

การศึกษาการจับของยาต้านมาลาเรียในกลุ่มอนุพันธ์ของควิโนลีนบน
จีควอดรูเพล็กซ์โมทิฟในบริเวณโปรโมเตอร์บนวาร์ยีนของ
เชื้อพลาสโมเดียมฟาลซิพารุม

นายปวีณวัชร	รัตนดิลก ฅ ภูเก็ต	5136605233
นายชนกร	จงสุขศิริ	5136564133
นายนพสิทธิ์	วงศ์พัชรปกรณ์	5136597933

โครงการปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
เภสัชศาสตรบัณฑิต
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2555

**Study of Quinoline Derivative Antimalarial Drugs Binding on
G-Quadruplex Motif in a Promoter Region of
Plasmodium falciparum Var Gene**

Mr. Pahweenvaj	Ratnatilaka Na Bhuket	5136605233
Mr. Thanakorn	Chongsuksiri	5136564133
Mr. Noppasith	Wongpatcharapakorn	5136597933

**A Senior Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement
for the Bachelor of Science Program in Pharmacy
Chulalongkorn University**

2012

บทคัดย่อปริญญาานิพนธ์

- ชื่อโครงการ (ภาษาไทย)** : การศึกษาการจับของยาต้านมาลาเรียในกลุ่มอนุพันธ์ของควิโนลีนบนจีควอครูเพล็กซ์
โมทิฟในบริเวณ โพรโมเตอร์บนวาร์ซีนของเชื้อพลาสโมเดียมฟัลซิพารุม
- ชื่อโครงการ (ภาษาอังกฤษ)** : Study of quinoline derivative antimalarial drugs binding on G-quadruplex motif
in a promoter region of *Plasmodium falciparum* var gene
- หัวหน้าโครงการ** : นายปวีณวัชร รัตนดิลก ณ ภูเก็ต 5136605233
- ผู้ร่วมโครงการ** : นายชนกร จงสุขศิริ 5136564133
: นายพนพิสิทธิ์ วงศ์พัชรปกรณ 5136597933
- อาจารย์ที่ปรึกษา** : อ.ภก.ดร.บดินทร์ ติวสุวรรณ, ผศ.ภก.ดร.มิตร ปทีปวนิช, อ.ภก.ดร.วรสิทธิ์ วงศ์สุทธิเลิศ
- ภาควิชา** : อาหารและเภสัชเคมี

วาร์ซีน (*var* gene) ในเชื้อ *Plasmodium falciparum* มีความสำคัญต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรคมาลาเรีย ซึ่งมีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าบริเวณ upstreamB (UpsB) ของยีนนี้สามารถเกิดโครงสร้างจีควอครูเพล็กซ์ได้ในหลอดทดลองภายใต้สภาวะที่มี monovalent cation ในการวิจัยนี้ได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาต้านมาลาเรียในกลุ่ม 4-substituted quinolines กับโครงสร้างจีควอครูเพล็กซ์ที่เกิดจากลำดับเบสบางส่วนในบริเวณ upstreamB (UpsB-1) ของวาร์ซีนโดยใช้เทคนิคทาง circular dichroism (CD) และ UV-visible spectroscopy พบว่า UpsB-1 สามารถเกิดโครงสร้างจีควอครูเพล็กซ์ที่มีความเสถียรในรูปแบบ parallel ได้แม้ในสภาวะที่ไม่มี monovalent cation ($T_m = 42.3^\circ\text{C}$) นอกจากนี้ยังพบว่าโพแทสเซียมไอออน (K^+) ช่วยเพิ่มความคงตัวให้กับโครงสร้างนี้ ($T_m = 55.6^\circ\text{C}$) และเกิดการเปลี่ยนโครงสร้างเป็นรูปแบบ parallel ที่มี external loop จากการศึกษานี้อันตรกิริยาของยาต้านมาลาเรียในสภาวะที่ไม่มี monovalent cation พบว่า quinine และ chloroquine ช่วยเพิ่มความคงตัวของโครงสร้างนี้ ($\Delta T_m = 4.9^\circ\text{C}$ และ 8.2°C ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามในสภาวะที่มี K^+ ร่วมด้วยพบว่ายา quinine และ chloroquine ไม่สามารถเพิ่มความคงตัวของจีควอครูเพล็กซ์ได้เหมือนกับสภาวะที่ปราศจาก K^+ ($\Delta T_m \leq 3^\circ\text{C}$) การวิจัยนี้จึงสรุปได้ว่า UpsB-1 สามารถเกิดโครงสร้างจีควอครูเพล็กซ์ที่มีความคงตัวทางอุณหพลศาสตร์และยาในกลุ่ม 4-substituted quinolines สามารถเกิดอันตรกิริยากับโครงสร้างจีควอครูเพล็กซ์ได้ โดยที่ K^+ มีผลต่อการเกิดอันตรกิริยาของยาในกลุ่มนี้ ดังนั้นโครงสร้างจีควอครูเพล็กซ์ที่เกิดจาก UpsB-1 บริเวณโปรโมเตอร์ของวาร์ซีนน่าจะสามารถถูกเปลี่ยนแปลงได้โดยสารโมเลกุลเล็กซึ่งอาจจะมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีน

ฝ่ายวิชาการ คณะเภสัชศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

.....
อาจารย์ที่ปรึกษา

บทคัดย่อปริยญาณิพนธ์

- ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) : การศึกษาการจับของยาต้านมาลาเรียในกลุ่มอนุพันธ์ของควิโนลีนบนจีควอครูเพิลิกซ์
โมทิฟในบริเวณ โพรโมเตอร์บนอาร์เอ็นเอของเชื้อพลาสโมเดียมฟาลซิพารุม
- ชื่อโครงการ (ภาษาอังกฤษ) : Study of quinoline derivative antimalarial drugs binding on G-quadruplex motif
in a promoter region of *Plasmodium falciparum var* gene
- หัวหน้าโครงการ : นายปวีณวัชร รัตนดิถก ณ ภูเก็ต 5136605233
- ผู้ร่วมโครงการ : นายธนกร จงสุขศิริ 5136564133
: นายพนพิสิทธิ์ วงศ์พัชรปกรณ 5136597933
- อาจารย์ที่ปรึกษา : อ.ภก.ดร.บดินทร์ ติวสุวรรณ, ผศ.ภก.ดร.มิตร ปทีปวัฒน์, อ.ภก.ดร.วรสิทธิ์ วงศ์สุทธิเลิศ
- ภาควิชา : อาหารและเภสัชเคมี

Var gene of *Plasmodium falciparum* involves in antigenic variation and pathogenesis of malaria caused by this parasite. There is an *in vitro* evidence that show the G-quadruplex (GQ) formation within the upstreamB (UpsB) region of this gene in the presence of monovalent cations. In this study, the potential interaction between the 4-substituted quinoline antimalarial drugs and the GQ structure arisen by a part of sequence from the upstreamB region (UpsB-1) of *var* gene is investigated by using combination techniques of UV-visible and circular dichroism (CD) spectroscopy. We find that UpsB-1 can adopt stable parallel-type GQ structure ($T_m = 42.3^\circ\text{C}$) although no the existence of monovalent cation. However, in the presence of K^+ , this sequence fold into parallel with external loop structure ($T_m = 55.6^\circ\text{C}$). In GQ-ligand binding study experiment, quinine and chloroquine increase thermodynamic stability of GQ adopted by UpsB-1 ($\Delta T_m = 4.9$ and 8.2°C respectively in the absence of K^+ and $\Delta T_m \leq 3^\circ\text{C}$ in the presence of K^+). These results reveal that UpsB-1 can form a stable GQ structure. In addition, 4-substituted quinoline antimalarials may able to interact the GQ structure and the presence of K^+ diminishes the interaction between this drug group and GQ. Therefore, our results support the GQ formation within the promoter region of *var* gene that may play an important role in gene regulation and be manipulated by small molecules.

ฝ่ายวิชาการ คณะเภสัชศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

.....
อาจารย์ที่ปรึกษา

คำนำ

โครงการปริญญาโทฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรเภสัชศาสตรบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยได้ทำการศึกษาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาต้านมาลาเรียในกลุ่มอนุพันธ์ควิโนลีนกับโครงสร้างจิวอดรูเพล็กซ์ที่เกิดจากลำดับเบสในบริเวณโปรโมเตอร์ของวารียีน ซึ่งในการทำวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ในการสร้างความเข้าใจการเกิดโครงสร้างจิวอดรูเพล็กซ์ในเชื้อ *Plasmodium falciparum* และการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยากับโครงสร้างนี้ซึ่งอาจจะเป็นแนวทางในกระบวนการค้นพบยาใหม่สำหรับการรักษาโรคมาลาเรียที่เกิดจากเชื้อดังกล่าว

คณะผู้ศึกษาหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงการปริญญาโทฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจ และสามารถนำไปใช้ในการศึกษาอื่นๆ ต่อไป

ธนกร จงสุขศิริ
นพสิทธิ์ วงศ์พัชรปกรณ์
ปวีณวัชร รัตนดิถก ณ ภูเก็ต

ผู้จัดทำ

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาโครงการปริญญาโทฉบับนี้ คณะผู้ทำวิจัยขอกราบขอบพระคุณท่านอาจารย์ที่ปรึกษาทั้งสามท่าน ได้แก่ อ.ภก.ดร.บดินทร์ ติวสุวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษา, ผศ.ภก.ดร.มิตร ปทีปวัฒน์ และอ.ภก.ดร.วรสิทธิ์ วงศ์สุทธิเลิศ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องของโครงการปริญญาโท ตลอดจนให้ความรู้และข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการปริญญาโทฉบับนี้ จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ ศ.ดร.สมศักดิ์ รุจิรวัดน์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในด้านการใช้เครื่องมือวิจัยสำหรับโครงการนี้ ภญ.ดร.มนทกานต์ จิตต์แจ้ง และคุณปาริชาติ เกตุคำ จากสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ และอำนวยความสะดวกด้านเครื่องมือวิจัยในการทำโครงการปริญญาโทฉบับนี้

ขอขอบคุณโรงงานเภสัชกรรมแอตแลนติกที่อนุเคราะห์ยา mefloquine สำหรับการทำให้โครงการปริญญาโทฉบับนี้

ขอขอบคุณดร.จิตติมา พิริยะพงศา จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติที่ให้คำแนะนำในการทำให้ BLAST analysis และการใช้ <http://plasmodb.org>

ขอขอบคุณภาควิชาอาหารและเภสัชเคมี ศูนย์เครื่องมือเพื่อการวิจัยทางเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อำนวยความสะดวกในด้านเครื่องมือสำหรับการทำโครงการปริญญาโทฉบับนี้

สารบัญ

บทคัดย่อปริญญาานิพนธ์	ง
คำนำ.....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	2
บทที่ 2 ปริทรรศน์วรรณกรรม (Literature Review)	3
2.1 โครงสร้างของจิวออครูเพอติกซ์.....	3
2.2 จิวออครูเพอติกซ์ในดีเอ็นเอ.....	7
2.3 อนุพันธ์ของพอร์ไฟริน (Porphyrin derivatives): TMPyP4.....	8
2.4 ยาต้านมาลาเรียในกลุ่มอนุพันธ์ของควิโนลีน: 4-substituted quinoline derivatives	9
2.5 Circular dichroism (CD) spectroscopy กับการระบุโครงสร้างจิวออครูเพอติกซ์.....	10
2.6 ความคงตัวของอุณหภูมิศาสตร์ของ โครงสร้างจิวออครูเพอติกซ์.....	13
2.7 การศึกษาอันตรกิริยาระหว่างลิแกนด์กับดีเอ็นเอที่มี โครงสร้างจิวออครูเพอติกซ์โดยใช้ CD spectroscopy และ UV-visible absorption titration	14
บทที่ 3 เครื่องมือที่ใช้และวิธีดำเนินการวิจัย.....	16
สารเคมี.....	16

วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ.....	17
การเตรียมสารเคมีและตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์.....	17
ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย.....	19
บทที่ 4 ผลและอภิปรายผลการวิจัย.....	17
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย.....	24
เอกสารอ้างอิง.....	25

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของโครงสร้างจิวอครูเพิลิกซ์ที่พบในบริเวณ upstreamB ของ <i>P. falciparum</i> โคลน 3D7	8
ตารางที่ 2 ข้อมูลสารในการศึกษาเกิดโครงสร้าง G-quadruplex.....	19
ตารางที่ 3 ข้อมูลสารในการทำ UV-visible absorption titration	21
ตารางที่ 4 ข้อมูลสารตัวอย่างในการทำ circular dichroism	21
ตารางที่ 5 ค่า T_m ของโครงสร้าง G-quadruplex ในสภาวะ 1XTE pH 7.4, 100 mM KCl.....	30
ตารางที่ 6 ค่า T_m ของโครงสร้าง G-quadruplex ในสภาวะ 10 mM Tris pH 7.4.....	30
ตารางที่ 7 ตารางสรุปการเปลี่ยนแปลงของค่า T_m ในสภาวะที่มีและไม่มีโพแทสเซียมไอออน	30
ตารางที่ 8 ตารางสรุปการเปลี่ยนแปลงของค่า T_m ในสภาวะที่มีลิแกนด์	30

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 โครงสร้างจีควอครูเพลิกส์	3
ภาพที่ 2 โพลีเมอร์ไอออนที่ช่วยประสานระหว่างเบสกวานีน	4
ภาพที่ 3 โซเดียมไอออนที่อยู่ระหว่าง G-quartet	4
ภาพที่ 4 การจัดเรียงโครงสร้างของจีควอครูเพลิกส์ที่แตกต่างกัน (ก) Tetramolecular, (ข) Bimolecular และ (ค) Bimolecular ที่แสดงให้เห็นถึง lateral loop ที่เรียงตัวจากหัวไปหัว (ง) Bimolecular ที่ lateral loop เรียงตัวจากหัวไปหาง (จ) Intramolecular ที่มีสอง lateral loop และมีหนึ่ง diagonal loop	5
ภาพที่ 5 ลักษณะโครงสร้างของ loop ที่แตกต่างกันสำหรับ intramolecular จีควอครูเพลิกส์	6
ภาพที่ 6 ภาพวาดแสดงรูปแบบของ loop ในรูปแบบต่างๆ (ก) diagonal loop, (ข) lateral loop, (ค) propeller loop	6
ภาพที่ 7 ร่องของโครงสร้างจีควอครูเพลิกส์	7
ภาพที่ 8 โครงสร้างของ 5, 10, 15, 20-tetrakis-(N-methylpyridinium-4-yl)-21H, 23H-porphyrin (TMPyP4)	9
ภาพที่ 9 โครงสร้างของ (ก) Quinine, (ข) Chloroquine, (ค) Hydroxychloroquine, (ง) Mefloquine และ (จ) Halofantrine	10
ภาพที่ 10 สเปกตรัมของโครงสร้างจีควอครูเพลิกส์ : (ก) และ (ข) anti-parallel, (ค) parallel และ (ง) parallel แบบมี external loop (9)	12
ภาพที่ 11 สเปกตรัมของ (ก) โครงสร้างจีควอครูเพลิกส์แบบ hybrid-type conformation ที่มีลำดับเบส เป็น dAGGG (TTAGGG) ₃ TT (10) และ (ข) unstructured DNA ที่มีลำดับเบสเป็น d(TTAGGG) ₂	13
ภาพที่ 12 ตัวอย่าง melting curve โดยใช้ CD spectroscopy	14
ภาพที่ 13 CD spectrum ของจีควอครูเพลิกส์ที่เกิดจาก d(TAGGGUTAGGGT) ใน 100 mM KCl และ porphyrin derivative NMM	15
ภาพที่ 14 สเปกตรัมของ 10 μ M UpsB-1 ใน 10 mM Tris pH 7.4 (ก) และ ใน 1XTE pH 7.4, 100 mM KCl (ข).....	17

