

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ
БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.113.7:615.277.3

КОМПЛЕКСЫ АНТИПАРАЛЛЕЛЬНОГО ТЕЛОМЕРНОГО
G-КВАДРУПЛЕКСА d(TTAGGG)₄ С КАРБОКСИМЕТИЛЬНЫМИ
ТЕТРАКАТИОННЫМИ ПОРФИРИНАМИ© 2013 г. О. А. Ковалева^{1,2}, А. К. Щелкина¹, О. К. Мамаева¹, В. А. Ольшевская³,
А. В. Макаренков³, А. С. Семейкин⁴, А. А. Штиль⁵, О. Ф. Борисова¹, Д. Н. Калужный^{1*}¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991²Московский физико-технический институт (ГУ), Долгопрудный, 141700³Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук, Москва, 119991⁴Ивановский государственный химико-технологический университет, Иваново, 153460⁵Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина Российской академии медицинских наук, Москва, 115478

Поступила в редакцию 17.12.2012 г.

Принята к печати 14.01.2013 г.

Порфирины и их производные – класс соединений, важный для создания лекарственных препаратов. Одной из мишеней катионных порфиринов являются G-квадруплексные структуры ДНК. Цель исследования – выявить роль отдельных химических групп порфиринового макроцикла в комплексообразовании с G-квадруплексами. Изучены комплексы порфириновых производных, отличающихся периферическими заместителями: 5,10,15,20-тетракис(N-карбоксиметил-4-пиридиний)порфирин (P1) и 5,10,15,20-тетракис(N-этоксикарбонилметил-4-пиридиний)порфирин (P2) с антипараллельным G-квадруплексом теломерной ДНК человека, образованным из d(TTAGGG)₄ последовательности (TelQ). Константы K_i и число мест связывания N_i определены из изотерм адсорбции, построенных с использованием спектров поглощения комплексов порфиринов P1 и P2 с TelQ. Обнаружено высокое сродство молекул P1 к структуре антипараллельного теломерного квадруплекса ($K_1 = (40 \pm 6) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $N_1 = 1$; $K_2 = (5.4 \pm 0.4) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $N_2 = 2$). Константы связывания P2 с TelQ ($K_1 = (3.1 \pm 0.2) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $N_1 = 1$; $K_2 = (1.2 \pm 0.2) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $N_2 = 2$) оказались на порядок ниже, чем у комплексов P1 с TelQ. Таким образом, наличие карбоксильных групп на периферии макроцикла у порфирина P1 обуславливает высокое сродство к антипараллельному квадруплексу TelQ. На основании анализа данных о квантовом выходе и длительности флуоресценции комплексов охарактеризованы два типа мест связывания порфиринов P1 и P2 с TelQ. Установлено, что сильный тип комплекса определяется взаимодействием с ТТА-петлями, более слабый – с G-квартетами. Изменения конформации TelQ, регистрируемые по спектрам КД при адсорбции молекул P1, можно объяснить разрушением одного G-квартета в комплексе TelQ : P1.

Ключевые слова: ДНК, G-квадруплекс, порфирины, круговой дихроизм, флуоресценция.

COMPLEXES OF ANTIPARALLEL TELOMERIC G-QUADRUPLEX d(TTAGGG)₄ WITH CARBOXY-METHYL TETRACATIONIC PORPHYRINS, by O. A. Kovaleva^{1,2}, A. K. Shchyolkina¹, O. K. Mamaeva¹, V. A. Ol'shevskaya³, A. V. Makarenkov³, A. S. Semeikin⁴, A. A. Shitil⁵, O. F. Borisova¹, D. N. Kaluzhny^{1*} (¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 119991 Russia; *e-mail: uzhny@mail.ru; ²Moscow Institute of Physics and Technology (State University), 141700 Russia; ³Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, Russian Academy of Sciences, 119991 Russia; ⁴Ivanovo State University of Chemistry and Technology, 153460 Russia; ⁵Blokhin Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, 115478 Russia). Porphyrins comprise a chemical class widely used in drug design. Cationic porphyrins may bind to DNA guanine quadruplexes. We report the parameters of binding of 5,10,15,20-tetrakis(N-carboxymethyl-4-pyridinium)porphyrin (P1) and 5,10,15,20-tetrakis(N-ethoxycarbonylmethyl-4-pyridinium)porphyrin (P2) to antiparallel telomeric G-quadruplex formed by d(TTAGGG)₄ sequence (TelQ). The binding constants (K_i) and the number of binding sites (N_i) were determined from absorption isotherms generated from absorption spectra of complexes of P1 and P2 with TelQ. Compound P1 demonstrated a high affinity to TelQ ($K_1 = (40 \pm 6) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $N_1 = 1$; $K_2 = (5.4 \pm 0.4) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $N_2 = 2$). In contrast, the binding constants of P2–TelQ complexes ($K_1 = (3.1 \pm 0.2) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $N_1 = 1$; $K_2 = (1.2 \pm 0.2) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $N_2 = 2$) were one order of magnitude smaller than the respective values for P2–TelQ complexes. Measurements of quantum yield and fluorescence lifetime of drug–TelQ complexes revealed two types of binding

*Эл. почта: uzhny@mail.ru

sites for P1 and P2 on the quadruplex oligonucleotide. The 'strong' complexes can result from interaction of the porphyrins with TTA loops whereas the weaker complexes are formed with G-quartets. The altered TelQ conformation detected by circular dichroism spectra of P1–TelQ complexes can be explained by a disruption of a G-quartet. We conclude that peripheral carboxy groups contribute to the high affinity of P1 for the antiparallel telomeric G-quadruplex.

Keywords: DNA, G-quadruplex, porphyrins, fluorescence, circular dichroism.

DOI: 10.7868/S0026898413030051

ВВЕДЕНИЕ

Одноцепочечный 3'-конец теломерной ДНК человека может сворачиваться в G-квадруплексную структуру [1], что способствует подавлению активности теломеразы и снижению пролиферативного потенциала опухолевых клеток [2]. Чтобы эффективно ингибировать теломеразу G-квадруплексными структурами важно найти низкомолекулярные лиганды, избирательно связывающиеся с G-квадруплексами и стабилизирующие их структуру [2, 3]. Созданы новые производные порфиринов с высоким сродством к ДНК, которые являются прототипами противоопухолевых лекарств [3–5].

