Nucl. Acids Res.* 2010, **38**, 1022.
- [21] Q. Yang, J.F. Xiang, S. Yang, Q. Li, Q. Zhou, A. Guan, L. Li, Y. Zhang, X. Zhang, H. Zhang, Y. Tang, G. Xu, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 9135.
- [22] H. Ihmels, L. Thomas, *Org. Biomol. Chem.* 2013, **11**, 480.
- [23] J. Mohanty, N. Barooah, V. Dhamodharan, S. Harikrishna, P.I. Pradeepkumar, A.C. Bhasikuttan, *J. Am. Chem. Soc.* 2013, **135**, 367.
- [24] S. Xu, Q. Li, J. Xiang, Q. Yang, H. Sun, A. Guan, L. Wang, Y. Liu, L. Yu, Y. Shi, H. Chen, Y. Tang, *Sci Rep*, 2016, **6**, 24793.
- [25] A.M. Fleming, Y. Ding, A. Alenko, C.J. Burrows, *ACS Infect Dis* 2016, **2**, 674.
- [26] M. Zahin, W.L. Dean, S.J. Ghim, J. Joh, R.D. Gray, S. Khanal, G.D. Bossart, A.A. Mignucci-Giannoni, E.C. Rouchka, A.B. Jenson, J.O. Trent, J.B. Chaires, J.H. Chariker, *PLoS ONE* 2018, **13**(4), e0195625.
- [27] W.A. Vinyard, A.M. Fleming, J. Ma, C.J. Burrows, *Biochemistry* 2018, **57**(47), 6551
- [28] S. Zhang, H. Sun, L. Wang, Y. Liu, H. Chen, Q. Li, A. Guan, M. Liu, Y. Tang, *Nucl. Acids Res.* 2018, **46**, 7522.
- [29] A. Guan, X.F. Zhang, X. Sun, Q. Li, J.F. Xiang, L.X. Wang, L. Lan, F.M. Yang, S.J. Xu, X.M. Guo, Y.L. Tang, *Sci. Rep.* 2018, **8**, 2666.
- [30] Y. Kataoka, H. Fujita, Y. Kasahara, T. Yoshihara, S. Tobita, M. Kuwahara, *Anal. Chem.* 2014 **86**(24), 12078.

- [31] S. Maiti, N.K. Chaudhury, S. Chowdhury, *Biochem. Bioph. Res. Comm.* 2003, **310**, 505.
- [32] U. Tawar, A.K. Jain, R. Chandra, Y. Singh, B.S. Dwarakanath, N.K. Chaudhury, L. Good, V. Tandon, *Biochemistry* 2003, **42**(45), 13339.
- [33] A.K. Jain, V.V. Reddy, A. Paul, K. Muniyappa, S. Bhattacharya, *Biochemistry* 2009, **48**(45), 10693.
- [34] F. Koepffel, J.F. Riou, A. Laoui, P. Mailliet, P.B. Arimondo, D. Labit, O. Petitgenet, C. Hélène, J.L. Mergny, *Nucl. Acids Res.* 2001, **29**(5), 1087.
- [35] T.Y. Tseng, C.H. Chien, J.F. Chu, W.C. Huang, M.Y. Lin, C.C. Chang, T.C. Chang, *J. Biomed. Opt.* 2013, **18**(10), 101309.
- [36] C.C. Chang, J.Y. Wu, C.W. Chien, W.S. Wu, H. Liu, C.C. Kang, L.J. Yu, T.C. Chang, *Anal. Chem.* 2003, **75**, 6177.
- [37] C.C. Chang, C. W. Chien, Y.H. Lin, C.C. Kang, T.C. Chang, *Nucl. Acids Res.* 2007, **35**(9), 2846.
- [38] C.C. Chang, I.C. Kuo, J.J. Lin, Y.C. Lu, C.T. Chen, H.T. Back, P.J. Lou, T.C. Chang, *Chem. Biodiver.* 2004, **1**(9), 1377.