ภาพที่ 15 สเปกตรัมการทำ UV-visible absorption titration ของ (ก) Quinine, (ข) Chloroquine, (ค) Hydroxychloroquine, (ง) Mefloquine และ (จ) TMPyP4 (positive control) 24

ภาพที่ 16 การเปรียบเทียบสเปกตรัมของ UpsB-1 แบบมีและไม่มีลิแกนด์ในสภาวะ 1XTE pH 7.4, 100 mM KCl ได้แก่ (ก) Quinine, (ข) Chloroquine, (ค) Hydroxychloroquine, (ง) Mefloquine และ (จ) TMPyP4 และในสภาวะ 10 mM Tris pH 7.4 ได้แก่ (ก) Quinine และ (ข) Chloroquine .. 27

ภาพที่ 17 Melting profile ของ (ก) UpsB-1 in 1XTE, (ข) Quinine, (ค) Chloroquine, (ง) Hydroxychloroquine และ (จ) Mefloquine..... 28

ภาพที่ 18 Melting profile ของ (ก) UpsB-1 in Tris, (ข) Quinine และ (ค) Chloroquine..... 29

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของการวิจัย

โครงสร้างจิวควดรูเพล็กซ์ (G-quadruplex) เป็นโครงสร้างที่มีลักษณะแตกต่างจากดีเอ็นเอสายคู่ (duplex) ทั่วไป ซึ่งมีลักษณะเป็น โครงสร้างสายดีเอ็นเอสี่สายเรียงตัวกัน โครงสร้างของจิวควดรูเพล็กซ์ เกิดจากสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีลักษณะที่เรียกว่า “จีแทรคท์” (G-tract) คือ มีเบสกวานีนอยู่เรียงติดกันสามถึงสี่เบส โดยอาศัยพันธะไฮโดรเจนที่เรียกว่า Hoogsteen hydrogen-bonding ในการเชื่อมต่อกันระหว่างสายจนเกิดเป็นลักษณะที่เรียกว่า “G-quartet” ซึ่งทั่วไปมักจะมีสามถึงสี่ G-quartet (2) โดยบริเวณที่มีลำดับเบสกวานีนอยู่เป็นจำนวนมาก (G-rich) จะมีแนวโน้มที่จะพบโครงสร้างจิวควดรูเพล็กซ์ได้เช่นในบริเวณของโปรโมเตอร์ (3, 4) ซึ่งเป็นจุดที่มีความสำคัญในการเริ่มต้นของกระบวนการทรานสคริปชัน โดยเชื่อว่าการเกิดจิวควดรูเพล็กซ์ที่บริเวณ โปรโมเตอร์นี้จะมีส่วนสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนได้ (2-4)

วาร์ซินของเชื้อ *Plasmodium falciparum* ทำหน้าที่ควบคุมการถอดรหัสของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพของโรคมาลาเรีย โดยมีงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าลำดับเบสที่บริเวณ upstream (UpsB-1) ของวาร์ซินสามารถเกิดโครงสร้างจิวควดรูเพล็กซ์ได้ในหลอดทดลอง (5) สิ่งที่น่าสนใจคือลำดับเบสที่ถูกแสดงว่าสามารถเกิดเป็นจิวควดรูเพล็กซ์ได้ในหลอดทดลองนั้นไม่พบในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นเมื่อทำ BLAST analysis เทียบลำดับเบส ดังนั้นลำดับเบสบริเวณดังกล่าวจึงมีความน่าสนใจที่จะนำมาเป็นเป้าหมายในการศึกษาความเป็นไปได้ในการจับกับยาที่มีความสามารถในการจับกับดีเอ็นเอสายคู่อย่างเช่นยาต้านมาลาเรียในกลุ่มอนุพันธ์ควิโนลีน

การศึกษาการเกิดโครงสร้างจิวควดรูเพล็กซ์และอันตรกิริยาระหว่างลิแกนด์กับจิวควดรูเพล็กซ์สามารถทำได้หลายวิธี เช่น X-ray crystallography, NMR spectroscopy, circular dichroism (CD) spectroscopy, UV-visible spectroscopy เป็นต้น (6) ในงานวิจัยนี้จะอาศัยสองเทคนิคคือ CD spectroscopy และ UV-visible spectroscopy ในการศึกษาการเกิดโครงสร้างจิวควดรูเพล็กซ์และการเกิดอันตรกิริยาระหว่างยาต้านมาลาเรียในกลุ่มอนุพันธ์ควิโนลีนกับจิวควดรูเพล็กซ์ที่เกิดจาก UpsB-1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาความสามารถในการเกิดและความคงตัวของ โครงสร้างจิวอดรูเพล็กซ์ที่เกิดจาก UpsB-1 ในสภาวะที่ไม่มี monovalent cation
2. เพื่อศึกษาความคงตัวของทางอุณหพลศาสตร์ของสารเชิงซ้อนจากการจับของยาต้านมาลาเรียในกลุ่มอนุพันธ์ของควิโนลีนกับ โครงสร้างจิวอดรูเพล็กซ์ในบริเวณ โพรโมเตอร์บนวารีนของ *Plasmodium falciparum*

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

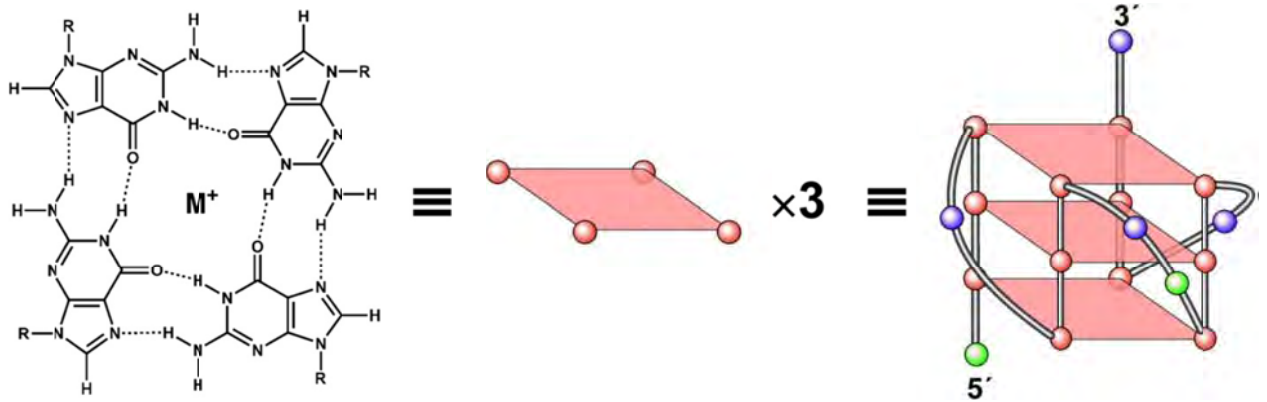
เป็นการเพิ่มเติมองค์ความรู้ใหม่ในการเกิด โครงสร้างจิวอดรูเพล็กซ์ในบริเวณลำดับเบสบน โพรโมเตอร์ของวารีนในเชื้อ *Plasmodium falciparum* ซึ่งอาจเป็นแนวทางในการพัฒนายาต้านมาลาเรีย กลุ่มใหม่ในอนาคต รวมถึงเป็นการเพิ่มเติมองค์ความรู้ในเรื่องกลไกการออกฤทธิ์ของยาต้านมาลาเรียในกลุ่มอนุพันธ์ควิโนลีน

บทที่ 2

ปริทรรศน์วรรณกรรม (Literature Review)

2.1 โครงสร้างของจิวอดรupleกซ์

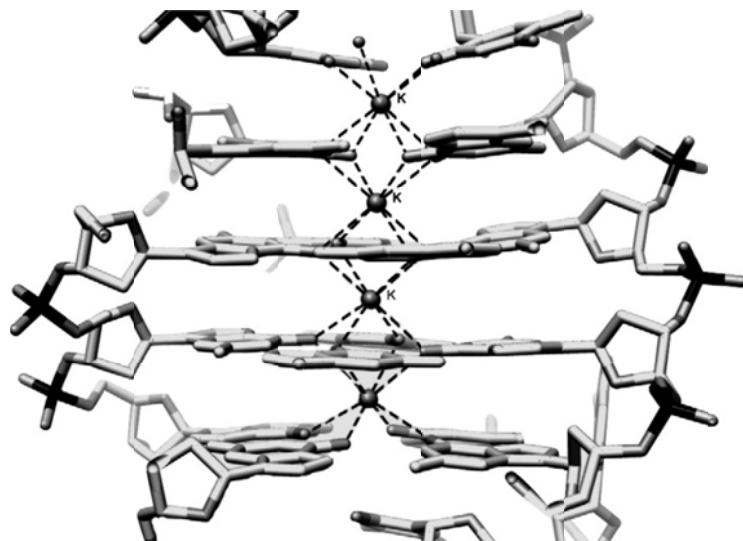
สายโพลิโนวคลีโอไทด์ที่ประกอบด้วยเบสกวานีนติดต่อกันสามถึงสี่เบสอาจเรียกว่าจีแทรคท์ (G-tract) สามารถรวมกันเป็นโครงสร้างสี่สายของดีเอ็นเอที่เรียกว่า จิวอดรupleกซ์ (G-quadruplex) หรือจีเตตราเพลกซ์ (G-tetraplex) โครงสร้างของจิวอดรupleกซ์สามารถเกิดขึ้น โดยอาศัยพันธะไฮโดรเจนที่เรียกว่า Hoogsteen hydrogen-bonding ระหว่างเบสกวานีนสี่เบสเกิดเป็น G-quartet ซึ่งแต่ละ G-quartet จะซ้อนอยู่บน G-quartet อีกอัน (ภาพที่ 1) (2)



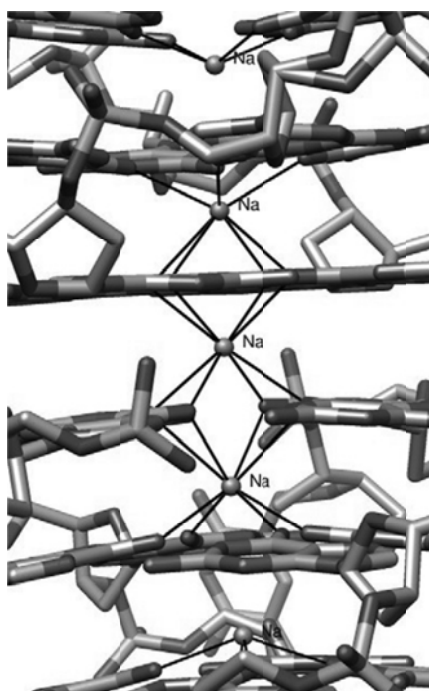
ภาพที่ 1 โครงสร้างจิวอดรupleกซ์ (3)

ไอออนของโลหะ เช่น โพแทสเซียมไอออนและโซเดียมไอออน จะมีผลต่อความเสถียรของโครงสร้างจิวอดรupleกซ์อย่างมาก โดยช่วยให้เกิดการประสานกันระหว่าง G-quartet ผ่านประจุลบของหมู่คาร์บอนิลที่ออกซิเจนตำแหน่งที่ 6 ของเบสกวานีนทั้ง 4 เบส เชื่อมเข้าสู่ศูนย์กลางของแต่ละ G-quartet ซึ่งตำแหน่งตรงกลางของ G-quartet จะมีช่องว่างที่ไอออนของโลหะเหล่านี้เข้าไปได้โดยขึ้นกับรัศมีของไอออนพบว่าโพแทสเซียมไอออนมีขนาดใหญ่เกินกว่าที่จะเข้าไปอยู่ในระนาบของ G-quartet ดังนั้นโพแทสเซียมไอออนจึงอาศัยอยู่ระหว่าง G-quartet แต่ละอัน (ภาพที่ 2) ส่วนโซเดียมไอออนมีขนาดเล็กเพียงพอที่จะอยู่ในระนาบของ G-quartet ทำให้โซเดียมไอออนไม่ได้กระจายอยู่ในช่องว่างตรงกลางของ G-quartet อย่างสม่ำเสมอ และที่ปลายของช่องว่างระหว่าง G-quartet โซเดียมไอออนจะอยู่ใกล้กับออกซิเจนที่ตำแหน่งที่ 6 ของเบสกวานีนเกือบเป็นระนาบเดียวกัน (ภาพที่ 3) โดยทั่วไปแล้วการมีอยู่ของโพแทสเซียมไอออนจะทำให้เกิดโครงสร้างจิวอดรupleกซ์ที่เสถียรมากกว่าการมีอยู่ของโซเดียมไอออน นอกจากโซเดียมและโพแทสเซียมไอออนยังมีรายงานว่าไอออนของโลหะชนิดอื่นที่สามารถทำให้เกิดโครงสร้างของจิวอดรupleกซ์ที่เสถียรแต่น้อยกว่าที่เกิดจาก

โพแทสเซียมไอออน เช่น รูบิเดียม (Rb^+), ซีเซียม (Cs^+), สตรอนเชียม (Sr^{3+}), แทลเลียม (Tl^+), แคลเซียม (Ca^{2+}), ตะกั่ว (Pb^{2+}), แบเรียม (Ba^{2+}) และไอออนของโลหะแลนทาไนด์



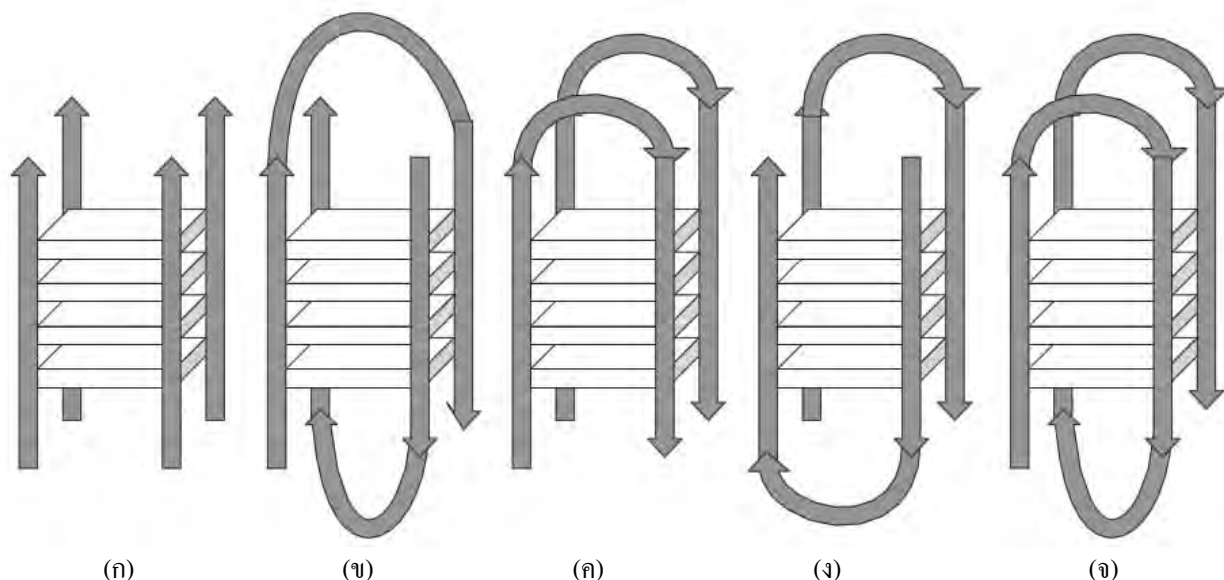
ภาพที่ 2 โพแทสเซียมไอออนที่ช่วยประสานระหว่างเบสควานีน