Порфирины и их производные находят широкое применение в фотодинамической терапии опухолей [5, 6]. Соединения этого обширного химического класса обладают антибактериальными и противовирусными свойствами [7]. Изучены комплексы катионных порфиринов с G-квадруплексными структурами, образованными теломерной последовательностью, а также с нуклеотидными последовательностями промоторов генов [3, 8]. Химические группы на периферии тетрапиррольного макроцикла, а также присутствие центрального иона металла существенно влияют на тип связывания этих лигандов с G-квадруплексами [8–10]. Ключевое значение во взаимодействии этих лигандов с ДНК и G-квадруплексами имеет локализация положительного заряда на периферии макроцикла. Так, тетраакционные *пара*-замещенные пиридиновые производные проявляют наибольшее сродство к G-квадруплексам по сравнению с *мета*- и *орто*-замещенными метилпиридиновыми порфиринами [10–13]. Известны комплексы катионного пиридиниевого производного порфирина с метильным заместителем при положительно заряженном атоме азота пиридиниевого кольца (ТМРуп4) с G-квадруплексами [3, 11, 12, 14].

Синтезированы новые соединения с различными заместителями на периферии катионного порфирина [15–18] с целью усиления биологической активности, в частности, взаимодействия с ДНК. Введение карбоксиметильных и этоксикарбонилметильных заместителей на периферию тетрапиррольного макроцикла повышает растворимость в воде за счет относительно большого объема заместителей и уменьшения энергии

образования кристаллического состояния вещества [17]. Мы показали, что 5,10,15,20-тетраакс(N-карбоксиметил-4-пиридиний)порфирин (P1) обладает повышенной аффинностью к GC-участкам двойной спирали ДНК, а 5,10,15,20-тетраакс(N-этоксикарбонилметил-4-пиридиний)порфирин (P2) адсорбируется на GC-богатых участках ДНК с константой на порядок ниже [19].

Учитывая хорошую водорастворимость P1 и P2 и повышенное сродство P1 к гуанин-богатым участкам ДНК, в данной работе впервые исследованы комплексы этих порфиринов с антипараллельным G-квадруплексом теломерной ДНК человека d(TTAGGG)₄ (TelQ).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. В экспериментах использовали олигонуклеотид d(TTAGGG)₄, синтезированный фирмой “Синтол”, Россия. Синтез 5,10,15,20-тетраакс(N-карбоксиметил-4-пиридиний)порфирина (P1) и 5,10,15,20-тетраакс(N-этоксикарбонилметил-4-пиридиний)порфирина (P2) (рис. 1) описан в работе [17]. Все измерения проведены в растворе, содержащем 100 мМ NaCl и 10 мМ фосфатного буфера, pH 7.8. Концентрацию олигонуклеотида в растворе определяли спектрофотометрически по поглощению на длине волны 260 нм при 90°C в воде, принимая коэффициент молярной экстинкции TelQ: $\epsilon[d(TTAGGG)_4] = 231\,000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Исходные растворы P1 и P2 (10⁻⁴ М) приготовлены растворением сухих соединений в воде.

Квадруплексная структура из олигонуклеотида d(TTAGGG)₄ получена быстрым отжигом: нагревали буферный раствор с олигонуклеотидом до 90°C, выдерживали 5 мин, затем помещали в лед на 10 мин и выдерживали при комнатной температуре 30 мин. Концентрация олигонуклеотида при отжиге не превышала 10 мкМ нитей. В условиях эксперимента обнаружено образование внутримолекулярной структуры антипараллельного G-квадруплекса, что подтверждено спектральными параметрами ДНК (характерный спектр кругового дихроизма, отрицательные изменения в полосе поглощения 295 нм при плавлении структуры [10, 20–23]).

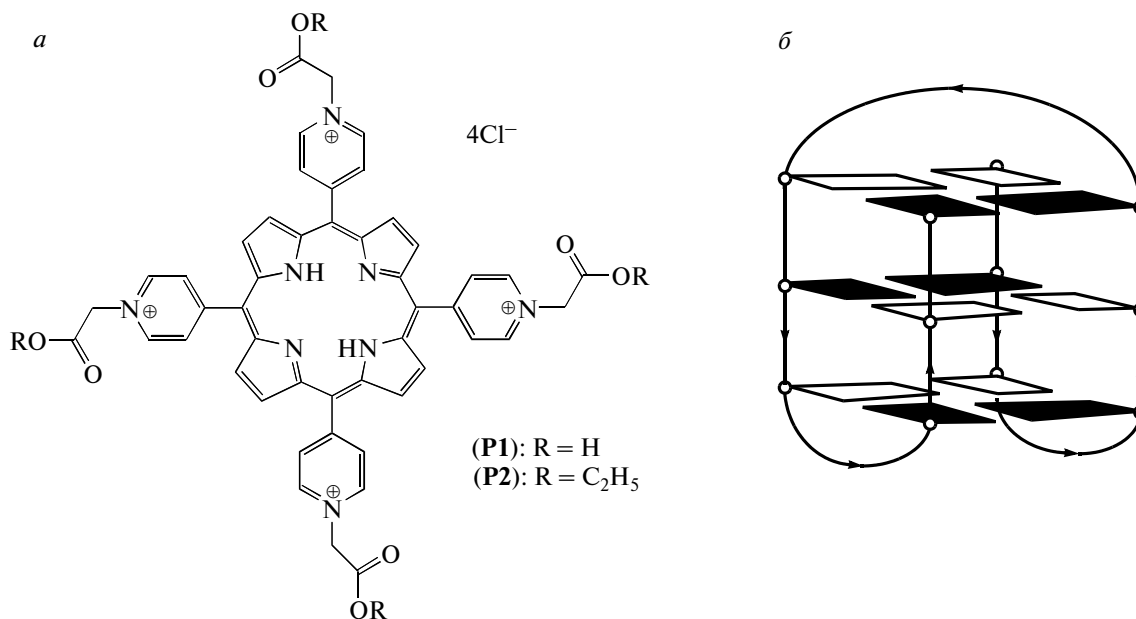


Рис. 1. *a* – Структура производных 5,10,15,20-тетракис(N-карбоксиметил-4-пиридиний) порфирина (P1) и 5,10,15,20-тетракис(N-этоксикарбонилметил-4-пиридиний) порфирина (P2). *б* – Схема антипараллельного теломерного G-квадруплекса, образованного олигонуклеотидом d(TTAGGG)₄ (TelQ). Гуанины в *syn*- и *anti*-конформациях обозначены черными и белыми прямоугольниками соответственно. Диагональная TTA-петля находится сверху гуанинового ядра, две латеральные петли – снизу [24].