- [39] C.C. Chang, J.F. Chu, F.J. Kao, Y.C. Chiu, P.J. Lou, H.C. Chen, T.C. Chang, *Anal. Chem.* 2006, **78**, 2810.
- [40] T.Y. Tseng, W.W. Chen, I.T. Chu, C.L. Wang, C.C. Chang, M.C. Lin, P.J. Lou, T.C. Chang, *Sci. Rep.* 2018, **8**, 16082.
- [41] W.C. Huang, T.Y. Tseng, Y.T. Chen, C.C. Chang, Z.F. Wang, C.L. Wang, T.N. Hsu, P.T. Li, C.T. Chen, J.J. Lin, P.J. Lou, T.C. Chang, *Nucl. Acids Res.* 2015, **43**(21), 10102.
- [42] C.C. Kang, W.C. Huang, C.W. Kouh, Z.F. Wang, C.C. Cho, C.C. Chang, C.L. Wang, T.C. Chang, J. Seemann, L.J. Huang, *Integr. Biol.* 2013, **5**, 1217.
- [43] B. Dumat, G. Bordeau, E. Faurel-Paul, F. Mahuteau-Betzer, N. Saettel, M. Bombled, G. Metgé, F. Charra, C. Fiorini-Debuisschert, M.P. Teulade-Fichou, *Biochimie* 2011, **93**, 1209.
- [44] X.F. Zhang, H.J. Zhang, J.F. Xiang, Q. Li, Q.F. Yang, Q. Shang, Y.X. Zhang, Y.L. Tang, J. Mol. Struct. 2010, **982**, 133.
- [45] B. Jin, X. Zhang, W. Zheng, X. Liu, C. Qi, F. Wang, D. Shangguan, *Anal. Chem.* 2014, **86**, 943.
- [46] Y. Wei, X. Zhang, L. Wang, Y. Liu, T. Bing, X. Liua, D. Shangguan, *RSC Adv.* 2015, **5**, 75911.
- [47] B. Maji, K. Kumar, M. Kaulage, K. Muniyappa, S. Bhattacharya, *J. Med. Chem.* 2014, **57**, 6973.
- [48] D. Panda, M. Debnath, S. Mandal, I. Bessi, H. Schwalbe, J. Dash, *Sci. Rep.* 2015, **5**, 13183.
- [49] D. Lin, X. Fei, Y. Gu, C. Wang, Y. Tang, R. Lib, J. Zhou, *Analyst* 2015, **140**, 5772.
- [50] M.H. Hu, R.J. Guo, S.B. Chen, Z.S. Huang, J.H. Tan, *Dyes Pigm.* 2017, **137**, 191.
- [51] F. Gao, S. Cao, W. Sun, S. Long, J. Fan, X. Peng, *Dyes Pigm.* 2019, **171**, 107749.
- [52] S. Wu, L. Wang, N. Zhang, Y. Liu, W. Zheng, A. Chang, F. Wang, S. Li, D. Shangguan, *Chem. Eur. J.* 2016, **22**, 6037.
- [53] C. Yang, R. Hu, Q. Li, S. Li, J. Xiang, X. Guo, S. Wang, Y. Zeng, Y. Li, G. Yang, *ACS Omega* 2018, **3**(9), 10487.
- [54] Y.J. Lu, D.P. Hu, K. Zhang, W.L. Wong, C.F. Chow, *Biosens. Bioelectron.* 2016, **81**, 373.
- [55] Y.L. Lu, X.L. Guo, M.H. Xu, W.W. Chen, W.L. Wong, K. Zhang, C.F. Chow, *Dyes Pigm.* 2017 **143**, 331.
- [56] M.Q. Wang, Y. Wu, Z.Y. Wang, Q.Y. Chen, F.Y. Xiao, Y.C. Jiang, A. Sang, *Dyes Pigm.* 2017, **145**, 1.
- [57] M.Q. Wang, J. Xu, L. Zhang, Y. Liao, H. Wei, Y.Y. Yin, Q. Liu, Y. Zhang, *Bioorg. Med. Chem.* 2019, **27**, 552.
