

## ТЕРМОДИНАМИКА СВЯЗЫВАНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ЛИГАНДОВ НА КРАЙНИХ КВАРТЕТАХ ТЕЛОМЕРНОГО G-КВАДРУПЛЕКСА

© 2016 г. Д.Н. Калюжный, О.К. Мамаева, А.Д. Бениаминов, А.К. Щелкина, М.А. Лившиц

*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32*

*E-mail: uzlhy@mail.ru*

Поступила в редакцию 05.11.15 г.

По эффективности тушения флуорофора, ковалентно присоединенного к 3'- или 5'-концу квадруплекса, определяли константу взаимодействия лиганда в соответствующем месте связывания. Температурная зависимость тушения отражает температурную зависимость константы связывания, которая в свою очередь определяется термодинамическими параметрами образования комплекса ДНК с лигандом. Поскольку тушение флуорофора осуществляет лишь близко расположенный лиганд, метод позволяет охарактеризовать комплексы в разных участках связывания лиганда.

*Ключевые слова: ДНК, G-квадруплекс, тушение флуоресценции.*

Структура G-квадруплекса ДНК, образованного теломерной последовательностью человека (TTAGGG)*n*, высоко полиморфна. В зависимости от фланкирующих нуклеотидов, ионных условий и водного окружения методом ЯМР определены несколько типов внутримолекулярных G-квадруплексных структур. В присутствии катионов натрия последовательность A(GGGTTA)<sub>3</sub>GGG образует антипараллельную структуру типа «корзина» [1]. В условиях пониженной активности воды в присутствии 40% ПЭГ-200 и ионов калия наблюдали образование параллельного квадруплекса с пропеллерными петлями вне зависимости от фланкирующих нуклеотидов [2]. Наибольший интерес представляет структура смешанного типа (рис. 1а), так называемая структура (3+1), в которую складывается ДНК теломерной последовательности человека в ионных условиях, наиболее приближенных к клеточным (100 мМ КСl). Показано, что в водном растворе, содержащем ионы калия, олигонуклеотиды TA(GGGTTA)<sub>3</sub>GGG и TA(GGGTTA)<sub>3</sub>GGGT образуют разные формы структуры смешанного типа (3+1) G-квадруплекса ДНК [3,4].

В последние годы найдены низкомолекулярные лиганды, которые проявляют высокую аффинность и избирательность при связывании с G-квадруплексными структурами [5]. Связывание таких лигандов с теломерной структурой, образованной однонитевым окончанием теломер, должно приводить к подавлению актив-

ности фермента теломеразы, активного в 90% различных типов рака [6]. Актуальным является поиск новых соединений, высокоаффинных и специфичных к G-квадруплексным структурам нуклеиновых кислот.

Для рационального дизайна новых химических соединений необходимо наиболее полное представление о характере взаимодействия известных на сегодняшний день лигандов с G-квадруплексными структурами. Такие соединения способны узнавать разные структурные элементы G-квадруплекса, что обуславливает различную стехиометрию и аффинность их связывания с G-ДНК [5]. Экспериментальные методы определения термодинамических параметров взаимодействия (изотермическая калориметрия титрования, дифференциально-сканирующая калориметрия, спектроскопия УФ-поглощения или кругового дихроизма) обычно требуют больших концентраций лиганда и ДНК [7]. Как следствие, результаты, полученные данными методами, представляют собой суммарную характеристику всех связанных на ДНК молекул лиганда и не дают информации о сродстве лиганда к индивидуальным сайтам связывания ДНК.

Флуоресцентный метод, основанный на направленном введении флуорофоров в G-квадруплексную структуру, является более чувствительным методом термодинамического анализа связывания лиганда с ДНК. Тушение флуоресценции обусловлено взаимодействием лиганда с участком квадруплексной ДНК, расположен-

ным в окрестности введенной флуоресцентной метки. Это позволяет определять сродство лиганда к различным сайтам связывания ДНК. Такой подход был использован в работе [8], в которой авторам удалось сравнить аффинность некоторых лигандов к 5'- и 3'-тетрадам G-квадруплексов.