Методы. Спектры поглощения комплексов TelQ с порфиринами P1 и P2 регистрировали на спектрофотометре Jasco V-550 в диапазоне длин волн 350–500 нм. Кривые плавления квадруплексной структуры регистрировали по изменению поглощения на длине волны 295 нм в зависимости от температуры. Спектры флуоресценции получены на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian). Флуоресценцию регистрировали в диапазоне $600 \leq \lambda \leq 800$ нм при возбуждении длиной волны $\lambda = 435$ нм (изобестическая точка). Кривые затухания флуоресценции P1 и P2 и их комплексов с TelQ измерены на тауметре OBV EasyLife VTM при возбуждении импульсным светодиодом ($\lambda = 435$ нм). Флуоресценцию детектировали с использованием фильтра, пропускающего свет длиной волны более 590 нм. Измерения проведены при температуре 20–22°C. Времена жизни гетерогенной флуоресценции τ_i и их концентрационный вклад a_i рассчитаны с помощью программы FelixGX. Спектры кругового дихроизма получены на спектрополяриметре JascoV-750 в термостатируемой кювете при температуре 20°C.

Относительный квантовый выход флуоресценции исследуемых образцов q_i рассчитывали с использованием спектров флуоресценции и поглощения [25]. Площадь под кривой спектра флуоресценции нормировали на единицу поглощенного кванта.

Изотермы адсорбции порфиринов P1 и P2 на TelQ построены с использованием спектров поглощения лигандов на длине волны $\lambda = 422$ и 415 нм при повышении концентрации TelQ. Учитывали изменение концентрации лиганда при разбавлении. Концентрацию адсорбированного лиганда C_b определяли по формуле:

$$C_b = \frac{\varepsilon - \varepsilon_f}{\varepsilon_b - \varepsilon_f} \times C_0, \quad (1)$$

где C_0 – общая концентрация лиганда в растворе, ε , ε_f и ε_b – коэффициенты молярных экстинкций исследуемого соединения, полностью свободного лиганда и полностью связанного на TelQ лиганда соответственно. Среднее заполнение

$r = \frac{C_b}{C_{DNA}}$ рассчитано на концентрацию TelQ-квадруплексов. Концентрацию свободного соединения C_f определяли по формуле $C_f = C_0 - C_b$. Константы связывания определяли аппроксимацией экспериментальной изотермы, построенной в координатах Скэтчарда, уравнением, описывающим модель независимых мест связывания лиганда на G-квадруплексе:

$$r = \sum_{i=1}^n \frac{N_i K_i C_f}{1 + K_i C_f}, \quad (2)$$

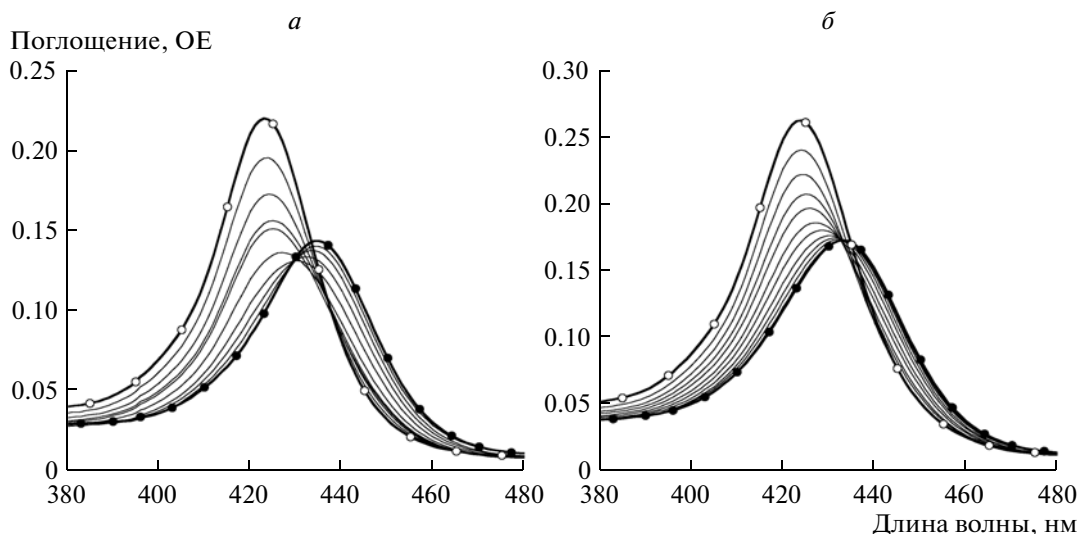


Рис. 2. Спектры поглощения порфиринов P1 (а) и P2 (б) при взаимодействии с G-квадруплексом TelQ. Спектры свободных порфиринов обозначены белыми, а полностью связанных – черными кружками. Концентрации порфиринов P1 и P2 – 1 мкМ, олигонуклеотида TelQ 0–3.4 мкМ.

где K_i – константы связывания, N_i – число мест связывания с i -ой константой на одной молекуле квадруплекса, n – количество типов комплексов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Спектры поглощения комплексов порфиринов P1 и P2 с квадруплексом TelQ

Адсорбцию производных порфиринов P1 и P2 на антипараллельном квадруплексе TelQ изучали спектрофотометрически. На рис. 2 представлены изменения спектров поглощения порфиринов P1 и P2 в полосе Core, $380 \leq \lambda \leq 480$ нм, при титровании олигонуклеотидом TelQ. Спектры поглощения свободных молекул P1 и P2 характеризуются максимумом поглощения на длине волны $\lambda = 422$ нм. По мере увеличения концентрации TelQ в растворе происходит смещение спектров поглощения порфиринов P1 и P2 в длинноволновую область (батохромный сдвиг), а также снижение интенсивности полосы поглощения в максимуме (гипохромный эффект), что отражает адсорбцию лигандов на ДНК.