- [58] M.Q. Wang, Y. Zhang, X.Y. Zeng, H. Yang, C. Yang, R.Y. Fu, H.J. Li, *Dyes Pigm.* 2019, **168**, 334.
- [59] J. Carvalho, E. Pereira, J. Marquevielle, M.P.C. Campello, J.L. Mergny, A. Paulo, G.F. Salgado, J.A. Queiroz, C. Cruz, *Biochimie* 2018, **144**, 144.

- [60] Q. Zhang, Y.C. Liu, D.M. Kong, D.S. Guo, *Chem. Eur. J.* 2015, **21**, 13253.
- [61] J.W. Yan, S.B. Chen, H.T. Liu, W.J. Ye, T.M. Ou, J.H. Tan, D. Li, L.Q. Gu, Z.S. Huang, *Chem. Commun.* 2014, **50**, 6927.
- [62] S.B. Chen, M.H. Hu, G.C. Liu, J. Wang, T.M. Ou, L.Q. Gu, Z.S. Huang, J.H. Tan *J. Am. Chem. Soc.* 2016, **138**, 10382.
- [63] K. Lyu, S.B. Chen, C.Y. Chan, J.H. Tan, C.K. Kwok, *Chem. Sci.* 2019, **10**, 11095.
- [64] H.H. Tan, T.M. Ou, J.Q. Hou, Y.L. Lu, S.L. Huang, H.B. Luo, J.Y. Wu, Z.S. Huang, K.Y. Wong, L.Q. Gu, *J. Med. Chem.* 2009, **52**(9), 2825.
- [65] W.J. Zhang, T.M. Ou, Y.L. Lu, Y.Y. Huang, W.B. Wu, Z.S. Huang, J.L. Zhou, K.Y. Wong, L.Q. Gu, *Bioorg. Med. Chem.* 2007, **15**, 5493.
- [66] A.C. Bhasikuttan, J. Mohanty, H. Pal, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, **46**, 9305.
- [67] D.M. Kong, Y.E. Ma, H.H. Guo, W. Yang, H.X. Shen, *Anal. Chem.* 2009, **81**, 2678.
- [68] D.M. Kong, Y.E. Ma, J. Wu, H.X. Shen, *Chem. Eur. J.* 2009, **15**, 901.
- [69] H. Lai, Y. Xiao, S. Yan, F. Tian, C. Zhong, Y. Liu, X. Weng, X. Zhou, *Analyst* 2014, **139**, 1834.
- [70] M.Q. Wang, W.X. Zhu, Z.Z. Song, S. Li, Y.Z. Zhang, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2015, **25**, 5672.
- [71] M.Q. Wang, L.X. Gao, Y.F. Yang, X.N. Xiong, Z.Y. Zheng, S. Li, Y. Wu, Y.Y. Ma, *Tetrahedron Lett* 2016, **57**, 5042.
- [72] M.Q. Wang, S. Liu, C.P. Tang, A. Raza, S. Li, L.X. Gao, J. Sun, S.P. Guo, *Dyes Pigm.* 2017, **136**, 78.
- [73] M.Q. Wang, Z.Y. Wang, Y.F. Yang, G.Y. Ren, X.N. Liu, S. Li, J.W. Wei, L. Zhang, *Tetrahedron Lett* 2017, **58**, 3296.
- [74] D. You, L. Liu, Q. Yang, X. Wu, S. Li, A. Li, *Dyes Pigm.* 2020, **176**, 108222.
- [75] Y. Chen, S. Yan, L. Yuan, Y. Zhou, Y. Song, X. Xiao, X. Weng, X. Zhou, *Org. Chem. Front.* 2014, **1**, 267.
- [76] B. Jin, X. Zhang, W. Zheng, X. Liu, J. Zhou, N. Zhang, F. Wang, D. Shangguan, *Anal. Chem.* 2014, **86**, 7063.
