

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПОРФИРИНОВ ТОЕРуР4 И ZnТОЕРуР4 С G-КВАДРУПЛЕКСАМИ

И.В. ВАРДАНЯН*, М.Х. БАДАЛЯН, Ц.М. ДЖОМАРДЯН,
Е.Б. ДАЛЯН, С.Г. АРУТЮНЯН

Ереванский государственный университет, Ереван, Армения

*e-mail: ishkhan@ysu.am

(Поступила в редакцию 06 декабря 2024 г.)

В работе исследовано взаимодействие двух катионных порфиринов мезо-тетра-(4N-оксиэтилпиридил) порфирина (ТОЕРуР4) и его Zn-содержащего производного (ZnТОЕРуР4) на G-квадруплексную конформацию последовательности d[5'-A(GGGTTA)₃GGG-3'] теломерной ДНК человека методами кругового дихроизма и оптической спектrophотометрии. Анализ полученных результатов показывает, что существует одно место связывания с этими порфиринами, но оно различается в зависимости от типа порфирина. Предполагается, что ТОЕРуР4 связывается параллельно плоскости G-квартета на внешней поверхности G-квадруплекса (внешний π - π^* стекинг), а связывание ZnТОЕРуР4 также происходит внешне, но в желобке боковой поверхности G-квадруплекса (желобковое связывание).

1. Введение

Известно, что в особых областях двухцепочечной геномной ДНК (таких как теломеры, промоторные области онкогенов, центромеры и др.) присутствуют G-обогащенные и C-обогащенные короткие регулярные последовательности, способные формировать четырехцепочечные структуры G-квадруплекса или I-мотива [1–6]. Формирование таких структур в клетке создает стерические препятствия для работы теломеразы или РНК-полимеразы, что приводит к гибели клетки. Такие тетраплексные структуры используются клеткой в качестве молекулярных переключателей для регуляции клеточных процессов в физиологических условиях. Открытие этого факта стало основой для формирования нового направления противоопухолевой терапии, основанного на целенаправленной генерации или разрушении G-квадруплексов и I-мотивов в выбранной области ДНК [7–12].

Одним из направлений этих исследований является поиск лигандов, стабилизирующих G-квадруплексы и I-мотивы в теломерной ДНК человека для блокирования активности теломеразы [7–19]. Например, было показано, что катионный порфирин мезо-тетра-(N4-метилпиридил) порфирин, ТМРуР4, является лигандом G-квадруплекса, хотя он обладает ограниченной селективностью к G-квадруплексам по сравнению с дуплексом [13]. Интерес к исследованию и

созданию селективных лигандов из класса порфиринов по-прежнему остается актуальным и вызывает постоянное внимание. [13–19]. Класс порфиринов представляет собой соединения с высокой биологической активностью, многие из которых проявляют противоопухолевые, противовирусные и противогрибковые свойства [20–24]. Многочисленные исследования показали, что порфирины могут взаимодействовать с ДНК как путем интеркаляции, так и путем внешнего связывания с желобком вдоль молекулы ДНК [25–27]. Механизм взаимодействия порфирина с ДНК зависит как от типа центрального металла и периферических заместителей в порфирине, так и от внешних условий (*pH* и ионной силы).

В настоящей работе мы исследовали взаимодействие 22-мерной гуанин-обогащенной регулярной последовательности теломерной ДНК человека d[5'-A(GGGTTA)3GGG-3'] (Tel22G) в конформации G-квадруплекса с мезо-тетра-(4N-оксиэтилпиридил) порфирином (ТОЕРуР4) и его Zn-содержащим производным (ZnТОЕРуР4) (рис.1).

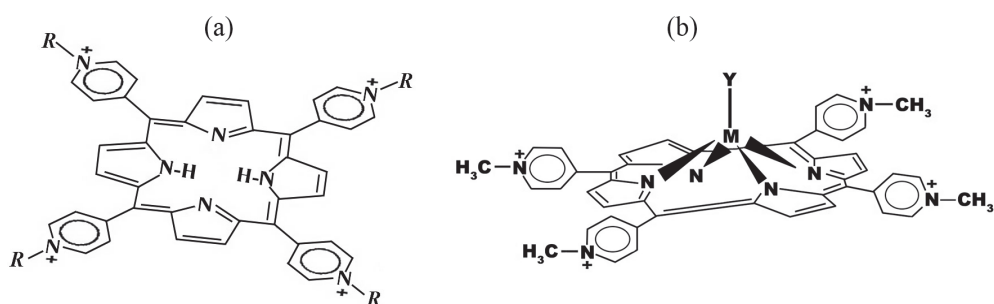


Рис.1. Структуры (а) ТОЕРуР4 и (б) ZnТОЕРуР4, боковые заместители $R = \text{CH}_2\text{--CH}_2\text{--OH}$, центральный металл $M = \text{Zn}$, аксиальный лиганд $Y = \text{H}_2\text{O}$.