Величины батохромного сдвига в спектрах поглощения P1 и P2 составляют 15 и 13 нм соответственно. Гипохромный эффект для обоих соединений на длине волны 422 нм примерно одинаков (~50%). Наблюдаемые изменения в спектрах поглощения P1 и P2 характерны для комплексов катионных порфиринов с G-квадруплексами ДНК.

Изотермы адсорбции порфиринов P1 и P2 на квадруплексе TelQ

Чтобы определить термодинамические параметры и стехиометрию связывания молекул P1 и P2 с антипараллельным теломерным квадруплексом TelQ, построены изотермы адсорбции этих лигандов (рис. 3). Концентрацию связанного C_b и свободного C_f лиганда определяли по уравнению (1), используя спектры поглощения, представленные на рис. 2. Изотермы адсорбции строили в координатах Скэтчарда, как зависимость r/C_f от r , где r – среднее количество адсорбированных молекул лиганда, приходящееся на олигонуклеотид TelQ, а C_f – концентрация свободного лиганда в растворе.

Изотермы адсорбции P1 и P2, приведенные на рис. 3, характеризуют связывание трех молекул лиганда с TelQ. Взаимодействие порфиринов с G-квадруплексной структурой ДНК можно описать моделью независимой посадки нескольких молекул лиганда. Аппроксимация экспериментальных данных уравнением (2) для двух типов комплексов с числом независимых мест связывания $N_1 = 1$ и $N_2 = 2$ позволила определить соответствующие константы связывания соединений P1 и P2 с TelQ (табл. 1).

Анализ изотерм адсорбции P1 и P2 на TelQ-квадруплексе позволяет сделать следующие выводы: 1) наличие у соединения P1 карбоксильных групп обуславливает высокое сродство трех молекул лиганда к TelQ; 2) молекулы P2, имеющие объемные заместители в боковых группах, проигрывают в аффинности и адсорбируются на TelQ с константами на порядок ниже, чем P1.

Сравнение констант связывания P1 и P2 на TelQ с константами, рассчитанными ранее для тимусной ДНК ($K = 3.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ для P1 и $K = 0.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ для P2 [19]), показывает, что P1 и P2 имеют более высокое сродство к G-квадруплексной структуре, чем к двойной спирали ДНК.

Спектры флуоресценции, квантовый выход и кинетика затухания флуоресценции комплексов порфиринов P1 и P2 с TelQ-квадруплексом

Природа гетерогенных мест связывания порфиринов P1 и P2 на антипараллельном TelQ-квадруплексе изучена по флуоресценции комплексов. Ранее мы установили, что квантовый выход q и длительность флуоресценции τ адсорбированных молекул P1 и P2 существенно зависят от нуклеотидного состава ДНК [19]. Взаимодействие P1 и P2 с участками ДНК, содержащими АТ-пары, приводило к двукратному возрастанию квантового выхода и длительности флуоресценции этих порфиринов. Взаимодействие P1 и P2 с GC-парами ДНК сопровождалось сильным тушением флуоресценции и сокращением длительности флуоресценции в 7 раз [19]. Аналогичные различия в квантовом выходе и длительности флуоресценции комплексов порфирина TMRyP4 с ДНК разного нуклеотидного состава наблюдались в ряде работ [26–28]. Установлено, что тушителем флуоресценции TMRyP4 вследствие образования комплекса с переносом заряда является гуанин [26, 29, 30]. Можно ожидать, что взаимодействие порфиринов с TTA-петлями квадруплекса будет приводить к возрастанию квантового выхода и длительности флуоресценции. Связывание с G-квартетами будет приводить к тушению флуоресценции комплексов.

Спектры флуоресценции. Спектры флуоресценции свободных молекул порфиринов P1 и P2 и их комплексов с антипараллельным TelQ-квадруплексом представлены на рис. 4а. Спектры регистрировали в условиях малого заполнения ($r \sim 1$), когда молекулы исследуемых порфиринов практически полностью связаны с TelQ.

На рис. 4 показано, что спектры флуоресценции свободных и связанных с TelQ порфиринов P1 и P2 различаются. У адсорбированных молекул возрастает интенсивность флуоресценции в полосах с максимумами 660 и 720 нм. Появление более выраженных полос флуоресценции можно объяснить ограничением колебательных степеней свободы молекул порфиринов при взаимодействии с TelQ. Следует отметить, что наблюдаемые изменения в спектрах флуоресценции подобны полученным ранее для комплексов P1 и P2 с АТ-дуплексом ДНК [19]. На основании данных о спектрах флуоресценции можно предполагать, что адсорбция молекул P1 и P2 при малом заполнении ($r \leq 1$) происходит в основном на TTA-петлях квадруплекса.

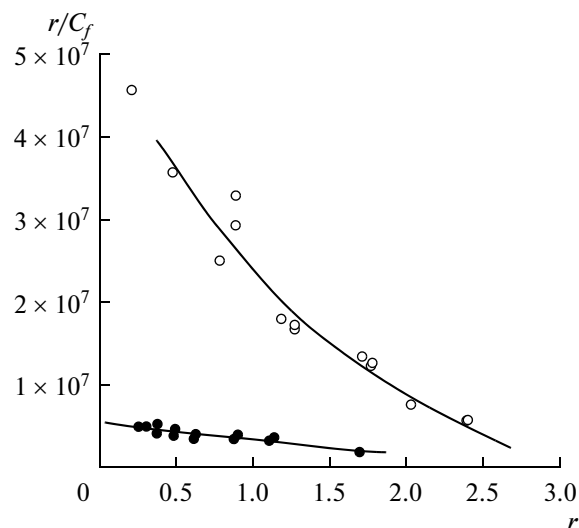


Рис. 3. Изотермы адсорбции порфиринов P1 и P2 (белые и черные кружки соответственно) на TelQ в координатах Скэтчарда. Концентрации связанного и свободного лиганда рассчитаны по уравнению (1) с использованием значений поглощения на длинах волн 415 и 420 нм. Аппроксимация экспериментальных точек уравнением (2) показана непрерывной кривой, параметры K_i и N_i приведены в табл. 1.

Полученные данные согласуются с локализацией порфирина TMRyP4 в петлях теломерного квадруплекса, которую наблюдали при изучении комплексов методом рентгеноструктурного анализа [8].