ภาพที่ 3 โซเดียมไอออนที่อยู่ระหว่าง G-quartet

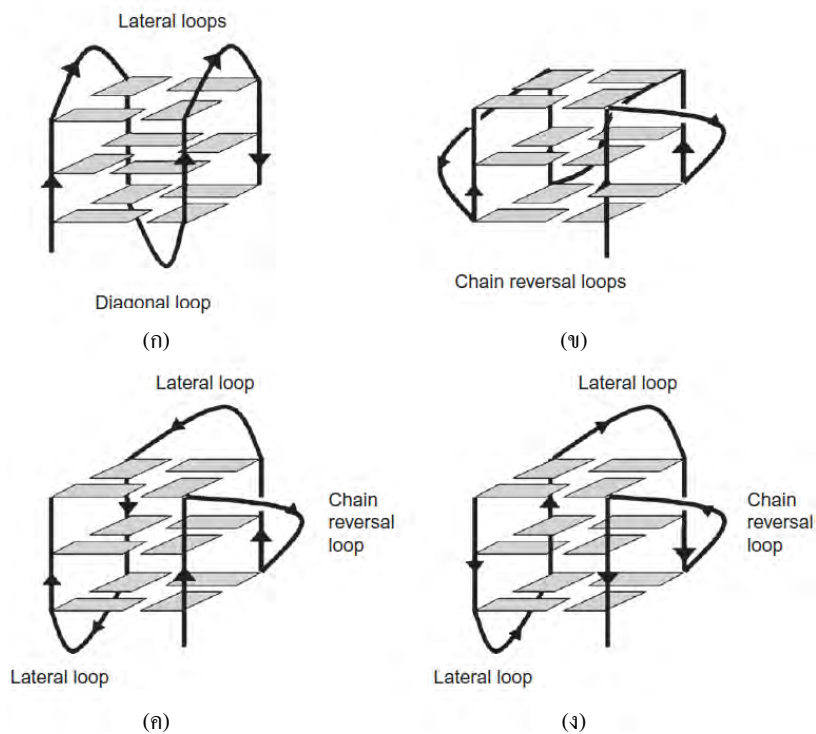
โครงสร้างจิกวอครูเพิลิกส์สามารถเกิดจากการรวมตัวกันของสายของดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ จากหนึ่งสาย สองสาย หรือสี่สายก็ได้ (ภาพที่ 4) ทำให้เกิดรูปแบบโครงสร้าง (topology) ได้หลากหลาย ซึ่งขึ้นกับจำนวนของ G-quartet ที่มาเรียงกัน ทิศทางของสาย ขนาดของ loop และลำดับเบส เป็นต้น ทำให้สามารถแยกประเภทของโครงสร้างจิกวอครูเพิลิกส์ได้หลายชนิด ได้แก่

- 1) Unimolecular ซึ่งหนึ่งในนั้นคือ intramolecular เป็น โครงสร้างจิวคอรูเพลิกส์ที่เกิดจาก นิวคลีโอไทด์หนึ่งสายที่มี G-tract เชื่อมต่อกันโดยทั่วไป G-tract มักมีความยาวเท่ากัน
- 2) Bimolecular เป็นจิวคอรูเพลิกส์ที่เกิดจากนิวคลีโอไทด์สองสายที่มี G-tract
- 3) Tetramolecular เกิดจากการรวมตัวของนิวคลีโอไทด์สี่สายที่มี G-tract ประกอบอยู่ในแต่ละสาย

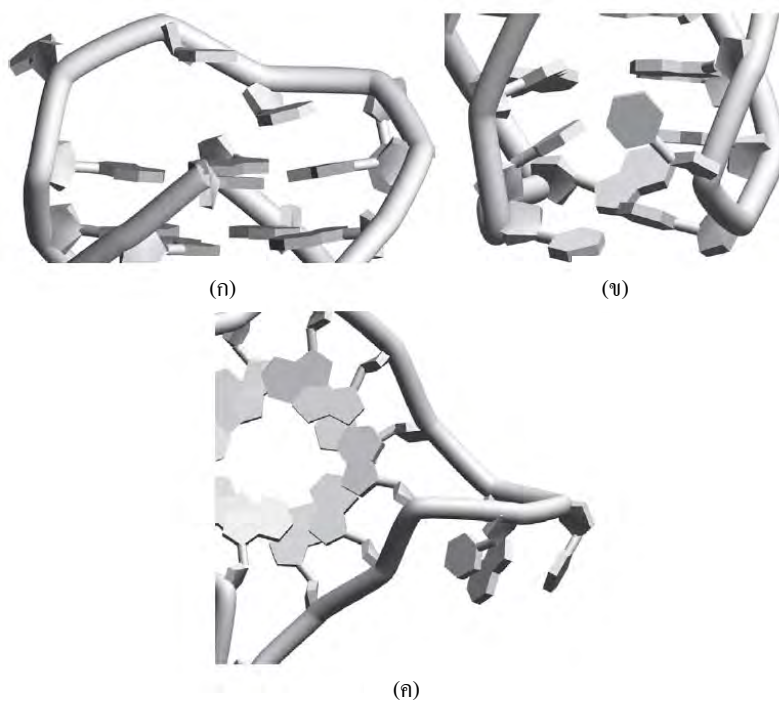


ภาพที่ 4 การจัดเรียงโครงสร้างของจิวคอรูเพลิกส์ที่แตกต่างกัน (ก) Tetramolecular, (ข) Bimolecular และ (ค) Bimolecular ที่แสดงให้เห็นถึง lateral loop ที่เรียงตัวจากหัวไปหัว (ง) Bimolecular ที่ lateral loop เรียงตัวจากหัวไปหาง (จ) Intramolecular ที่มีสอง lateral loop และมีหนึ่ง diagonal loop

ลำดับเบสที่เชื่อมระหว่าง G-tract จะเชื่อมระหว่าง G-quartet ด้วยจำนวนที่แตกต่างกันทำให้ loop มีความยาวต่างกัน นอกจากนี้ยังขึ้นกับลำดับเบสและบางครั้งยังมีผลของไอออนของโลหะมาเกี่ยวข้อง ทำให้เกิดความหลากหลายของจิวคอรูเพลิกส์ (ภาพที่ 5) ลำดับเบสที่เป็นตัวเชื่อมระหว่าง G-quartets สามารถแบ่งเป็นประเภทต่างๆ ดังนี้ diagonal, lateral (edgewise) และ propeller loop (chain-reversal) ในส่วนของ propeller loop สามารถเกิดโดยการเชื่อมของลำดับเบสสองสายที่อยู่ด้านเดียวกันที่มีรูปแบบ parallel โดยเชื่อม G-quartet ด้านบนและด้านล่างในขณะที่ diagonal และ lateral loop เกิดจากสายที่มีรูปแบบ anti-parallel ในส่วนของ lateral loop จะเชื่อม G-strand ที่อยู่ข้างๆ กัน หากมีสอง lateral loop จะสามารถเชื่อมที่ด้านเดียวกันแบบหัวไปหัว (ภาพที่ 4 (ค) และ 6 (ข)) และเชื่อมคนละด้านแบบหัวไปหาง (ภาพที่ 4(ง)) และในส่วนของ diagonal loop จะเชื่อม G-strand ในด้านตรงข้ามกัน



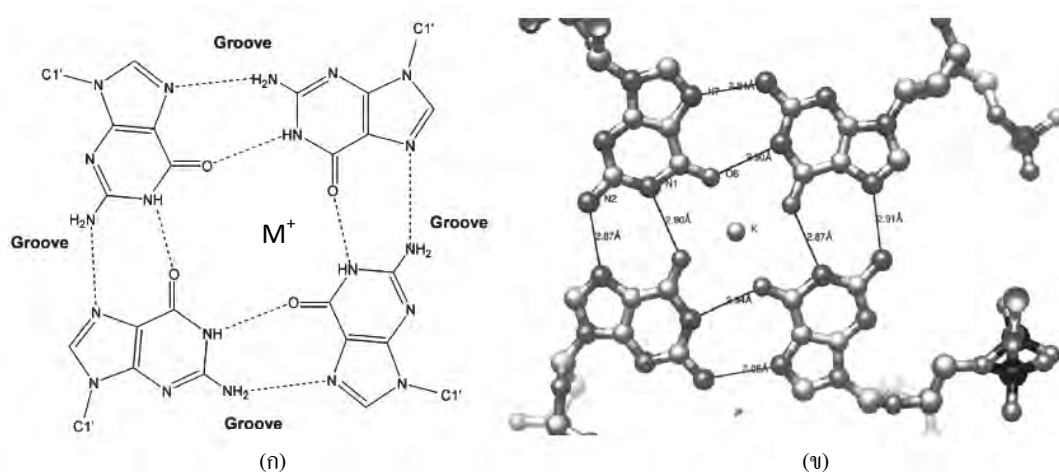
ภาพที่ 5 ลักษณะโครงสร้างของ loop ที่แตกต่างกันสำหรับ intramolecular จีควอดรูเพล็กซ์



ภาพที่ 6 ภาพวาดแสดงรูปแบบของ loop ในรูปแบบต่างๆ (ก) diagonal loop, (ข) lateral loop, (ค) propeller loop

โครงสร้างจีควอดรูเพล็กซ์ที่มีรูปแบบ parallel จะมีมุมของเบสกวานีนกับหมู่ไฮดรอกซิลแบบ *anti*-conformation ในขณะที่จีควอดรูเพล็กซ์ที่มีรูปแบบ anti-parallel จะมีจำนวนของเบสกวานีนแบบ *syn* และ *anti*-conformation เท่าๆ กัน โครงสร้างของจีควอดรูเพล็กซ์จะมีร่อง (grooves) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่

ถูกเชื่อมต่อโดย phosphodiester (ภาพที่ 7) ขนาดของร่องจะแตกต่างกัน โดยอาจขึ้นกับโครงสร้างหรือ loop เป็นต้น



ภาพที่ 7 ร่องของโครงสร้างจิกวอดรูเพิลิกซ์ (4)

2.2 จิกวอดรูเพิลิกซ์ในดีเอ็นเอ

มีรายงานว่าในจีโนมของมนุษย์มีบริเวณที่น่าจะเกิดโครงสร้างจิกวอดรูเพิลิกซ์มากถึง 376,000 แห่ง และประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ของยีนอยู่ที่บริเวณโปรโมเตอร์ (5) สายดีเอ็นเอบริเวณที่ประกอบด้วยเบสกวานีนจำนวนมากพบได้ในหลายบริเวณที่สำคัญ ได้แก่ เทโลเมียร์ (telomere), immunoglobulin switch region, โปรโมเตอร์ของยีนต่างๆ และลำดับเบสที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคในมนุษย์ ซึ่งบริเวณที่กล่าวมาข้างต้นมีการศึกษาในหลอดทดลอง พบว่าสามารถเกิดโครงสร้างจิกวอดรูเพิลิกซ์ได้ (7)

จิกวอดรูเพิลิกซ์มีส่วนในการควบคุมความยาวปลายสายดีเอ็นเอหรือเทโลเมียร์ และควบคุมการถอดรหัสในหลายยีน เช่น *c-MYC*, *c-kit* หรือ *KRAS* (5) เมื่อไม่นานมานี้ Balasubramanian และคณะได้ทำการศึกษาจิกวอดรูเพิลิกซ์โดยใช้เซลล์ของมนุษย์ด้วยเทคนิค immunofluorescence การทดลองดังกล่าวได้แสดงให้เห็นว่าสายดีเอ็นเอของมนุษย์สามารถเกิดโครงสร้างจิกวอดรูเพิลิกซ์ได้ (8)

จิกวอดรูเพิลิกซ์ที่พบในดีเอ็นเอมีความน่าสนใจสำหรับเป็นเป้าหมายของการออกแบบยาต้านมะเร็ง การศึกษาในหลอดทดลองพบว่าดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอหลายชนิดสามารถนำมาเป็นเป้าหมายที่จำเพาะของยาได้ นอกจากนี้ยังพบโมเลกุลขนาดเล็กมากมายที่สามารถเกิดอันตรกิริยากับจิกวอดรูเพิลิกซ์และยังสามารถยับยั้งเอนไซม์เทโลเมอเรสได้ (7) ประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์เนื้อเยื่อพบว่าการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์เทโลเมอเรส ดังนั้นการยับยั้งเอนไซม์เทโลเมอเรสมีผลต่อการรักษามะเร็งอย่างมาก (9)

2.2.1 จีควอดรูเพล็กซ์ที่พบใน *Plasmodium falciparum*

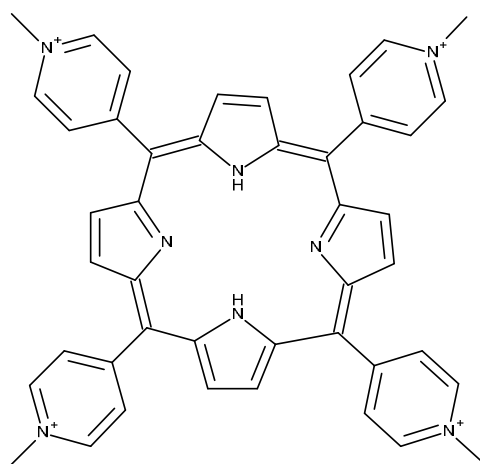
โดยทั่วไปสายดีเอ็นเอจะมีลักษณะเป็นเกลียวคู่ขวา (B-form) อย่างไรก็ตามมีหลักฐานที่แสดงให้เห็นว่าบนสายดีเอ็นเอที่มีเบสกวานีนเป็นจำนวนมากใน *P. falciparum* สามารถเกิดเป็นโครงสร้างจีควอดรูเพล็กซ์ได้ เช่น ในบริเวณเทโลเมียร์ของ *P. falciparum* clone 3D7 นอกจากนี้มีการศึกษาถึงบริเวณที่ไม่ใช่เทโลเมียร์โดยอาศัย QGRS-Maper software พบว่ามีโอกาสเกิดโครงสร้างจีควอดรูเพล็กซ์ได้ เช่น ลำดับเบสบนบริเวณ upstream ของวารียีน ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการถอดรหัสของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพของโรคมาลาเรีย พบว่ามี 63 บริเวณของที่คาดว่าน่าจะเกิดโครงสร้างจีควอดรูเพล็กซ์ มี 16 บริเวณเป็นส่วนที่มีความสำคัญพบในบริเวณที่เรียกว่า “upstreamB” ของวารียีน อย่างไรก็ตามพบว่ามีเพียง 3 บริเวณที่เป็นส่วนที่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนของลำดับเบส ได้แก่ UpsB-Q-1, UpsB-Q-2 และ Ups-Q-3 ซึ่งมีลำดับเบส (ตารางที่ 1) เมื่อวิเคราะห์โดยอาศัย BLAST พบว่าลำดับเบสทั้ง 3 บริเวณนี้ไม่พบในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของโครงสร้างจีควอดรูเพล็กซ์ที่พบในบริเวณ upstreamB ของ *P. falciparum* โคลน 3D7 (5)