2. Материалы и методы исследования

В настоящем исследовании использовалась 22-мерная гуанин-обогащенная регулярная последовательность теломерной ДНК человека d[5'-A(GGGTTA)3GGG-3'] (Tel22G), приобретенная у компании «Integrated DNA Technologies», Inc. (USA).

Использованные в данной работе водорастворимый катионный мезо-тетра-(4N-оксиэтилпиридил) порфирин, ТОЕРуР4, ($M_w = 980$ Да) и его Zn-производное, ZnТОЕРуР4, ($M_w = 1003$ Да) были синтезированы доктором Р. Казаряном в Ереванском государственном медицинском университете по методике, описанной в работе [28].

Эксперименты проводились в 0.1 BPSE буфере (1 BPSE = 10 mM NaH_2PO_4 + 10 mM Na_2HPO_4 + 0.1 mM Na_2EDTA + 0.1 mM NaN_3), *pH* 7.

Концентрация Tel22G определялась спектрофотометрическим измерением поглощения на 260 нм при 80°C с использованием следующего коэффициента экстинкции: $\varepsilon_{260} = 228500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для Tel22G на спектрофотометре UV/Vis Lambda-800 (Perkin Elmer, USA). Конформационные изменения Tel22G изучались методом кругового дихроизма с использованием КД спектрофотометра DSM 20 (Olis, США). Использовались кварцевые кюветы объемом 3 мл и оптическим путем 1 см.

Растворы исходных концентраций Tel22G (3.06×10^{-6} М) и порфиринов (10^{-3} М) готовились за 1 час до эксперимента. Растворы, содержащие порфирины, хранились в темноте во избежание фотохимической модификации порфиринов. Диапазон концентраций порфирина на одну молекулу TelG составляет $0.001 < r < 3.78$, где $r = C_{\text{porph}}/C_{\text{TelG}}$. При расчете параметров связывания порфиринов с G-квадруплексом использовалась модель Скетчарда для случая, когда имеется один независимый тип центра связывания [14].

Уравнение, описывающее изотерму адсорбции, имеет следующий вид:

$$\frac{r_b}{C_{\text{free}}} = K(n - r_b), \quad (1)$$

где K – константа связывания, n – число мест связывания на одной молекуле G-квадруплекса. В уравнении (1) C_{free} – концентрация свободных порфиринов, определяемая из спектров титрования по следующей формуле:

$$C_{\text{free}} = \frac{C_0(A - A_{\text{min}})}{(A_{\text{max}} - A_{\text{min}})}, \quad (2)$$

где C_0 – общая концентрация порфирина в растворе, A_{max} – поглощение при концентрации свободного порфирина, A_{min} – поглощение при концентрации полностью связанного порфирина и A – поглощение при данной концентрации порфирина. r_b – число молекул порфирина, связанных с 1 молекулой G-квадруплекса: $r_b = C_b / C_{\text{TelG}}$, где C_b является концентрацией связанных порфиринов и $C_b = C_0 - C_{\text{free}}$.

Для обработки экспериментальных данных пользовались программой OriginPro9.

3. Результаты и их обсуждение

3.1. Спектры кругового дихроизма

Нашей целью было изучение влияния порфиринов на G-квадруплексную конформацию Tel22G. Наилучшим способом подтверждения формирования G-квадруплексной структуры последовательностью $d[5'-A(GGGTTA)_3GGG-3']$ (Tel22G) является исследование КД-спектров. На рис.2 представлены КД-спектры Tel22G при наличии различных концентраций обоих порфиринов. Кривая 1 на рис.2а,б представляет собой КД-спектр Tel22G без порфирина. Пики КД-спектра Tel22G проявляются при 295 и 265 нм, что позволяет подтвердить наличие «корзинообразной» конформации G-квадруплекса в данных экспериментальных условиях [1–3]. Далее мы пошагово добавляли небольшие количества порфиринов к тому же раствору G-квадруплекса (КД-титрование G-квадруплекса порфиринами). Полученные спектры представлены на рис.2а,б.