В данной работе мы исследовали температурную зависимость тушения флуоресцентно-меченных G-квадруплексов низкомолекулярными лигандами. Это позволило определить термодинамические параметры связывания лигандов с крайними G-тетрадами теломерного квадруплекса.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Соединения 5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridinio)porphyrin tetra(p-toluenesulfonate) (TMPyP4) и pyridostatin trifluoroacetate salt (PDS) приобретены в Sigma-Aldrich, США. Олигонуклеотиды TQ-23: d(TA(GGGTTA)<sub>3</sub>GGG), F-TQ23: FAM-d(TA(GGGTTA)<sub>3</sub>GGG) и TQ23-F: d(TA(GGGTTA)<sub>3</sub>GGG)-FAM синтезированы ООО «ДНК Синтез» (Москва, Россия). Исследования проведены в буфере, содержащем 0,1 М KCl и 0,01 М Na-фосфатного буфера, pH 7,8. Квадруплексную структуру олигонуклеотидов получали путем быстрого отжига: раствор олигонуклеотида инкубировали 5 мин при 90°C, переносили на 10 мин в лед, а затем выдерживали 20 мин при комнатной температуре.

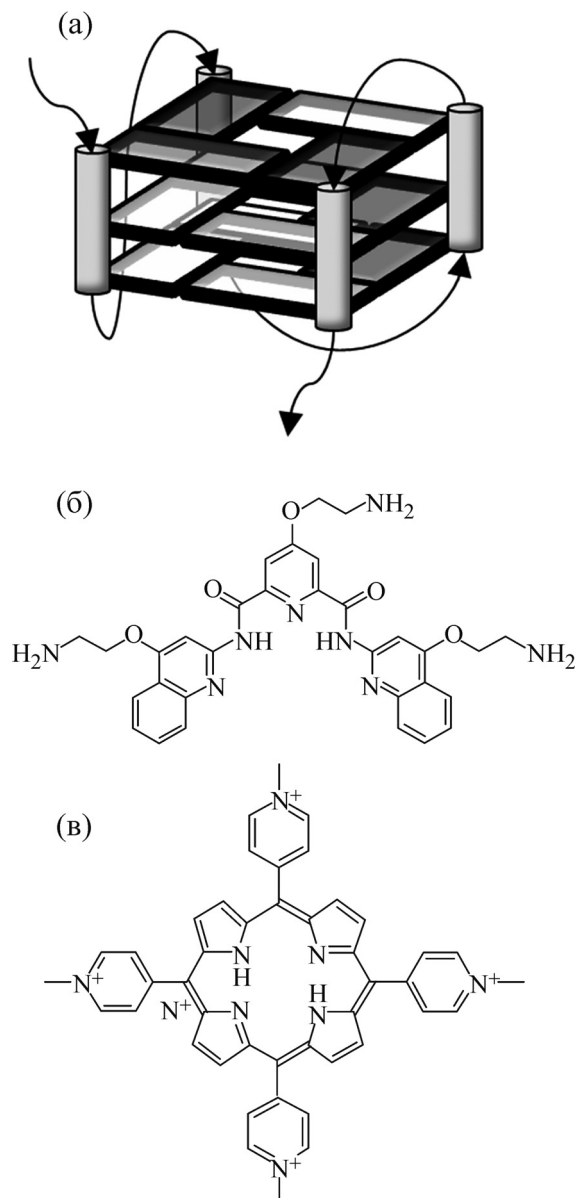
Спектры кругового дихроизма измерены на спектрополяриметре Jasco J715 (Япония) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см при концентрации олигонуклеотидов 1 мкМ. Температуру поддерживали постоянной (20°C) с использованием элемента Пельтье.

Интенсивность флуоресценции 5'-карбоксифлуоресцеина (FAM) была измерена на спектрофлуориметре CaryEclipse (Австралия) в кварцевой кювете объемом 140 мкл на длине волны 515 нм при возбуждении на длине волны 490 нм.