ชื่อ	ลำดับเบส
UpsB-Q-1	CAGGGTTAAGGGTATAACTTTAGGGGTTAGGGTT
UpsB-Q-2	TAGGGTTAAGGGTATAACGTTAAGGGTTAGGGTT
UpsB-Q-3	CAGGGTTAAGGGTATAACATTTAGGGGTTAGGGTT

2.3 อนุพันธ์ของพอร์ไฟริน (Porphyrin derivatives): TMPyP4

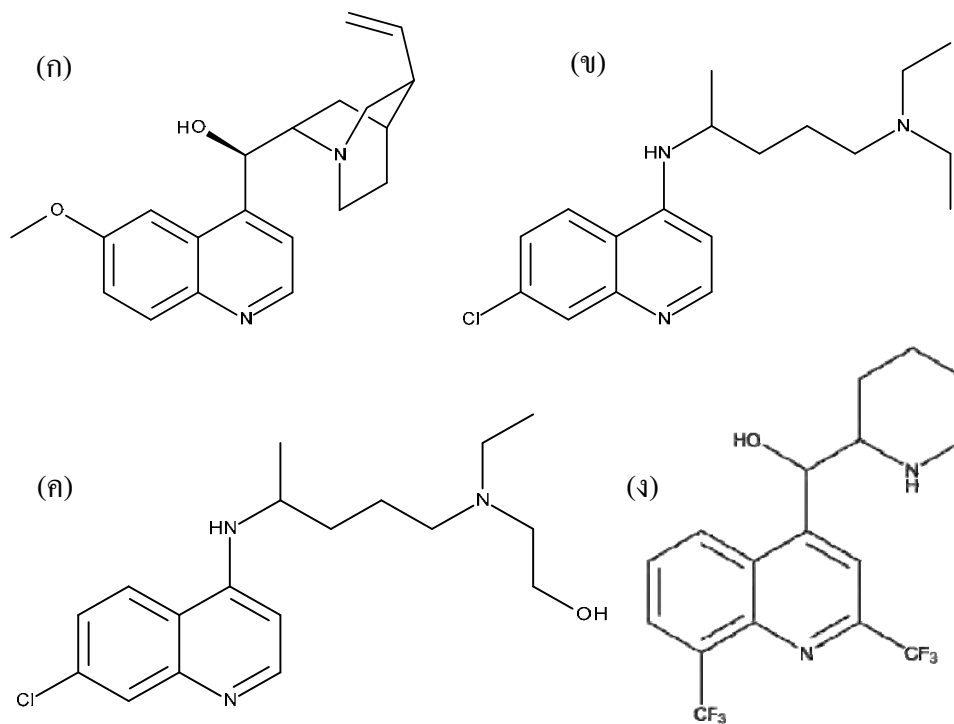
อนุพันธ์ของพอร์ไฟรินเป็นกลุ่มสารที่ได้รับการนิยมนำมาศึกษาอันตรกิริยากับโครงสร้างจีควอดรูเพล็กซ์ โดยเฉพาะ 5, 10, 15, 20-tetrakis-(N-methylpyridinium-4-yl)-21H, 23H-porphyrin หรือ TMPyP4 (ภาพที่ 8) ที่มีการศึกษาอย่างมากมาย Martino L. และคณะได้แสดงให้เห็นว่า TMPyP4 มี selectivity ต่อโครงสร้างจีควอดรูเพล็กซ์สูงกว่าโครงสร้างดีเอ็นเอสายคู่ภายใต้ molecular crowding (10) สำหรับลักษณะการจับของ TMPyP4 กับโครงสร้างจีควอดรูเพล็กซ์รูปแบบ parallel สายที่มีลำดับเป็น TG₄T ภายใต้สภาวะที่มีโพแทสเซียมไอออนพบว่า TMPyP4 จับกับโครงสร้างจีควอดรูเพล็กซ์ทั้งที่บริเวณ loop และส่วนนอกของโครงสร้างในลักษณะ end stacking (11) โดยที่การจับแบบ end stacking จะมีค่า binding affinity ที่สูงกว่ากรณีที่จับกับบริเวณ loop ของโครงสร้าง นอกจากนี้ TMPyP4 ยังสามารถจับกับโครงสร้างจีควอดรูเพล็กซ์ในลักษณะที่แทรกกระหว่างชั้น (intercalation) ของ G-quartet ที่เกิดขึ้นจากลำดับเบสของเทโลเมียร์ในมนุษย์ (T₂AG₃) ได้เช่นกัน (12)

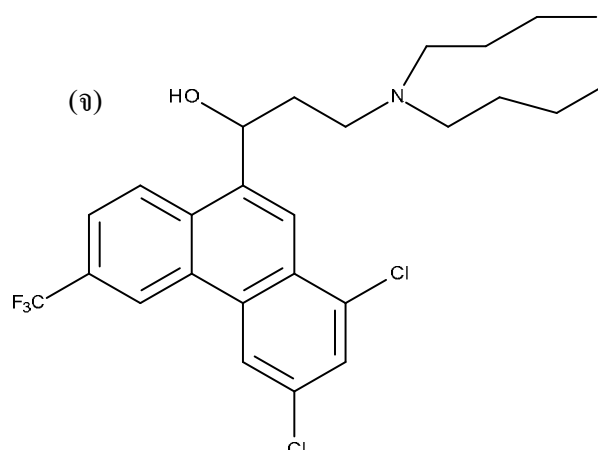


ภาพที่ 8 โครงสร้างของ 5, 10, 15, 20-tetrakis-(N-methylpyridinium-4-yl)-21H, 23H-porphyrin (TMPyP4)

2.4 ยาต้านมาลาเรียในกลุ่มอนุพันธ์ของควิโนลีน: 4-substituted quinoline derivatives

ยาต้านมาลาเรียในกลุ่มนี้มีโครงสร้างหลักเป็นควิโนลีน (quinoline) ซึ่งมีลักษณะแบนราบโดยมีการแทนที่ไฮโดรเจนที่ตำแหน่งที่ 4 ด้วย aminoalkyl chain ที่ต่างๆ กันไปรวมถึงหมู่แทนที่ต่างๆ บน quinoline nucleus ยาในกลุ่มนี้มีอยู่ 5 ชนิด (13) ได้แก่ quinine, chloroquine, hydroxychloroquine, mefloquine และ halofantrine





ภาพที่ 9 โครงสร้างของ (ก) Quinine, (ข) Chloroquine, (ค) Hydroxychloroquine, (ง) Mefloquine และ (จ) Halofantrine

กลไกการออกฤทธิ์ของยากลุ่มนี้ได้ถูกเสนอไว้ 3 กลไกคือ 1) DNA intercalation, 2) weak base hypothesis และ 3) ferriprotoporphyrin hypothesis โดยปัจจุบันเชื่อว่ากลไกการออกฤทธิ์ของยากลุ่มนี้เป็นไปตามกลไกที่ 2 และ 3 เป็นหลัก (13) สำหรับการเกิดอันตรกิริยากับดีเอ็นเอ นั้น ได้มีคณะวิจัยหลายคณะที่ได้ศึกษาและแสดงให้เห็นความสามารถในการจับดีเอ็นเอรูปแบบสายคู่โดยเฉพาะ chloroquine ที่มีการศึกษามากกว่ายาตัวอื่นและมีหลักฐานแสดงว่ายา chloroquine มีความชอบในการจับกับดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสเป็น GC-rich มากกว่าลำดับเบสลักษณะอื่น (14-17) อย่างไรก็ตามยังไม่ม้งานวิจัยใดที่ศึกษาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโครงสร้างจีควอครูเพิล็กซ์กับยาในกลุ่มนี้

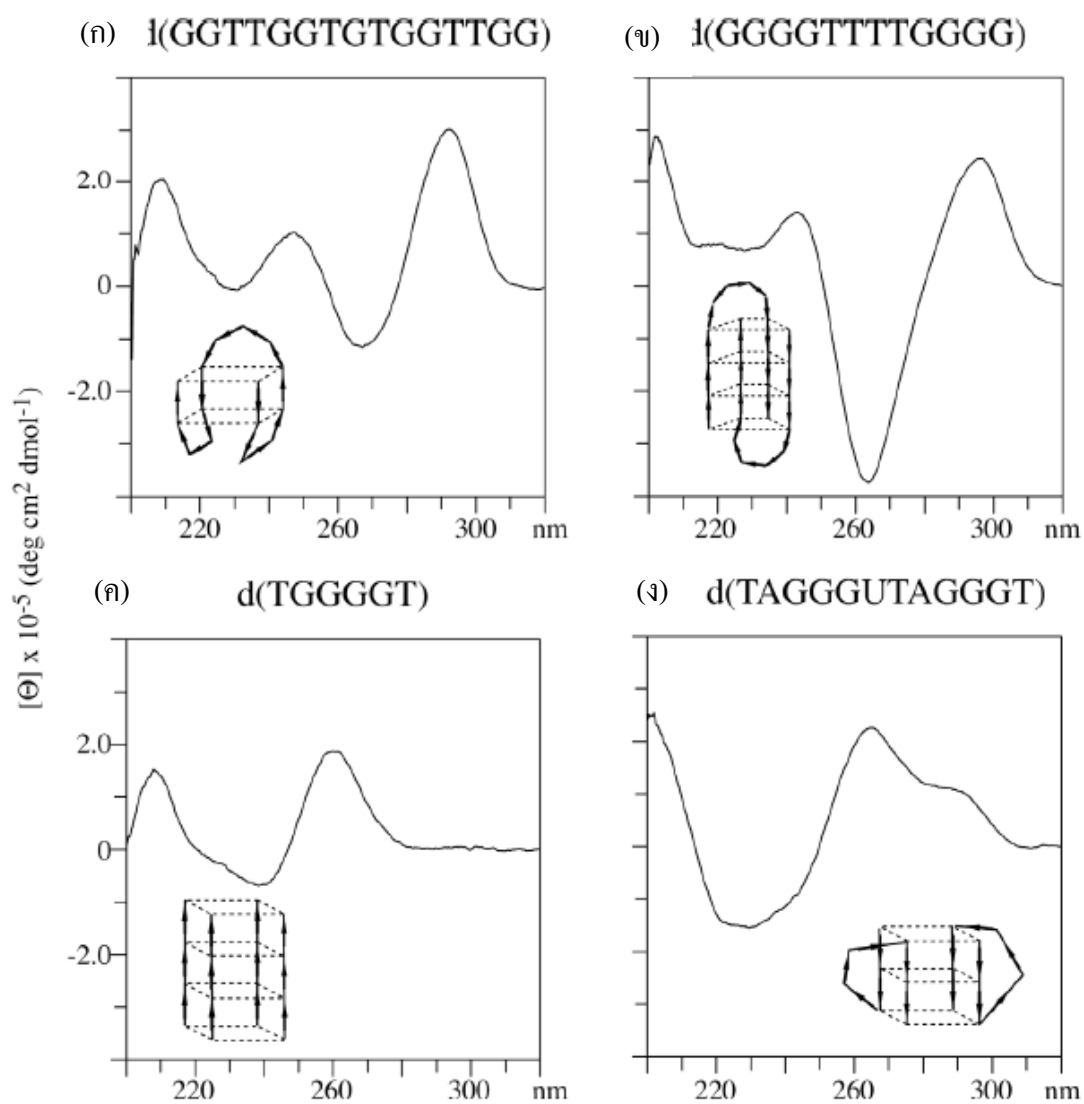
2.5 Circular dichroism (CD) spectroscopy กับการระบุโครงสร้างจีควอครูเพิล็กซ์

Circular dichroism (CD) เป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นจากการที่โมเลกุลที่ไม่สมมาตรหรือโมเลกุลที่มีคุณสมบัติไครัล (asymmetrical molecule or chiral molecule) เกิดอันตรกิริยากับแสงโพลาไรซ์ที่คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าหมุนเป็นวงกลม (circularly polarized electromagnetic rays) สารที่มีคุณสมบัติไครัลจะดูดกลืนแสงโพลาไรซ์ที่หมุนทางซ้ายและทางขวาได้ไม่เท่ากัน ความแตกต่างระหว่างการดูดกลืนแสงนี้เรียกว่า circular dichroism โดยค่าความแตกต่างนี้จะถูกวัดออกมาในรูปของ ellipticity (Θ) มีหน่วยเป็น degree (deg) หรือในรูปของความแตกต่างของค่า molar extinction coefficient, $\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$ ซึ่งมีหน่วยเป็น $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (18)

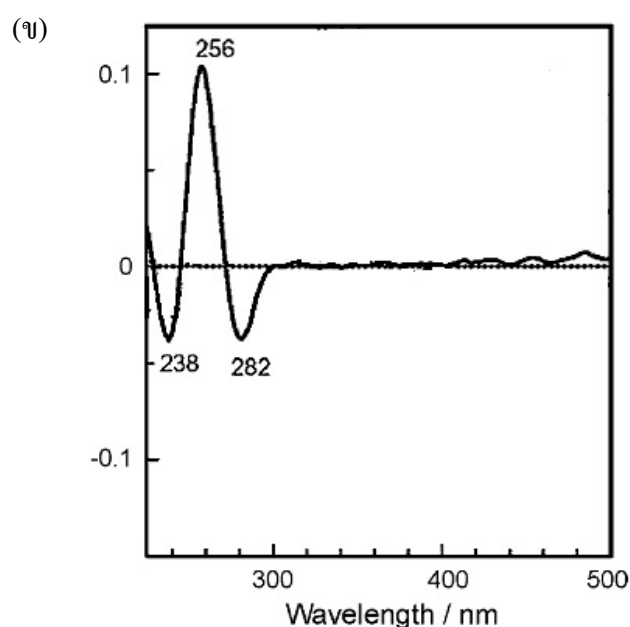
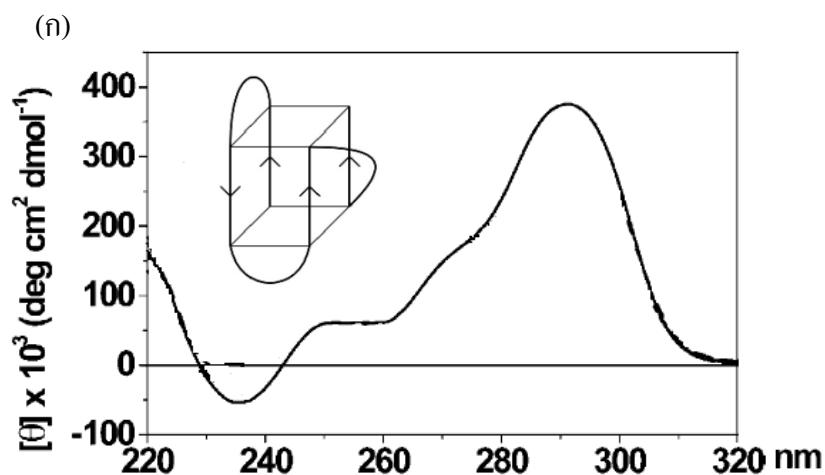
ดีเอ็นเอเป็นสารชีวโมเลกุลชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติไครัลและมีโครงสร้างหลากหลายรูปแบบซึ่งนำไปสู่การที่มี CD spectrum ที่แตกต่างกันไป เราจึงสามารถใช้เทคนิคทาง CD spectroscopy นี้มาระบุรูปแบบโครงสร้างของดีเอ็นเอในตัวอย่าง (sample) ต่างๆ ในเบื้องต้นได้ ข้อดีของ CD spectroscopy ในการใช้วิเคราะห์รูปแบบโครงสร้างของดีเอ็นเอนี้มีอยู่หลายประการ (18) ประการแรกคือเป็นวิธีที่มีความไวสูง (highly sensitive) แม้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอจะต่ำถึง $20 \mu\text{g/mL}$ ก็ตาม