- [77] X. Zhang, Y. Wei, T. Bing, X. Liu, N. Zhang, J. Wang, J. He, B. Jin, D. Shangguan, *Sci. Rep.* 2017, **7**, 4766.
- [78] V. Grande, F. Doria, M. Freccero, F. Wurthner, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2017, **56**, 7520.
- [79] M. Zuffo, F. Doria, V. Spalluto, S. Ladame, M. Freccero, *Chem. Eur. J.* 2015, **21**, 17596.
- [80] M. Zuffo, S. Ladame, F. Doria, M. Freccero, *Sensor Actuat B-Chem* 2017, **245**, 780.
- [81] R. Perrone, F. Doria, E. Butovskaya, I. Frasson, S. Botti, M. Scalabrin, S. Lago, V. Grande, M. Nadai, M. Freccero, S.N. Richter, *J. Med. Chem.* 2015, **58**, 9639.
- [82] F. Doria, M. Nadai, M. Zuffo, R. Perrone, M. Freccero, S.N. Richter, *Chem. Commun.* 2017, **53**, 2268.
- [83] F. Doria, A. Oppi, F. Manoli, S. Botti, N. Kandoth, V. Grande, I. Manet, M. Freccero, *Chem. Commun.* 2015, **51**, 9105.
- [84] A. Shivalingam, M.A. Izquierdo, A. Le Marois, A. Vysniauskas, K. Suhling, M.K. Kuimova, R. Vilar, *Nature Comm.* 2015, **6**, 8178.
- [85] L. Zhang, J.C. Er, K.K. Ghosh, W.J. Chung, J. Yoo, W. Xu, W. Zhao, A.T. Phan, Y.T. Chang, *Sci. Rep.* 2013, **4**, 3776.
- [86] G. Feng, C. Luo, H. Yi, L. Yuan, B. Lin, X. Luo, X. Hu, H. Wang, C. Lei, Z. Nie, S. Yao, *Nucl. Acids Res.* 2017, **45**(18), 10380.
- [87] M. Deiana, K. Chand, J. Jamroskovic, I. Obi, E. Chorell, N. Sabouri, *Angew. Chem.* 2020, **132**, 906.
- [88] M.H. Hu, S.B. Chen, R.J. Guo, T.M. Ou, Z.S. Huang, J.H. Tan, *Analyst* 2015, **140**, 4616.
- [89] M.H. Hu, X. Chen, S.B. Chen, T.M. Ou, M. Yao, L.Q. Gu, Z.S. Huang, J.H. Tan, *Sci. Rep.* 2015, **5**, 17202.



- [90] M.H. Hu, S.B. Chen, B. Wang, T.M. Ou, L.Q. Gu, J.H. Tan, Z.S. Huang, *Nucl. Acids Res.* 2017, **45**(4), 1606.
- [91] M.H. Hu, J. Zhou, W.H. Luo, S.B. Chen, Z.S. Huang, R. Wu, J.H. Tan, *Anal. Chem.* 2019, **91**, 2480.
- [92] M.H. Hu, Y.Q. Wang, Z.Y. Yu, L.N. Hu, T.M. Ou, S.B. Chen, Z.S. Huang, J.H. Tan, *J. Med. Chem.* 2018, **61**, 2447.
- [93] J. Ren, J.B. Chaires, *Biochemistry* 1999, **38**, 16067.
- [94] A. Siddiqui-Jain, C.L. Grand, D.J. Bearss, L.H. Hurley, *PNAS* 2002, **99**(18), 11593.
- [95] M.W. Freyer, R. Buscaglia, K. Kaplan, D. Cashman, L.H. Hurley, E.A. Lewis, *Biophys. J.* 2007, **92**, 2007.
- [96] E. Boschi, S. Davis, S. Taylor, A. Butterworth, L.A. Chirayath, V. Purohit, L.K. Siegel, J. Buenaventura, A.H. Sheriff, R. Jin, R. Sheardy, L.A. Yatsunyk, M. Azam, *J. Phys. Chem. B* 2016, **120**, 12807.