Квантовый выход флуоресценции. Абсолютные квантовые выходы флуоресценции q_0 свободных молекул порфиринов P1 и P2 рассчитаны ранее ($q_0 = 0.0093$ для P1 и $q_0 = 0.0086$ для P2) [19]. Квантовые выходы флуоресценции комплексов порфиринов P1 и P2 с TelQ рассчитывали относительно q_0 свободного лиганда, используя площади под спектрами флуоресценции (рис. 4), нормированными на единицу поглощенного кванта. Численные значения относительных выходов флуоресценции комплексов этих лигандов q/q_0 приведены в табл. 2. Видно, что при связывании P1 и P2 с антипараллельным TelQ квадруплексом ($r = 1$) квантовый выход флуоресценции комплексов этих порфиринов возрастает в 1.4 раза по сравнению со свободным лигандом. При увеличении концентрации адсорбированных порфиринов ($r \sim 2$) квантовый выход уменьшался до величин

Таблица 1. Параметры комплексообразования P1 и P2 с TelQ

Порфирины	$K_1, 10^6 \text{ M}^{-1}$	N_1	$K_2, 10^6 \text{ M}^{-1}$	N_2
P1	40 ± 6	1.0	5.4 ± 0.4	2.0
P2	3.1 ± 0.2	1.0	1.2 ± 0.2	2.0

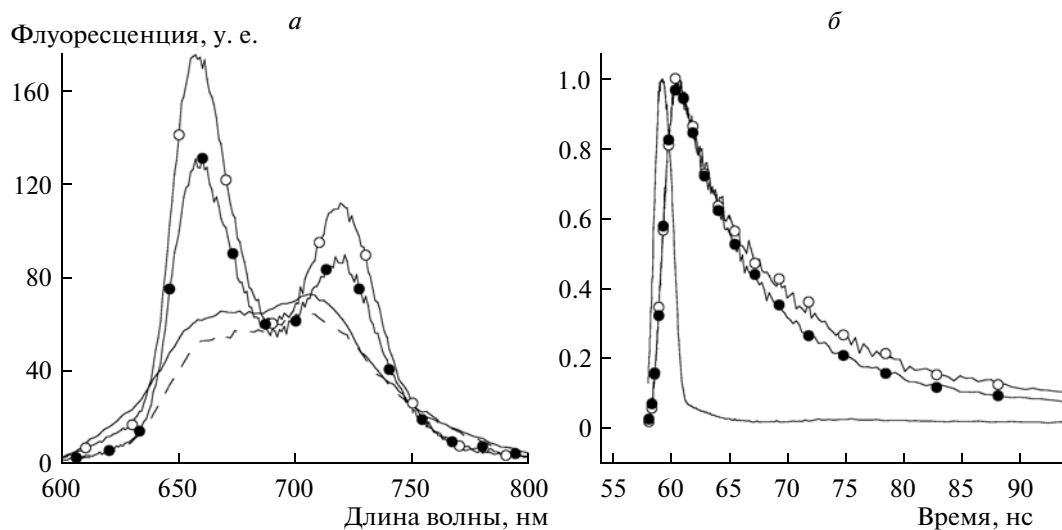


Рис. 4. *а* – Спектры флуоресценции свободного (непрерывная кривая P1, пунктир P2) и адсорбированного на TelQ-квадруплексе порфиринов P1 и P2 (белые и черные кружки соответственно). *б* – Кривые затухания флуоресценции порфиринов P1 и P2 (белые и черные кружки соответственно) в комплексе с TelQ; непрерывная кривая – кривая отклика системы (IRF). Интенсивности флуоресценции в максимуме кривых затухания приняты за единицу. Длина волны возбуждения – 435 нм. Концентрации TelQ, P1 и P2 – 1 мкМ.

ны, сравнимой с квантовым выходом свободного лиганда ($q/q_0 = 0.97$).

Наблюдаемое возрастание квантового выхода флуоресценции подтверждает наше предположение, что при малом заполнении ($r \leq 1$) образуются в основном комплексы на ТГА-петлях TelQ-квадруплекса.

Кинетика затухания флуоресценции комплексов. Чтобы объяснить природу тушения порфиринов в комплексе с TelQ, изучали кинетику затухания флуоресценции комплексов P1 и P2 с TelQ. На рис. 4*б* приведены кривые затухания флуоресценции порфиринов P1 и P2 в комплексе с TelQ при заполнении $r = 1$. Видно, что кривые затухания флуоресценции комплексов P1 и P2 слабо различаются. Кинетика затухания этих кривых хорошо описывается биэкспоненциальным уравнением (см. табл. 2). Следует отметить, что кинетику затухания флуоресценции свободных молекул P1 и P2 в том же буферном растворе можно описать моноэкспоненциальным законом затухания ($\tau = 4.8$ нс для P1 и $\tau = 4.6$ нс для P2) [19].

В табл. 2 приведены рассчитанные времена затухания флуоресценции долгоживущих (τ_1) и короткоживущих (τ_2) комплексов порфиринов P1 и P2 с TelQ: $\tau_1 = 8.0 \pm 0.1$ нс и 6.6 ± 0.1 нс, соответственно; $\tau_2 = 0.9 \pm 0.1$ нс. Доля молекул P1 и P2 с коротким временем жизни τ_2 составляет $\sim 30\%$. При повышении концентрации адсорбированного лиганда вплоть до $r \sim 2$ кинетика затухания флуоресценции несколько изменялась. Наблюдали увеличение доли короткоживущей фракции как P1, так и P2 до $\sim 50\%$ (см. табл. 2). Данные о времени затухания флуоресценции комплексов порфиринов P1 и P2 с TelQ квадруплексом указывают на наличие двух типов мест связывания в диапазоне заполнения $0 < r \leq 3$ (табл. 2). Ранее нами измерены времена затухания комплексов P1 и P2 с AT- и GC-дуплексами ДНК [19]: $\tau(\text{AT}) = 10.0 \pm 0.2$ нс и $\tau(\text{GC}) = 0.7 \pm 0.2$ нс для P1; $\tau(\text{AT}) = 8.6 \pm 0.1$ нс и $\tau(\text{GC}) = 0.8 \pm 0.2$ нс для P2. Сопоставление этих данных с τ_1 и τ_2 комплексов P1 и P2 с TelQ позволяет утверждать, что молекулы P1 и P2 в интервале заполнений $0 < r \leq 1$ связаны в основ-

Таблица 2. Квантовый выход и длительность флуоресценции комплексов P1 и P2 с TelQ