ประการที่สอง คือใช้ได้ทั้งกับตัวอย่างที่มีความยาวของสายสั้นๆ (oligonucleotide) หรือตัวอย่างที่มีความยาวของสายมาก ประการที่สาม สามารถใช้ตรวจวัดและแยกแยะการเปลี่ยนแปลงรูปแบบโครงสร้างของตัวอย่างจากการทำไทเทรตด้วยลิแกนด์ได้ไม่ยาก ประการที่สี่ ตัวอย่างที่ใช้สามารถอยู่ทั้งในรูปสารละลายและแผ่นฟิล์ม รวมถึงสามารถนำไปเทียบกับผลที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเทคนิค infrared spectroscopy และ X-ray diffraction ประการสุดท้าย คือเวลาและค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้ไม่สูงมากนัก ดังนั้น CD spectroscopy จึงเป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมในการใช้ในการวิเคราะห์รูปแบบโครงสร้างของดีเอ็นเอ

สำหรับรูปแบบโครงสร้างจิวอครุเพล็กซ์ของดีเอ็นเอนั้นพบว่ามี 2 แบบคือ parallel และ anti-parallel (19) โดยที่ความแตกต่างใน CD spectrum pattern ของรูปแบบทั้งสองนั้นเกิดจากการจัดเรียง glycosidic bond angle (GBA) ที่แตกต่างกัน (19, 20) ลักษณะสเปกตรัมของโครงสร้างแบบ parallel นั้นจะแสดง positive band ที่ความยาวคลื่นประมาณ 260-265 nm และ negative band ที่ความยาวคลื่นประมาณ 240-245 nm หากมี external loop จะมี shoulder ที่ความยาวคลื่นประมาณ 290 nm ด้วย (9) สำหรับโครงสร้างแบบ anti-parallel จะแสดง positive band ที่ความยาวคลื่นประมาณ 295 nm, negative band ที่ความยาวคลื่นประมาณ 260-265 nm (21) นอกจากนี้ยังมีโครงสร้างอีกรูปแบบคือ hybrid-type conformation หรือ (3+1) mixed conformation ซึ่ง CD spectrum ของโครงสร้างรูปแบบนี้จะมี positive band ที่ความยาวคลื่นประมาณ 290 nm, shoulder ที่ความยาวคลื่นประมาณ 270 nm และ negative band ที่ความยาวคลื่นประมาณ 240 nm (10) สำหรับ unstructured DNA จะให้ CD spectrum ที่มี positive band ประมาณ 256 nm และ negative band ประมาณ 238 และ 282 nm (22)



ภาพที่ 10 สเปกตรัมของโครงสร้างจิวคอรูเพอติกซ์ : (ก) และ (ข) anti-parallel, (ค) parallel และ (ง) parallel แบบมี external loop (9)

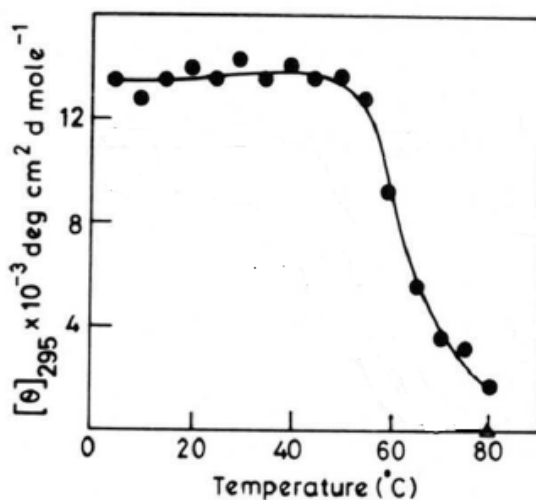


ภาพที่ 11 สเปกตรัมของ (ก) โครงสร้างจิวควดูเพล็กซ์แบบ hybrid-type conformation ที่มีลำดับเบสเป็น dAGGG (TTAGGG)₃TT (10) และ (ข) unstructured DNA ที่มีลำดับเบสเป็น d(TTAGGG)₂ (22)

2.6 ความคงตัวของอุณหภูมิศาสตร์ของโครงสร้างจิวควดูเพล็กซ์

ความคงตัวของอุณหภูมิศาสตร์ของโครงสร้างจิวควดูเพล็กซ์นั้นเราสามารถพิจารณาได้จากค่า melting temperature (T_m) โดย melting temperature เป็นอุณหภูมิที่สัดส่วนโมลของดีเอ็นเอที่ไม่เกิดโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) เท่ากับสัดส่วนโมลของดีเอ็นเอที่เกิดโครงสร้างทุติยภูมิ เทคนิคทางสเปกโตรสโคปีโดยเฉพาะ UV-visible และ CD spectroscopy เป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมใช้ในการหาค่า T_m ของโครงสร้างดีเอ็นเอรูปแบบต่างๆ ในการหาค่า T_m โดยทั่วไปจะเลือกใช้ความยาวคลื่นที่ 260 nm หรือความยาวคลื่น 295 nm ทั้งนี้ความยาวคลื่นที่จะเลือกใช้ติดตามการเปลี่ยนแปลง CD spectrum นั้นขึ้นอยู่กับรูปแบบของโครงสร้างจิวควดูเพล็กซ์ว่าจะมีลักษณะเป็นเช่นไร (23, 24)

นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงของค่า T_m เมื่อมีลิแกนด์อยู่ในสารละลายเดียวกับควอดรูเพล็กซ์สามารถใช้บอกการเกิดอันตรกิริยาระหว่างลิแกนด์นั้นกับจิวควอดรูเพล็กซ์ได้ (25)

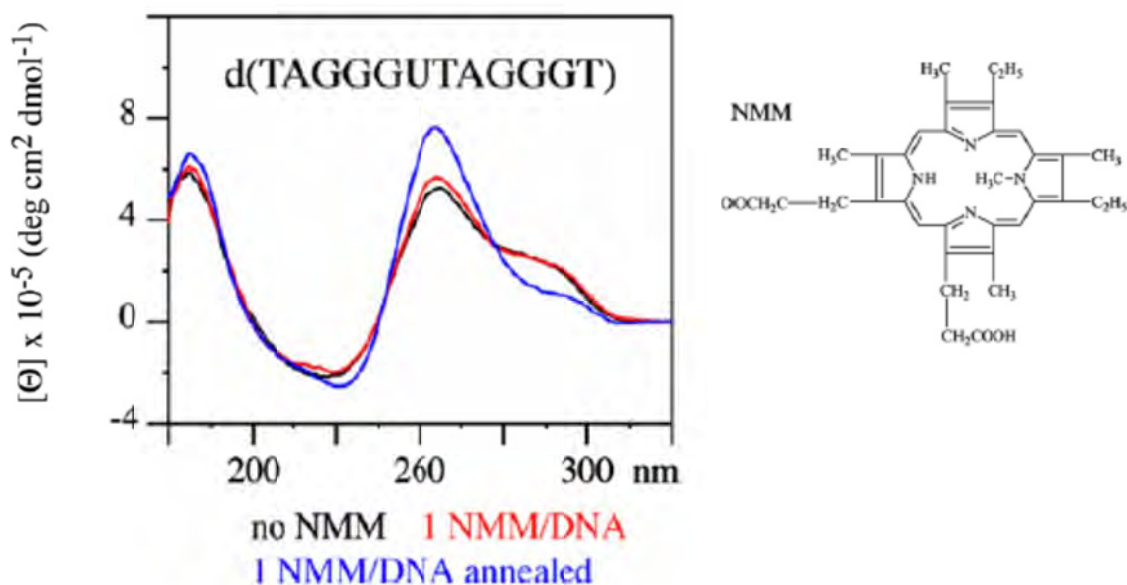


ภาพที่ 12 ตัวอย่าง melting curve โดยใช้ CD spectroscopy (26)

2.7 การศึกษาอันตรกิริยาระหว่างลิแกนด์กับดีเอ็นเอที่มีโครงสร้างจิวควอดรูเพล็กซ์โดยใช้ CD spectroscopy และ UV-visible absorption titration

เทคนิคในการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างดีเอ็นเอที่มีโครงสร้างจิวควอดรูเพล็กซ์กับลิแกนด์นั้นมีอยู่หลายวิธี เช่น เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี (spectroscopy) เทคนิคทางแคลอริเมตรี (calorimetry) เป็นต้น เทคนิค CD spectroscopy และ UV-visible absorption titration เป็นเทคนิคที่สามารถใช้ในการศึกษาอันตรกิริยาระหว่างลิแกนด์กับดีเอ็นเอได้ บริเวณของดีเอ็นเอที่จะเกิดอันตรกิริยากับลิแกนด์มักจะเป็นส่วนของหมู่ฟอสเฟตผ่านแรงดึงดูดทางไฟฟ้า หรือจะเป็นในส่วนของเบสต่างๆ โดยการเกิดอันตรกิริยากับหมู่ฟังก์ชันต่างๆ บนเบส การเกิดอันตรกิริยาระหว่างดีเอ็นเอกับลิแกนด์นี้ทำให้คุณสมบัติในการดูดกลืนแสงต่างๆ เปลี่ยนแปลงไป

จากที่เคยกล่าวไว้แล้วในข้างต้นว่าเทคนิคทาง CD spectroscopy ใช้ศึกษาคุณสมบัติไครัลของสารไครัลอย่างเช่นดีเอ็นเอ เมื่อโครงสร้างดีเอ็นเอรูปแบบพิเศษอย่างจิวควอดรูเพล็กซ์เกิดอันตรกิริยากับลิแกนด์สภาพแวดล้อมของความเป็นไครัลก็จะเปลี่ยนแปลงไปจึงทำให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของ CD spectrum ไปจากเดิม (1, 27)



itive

สำหรับเทคนิค UV-visible absorption titration อาศัยคุณสมบัติการดูดกลืนแสงช่วง UV ของสารที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อมีการเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (complex) ทำได้โดยสารละลายของ จีควอครูเพอริกซ์จะค่อยๆ ถูกเติมลงไปนสารละลายของลิแกนด์ สเปกตรัมของลิแกนด์จะค่อยๆ เปลี่ยนแปลงจากการเกิดอันตรกิริยากับดีเอ็นเอจนกระทั่งสเปกตรัมไม่มีการเปลี่ยนแปลงอีกเมื่อเติม สารละลายของจีควอครูเพอริกซ์ลงไปสามครั้งติดกัน การลดลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสงสูงสุดของสาร (soret band, λ_{\max}) มักจะแสดงในเทอมของ % hypochromicity โดยคำนวณได้จากสมการ

$$\% \text{ hypochromicity} = \left(\frac{\varepsilon_f - \varepsilon_b}{\varepsilon_f} \right) \times 100$$

โดยที่ ε_f และ ε_b คือ molar extinction coefficient ของลิแกนด์อิสระและลิแกนด์ที่มีการจับกับ

โครงสร้างจีควอครูเพอริกซ์ ตามลำดับ และ $\varepsilon_f = \frac{A_f}{C_f}$, $\varepsilon_b = \frac{A_b}{C_b}$ (11, 12)

บทที่ 3

เครื่องมือที่ใช้และวิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมี

1. Sterile distill water (SDW)
2. 5, 10, 15, 20- Tetrakis (1-methyl-4-pyridinio) porphyrin tetra (*p*-toluenesulfonate) (TMPyP4) ($C_{72}H_{66}N_8O_{12}S_4$; MW 1363.60 g/mole, %LA 97, Aldrich[®])
3. Quinine sulfate dihydrate (MW 782.96 g/mole, %LA 99, Acros Organics[®])
4. Chloroquine diphosphate (MW 515.86 g/mole, %LA 98, Sigma-aldrich[®])
5. Hydroxychloroquine sulfate (MW 433.95 g/mole, %LA 99.0, Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.)
6. Mefloquine HCl ($C_{17}H_{17}ClF_6N_2O$; MW 414.77g/mole, %LA 98.60, Atlantic Laboratories Corp., Ltd.)
7. Disodium EDTA dihydrate (MW 372.24 g/mole) (USB[®])
8. Tris ($NH_2C(CH_2OH)_3$; MW 121.14 g/mole) (USB[®])
9. Potassium chloride (KCl; MW 74.55 g/mole)
10. Hydrochloric acid (HCl; MW 36.46 g/mole)
11. Potassium hydroxide (KOH; MW 56.11 g/mole)
12. Ethanol (C_2H_5OH ; MW 46.07 g/mole)
13. Methanol (CH_3OH ; MW 32.04 g/mole)
14. Liquid Nitrogen (Taylor-Wharton)
15. Synthetic oligodeoxynucleotide (Pacific science)

Primer name/ Sequence (5' to 3')	MW (μg/μmole)
UpsB-1 CAGGGTTAAGGGTATAACTTTAGGGGTTAGGGTT	10,647.92

วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ

1. CD spectrometer (Jasco[®] J-815)
2. UV-visible spectrophotometer (Agilent[®] 8453)
3. Temperature controller (Jasco[®] PTC-423S/15)
4. Nanodrop spectrophotometer
5. Vortex-2 genie (Scientific industries[®])
6. Microcentrifuge (Daiham labtech[®])
7. Microcentrifuge tube (Axygen[®])
8. pH meter (Mettler telodo[®])
9. Hotplate (Heidolph[®] MR3001)
10. Micropipette (Mettler telodo[®]) ขนาด 2, 10, 25, 100, 200, 1000 μ l
11. Micropipette tip (Axygen scientific[®])
12. Cuvette; quartz, path length 0.2, 1.0 cm (Hellma[®])
13. Rubber glove
14. Analytical balance (Mettler telodo[®])

การเตรียมสารเคมีและตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์

- 1) การเตรียม 2 M KCl solution
ชั่ง potassium chloride 29.82 g ละลายและปรับปริมาตรด้วย SDW ใน volumetric flask ขนาด 200 ml
- 2) การเตรียม 6 M HCl solution
ตวงกรด hydrochloric 38%w/w (12.39 M) 96.85 ml ละลายและปรับปริมาตรด้วย SDW ใน volumetric flask ขนาด 200 ml
- 3) การเตรียม 6 M KOH solution
ชั่ง potassium hydroxide 67.332 g ละลายและปรับปริมาตรด้วย SDW ใน volumetric flask ขนาด 200 ml
- 4) การเตรียม 500 mM Tris stock solution pH 7.4
ชั่ง Tris 12.114 g ละลายด้วย SDW ประมาณ 160 ml ปรับ pH ด้วย 6M HCl และปรับปริมาตรใน volumetric flask ขนาด 200 ml จะได้สารละลาย Tris 500 mM