- [97] H. Arthanari, S. Basu, T.L. Kawano, P.H. Bolton, *Nucl. Acids Res.* 1998, **26**(16), 3724.
- [98] T. Li, E. Wang, S. Dong, *Anal. Chem.* 2010, **82**, 7576.
- [99] H. Qin, J. Ren, J. Wang, N.W. Luedtke, E. Wang, *Anal. Chem.* 2010, **82**, 8356.
- [100] J. Alzeer, B.R. Vummidi, P.J.C. Roth, N.W. Luedtke, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009, **48**, 9362.
- [101] A. Membrino, M. Paramasivam, S. Cogoi, J. Alzeer, N.W. Luedtke, L.E. Xodo, *Chem. Commun.* 2010, **46**, 625.
- [102] D.P.N. Goncalves, R. Rodriguez, S. Balasubramanian, J.K.M. Sanders, *Chem. Commun.* 2006, 4685.
- [103] J. Alzeer, N.W. Luedtke, *Biochemistry* 2010, **49**, 4339.
- [104] D.L. Ma, C.M. Che, S.C. Yan, *J. Am. Chem. Soc.* 2009, **131**(5), 1835.
- [105] P. Wang, C.H. Leung, D.L. Ma, S.C. Yan, C.M. Che, *Chem. Eur. J.* 2010, **16**, 6900.
- [106] P. Wu, D.L. Ma, C.H. Leung, S.C. Yan, N. Zhu, R. Abagyan, C.M. Che, *Chem. Eur. J.* 2009, **15**, 13008.
- [107] S. Shi, X. Geng, J. Zhao, T. Yao, C. Wang, D. Yang, L. Zheng, L. Ji, *Biochimie* 2010, **92**, 370.
- [108] S. Shi, J. Zhao, X. Geng, T. Yao, H. Huang, T. Liu, L. Zheng, Z. Li, D. Yanga, L. Ji, *Dalton. Trans.* 2010, **39**, 2490.
- [109] J. Sun, Y. An, L. Zhang, H.Y. Chen, Y. Han, Y.J. Wang, Z.W. Mao, L.N. Ji, *J. Inorg. Biochem.* 2011, **105**, 149.
- [110] C. Rajput, R. Rutkaite, L. Swanson, I. Haq, J.A. Thomas, *Chem. Eur. J.* 2006, **12**, 4611.
- [111] M. Gill, J. Garcia-Lara, S. Foster, C. Smythe, G. Battaglia, J. Thomas, *Nature Chem.* 2009, **1**, 662.
- [112] L. Xu, D. Zhang, J. Huang, M. Deng, M. Zhang, X. Zhou, *Chem. Commun.* 2010, **46**, 743.
- [113] S. Xu, Q. Li, J. Xiang, Q. Yang, H. Sun, A. Guan, L. Wang, Y. Liu, L. Yu, Y. Shi, H. Chen, Y. Tang, *Nucl. Acids Res.* 2015, **43**(20), 9575.
- [114] Y. Wang, Y. Hu, T. Wu, H. Liu, L. Zhang, X. Zhou, Y. Shao, *Analyst* 2015, **140**, 5169.
- [115] X.C. Chen, S.B. Chen, J. Dai, J.H. Yuan, T.M. Ou, Z.S. Huang, J.T. Tan, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2018, **57**, 4702.
- [116] X. Luo, B. Xue, G. Feng, J. Zhang, B. Lin, P. Zeng, H. Li, H. Yi, X.L. Zhang, H. Zhu, Z. Nie, *J. Am. Chem. Soc.* 2019, **141**, 5182.
- [117] A. Laguerre, K. Hukezalie, P. Winckler, F. Katranji, G. Chanteloup, M. Pirrotta, J.M. Perrier-Cornet, J.M.Y. Wong, D. Monchaud, *J. Am. Chem. Soc.* 2015, **137**, 8521.

Praca wpłynęła do Redakcji 2 września 2020 r.