Порфирины	τ_1 , нс	a_1 , %	τ_2 , нс	a_2 , %	q/q_0
P1 ($r = 1$)	8.0 ± 0.1	68 ± 2	0.9 ± 0.1	32 ± 5	1.4
P1 ($r = 2.5$)	7.2 ± 0.6	45 ± 15	1.0 ± 0.1	55 ± 15	0.97
P2 ($r = 1$)	6.6 ± 0.1	77 ± 8	0.9 ± 0.1	23 ± 5	1.4
P2 ($r = 2.2$)	6.2 ± 0.1	50 ± 10	1.1 ± 0.1	50 ± 20	0.97

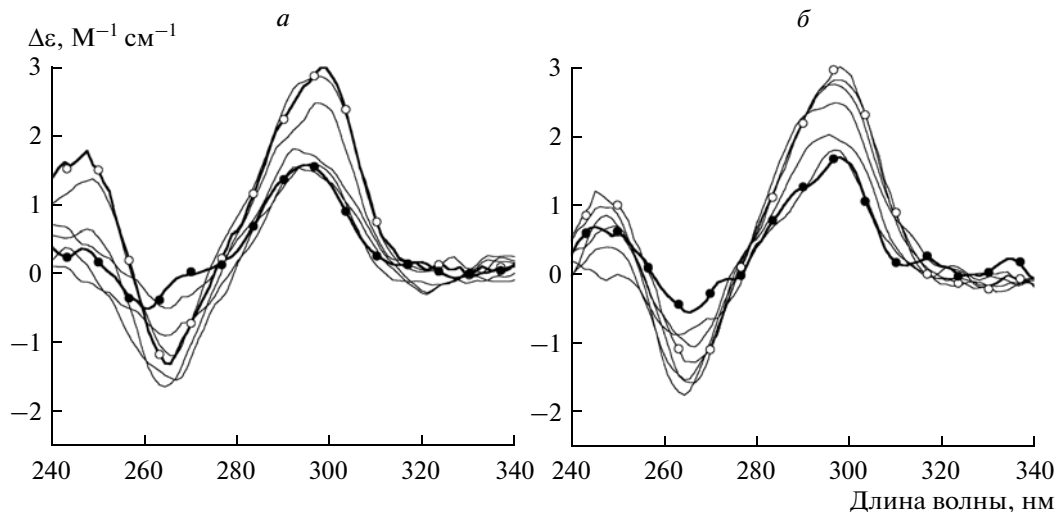


Рис. 5. Круговой дихроизм квадруплекса TelQ в Na^+ -буфере и при добавлении P1 (а) и P2 (б). Концентрации P1 и P2 от 0 (белые кружки) до 9 мкМ (черные кружки), а TelQ – 0.8 мкМ и 0.9 мкМ соответственно.

ном с петлями ТТА, а при $r > 1$ – с G-квартетами. Как видно в табл. 2, при низком заполнении ($r \leq 1$) преобладают места связывания с ТТА-петлями (70–80%), при высоком заполнении ($r \sim 2$) половина адсорбированных молекул связана с G-квартетами. Эти данные согласуются с изотермами адсорбции для двух типов комплексов. Таким образом, уточнена природа двух типов комплексов производных порфирина P1 и P2 с антипараллельным теломерным квадруплексом: первый сильный тип комплексов P1 и P2 можно отнести к связыванию на ТТА-петлях с образованием долгоживущей флуоресцирующей компоненты; второй, более слабый комплекс – к связыванию с G-квартетами (потушенный комплекс).

Спектры кругового дихроизма TelQ квадруплекса в комплексе с порфиринами P1 и P2

Изменения конформации TelQ-квадруплекса, вызываемые адсорбцией порфиринов, изучали по спектрам кругового дихроизма (КД) в УФ-области. Спектр КД молекул TelQ (рис. 5) соответствует вторичной структуре, образованной сворачиванием олигонуклеотида $d(\text{TTAGGG})_4$ в антипараллельный G-квадруплекс [21, 24]. Спектр КД такой структуры характеризуется положительной полосой с максимумом 295 нм и отрицательной с минимумом 265 нм. Данная форма спектра, главным образом, обусловлена *syn-anti*-стекинг-контактом гуанинов в квартетах [22].

При увеличении концентрации порфиринов в растворе обнаружено изменение спектров КД олигонуклеотида TelQ (рис. 5). Изменения спектров КД квадруплекса при адсорбции P1 и P2 схожи, что может свидетельствовать об образовании одинаковых типов комплексов лигандами P1 и P2.

При низком заполнении ($r < 1$) изменения в спектрах КД незначительны. Однако при дальнейшем увеличении концентрации порфиринов интенсивности положительной полосы с максимумом 295 нм и отрицательной – 265 нм существенно уменьшаются, что характеризует ослабление или частичное разрушение стекинг-взаимодействий гуанинов. Отсюда следует, что при низком заполнении взаимодействие порфиринов не нарушает структуру квартетного ядра G-квадруплекса и подтверждает, что взаимодействие происходит с ТТА-петлями (см. выше). Участок латеральных петель наиболее богат нуклеотидами А и Т, и связывание порфиринов в этой области ограничивает контакт лиганда с гуанинами. Таким образом, можно предположить, что сайт наиболее сильного связывания флуоресцирующей молекулы расположен на латеральных ТТА-петлях (рис. 1).

Изменения в спектре КД при более высоком заполнении можно интерпретировать как значительное уменьшение стекинг-взаимодействия гуаниновых квартетов и, возможно, частичное разрушение G-квартетов. Наблюдаемое двухкратное уменьшение интенсивности полосы на длине волны 295 нм ($r \sim 3$) может свидетельствовать о разрушении одного из двух крайних квартетов в структуре TelQ, поскольку потеря лишь одного квартета вдвое уменьшает число стекинг-контактов между квартетами (с двух контактов до одного).