Как видно из рис.2, в видимой области КД-спектра, где ДНК прозрачна, добавление порфиринов вызывает появление новой индуцированной полосы (ИКД). Свободные порфирины, будучи планарными симметричными соединениями, не вызывают эффект Коттона, который наблюдается при характерном изменении дисперсии вращения плоскости поляризации света и/или кругового дихроизма вблизи полосы поглощения вещества. Следовательно, асимметричное

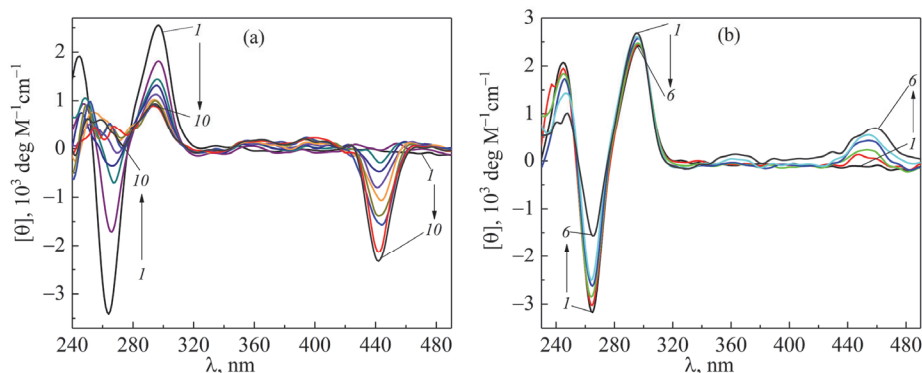


Рис.2. КД-спектры комплексов G-квадруплекса с порфиринами при различных относительных концентрациях порфиринов r на 1 молекулу Tel22G. (a) Для ТОЕРуР4 значения r , соответствующие кривым от 1 до 10, изменяются от 0 до 3.78. (b) Для ZnТОЕРуР4 значения r , соответствующие кривым от 1 до 6, изменяются от 0 до 1.52.

окружение нуклеиновых кислот, с которыми взаимодействуют порфирины, заставляет их складываться асимметрично на ДНК, что индуцирует ИКД-спектр комплекса.

Другими словами, КД-спектр комплекса можно разделить на два диапазона: УФ и видимые (ИКД) спектры. УФ область отражает изменения в структуре G-квадруплекса. Как видно из рис.2, при увеличении r происходит уменьшение характерной для G-квадруплексов полосы θ при 295 нм. Это означает, что увеличение концентрации порфирина приводит к разрушению G-квадруплекса. Особенно сильный эффект наблюдается для планарного безметалльного ТОЕРуР4 (рис.2а).

Для Zn-содержащего ZnТОЕРуР4 эффект гораздо слабее (рис.2b). Это предполагает, что данные порфирины по-разному взаимодействуют с квадруплексом.

Особый интерес представляет видимая часть КД-спектров (ИКД), связанная с порфиринами. Полоса ИКД в области 400–500 нм связана с наиболее интенсивной характеристической полосой поглощения порфиринов (полосой Sore), которая после связывания с ДНК становится оптически активной. На рис.2 показано, что ИКД-спектры комплексов G-квадруплекс-ТОЕРуР4 имеют отрицательный знак и быстро меняются с увеличением концентрации порфирина. Что касается комплексов G-квадруплекс-ZnТОЕРуР4, то ИКД-спектры имеют положительный знак, и их интенсивность незначительно увеличивается с концентрацией ZnТОЕРуР4.

Полученный результат показывает, что механизмы связывания принципиально различны, и это обусловлено структурой порфиринов. Одна из 5 координационных связей атома Zn в ZnТОЕРуР4 выходит из плоскости порфирина и делает невозможным режим интеркаляционного связывания, в отличие от планарного ТОЕРуР4. Это приводит к тому, что ZnТОЕРуР4 может связываться с G-квадруплексом только посредством внешнего связывания. В результате можно предположить, что ТОЕРуР4 связывается путем интеркаляции или внешнего стеккига, в то время как ZnТОЕРуР4 связывается внешне по стерическим причинам. Если бы такие изменения в ИКД-спектре наблюдались в случае двухцепочечной

ДНК, то вывод был бы утвердительным, однако для такого утверждения о квадруплексной структуре необходимы дополнительные исследования.