Температурная зависимость интенсивности флуоресценции получена при концентрации 1 нМ олигонуклеотида и 15 нМ лиганда. Температуру варьировали с шагом 1°C, средняя скорость нагрева составляла 0,5°C/мин.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Для данного исследования мы выбрали олигонуклеотид TQ23: TA(GGGTTA)<sub>3</sub>GGG, который образует структуру смешанного (3+1) G-квадруплекса в присутствии ионов калия (рис. 1а) [3]. Положения и интенсивности полос



**Рис. 1.** (а) – Схематическое изображение структуры смешанного типа теломерного квадруплекса. Стрелки указывают 5'→3' направление сахарофосфатного остова. Квадруплекс-специфичные лиганды: (б) – PDS (4-(2-aminoethoxy)-N2,N6-bis[4-(2-aminoethoxy)-2-quinoliny]-2,6-pyridinedicarboxamide); (в) – TMPyP4 (5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridinio)porphyrin).

(положительная на 290 нм и отрицательная на 240 нм) спектра кругового дихроизма являются характерными для G4-структуры в конформации (3+1) (рис. 2). Внесение флуоресцентной метки FAM на 5'- или 3'-конец олигонуклеотида TQ23 (олигонуклеотиды F-TQ23 и TQ23-F соответственно) практически не меняет форму и амплитуду спектров кругового дихроизма, что свидетельствует о сохранении исходной конформации квадруплекса.

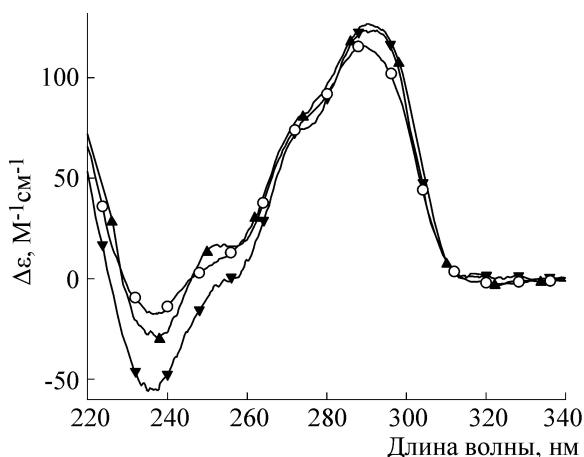
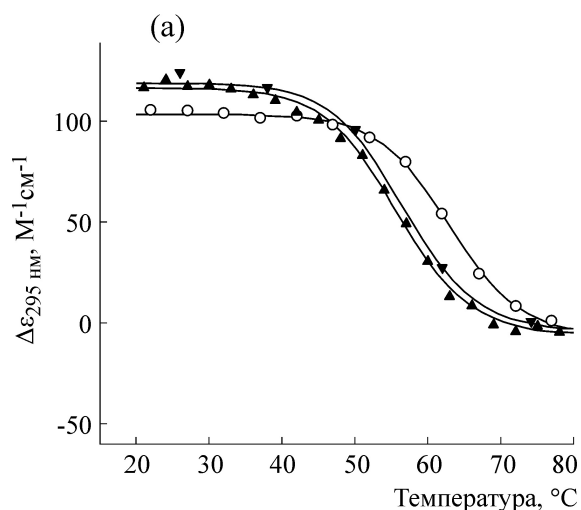


Рис. 2. Спектры кругового дихроизма олигонуклеотидов TQ23 (кружки), F-TQ23 (треугольники) и TQ23-F (обратные треугольники).

### Температурная денатурация квадруплекса.

Ковалентное присоединение к 3'- или 5'-концам олигонуклеотида TQ23 флуоресцентной метки снижает стабильность квадруплексной структуры не больше чем на 10°C (рис. 3а).

Температурные зависимости интенсивности флуоресценции FAM на разных концах олигонуклеотида TQ23 различны (рис. 3б). В олигонуклеотиде F-TQ23 флуорофор расположен на расстоянии двух нуклеотидов от квадруплексного ядра, вследствие этого интенсивность флуоресценции F-TQ23 менее чувствительна к конформационным перестройкам, чем в образце TQ23-F, в котором метка FAM введена на 3'-конце. Однако для обоих образцов изменения интенсивности флуоресценции (на 20% для F-TQ23 и 40% для TQ23-F, рис. 3б) происходят одновременно с плавлением G-квадруплексного



ядра, которое наблюдали по изменению сигнала кругового дихроизма.