Наиболее вероятный сайт связывания лиганда в стекинге с гуаниновым квартетом – квартет вблизи диагональной петли [31]. При разрушении молекулами P1 и P2 контактирующего G-квартета длина диагональной ТТА-петли может возрасти за счет присоединения двух крайних гуанинов – GTTAG. Возможность существования стабильного

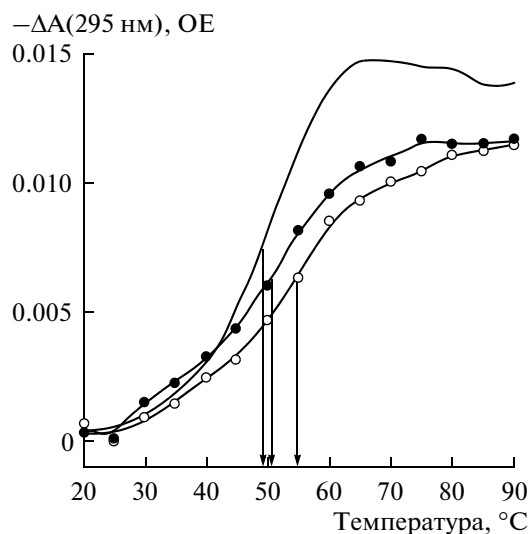


Рис. 6. Кривые температурного плавления антипараллельного TelQ (непрерывная кривая) в комплексе с двумя молекулами P1 и P2 (белые и черные кружки соответственно).

антипараллельного TelQ с двумя квартетами установлена в калийном буфере для олигонуклеотида $d(\text{GGGTTA})_3\text{GGG}$ методом ЯМР [32]. При этом диагональную петлю удлиняли от трех нуклеотидов ТТА до пяти GTTAG. Кроме того, известно, что сродство порфирина ТМРyP4 существенно зависит от длины петель квадруплексной структуры — наиболее выгодна длина в 5 н. [33].

Термическое плавление комплексов квадруплекса TelQ с порфиринами P1 и P2

На рис. 6 приведены кривые термического плавления антипараллельного TelQ в свободном состоянии и в комплексе с молекулами P1 и P2. Изменения в поглощении TelQ при повышении температуры раствора регистрировали при длине волны 295 нм (поглощение G-квартетов) [20]. Температура плавления $T_{\text{пл}}$ (температура полуперехода квадруплекс–расплавленная нить) отмечена вертикальными линиями. Величина $T_{\text{пл}}$ для свободного квадруплекса равна 49°C. При адсорбции в среднем двух молекул порфирина P1 температура плавления квадруплекса увеличивается на 6°C ($T_{\text{пл}} = 55^\circ\text{C}$) и мало изменяется при адсорбции двух молекул P2 ($T_{\text{пл}} = 51^\circ\text{C}$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оптическими методами изучено влияние карбоксильного и этоксикарбонильного заместителей катионных порфиринов P1 и P2 на взаимодействие с антипараллельным теломерным G-квадруплексом. Выделены и охарактеризованы два типа

мест связывания: первый — на ТТА-петлях, второй — на G-квартетах. Константа связывания порфирина P1 с антипараллельным TelQ на порядок выше таковой для P2.

Более низкая константа ассоциации P2 позволяет предположить, что инертная OS_2H_5 -группа при положительно заряженном атоме азота в пиридиновом кольце P2 препятствуют сильному связыванию молекул P2 с боковыми ТТА-петлями и G-квартетами антипараллельного TelQ. Изменения структуры квадруплекса при взаимодействии с P1 и P2 интерпретированы как разрушение одного крайнего G-квартета. При этом термостабильность квадруплекса в комплексе не уменьшалась. Количественные параметры комплексообразования производных порфиринов с теломерным G-квадруплексом следует принимать во внимание при рациональном дизайне лекарств, мишень которых — сложные структуры ДНК.

Авторы благодарны М.А. Лившицу за обсуждение результатов.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (12-04-00929).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Neidle S., Parkinson G.N. 2003. The structure of telomeric DNA. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**(3), 275–283.
2. Han H., Hurley L.H. 2000. G-quadruplex DNA: a potential target for anti-cancer drug design. *Trends Pharmacol. Sci.* **21**(4), 136–142.
3. Kerwin S.M. 2000. G-Quadruplex DNA as a target for drug design. *Curr. Pharm. Design.* **6**(4), 441–471.
4. Luo Y., Chang C.K., Kessel D. 1996. Rapid initiation of apoptosis by photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **63**(4), 528–534.
5. Shieh Y.-A., Yang S.-J., Wei M.-F., Shieh M.-J. 2010. Aptamer-based tumor-targeted drug delivery for photodynamic therapy. *ACS Nano.* **4**(3), 1433–1442.
6. Lang K., Mosinger J., Wagnerová D.M. 2004. Photochemical properties of porphyrinoid sensitizers non-covalently bound to host molecules; models for photodynamic therapy. *Coord. Chem. Rev.* **248**(3–4), 321–350.
7. Ding L., Balzarini J., Schols D., Meunier B., De Clercq E. 1992. Anti-human immunodeficiency virus effects of cationic metalloporphyrin-ellipticine complexes. *Biochem. Pharmacol.* **44**(8), 1675–1679.
8. Parkinson G.N., Ghosh R., Neidle S. 2007. Structural basis for binding of porphyrin to human telomeres. *Biochemistry.* **46**(9), 2390–2397.
9. Seenisamy J., Bashyam S., Gokhale V., Vankayalapati H., Sun D., Siddiqui-Jain A., Streiner N., Shin-ya K., White E., Wilson W.D., Hurley L.H. 2005. Design and synthesis of an expanded porphyrin that has selectivity for the c-MYC G-quadruplex structure. *J. Am. Chem. Soc.* **127**(9), 2944–2959.
10. Дутикова Ю.В., Борисова О.Ф., Щелкина А.К., Lin J., Huang S., Штиль А.А., Калужный Д.Н. 2010. 5,10,15,20-Тетра-(N-метил-3-пиридил)порфирин