- 5) การเตรียม 10 mM Tris buffer solution pH 7.4
เจือจางสารละลาย 500 mM Tris 2 ml กับ SDW 98 ml
- 6) การเตรียม 500 mM disodium EDTA stock solution pH 8.0
ชั่ง disodium EDTA 18.612 g ละลายด้วย SDW ประมาณ 75 ml ค่อยๆ เติม 6M KOH ลงในสารละลายจนได้สารละลายใส จากนั้นปรับ pH ด้วย 6M KOH และปรับปริมาตรใน volumetric flask ขนาด 100 ml จะได้สารละลาย disodium EDTA 500 mM
- 7) การเตรียม 10XTE buffer stock solution pH 7.4 (100 mM Tris/10 mM EDTA)
ผสมสารละลาย 500 mM Tris stock solution pH 7.4 ปริมาตร 50 ml, 500 mM disodium EDTA stock solution pH 8.0 ปริมาตร 5 ml และ SDW 125 ml ปรับให้ได้ pH 7.4 ด้วย 6M KOH หรือ 6M HCl แล้วปรับปริมาตรใน volumetric flask ขนาด 250 ml
- 8) การเตรียม 1XTE buffer solution pH 7.4
เจือจางสารละลาย 10XTE buffer 25 ml กับ SDW 225 ml
- 9) การเตรียม 0.5 mM quinine sulfate stock solution
ชั่ง quinine sulfate 99.86 mg ละลายและปรับปริมาตรด้วย SDW ใน volumetric flask ขนาด 250 ml
- 10) การเตรียม 10 mM chloroquine stock solution
ชั่ง chloroquine diphosphate 131.60 mg ละลายและปรับปริมาตรด้วย SDW ใน volumetric flask ขนาด 25 ml
- 11) การเตรียม 10 mM hydroxychloroquine sulfate stock solution
ชั่ง hydroxychloroquine 219.17 mg ละลายและปรับปริมาตรด้วย SDW ใน volumetric flask ขนาด 50 ml
- 12) การเตรียม 1 mM mefloquine HCl stock solution
ชั่ง mefloquine HCl 105.16 mg ละลายและปรับปริมาตรด้วย SDW ใน volumetric flask ขนาด 250 ml
- 13) การเตรียม 10 mM TMPyP4 stock solution
ชั่ง TMPyP4 4.2173 mg ละลายในด้วย 1XTE buffer solution pH 7.4 ปริมาตร 300 μ l
- 14) การเตรียม promoter UpsB-1 stock solution ใน 1XTE buffer solution pH 7.4
ละลายผงแห้งของ oligonucleotide ด้วยสารละลาย 1XTE buffer solution pH 7.4 จนได้สารละลายใส ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าความเข้มข้นด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer แล้วปรับให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ

15) การเตรียม promoter UpsB-1 stock solution ใน Tris buffer pH 7.4

ละลายผงแห้งของ oligonucleotide ด้วยสารละลาย 10 mM Tris buffer pH 7.4 จนได้สารละลายใส ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าความเข้มข้นด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer แล้วปรับให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

1. การศึกษาการเกิดโครงสร้าง G-quadruplex ของ UpsB-1

ตารางที่ 2 ข้อมูลสารในการศึกษาเกิดโครงสร้าง G-quadruplex

โอลิโกนิวคลีโอไทด์	สถานะ	ปริมาตรสารละลาย (μL)
10 μM UpsB-1	10 mM Tris pH 7.4	360
10 μM UpsB-1	1 XTE pH 7.4, 100 mM KCl	360

การเตรียมสารละลายดีเอ็นเอ: นำสารละลายดีเอ็นเอไปให้ความร้อนที่ 95°C เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งให้เย็นอย่างช้าๆ แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง CD spectrometer ที่ความยาวคลื่น 200-500 nm, อุณหภูมิ 25°C, scanning rate 50 nm/min, response time 8 sec, 0.5 nm data pitch

2. การศึกษาการจับของยากับโครงสร้าง G- quadruplex

การเตรียมสารละลายดีเอ็นเอ: นำสารละลายดีเอ็นเอ (UpsB-1) เข้มข้นไปให้ความร้อนที่ 95°C เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งให้เย็นอย่างช้าๆ จากนั้นนำมาเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ ด้วยสารละลาย 1XTE pH 7.4, 100 mM KCl

2.1 ศึกษาการจับของยาด้วยวิธี UV-visible absorption titration

การศึกษาการจับของยา TMPyP4

เตรียมสารละลายยา TMPyP4 ความเข้มข้น 3.5 μM ใน 1XTE pH 7.4, 100 mM KCl นำไปวัด spectrum ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer โดยเก็บค่าช่วง 200 - 1,100 nm จากนั้นค่อยๆ เติมสารละลาย DNA ความเข้มข้น 30 uM ลงไปครั้งละ 1 μl จนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 422 nm ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

การศึกษาการจับของยา Quinine

เตรียมสารละลายยา quinine ความเข้มข้น 150 μM ใน 1XTE pH 7.4, 100 mM KCl นำไปวัด spectrum ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer โดยเก็บค่าช่วง 200 - 1,100 nm จากนั้นค่อยๆ เติมสารละลาย DNA ความเข้มข้น 300 μM ลงไปครั้งละ 1 μl จนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 331 nm ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

การศึกษาการจับของยา Chloroquine

เตรียมสารละลายยา chloroquine ความเข้มข้น 50 μM ใน 1XTE pH 7.4, 100 mM KCl นำไปวัด spectrum ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer โดยเก็บค่าช่วง 200 - 1,100 nm จากนั้นค่อยๆ เติมสารละลาย DNA ความเข้มข้น 300 μM ลงไปครั้งละ 1 μl จนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 330 และ 343 nm ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

การศึกษาการจับของยา Hydroxychloroquine

เตรียมสารละลายยา hydroxychloroquine ความเข้มข้น 50 μM ใน 1XTE pH 7.4, 100 mM KCl นำไปวัด spectrum ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer โดยเก็บค่าช่วง 200-1,100 nm จากนั้นค่อยๆ เติมสารละลาย DNA ความเข้มข้น 300 μM ลงไปครั้งละ 1 μl จนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 330 และ 343 nm ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

การศึกษาการจับของยา Mefloquine

เตรียมสารละลายยา mefloquine ความเข้มข้น 150 μM mM ใน 1XTE pH 7.4, 100 mM KCl นำไปวัด spectrum ด้วยเครื่อง UV-visible spectrophotometer โดยเก็บค่าช่วง 200 - 1,100 nm จากนั้นค่อยๆ เติมสารละลาย DNA ความเข้มข้น 300 μM ลงไปครั้งละ 1 μl จนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 317 nm ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

ตารางที่ 3 ข้อมูลสารในการทำ UV-visible absorption titration

ความเข้มข้นลิแกนด์	ปริมาตรเริ่มต้นของลิแกนด์ (μL)	ความเข้มข้นดีเอ็นเอที่ใช้ (μM)
TMPyP4 3.5 μM ใน 1XTE 100 mM KCl	350	30
Quinine 150 μM ใน 1XTE 100 mM KCl	350	300
Chloroquine 50 μM ใน 1XTE 100 mM KCl	350	300
Mefloquine 150 μM ใน 1XTE 100 mM KCl	350	300
Hydroxychloroquine 50 μM ใน 1XTE 100 mM KCl	350	300

2.2 ศึกษาการจับของยาด้วยเทคนิค Circular dichroism

ตารางที่ 4 ข้อมูลสารตัวอย่างในการทำ circular dichroism

ความเข้มข้นลิแกนด์	ความเข้มข้นดีเอ็นเอ (μM)	ปริมาตร (μL)
30 μM TMPyP4 ใน 1XTE 100 mM KCl	10	370
30 μM Quinine ใน 1XTE 100 mM KCl	10	370
30 μM Quinine ใน 10 mM Tris	10	370
30 μM Chloroquine ใน 1XTE 100 mM KCl	10	370
30 μM Chloroquine ใน 10 mM Tris	10	370
30 μM Hydroxychloroquine ใน 1XTE 100 mM KCl	10	370
30 μM Mefloquine ใน 1XTE 100 mM KCl	10	370

การเตรียมสารตัวอย่าง: ใส่ลิแกนด์ลงไปในตัวเอ็นเอที่เกิดโครงสร้าง G-quadruplex แล้ว ให้ได้ความเข้มข้นของลิแกนด์ต่อดีเอ็นเอ เป็นอัตราส่วน 3:1 จากนั้นนำไปวัดด้วยเครื่อง CD spectrometer

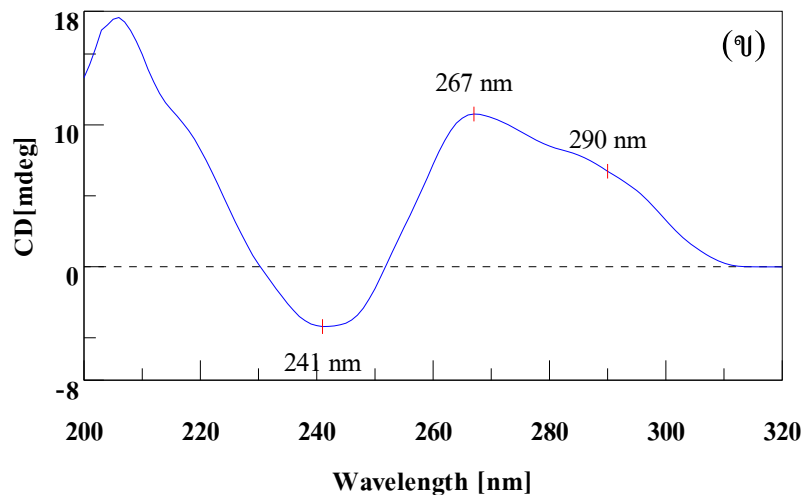
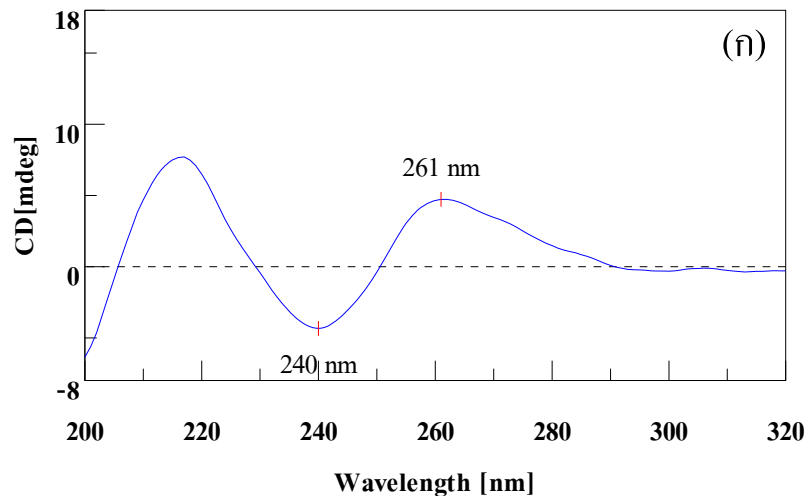
3. การศึกษาผลของยาต่อความคงตัวของโครงสร้าง G-quadruplex

นำสารตัวอย่างจากข้อ 2.2 มาทำการวัดค่า melting temperature (T_m) ด้วยเครื่อง CD spectrometer โดยทำการ scan ที่ความยาวคลื่น 200-320 nm, ช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 5 - 95°C อัตราเร็วในการเพิ่มอุณหภูมิ 2°C/min, response time 8 sec, 0.2°C data pitch, bandwidth 1 nm และทำการเก็บ spectrum ทุกๆ 10°C

บทที่ 4

ผลและอภิปรายผลการวิจัย

1. ผลการศึกษาการเกิดโครงสร้าง G-quadruplex ของ UpsB-1



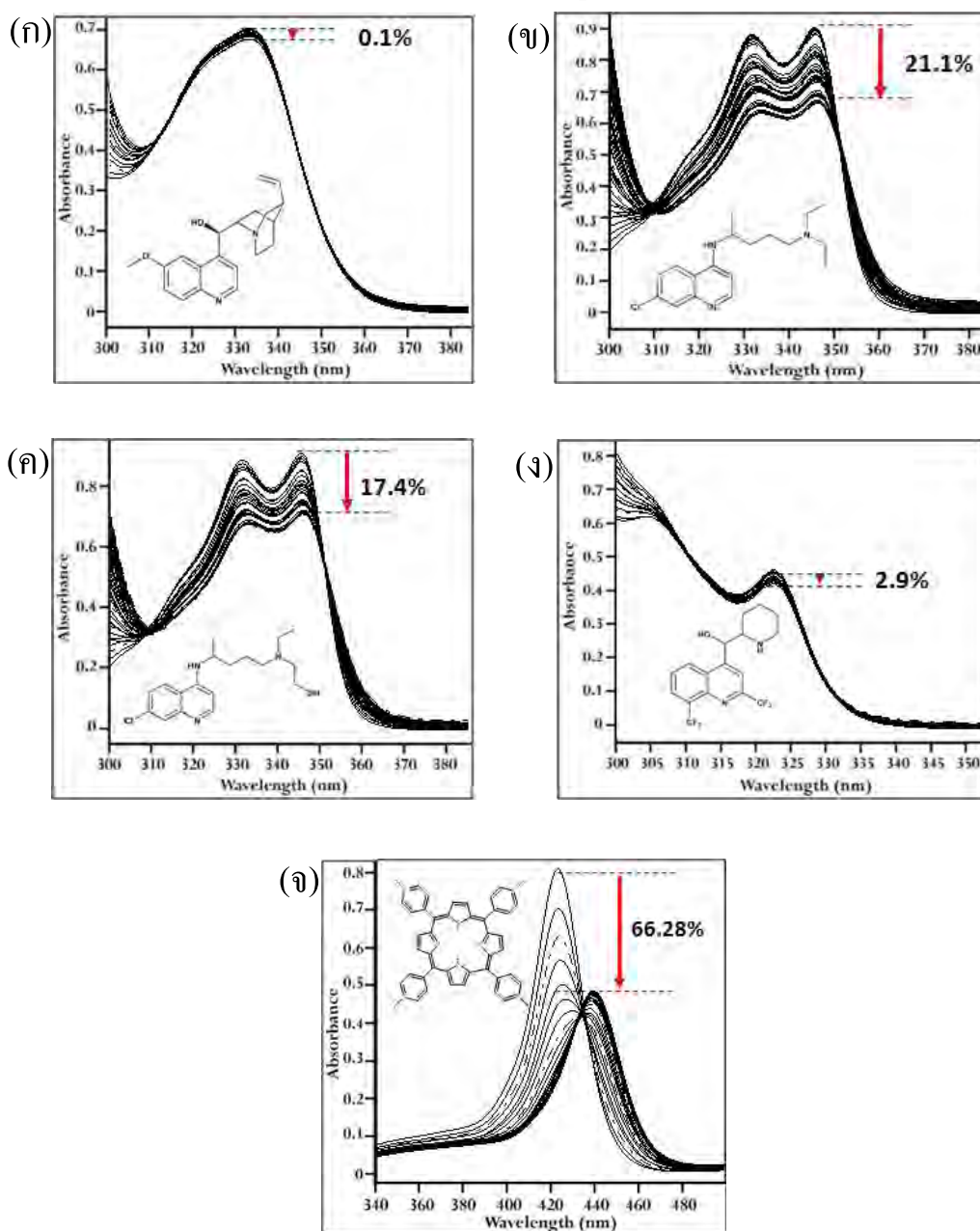
ภาพที่ 14 สเปกตรัมของ 10 μ M UpsB-1 ใน 10 mM Tris pH 7.4 (ก) และ ใน 1XTE pH 7.4, 100 mM KCl (ข)