**Тушение 5'-карбоксифлуоресцеина, ковалентно присоединенного к концу олигонуклеотида, при связывании квадруплексных лигандов.** На рис. 4 представлены кривые тушения FAM при добавлении лигандов PDS (рис. 4а) и TMRyP4 (рис. 4б). Ввиду того, что лиганды обладают гидрофобной поверхностью, изогеометричной гуаниновым квартетам, предполагается образование комплексов с концевыми квартетами квадруплекса. Можно ожидать, что молекула лиганда, связавшаяся с 3'- или 5'-торцевым квартетом, будет тушить флуоресцеин на 3'-конце (5'-конце) олигонуклеотида по механизму проксимального тушения [8].

На рис. 4 показаны отличия в связывании двух лигандов с (3+1)-теломерным квадруплексом. Так, пиридостатин способен тушить флуоресцентную метку на 3'- и 5'-концах олигонуклеотида с равной эффективностью, что предполагает сходную аффинность этого лиганда к обоим торцевым квартетам (рис. 4а). Напротив, порфирин тушит 5'-концевой FAM при меньших концентрациях, чем 3'-концевой FAM, что означает большее сродство этого лиганда именно к 5'-торцевому квартету квадруплекса (рис. 4б).

Рассмотрим количественную оценку параметров связывания лигандов с квадруплексом. Константу связывания ( $K$ ) в каждом сайте можно определить из уравнения Ленгмюра

$$r = \frac{KC}{1 + KC},$$

где  $r$  – заселенность данного сайта связывания, а  $C$  – концентрация свободного лиганда. При избытке лиганда можно считать, что концен-

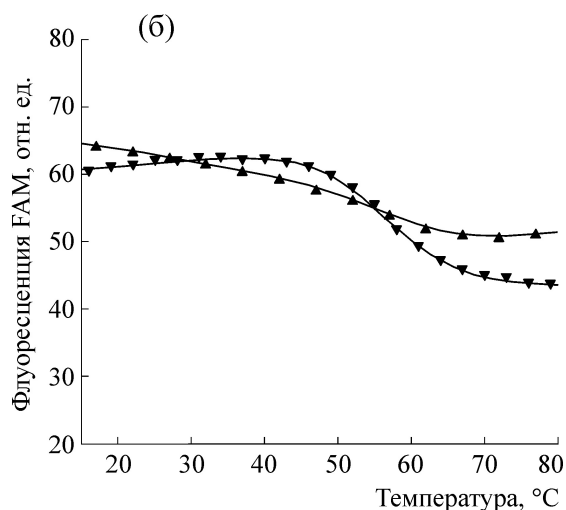
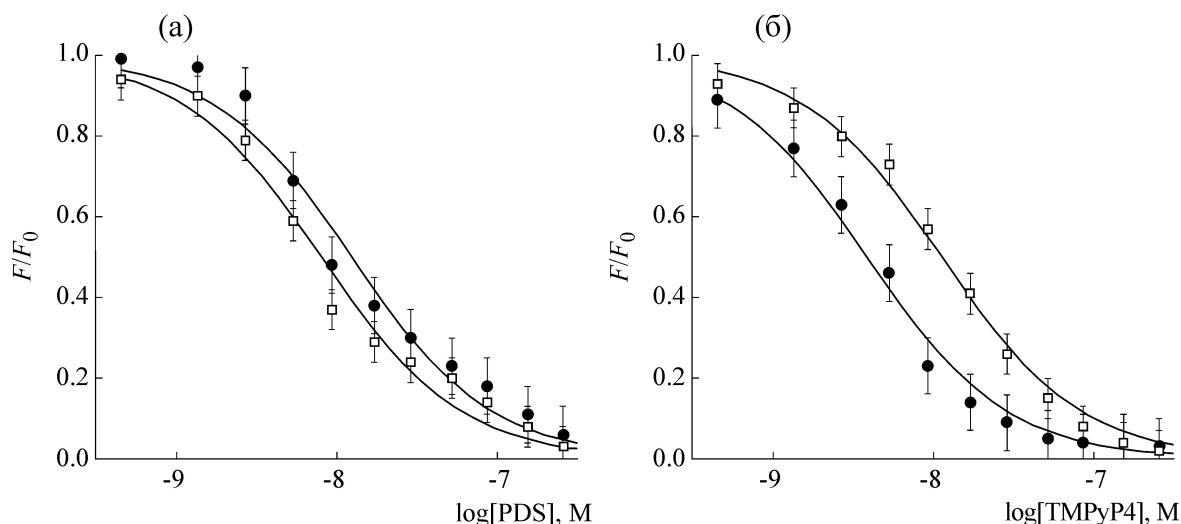