3.2. УФ/видимая спектрофотометрия

Дополнительную информацию о взаимодействии G-квадруплексов с порфиринами можно получить, изучая зависимость изменения оптической плотности раствора порфирина в полосе Соре при титровании G-квадруплексом. Раствор G-квадруплекса добавлялся к раствору порфирина небольшими порциями и после каждого добавления регистрировался УФ/видимый спектр. Процесс титрования продолжался до тех пор, пока спектры не переставали изменяться (наступало насыщение). На рис.3 показаны спектры поглощения полосы Соре ТОЕРуР4 ($\lambda_{\max} = 422$ нм) и ZnТОЕРуР4 ($\lambda_{\max} = 440$ нм) после добавления определенного количества G-квадруплекса.

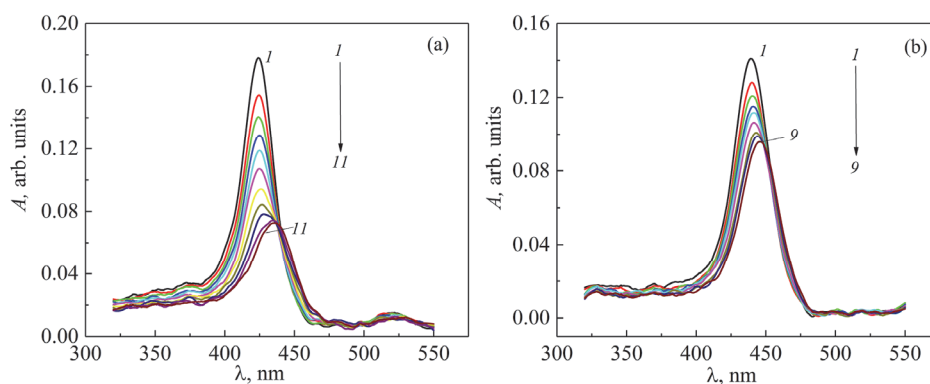


Рис.3. Спектры поглощения порфиринов при их титровании с G-квадруплексами Tel22G. (а) Для ТОЕРуР4 относительная концентрация r , соответствующая кривым от 2 до 10, изменяется от 227.7 до 8.6. (б) Для ZnТОЕРуР4 значения r , соответствующие кривым от 2 до 9, изменяются от 106.2 до 8.8.

В обоих случаях, как видно из спектров поглощения, добавление Tel22G к раствору порфирина приводит к уменьшению максимума поглощения (показано стрелкой) и батохромному сдвигу длины волны максимума полосы Соре. Уменьшение интенсивности поглощения и батохромный сдвиг максимума указывают на образование комплексов G-квадруплекс–порфирин. На основе полученных спектральных данных были построены изотермы связывания порфиринов ТОЕРуР4 и ZnТОЕРуР4 с G-квадруплексом, как зависимость концентрации свободного лиганда (порфирина) $[C_{\text{free}}]$ от относительной концентрации порфирина, связанного с G-квадруплексом $[r_b]$ (рис.4).

Приведенные на рис.4 изотермы связывания ТОЕРуР4 и ZnТОЕРуР4 порфиринов с G-квадруплексом фитированны по формуле (1) [14]. По результатам фитирования были получены параметры связывания: константа связывания K и n – число мест связывания на одной молекуле G-квадруплекса. При связывании ТОЕРуР4 с G-квадруплексом K и n соответственно равны $1.011 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ и 0.92, а в случае ZnТОЕРуР4 – $9.05 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ и 0.83, которые находятся в хорошем согласии с результатами, полученными ранее для других порфиринов [14].

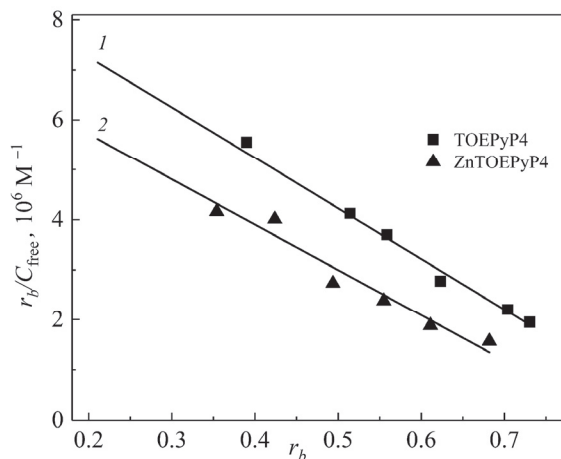


Рис.4. Изотермы связывания ТОЕРуР4(■) и ZnТОЕРуР4 (▲) с G-квадруплексами после фитирования значений, полученных по формуле (1).