ในสภาวะที่ไม่มี monovalent cation (ภาพที่ 14 (ก)) UpsB-1 แสดง CD spectrum ที่มี positive peak อยู่ที่ 261 nm และ negative peak ที่ 240 nm ลักษณะของ CD spectrum ดังกล่าวเป็นลักษณะของ จีควอดรูเพิลด์แบบ parallel สำหรับในสภาวะที่มีโพแทสเซียมไอออน UpsB-1 ให้ CD spectrum ซึ่งมี negative peak, positive peak และ shoulder ที่ 241, 267 และ 290 nm ตามลำดับซึ่งเป็นลักษณะของ จีควอดรูเพิลด์แบบ parallel ที่มี external loop จากผล CD spectrum ดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าโครงสร้าง จีควอดรูเพิลด์ที่เกิดขึ้นในทั้งสองสภาวะมีความแตกต่างในด้านของ stoichiometry โดยคาดว่า

โครงสร้างที่เกิดขึ้นในสถานะที่ไม่มี monovalent cation เป็นแบบ tetrameric ขณะที่ในสถานะที่มีโพแทสเซียมคาดว่าเป็นแบบ monomeric หรือ dimeric การที่ลำดับเบสส่วน UpsB-1 สามารถเกิดโครงสร้างจิวคอรูเพลิกซ์ได้เองนั้นเป็นการบ่งบอกถึงความเป็นไปได้ที่ลำดับเบสดังกล่าวจะเกิดโครงสร้างจิวคอรูเพลิกซ์ขึ้นได้ภายในเซลล์ อย่างไรก็ตาม โครงสร้างที่แท้จริงที่เกิดขึ้นจำเป็นต้องใช้วิธีการอื่นอย่างเช่น 2D ^1H NMR หรือ gel electrophoresis ในการระบุโครงสร้าง

2. ผลการศึกษาการจับของยากับโครงสร้าง G- quadruplex

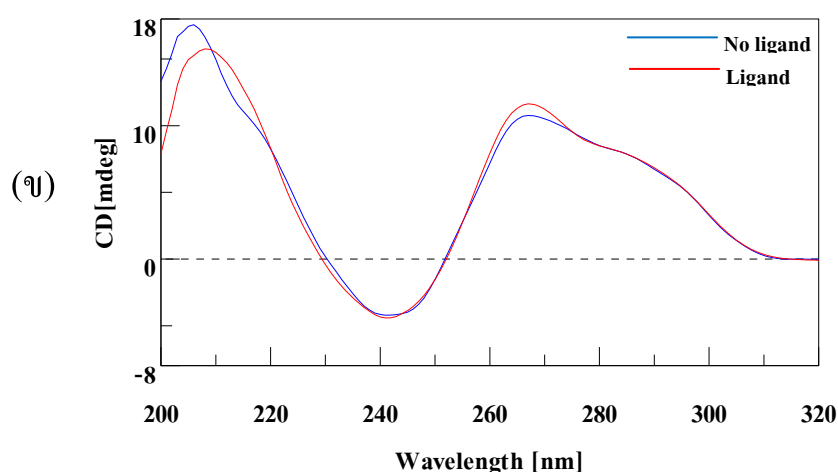
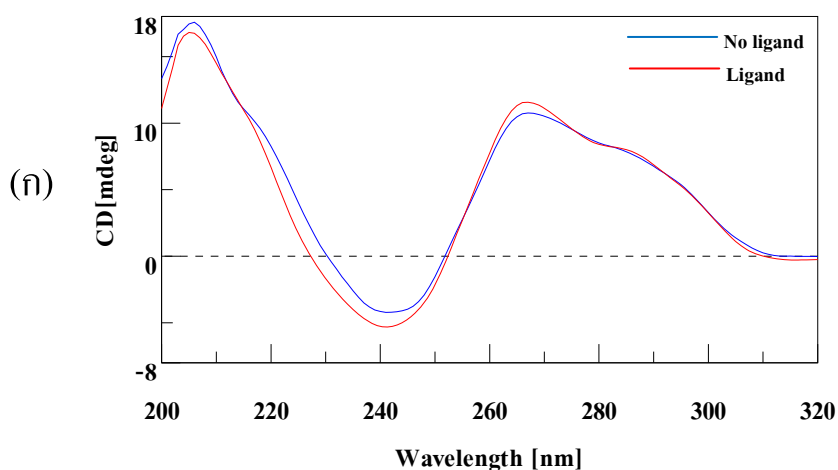
2.1 ผลศึกษาการจับของยากับวิธี UV-visible absorption titration

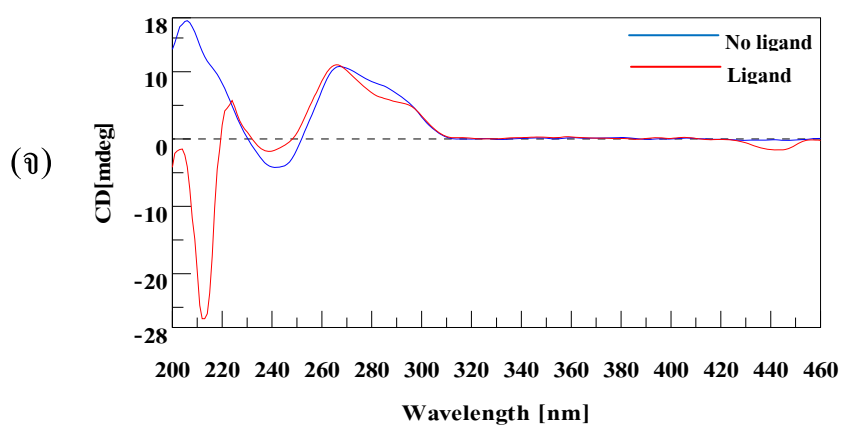
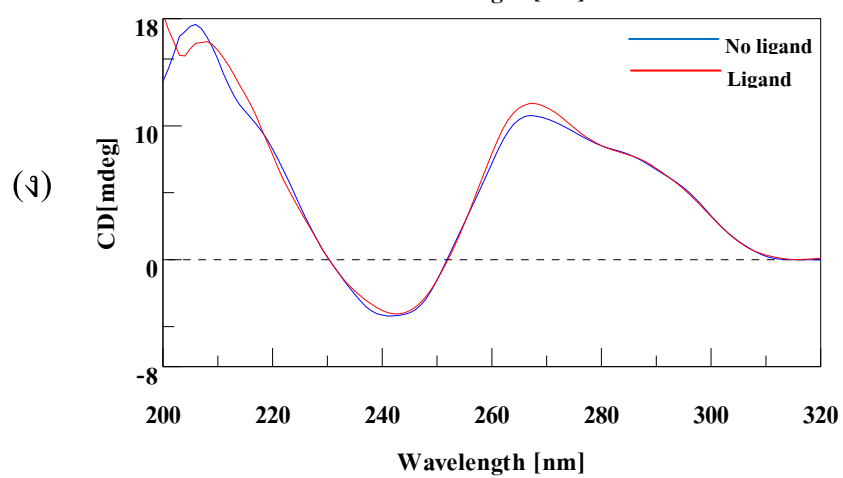
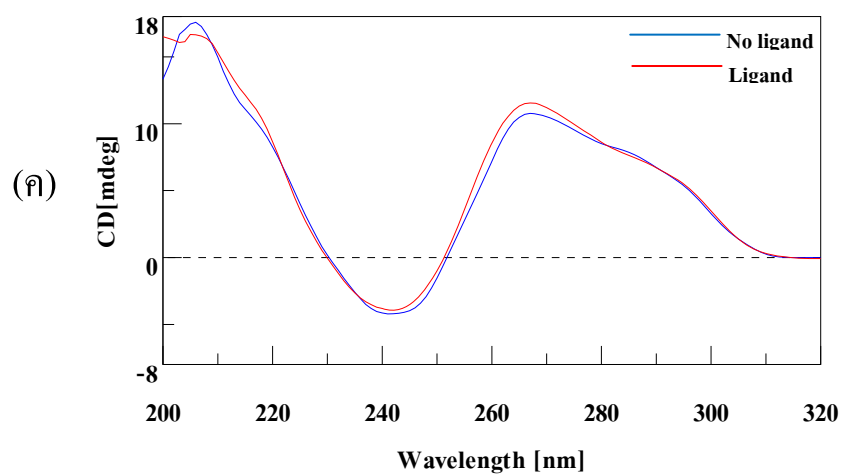


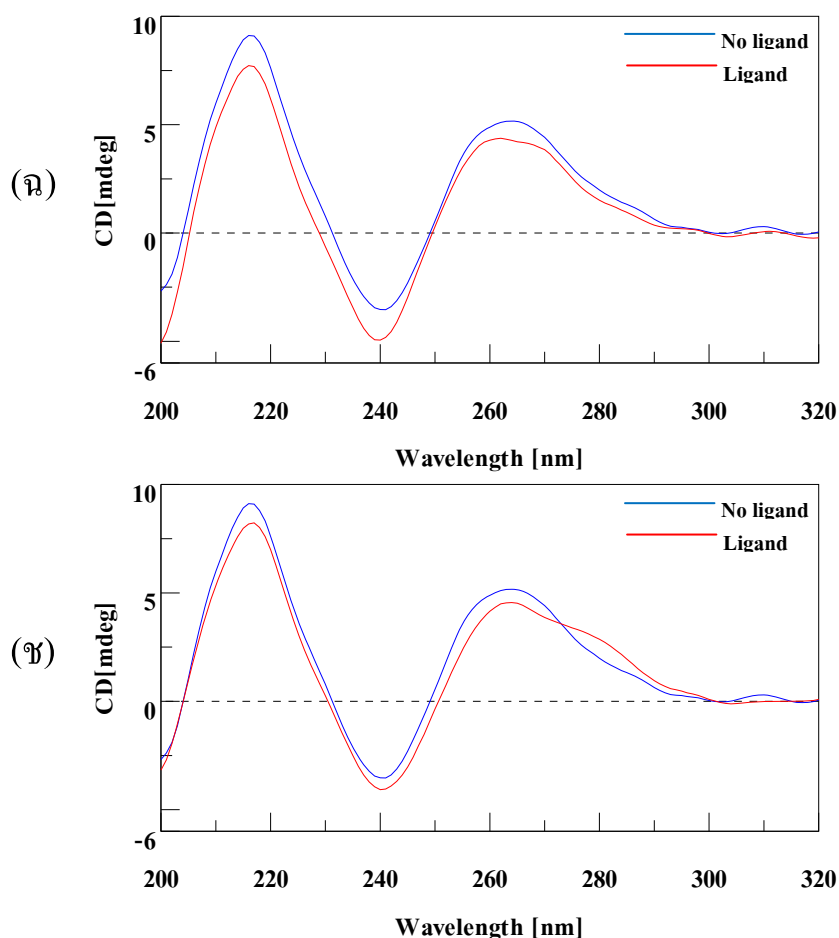
ภาพที่ 15 สเปกตรัมการทำ UV-visible absorption titration ของ (ก) Quinine, (ข) Chloroquine, (ค) Hydroxychloroquine, (ง) Mefloquine และ (จ) TMPyP4 (positive control)

ผลจากการทำ UV-visible absorption titration โดยใช้ TMPyP4 ซึ่งเป็นสารที่เป็นทราบกันว่าจับกับโครงสร้างจีควอครูเพอริกซ์เป็น positive control พบว่า UV spectrum ของ chloroquine และ hydroxychloroquine เห็นการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนเมื่อมีการเติมสารละลายจีควอครูเพอริกซ์ลงไป โดยมีค่า % hypochromicity เท่ากับ 21.1 และ 17.4% ตามลำดับ ผลที่เกิดขึ้นนี้ออกเป็นนัยว่ามีการเกิดอันตรกิริยาระหว่างโครงสร้างจีควอครูเพอริกซ์กับยาทั้งสองนี้ สำหรับ quinine และ mefloquine ไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงของ UV spectrum ที่ชัดเจน วิธีการนี้จึงไม่เหมาะในการใช้บอกการเกิดอันตรกิริยาระหว่างจีควอครูเพอริกซ์กับยาทั้งสอง ดังนั้นจึงควรใช้เทคนิคอื่นในการศึกษาเช่น fluorospectrometry ซึ่งมี sensitivity สูงกว่าแทน