Рис. 3. Температурные зависимости кругового дихроизма на 295 нм (а) и интенсивности флуоресценции (б) олигонуклеотидов TQ23 (кружки), F-TQ23 (треугольники) и TQ23-F (обратные треугольники).

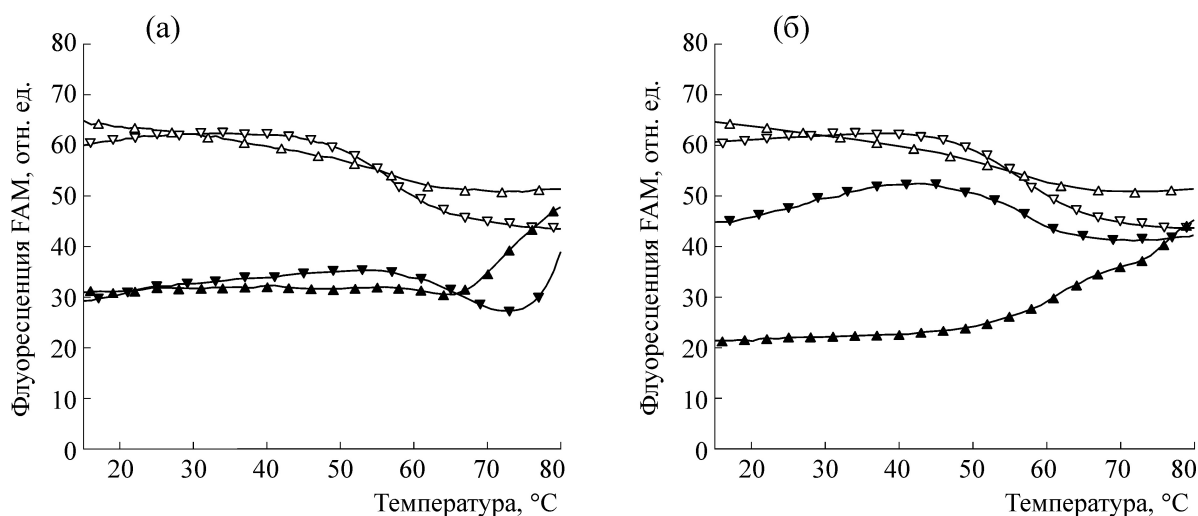


**Рис. 4.** Кривые тушения флуоресценции FAM в зависимости от логарифма концентрации лигандов PDS (а) и TMPyP4 (б) в растворе при температуре 25°C (квадраты – TQ23-F, кружки – F-TQ23).

трация свободного лиганда равна концентрации добавленного. Если предположить, что одной молекулы лиганда достаточно, чтобы потушить расположенную в окрестности данного сайта флуоресцентную метку FAM, то  $r = 1 - F/F_0$ . Здесь  $F$  и  $F_0$  обозначают интенсивности флуоресценции в присутствии лиганда и без него. Полученные экспериментальные зависимости тушения флуоресценции FAM, находящегося на 5'- и 3'-концах теломерного олигонуклеотида, хорошо описываются уравнением Ленгмюра (теоретические кривые – непрерывные линии на рис. 4а и 4б). Такой анализ позволяет оценить константы связывания лигандов, которые при 25°C составляют  $(10 \pm 1) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$  при свя-

зывании PDS в обоих сайтах и  $(25 \pm 1) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$  и  $(8 \pm 1) \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$  для лиганда TMPyP4 при связывании на 5'- и 3'-концах квадруплекса соответственно.