Как видно из этих значений, константа связывания ТОЕРуР4 с G-квадруплексом больше, чем в случае ZnТОЕРуР4, а значения чисел мест связывания позволяют сделать вывод о наличии на G-квадруплексе одного места связывания для порфиринов (ТОЕРуР4 или ZnТОЕРуР4). Сравнивая этот результат с полученным методом КД результатом, можно заключить, что ТОЕРуР4 и ZnТОЕРуР4 связываются в различных местах квадруплекса. Этот вывод позволяет предположить (по аналогии со связыванием порфиринов с ДНК [19–23]), что плоский ТОЕРуР4, константа связывания которого выше, связывается параллельно плоскости G-квартетов на внешней поверхности G-квадруплекса (внешний стекинг), а объемный ZnТОЕРуР4 связывается с боковой поверхностью G-квадруплекса в желобке (внешнее желобковое связывание).

4. Заключение

Впервые было исследовано взаимодействие ТОЕРуР4 и ZnТОЕРуР4 порфиринов с G-квадруплексами. Полученные данные указывают на то, что константа связывания ТОЕРуР4 с G-квадруплексом выше, чем у ZnТОЕРуР4, а значения n свидетельствуют о наличии одного места связывания для порфиринов на молекуле G-квадруплекса. Сравнение результатов, полученных методом кругового дихроизма, подтверждает, что ТОЕРуР4 и ZnТОЕРуР4 связываются в различных участках G-квадруплекса. Было выявлено, что ТОЕРуР4, имеющая плоскую структуру и обладающая более высокой константой связывания, связывается параллельно плоскости G-квартетов на внешней поверхности квадруплекса, что соответствует внешнему стекингу. В то же время объемный ZnТОЕРуР4 связывается с боковой поверхностью G-квадруплекса в желобке, реализуя внешнее желобковое связывание. Таким образом, результаты настоящего исследования расширяют понимание механизмов взаимодействия порфиринов с G-квадруплексами и могут быть полезны для разработки и выявления новых молекулярных зондов или терапевтических агентов.

Данная работа была поддержана Комитетом по высшему образованию и науке Министерства образования, науки, культуры и спорта РА в рамках гранта № 21T-1F115

ЛИТЕРАТУРА

1. **Y. Qin, L.H. Hurley.** *Biochimie*, **90**, 1149 (2008).
2. **J.L. Huppert.** *Chem. Soc. Rev.*, **37**, 1375 (2008).
3. **J.L. Huppert.** *FEBS J.*, **277**, 3452 (2010).
4. **N. Sugimoto.** *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.*, **307**, 205 (2014).
5. **A. De Cian, L. Lacroix, C. Douarre, N. Temime-Smaali, C. Trentesaux, J.F. Riou, J.L. Mergny.** *Biochimie*, **90**, 131 (2008).
6. **L.H. Hurley.** *Nat. Rev. Cancer*, **2**, 188 (2002).
7. **L. Oganessian, T.M. Bryan.** *BioEssays*, **29**, 155 (2007).
8. **S. Balasubramanian, L.H. Hurley, S. Neidle.** *Nat. Rev. Drug Discovery*, **10**, 261 (2011).
9. **N. Maizels.** *EMBO Rep.*, **16**, 910 (2015).
10. **T.A. Brooks, S. Kendrick, L. Hurley.** *FEBS J.*, **277**, 3459 (2010).
11. **V. Sanchez-Martin.** *DNA*, **3**, 1 (2023).
12. **G.W. Collie, G.N. Parkinson.** *Chem. Soc. Rev.*, **40**, 5867 (2011).
13. **H. Han, D.R. Langley, A. Rangan, L.H. Hurley.** *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 8902 (2001).
14. **C. Wei, G. Jia, J. Zhou, G. Han, C. Li.** *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **11**, 4025 (2009).
15. **C. Bruckner.** *J. Chem. Educ.*, **81**, 3060 (2004).
16. **D.R. McMillin, K.M. McNett.** *Chem. Rev.*, **98**, 1201 (1998).
17. **C. Wei, G. Jia, J. Yuan, Z. Feng, C. Li.** *Biochemistry*, **45**, 6681 (2006).
18. **L.A. Lipscomb, F.X. Zhou, S.R. Presnell, R.J. Woo, M.E. Peek, R.R. Plaskon, L.D. Williams.** *Biochemistry*, **35**, 2818 (1996).
19. **H. Han, D.R. Langley, A. Rangan, L.H. Hurley.** *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 8902 (2001).
20. **L. Aslanyan, J. Ko, B.G. Kim, I. Vardanyan, Y.B. Dalyan, T.V. Chalikian.** *J. Phys. Chem. B*, **121**, 6511 (2017).
21. **Y.B. Dalyan, L.G. Aslanyan, I.V. Vardanyan.** *Proc. YSU A: Phys. Math. Sci.*, **54**, 115 (2020).
22. **M.K. Badalyan, I.V. Vardanyan, S.G. Haroutiunian, Y.B. Dalyan.** *ACS Omega*, **8**, 47051 (2023).
23. **L. Liu, C. Ma, J.W. Wells, T.V. Chalikian.** *J. Phys. Chem. B*, **124**, 751 (2020).
24. **T.V. Chalikian, L. Liu, R.B. Macgregor Jr.** *Biophys. Chem.*, **267**, 106473 (2020).
25. **R.J. Fiel, J.C. Howard, M.E. Mark, N.D. Gupta.** *Nucl. Acid Res.*, **6**, 3093 (1979).
26. **R.F. Pasternack, E.J. Gibbs.** *Metal Ions Biol. Syst.*, **33**, 367 (1996).
27. **J. Monaselidze, G. Majagaladze, S. Barbakadze, D. Khachidze, M. Gorgoshidze, Y. Kalandadze, S. Haroutiunian, Y. Dalyan, V. Vardanyan.** *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **25**, 410 (2007).