2.2 ผลศึกษาการจับของลิแกนด์ด้วยเทคนิค Circular dichroism



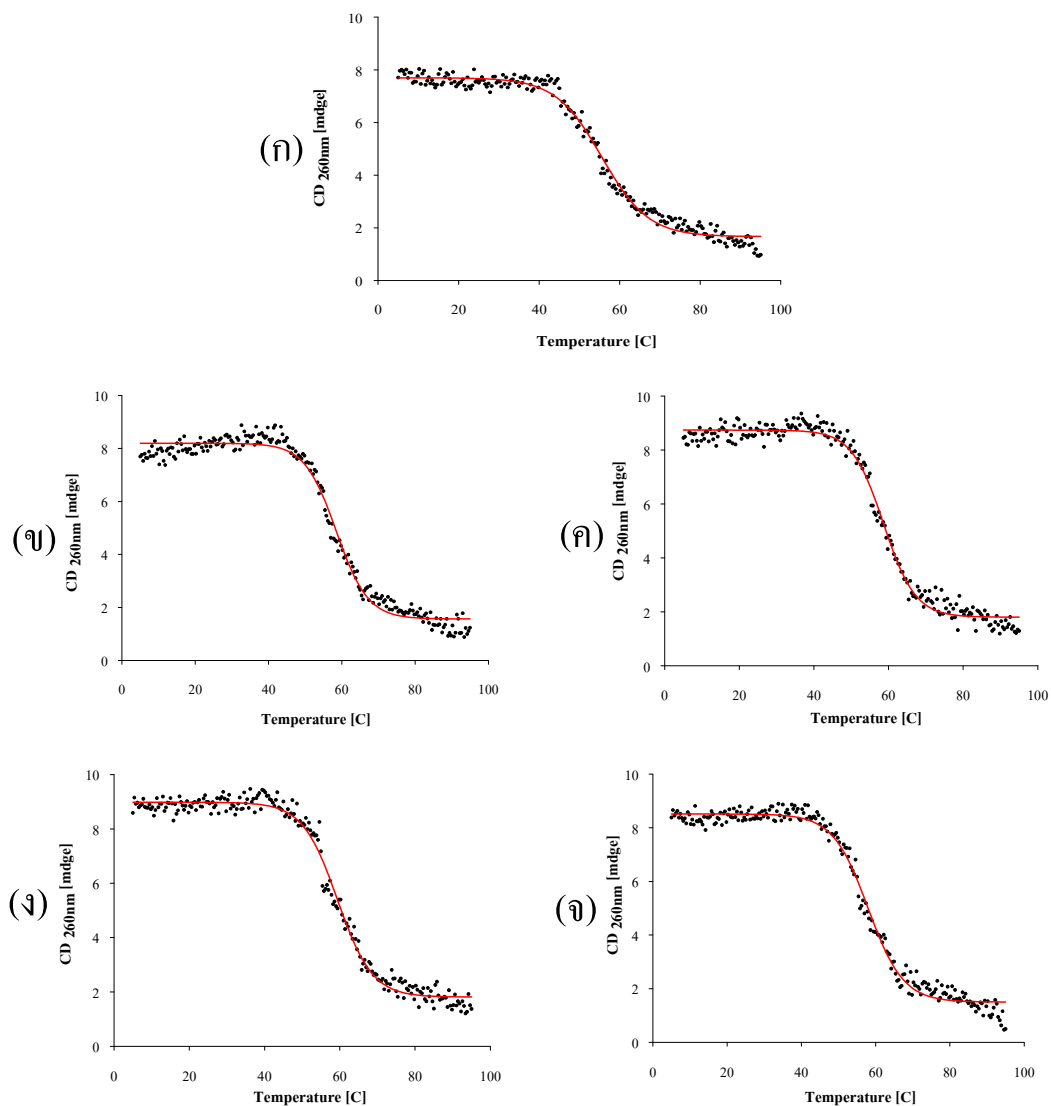




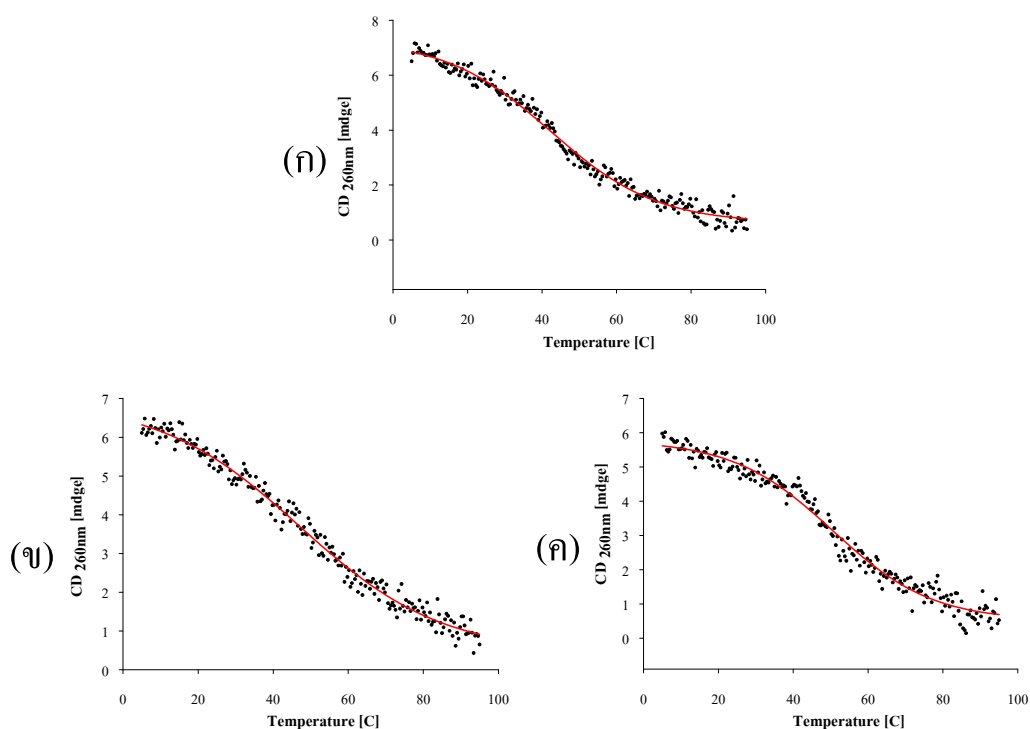
ภาพที่ 16 การเปรียบเทียบสเปกตรัมของ UpsB-1 แบบมีและไม่มีลิแกนด์ในสภาวะ 1XTE pH 7.4, 100 mM KCl ได้แก่ (ก) Quinine, (ข) Chloroquine, (ค) Hydroxychloroquine, (ง) Mefloquine และ (จ) TMPyP4 และในสภาวะ 10 mM Tris pH 7.4 ได้แก่ (ฉ) Quinine และ (ช) Chloroquine

เมื่อทำการวัด CD spectrum ของโครงสร้างจิวอครูเพล็กซ์ที่เกิดจาก UpsB-1 ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีลิแกนด์อยู่ด้วย พบว่าในสภาวะที่มีโพแทสเซียมไอออน CD spectrum ของ UpsB-1 หลังจากเติมลิแกนด์ลงไปไม่มีความแตกต่างที่ชัดเจนเมื่อเทียบกับก่อนเติมลิแกนด์ลงไป ยกเว้น TMPyP4 ซึ่งเป็น negative control ที่จะเห็นการเปลี่ยนแปลงของ CD spectrum ชัดเจน โดยเฉพาะการมี negative peak ปากฎขึ้น ที่ความยาวคลื่นประมาณ 440 nm ในขณะที่ในสภาวะที่ไม่มี monovalent cation อยู่เมื่อมีการเติมลิแกนด์ลงไปในการละลายของ UpsB-1 CD spectrum ที่ได้มีการเปลี่ยนแปลงมากกว่าในสภาวะที่มีโพแทสเซียมไอออน แต่อย่างไรก็ตาม การเปลี่ยนแปลงนี้ไม่สามารถบอกได้แน่ชัดว่าลิแกนด์มีการจับกับ UpsB-1 หรือไม่

3. ผลการศึกษาผลของยาต่อความคงตัวของโครงสร้าง G-quadruplex



ภาพที่ 17 Melting profile ของ (ก) UpsB-1 in 1XTE, (ข) Quinine, (ค) Chloroquine, (ง) Hydroxychloroquine และ (จ) Mefloquine



ภาพที่ 18 Melting profile ของ (ก) UpsB-1 in Tris, (ข) Quinine และ (ค) Chloroquine

ค่า melting temperature (T_m) เป็นค่าหนึ่งที่ใช้บอกความคงตัวของโครงสร้างจิวอครูเพล็กส์ ค่า T_m ของ UpsB-1 ในสถานะที่มีโพแทสเซียมไอออนมีค่า 55.6°C และเมื่อมีการเติมลิแกนด์ต่างๆ ลงไปพบว่าค่า T_m ของ UpsB-1 เพิ่มขึ้น $3-4^\circ\text{C}$ (ตารางที่ 4) สำหรับค่า T_m ของ UpsB-1 ในสถานะที่ไม่มี monovalent cation มีค่าเท่ากับ 42.3°C แต่เมื่อมีการเติม quinine และ chloroquine ลงไปพบว่าค่า T_m เพิ่มขึ้น 4.9 และ 8.2°C ตามลำดับ การเพิ่มขึ้นของค่า T_m นี้แสดงให้เห็นว่ายานกลุ่มนี้สามารถเพิ่มความคงตัวของโครงสร้างจิวอครูเพล็กส์ที่เกิดจาก UpsB-1 ได้ ผลดังกล่าวบ่งชี้เป็นการเกิดอันตรกิริยาเกิดขึ้นระหว่าง UpsB-1 กับยากลุ่มนี้ อย่างไรก็ตามจะสังเกตได้ว่าการมีโพแทสเซียมไอออนอยู่ในสารละลายนั้นจะลดความสามารถในการเพิ่มความคงตัวของยานกลุ่มนี้ต่อ UpsB-1 (ตารางที่ 4 ถึง 7) ที่เป็นเช่นนี้คาดว่าเกิดจากการที่โพแทสเซียมไอออนไปสะเทินประจุลบบนหมู่ฟอสเฟต ทำให้แรงดึงดูดระหว่างประจุบวกของยานกลุ่มนี้กับประจุลบของจิวอครูเพล็กส์ลดลง ยานกลุ่มนี้จึงเข้ามาเกิดอันตรกิริยาได้ลดลง ซึ่งในอดีตก็ได้มีผู้ค้นพบเหตุการณ์ดังกล่าวแต่เป็นการศึกษาการจับกันระหว่างยา chloroquine กับดีเอ็นเอสายคู่ (duplex)

ตารางที่ 5 ค่า T_m ของโครงสร้าง G-quadruplex ในสภาวะ 1XTE pH 7.4, 100 mM KCl

Ligands	T_m (°C)	ΔT_m (°C)
-	55.6	-
Quinine	58.5	2.9
Chloroquine	58.7	3.1
Hydroxychloroquine	59.4	3.8
Mefloquine	58.0	2.4

ตารางที่ 6 ค่า T_m ของโครงสร้าง G-quadruplex ในสภาวะ 10 mM Tris pH 7.4

Ligands	T_m (°C)	ΔT_m (°C)
-	42.3	-
Quinine	47.2	4.9
Chloroquine	50.5	8.2

ตารางที่ 7 ตารางสรุปการเปลี่ยนแปลงของค่า T_m ในสภาวะที่มีและไม่มีโพแทสเซียมไอออน

T_m (°C)		ΔT_m (°C)
Absence of K^+	Presense of K^+	
42.3	55.6	13.3

ตารางที่ 8 ตารางสรุปการเปลี่ยนแปลงของค่า T_m ในสภาวะที่มีลิแกนด์

Ligand	ΔT_m (°C)	ΔT_m (°C)
	Absence of K^+	Presense of K^+
Quinine	4.9	2.9
Chloroquine	8.2	3.1
Hydroxychloroquine	-	3.8
Mefloquine	-	2.4

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

ในการวิจัยนี้ เป็นงานวิจัยชิ้นแรกที่แสดงให้เห็นว่าลำดับเบสบริเวณโปรโมเตอร์ที่ชื่อ UpsB-1 ของวาร์ฮินสามารถที่จะเกิดโครงสร้างจิวอครูเพล็กซ์ที่คงตัวได้แม้จะไม่มี monovalent cation รูปแบบของ CD spectrum ที่ได้บ่งชี้ว่าโครงสร้างที่เกิดขึ้นเป็น tetrameric parallel แต่ในสถานะที่มีโพแทสเซียมไอออนมีโครงสร้างจิวอครูเพล็กซ์ที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็น parallel ที่มี external loop นอกจากนี้ยาในกลุ่มอนุพันธ์ของควิโนลีนสามารถที่จะเพิ่มความคงตัวให้กับโครงสร้างจิวอครูเพล็กซ์ที่เกิดจากลำดับเบสดังกล่าวได้โดยที่ความสามารถในการเพิ่มความคงตัวของจิวอครูเพล็กซ์นี้จะถูกรบกวนเมื่อมีโพแทสเซียมไอออนอยู่ ผลในการเพิ่มความคงตัวนี้สามารถบอกเป็นนัยได้ว่ายาในกลุ่มอนุพันธ์ของควิโนลีนสามารถเกิดอันตรกิริยากับโครงสร้างจิวอครูเพล็กซ์ได้ ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จึงเป็นงานที่สนับสนุนความเป็นไปได้ในการเกิดโครงสร้างจิวอครูเพล็กซ์ในบริเวณโปรโมเตอร์ของวาร์ฮินซึ่งอาจจะมีส่วนสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนและสามารถถูกเปลี่ยนแปลงได้โดยสารโมเลกุลเล็ก

เอกสารอ้างอิง

1. Paramasivan S, Rujan I, Bolton PH. Circular dichroism of quadruplex DNAs: applications to structure, cation effects and ligand binding. *Methods*. 2007;43(4):324-31.
2. Lipps HJ, Rhodes D. G-quadruplex structures: in vivo evidence and function. *Trends in cell biology*. 2009;19(8):414-22.
3. Qin Y, Hurley LH. Structures, folding patterns, and functions of intramolecular DNA G-quadruplexes found in eukaryotic promoter regions. *Biochimie*. 2008;90(8):1149-71.
4. Neidle S. *Therapeutic applications of quadruplex nucleic acids*. United States of America: Elsevier; 2012.
5. Smargiasso N, Gabelica V, Damblon C, Rosu F, De Pauw E, Teulade-Fichou MP, et al. Putative DNA G-quadruplex formation within the promoters of *Plasmodium falciparum* var genes. *BMC genomics*. 2009;10:362.
6. Sannohe Y, Sugiyama H. Overview of formation of G-quadruplex structures. *Current protocols in nucleic acid chemistry / edited by Serge L Beaucage [et al]*. 2010;Chapter 17:Unit 17 2 1-.
7. Keniry MA. Quadruplex structures in nucleic acids. *Nucleic Acid Sci*. 2001;56:123-46.
8. Biffi G, Tannahill D, McCafferty J, Balasubramanian S. Quantitative visualization of DNA G-quadruplex structures in human cells. 2013:1-5.
9. Rujan IN, Meleney JC, Bolton PH. Vertebrate telomere repeat DNAs favor external loop propeller quadruplex structures in the presence of high concentrations of potassium. *Nucleic acids research*. 2005;33(6):2022-31.
10. Luigi Martino BP, Iolanda Fotticchia, Stephen Neidle and Concetta Giancola. Shedding Light on the Interaction between TMPyP4 and Human Telomeric Quadruplexes. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2009;113(44):14779-86.
11. Wei C, Wang L, Jia G, Zhou J, Han G, Li C. The binding mode of porphyrins with cation side arms to (TG4T)₄ G-quadruplex: spectroscopic evidence. *Biophysical chemistry*. 2009;143(1-2):79-84.
12. Zhang H, Wang X, Wang P, Pang S, Ai X, Zhang J. Interactions between meso-tetrakis(4-(N-methylpyridiumyl))porphyrin TMPyP4 and DNA G-quadruplex of telomeric repeated sequence TTAGGG. *Science in China Series B: Chemistry*. 2008;51(5):452-6.

13. Lemke TL. Antiparasitic Agents. In: Thomas L. Lemke DAW, Victoria F. Roche and S. William Zito, editor. Foye's Principles of Medicinal Chemistry. 6th ed. The United States of America: Lippincott Williams & Wilkins; 2008. p. 1096.
14. Richard L. O'Brien JGOaFEH. Reactions of Quinine, Chloroquine, and Quinacrine with DNA and Their Effects on the DNA and RNA Polymerase Reactions. *Biochemistry*. 1966;55.
15. Michael W. Davidson BGG, David W. Boykin and W. David Wilson. Molecular Structural Effects Involved in the Interaction of Quinolinemethanolamines with DNA. Implications for Antimalarial Action. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1977;20(9):1117-22.
16. Meshnick FK-BaSR. Binding of chloroquine to DNA. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1989;35:51-6.
17. Watson DG. Antiparasitic Drugs. In: Watson DG, editor. *Pharmaceutical Chemistry*. China: Elsevier; 2011. p. 511-4.
18. Kypr J, Kejnovska I, Renciuik D, Vorlickova M. Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucleic acids research*. 2009;37(6):1713-25.
19. Burge S, Parkinson GN, Hazel P, Todd AK, Neidle S. Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic acids research*. 2006;34(19):5402-15.
20. Karsisiotis AI, Hessari NM, Novellino E, Spada GP, Randazzo A, Webba da Silva M. Topological characterization of nucleic acid G-quadruplexes by UV absorption and circular dichroism. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2011;50(45):10645-8.
21. Gray DM, Wen JD, Gray CW, Repges R, Repges C, Raabe G, et al. Measured and calculated CD spectra of G-quartets stacked with the same or opposite polarities. *Chirality*. 2008;20(3-4):431-40.
22. Zhang H, Xiao X, Wang P, Pang S, Qu F, Ai X, et al. Conformational conversion of DNA G-quadruplex induced by a cationic porphyrin. *Spectrochimica acta Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy*. 2009;74(1):243-7.
23. Lacroix J-LMaL. Analysis of Thermal Melting Curves. *Oligonucleotides*. 2003;13:515-37.
24. Rachwal PA, Fox KR. Quadruplex melting. *Methods*. 2007;43(4):291-301.
25. Chen M, Song G, Wang C, Hu D, Ren J, Qu X. Small-molecule selectively recognizes human telomeric G-quadruplex DNA and regulates its conformational switch. *Biophysical journal*. 2009;97(7):2014-23.
26. Brahmachari PBaSK. Structure and Stability of Human Telomeric Sequence. *The Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(34):21858-69.

27. Ranjbar B, Gill P. Circular dichroism techniques: biomolecular and nanostructural analyses- a review. *Chemical biology & drug design*. 2009;74(2):101-20.