**Температурная зависимость тушения 5'-карбоксифлуоресцеина при постоянной концентрации квадруплексного лиганда.** Рис. 5 демонстрирует температурные зависимости тушения FAM при постоянной концентрации лигандов. При повышении температуры эффективность тушения флуоресценции FAM лигандом уменьшается. Константу ассоциации при каждой температуре и постоянной концентрации лиганда  $C$  находили по экспериментальным данным тушения флуоресценции следующим образом:



**Рис. 5.** Температурные зависимости тушения флуоресценции FAM свободных олигонуклеотидов F-TQ23 (светлые треугольники), TQ23-F (светлые обратные треугольники) и в присутствии 15 нМ лигандов PDS (а) и TMPyP4 (б) в растворе (темные треугольники).

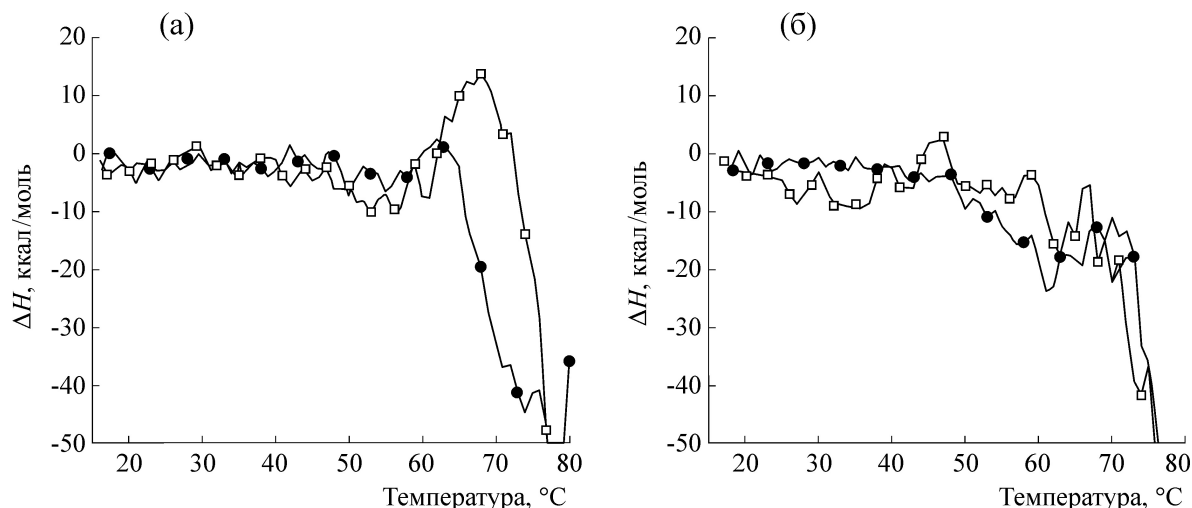


Рис. 6. Температурные зависимости энтальпии взаимодействия лигандов PDS (а) и TMPyP4 (б) вблизи 3'-крайних квартетов (квадраты) и 5'-крайних квартетов (кружки).

$$K = r/(1-r) = \frac{F_0}{F} - 1 \cdot C$$

Связь константы ассоциации и термодинамических параметров взаимодействия описывается уравнениями Вант-Гоффа:

$$-RT \ln K = \Delta G = \Delta H - T\Delta S;$$

$$\Delta H = RT^2 \frac{\partial \ln K}{\partial T}, \Delta S = R \ln K + \frac{\Delta H}{T}.$$

Энтальпию и энтропию связывания рассматривали как переменные параметры, зависящие от температуры. При расчете энтальпии производную логарифма константы ассоциации усредняли на интервале  $\Delta T = 3^\circ\text{C}$  для каждой температуры.

Найденные термодинамические параметры комплексообразования практически постоянны до температуры  $40^\circ\text{C}$ , т.е. до начала плавления квадруплексной структуры (рис. 6). При дальнейшем увеличении температуры происходит плавление структуры квадруплекса, что иска-

жает сайты связывания лиганда и приводит к значительным изменениям найденных термодинамических параметров. Определен температурный интервал, на котором найденные термодинамические параметры постоянны, следовательно, их можно рассматривать как энтальпию и энтропию связывания. Значения усредненных термодинамических параметров для температурного интервала  $20\text{--}40^\circ\text{C}$  приведены в таблице.