- дестабилизирует антипараллельный теломерный квадруплекс D(TTAGGG)₄. *Молекуляр. биология.* **44**(5), 929–937.
11. Kruk N.N., Dzhagarov B.M., Galievsky V.A., Chirvony V.S., Turpin Y. 1998. Photophysics of the cationic 5,10,15,20-tetrakis(4-N-methylpyridyl)porphyrin bound to DNA, [poly(dA-dT)]₂ and [poly(dG-dC)]₂: interaction with molecular oxygen studied by porphyrin triplet-triplet absorption and singlet oxygen luminescence. *J. Photochem. Photobiol. B.* **42**(3), 181–190.
 12. Tjahjono D.H., Mima S., Akutsu T., Yoshioka N., Inoue H. 2001. Interaction of metallopyrazoliumporphyrins with calf thymus DNA. *J. Inorg. Biochem.* **85**(2–3), 219–228.
 13. Yamashita T., Uno T., Ishikawa Y. 2005. Stabilization of guanine quadruplex DNA by the binding of porphyrins with cationic side arms. *Bioorg. Med. Chem.* **13**(7), 2423–2430.
 14. De Cian A., Guittat L., Shin-ya K., Riou J.-F., Mergny J.-L. 2005. Affinity and selectivity of G4 ligands measured by FRET. *Nucl. Acids Symp. Ser. (Oxf).* **49**(1), 235–236.
 15. Mezö G., Herényi L., Habdas J., Majer Z., Myśliwa-Kurdziel B., Tóth K., Csík G. 2011. Syntheses and DNA binding of new cationic porphyrin-tetrapeptide conjugates. *Biophys. Chem.* **155**(1), 36–44.
 16. Xu H.J., Stefan L., Haudecoeur R., Vuong S., Richard P., Denat F., Barbe J.M., Gros C.P., Monchaud D. 2012. Porphyrin-templated synthetic G-quartet (PorphySQ): a second prototype of G-quartet-based G-quadruplex ligand. *Org. Biomol. Chem.* **10**, 5212–5218.
 17. Березин М.Б., Березина Н.М., Семейкии А.С., Вьюгина А.И. 2007. Термохимия растворения некоторых N-производных тетра(4-пиридил)порфирина в воде. *Журнал общей химии.* **77**(11), 1905–1908.
 18. Garcia G., Sarrazy V., Sol V., Morvan C.L., Granet R., Alves S., Krausz. 2009. DNA photocleavage by porphyrin-polyamine conjugates. *Bioorg. Med. Chem.* **17**(2), 767–776.
 19. Kovaleva O., Tsvetkov V., Shchyolkina A., Borisova O., Ol'shevskaya V., Makarenkov A., Semeikin A., Shtil A., Kaluzhny D. 2012. The role of carboxymethyl substituents in the interaction of tetracationic porphyrins with DNA. *Eur. Biophys. J.* **41**(9), 723–732.
 20. Mergny J.L., Lacroix L. 2009. UV Melting of G-Quadruplexes. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **17**, Unit 17.1.
 21. Gray R.D., Chaires J.B. 2008. Kinetics and mechanism of K⁺- and Na⁺-induced folding of models of human telomeric DNA into G-quadruplex structures. *Nucl. Acids Res.* **36**(12), 4191–4203.
 22. Gray D.M., Wen J.-D., Gray C.W., Repges R., Repges C., Raabe G., Fleischhauer J. 2008. Measured and calculated CD spectra of G-quartets stacked with the same or opposite polarities. *Chirality.* **20**(3–4), 431–440.
 23. Бессчетнова И.А., Позмогова Г.Е., Чувилин А.Н., Щелкина А.К., Борисова О.Ф. 2006. Комплексы теломерных олигонуклеотидов d(TTAGGG)₄ с новым рекомбинантным белковым вектором PGEk – переносчиком нуклеиновых кислот в пролиферирующие клетки. *Молекуляр. биология.* **40**(3), 489–496.
 24. Patel D.J., Phan A.T., Kuryavvi V. 2007. Human telomere, oncogenic promoter and 5'-UTR G-quadruplexes: diverse higher order DNA and RNA targets for cancer therapeutics. *Nucl. Acids Res.* **35**(22), 7429–7455.
 25. Borisova O.F., Golova Yu.B., Gottikh B., Zibrov A.S., Il'icheva I.A., Lysov Yu., Mamayeva O.K., Chernov B.K., Chernyi A.A., Shchyolkina A.K. 1991. Parallel double stranded helices and the tertiary structure of nucleic acids. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **8**(6), 1187–1210.
 26. Chirvony V.S., Galievskiy V.A., Kruk N.N., Dzhagarov B.M., Turpin Y. 1997. Photophysics of cationic 5,10,15,20-tetrakis-(4-N-methylpyridyl)porphyrin bound to DNA, [poly(dA-dT)]₂ and [poly(dG-dC)]₂: on a possible charge transfer process between guanine and porphyrin in its excited singlet state. *J. Photochem. Photobiol. B.* **40**(2), 154–162.
 27. Jasuja R., Jameson D.M., Nishijo C.K., Larsen R.W. 1997. Singlet excited state dynamics of tetrakis(4-N-methylpyridyl)porphine associated with DNA nucleotides. *J. Phys. Chem. B.* **101**(8), 1444–1450.
 28. Sazanovich I.V., Petrov E., Chirvony V.S. 2006. Interaction of cationic 5,10,15,20-tetrakis(4-N-methylpyridyl) porphyrin with mono- and polynucleotides: A study by picosecond fluorescence spectroscopy. *Optics Spectroscopy.* **100**(2), 209–218.
 29. Zozulya V., Ryazanova O., Voloshin I., Glamazda A., Karachevtsev V. 2010. Spectroscopic detection of tetracationic porphyrin H-aggregation on polyanionic matrix of inorganic polyphosphate. *J. Fluoresc.* **20**(3), 695–702.
 30. Borisova O.F., Potapov A., Surovaya A.N., Trubitsyn S.N., Volkenstein M.V. 1972. The dependence of fluorescence quantum yield of the tRNA-acriflavine complexes on the conformational changes in tRNA. *FEBS Lett.* **27**(1), 167–170.
 31. Kaluzhny D., Ilyinsky N., Shchekotikhin A., Sinkevich Y., Tsvetkov V., Tsvetkov V., Veselovsky A., Livshits M., Borisova O., Shtil A., Shchyolkina A. 2011. Disordering of human telomeric G-quadruplex with novel antiproliferative anthrathiophenedione. *PLoS ONE.* **6**(11), e27151.
 32. Zhang Z., Dai J., Veliath E., Jones R.A., Yang D. 2010. Structure of a two-G-tetrad intramolecular G-quadruplex formed by a variant human telomeric sequence in K⁺ solution: insights into the interconversion of human telomeric G-quadruplex structures. *Nucl. Acids Res.* **38**(3), 1009–1021.
 33. Arora A., Maiti S. 2009. Stability and molecular recognition of quadruplexes with different loop length in the absence and presence of molecular crowding agents. *J. Phys. Chem. B.* **113**(25), 8784–8792.