28. В.Н. Мадакян, Р.К. Казарян, М.А. Хачатрян, А.С. Степанян, Т.С. Куртикян, М.Б. Ордян. Химия гетероциклических соединений, 2, 212 (1986).

TOEPYP4 ԵՎ ZnTOEPYP4 ՊՈՐՖԻՐԻՆՆԵՐԻ ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ
G-ՔՈՒԱԴՐՈՒՊԼԵՔՍՆԵՐԻ ՀԵՏ

Ի.Վ. ՎԱՐԴԱՆՅԱՆ, Մ.Խ. ԲԱԴԱԼՅԱՆ, Ծ.Մ. ՋՈՄԱՐԴՅԱՆ,
Ե.Բ. ԴԱԼՅԱՆ, Ս.Գ. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ

Տվյալ աշխատանքում շրջանային դիսքրոիզմի և ՈւՄ/տեսանելի սպեկտրոֆոտոմետրիայի մեթոդների միջոցով ուսումնասիրվել է մարդու տելոմերային ԴՆԹ-ի d[5'-A(GGGTTA)₃GGG-3'] հաջորդականության G-քուադրուպլեքսի կոնֆորմացիայի վրա երկու կատիոնային պորֆիրինների՝ մեզո-տետրա-(4N-օքսիէթիլպիրիդիլ) պորֆիրինի (TOEPyP4) և դրա Zn-պարունակող ածանցյալի (ZnTOEPyP4) ազդեցությունը: Ստացված արդյունքների վերլուծությունը ցույց է տալիս, որ կա միայն մեկ կապման տեղ այս պորֆիրինների համար, սակայն այն տարբերվում է՝ կախված պորֆիրինից: Ենթադրվում է, որ TOEPyP4-ը կապվում է քառյակի հարթությանը զուգահեռ G-քուադրուպլեքսի արտաքին մակերևույթին (արտաքին π - π ստեկինգ), իսկ ZnTOEPyP4-ի կապումը նույնպես տեղի է ունենում արտաքինից, սակայն G-քուադրուպլեքսի կողմնային մակերևույթի ակոսում (ակոսային կապում):

THE INTERACTION OF TOEPyP4 AND ZNTOEPyP4 PORPHYRINS
WITH G-QUADRUPLEXES

I.V. VARDANYAN, M.KH. BADALYAN, TS.M. JOMARDYAN,
Y.B. DALYAN, S.G. HAROUTIUNIAN

In the current work the methods of Circular Dichroism and UV/Vis spectrophotometry were used to study the influence of two cationic porphyrins meso-tetra-(4N-oxyethylpyridyl) porphyrin (TOEPyP4) and its Zn-containing derivative (ZnTOEPyP4) on the G-quadruplex conformation of d[5'-A(GGGTTA)₃GGG-3'] sequence of human telomeric DNA. The analysis of the obtained results indicates that there is a single binding site for these porphyrins, but it differs depending on the porphyrin. It is assumed that TOEPyP4 binds parallel to the quartet plane on the outer surface of the G-quadruplex (external π - π stacking), and the binding of ZnTOEPyP4 also occurs externally, but in the groove of the lateral surface of the G-quadruplex (groove binding).