Взаимодействие PDS с обоими торцевыми квартетами и TMPyP4 с 5'-торцевым квартетом носит энтропийный характер, что связано со стекнинг-взаимодействиями лигандов с квартетами. При этом связывание порфирина с 5'-квартетом прочнее, чем с 3'. Связывание порфирина вблизи 3'-торца происходит с меньшим сродством, большей энтальпией и меньшей энтропией образования комплекса и, возможно, является следствием взаимодействия лиганда с ближайшими нуклеотидами петель квадруплекса.

Итак, использование флуоресцирующей метки, ковалентно присоединенной к 3'- или

Термодинамические параметры образования комплексов PDS и TMPyP4 с теломерным квадруплексом вблизи крайних квартетов

	PDS		TMPyP4	
	5'	3'	5'	3'
$\Delta H$ , ккал/моль	$-1,7 \pm 0,9$	$-2,0 \pm 0,8$	$-1,6 \pm 0,4$	$-5,6 \pm 2,6$
$\Delta S$ , кал/(моль·К)	$30 \pm 3$	$30 \pm 3$	$32 \pm 1$	$15 \pm 8$
$\Delta G^{25^\circ\text{C}}$ , ккал/моль	$-10,8$	$-10,8$	$-11,2$	$-10,0$
$K_D^{25^\circ\text{C}}$ , нМ	13	12	6	48

5'-концам мономолекулярного квадруплекса, позволяет определять термодинамические параметры взаимодействия этого квадруплекса с лигандами благодаря тушению метки, находящейся в окрестности сайта связывания лиганда. При этом рассматриваются места связывания вблизи каждого из терминальных квартетов, оценивается константа, энтальпия и энтропия образования каждого комплекса. Величины энтальпии и энтропии комплексообразования, в частности, проливают свет на тип связывания лиганда с квадруплексом, а именно, происходит ли стекнинг лиганда с торцевым гуаниновым квартетом или преимущественно происходит образование связей с петлями квадруплекса.

Авторы благодарят А. Варижук за ценные обсуждения и помощь в работе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 15-04-01748) и Програм-

мы РАН «Молекулярная и клеточная биология».

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Y. Wang and D. J. Patel, *Structure* **1** (4), 263 (1993).
2. B. Heddi and A. T. Phan, *J. Am. Chem. Soc.* **133** (25), 9824 (2011).
3. K. N. Luu, A. T. Phan, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **128** (30), 9963 (2006).
4. A. T. Phan, K. N. Luu, et al., *Nucl. Acids Res.* **34** (19), 5715 (2006).
5. N. S. Ilyinsky, A. Varizhuk, et al., *Mol. Biol.* **48** (6), 778 (2014).
6. J. W. Shay and S. Bacchetti, *Eur. J. Cancer* **33** (5), 787 (1997).
7. E. Bereznyak, N. Gladkovskaya, et al., *AIMS Biophysics* **2** (2377–9098), 423 (2015).
8. D. D. Le, M. Di Antonio, et al., *Chemical Communications* **51** (38), 8048 (2015).

## Thermodynamics for Binding of Low Molecular Weight Ligands in the Extreme Quartets of Telomeric G-Quadruplex

D.N. Kaluzhny, O.K. Mamaeva, A.D. Beniaminov, A.K. Shchyolkina, and M.A. Livshits

*Engelhard Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia*

Ligand binding constants at 3' and 5' ends of the telomeric G-quadruplex structure were determined by quenching a fluorophore covalently attached to the oligonucleotide ends. The temperature dependence of the fluorescence quenching reflects the temperature dependence of the binding constants, which is in turn determined by the thermodynamic parameters of the DNA-ligand complex formation. Since only proximal ligand is able to quench the fluorescence, this method provides the possibility to characterize complexes in different sites of the ligand binding.

*Key words: DNA, G-quadruplex, fluorescence quenching*