

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ  
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ՉԻԼԻՆԳԱՐՅԱՆ ԳԱՐԲԻ ՎԱՉԱԳԱՆԻ

ՑԱԾՐԱՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ՈՐՈՇ ՄԻԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ  
ԹԵԼՈՄԵՐԱՅԻՆ G-ՔՎԱԴՐՈՒՊԼԵՔՍԱՅԻՆ ԴՆԹ-Ի ՀԵՏ

Գ.00.02 – Կենսաֆիզիկա, կենսաինֆորմատիկա մասնագիտությամբ  
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի  
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՄԵՂՍԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2020

---

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РА  
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ЧИЛИНГАРЯН ГАРРИ ВАЧАГАНОВИЧ

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НЕКОТОРЫХ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ С  
ТЕЛОМЕРНОЙ G-КВАДРУПЛЕКСНОЙ ДНК

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук по специальности  
03.00.02 – Биофизика, биоинформатика

ЕРЕВАН – 2020

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում

Գիտական ղեկավար՝ կեն. գիտ. թեկնածու, դոցենտ  
Ա.Ա. Հովհաննիսյան


Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆ. Պ. Հ. Վարդևանյան  
կենս. գիտ. թեկնածու Գ.Գ. Առաքելով

Առաջատար կազմակերպություն՝ ՀՀ ԳԱԱ Միջազգային գիտակրթական կենտրոն

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2020թ. հուլիսի 21-ին ժամը 12<sup>00</sup>-ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲՈՒԿ-ի Կենսաֆիզիկայի 051 մասնագիտական խորհրդի նիստում (0025, Երևան, Ալեք Մանուկյան փ. 1, ԵՊՀ, կենսաբանության ֆակուլտետ):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ Երևանի պետական համալսարանի գրադարանում:

Ատենախոսության սեղմագիրն առաքված է 2020թ. հունիսի 9-ին:

051 Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,  
կենս. գիտ. թեկնածու, դոցենտ  Մ.Ա. Փարսադանյան

---

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете  
Научный руководитель: канд. биол. наук, доцент

А.А. Оганесян

Официальные оппоненты: доктор биол. наук, проф. П.О. Вардеванян  
канд. биол. наук Г.Г. Аракелов

Ведущая организация: Международный научно-образовательный центр НАН РА

Защита диссертации состоится 21-го июля 2020г. в 12.00 часов на заседании Специализированного совета 051 по Биофизике ВАК РА при Ереванском государственном университете (0025, Ереван, ул. Алека Манукяна 1, ЕГУ, биологический факультет).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Ереванского государственного университета.

Автореферат диссертации разослан 9-го июня 2020г.

Ученый секретарь Специализированного совета 051,  
кандидат биол. наук, доцент



М.А. Парсаданян

Актуальность работы. Структура и стабильность теломерного участка ДНК тесно связана с молекулярными механизмами старения [Opresko et al., 2017], стабильностью генома человека [Matthew et al. 2012; Blackburn et al., 2015], онкологическими заболеваниями [Neidle & Parkinson 2002; Jafri et al., 2016; Spiegel et al. 2020] и т.д. 3'-концы теломерных участков хромосом представляют собой одноцепочечную tandemную последовательность богатую гуанинами [Moyazis et al., 1988; Wright et al., 1997]. В *in vitro* и *in vivo* экспериментах было продемонстрировано что G-квадруплексные структуры, формирующиеся на этих концах, нарушают молекулярный механизм функционирования теломеразы в раковых клетках, что приводит к антипролиферативному эффекту [De Cian et al., 2008; Rodriguez et al., 2012; Ohnmacht et al., 2015]. Также было продемонстрировано, что формирование большого количества квадруплексных структур на одноцепочечном конце теломер приводит к активации молекулярных механизмов ответа на ДНК повреждения, что приводит к селективному ингибированию клеточного роста [Gomez et al., 2006; Chen et al., 2015]. Взаимодействие G-квадруплексных структур с низкомолекулярными лигандами приводит к ингибированию клеточного роста и пролиферации клеток в *in vivo* и *in vitro* моделях онкологических процессов [Johnson et al., 2000; Mulholland et al., 2017]. Соединения, специфически связывающие G-квадруплексные ДНК, нарушают молекулярный механизм функционирования белка теломеразы и тем самым приводят к сильному антипролиферативному эффекту [Rhodes & Lipps, 2015]. Таким образом G-квадруплексные структуры формирующиеся на одноцепочечном конце теломер рассматриваются в качестве альтернативной молекулярной мишени в современной терапии онкологических заболеваний. Одной из актуальных задач биомедицины является поиск низкомолекулярных лигандов селективно связывающихся и стабилизирующих теломерные G-квадруплексные структуры [Neidle 2009; Antonyan et al., 2015; Hänsel-Hertsch 2017; Spiegel et al., 2020].

Исследования, направленные на поиск низкомолекулярных лигандов, связывающихся с G-квадруплексными структурами, за последнее десятилетие продвинулись незначительно. Большое количество низкомолекулярных соединений связываются с квадруплексными структурами посредством интеркаляции [Vardevanyan et al., 2014]. Всего несколько соединений достигли стадии клинических испытаний FDA (Food & Drug Administration) США [Drygin et al., 2009; Miyazaki et al., 2012; Read et al., 2001]. Обнаруженные соединения обладают рядом недостатков, таких как высокая цитотоксичность, низкая селективность, слабая проницаемость для клеточной мембраны, небольшое терапевтическое окно и т.п.

Существует ряд причин, затрудняющих исследования в области поиска и дизайна новых низкомолекулярных лигандов стабилизирующих теломерные G-квадруплексные ДНК:

- Ограниченность традиционных биофизических методов для исследования G-квадруплексных структур. Спектроскопические методы низкого разрешения (циркулярный дихроизм, ультрафиолетовая спектроскопия) неэффективны при определении специфических особенностей различных G-квадруплексных структур [Dailey et al., 2010]. Структурные методы высокого разрешения (ЯМР спектроскопия, кристаллография) тоже предоставляют ограниченную информацию при исследовании структурного полиморфизма G-ДНК [Hänsel et al., 2011]. Это приводит к отсутствию доступных данных высокого разрешения о различных структурных топологиях теломерной G-квадруплексной ДНК.

- Низкая избирательность низкомолекулярных лигандов к теломерной G-ДНК: для разрешения прохождения соединения на стадию клинических испытаний FDA США необходима селективность как минимум в десять тысяч раз [Dixon, et al., 2007] в сравнении с двуцепочечной ДНК.
- В физиологических условиях теломерная G-квадруплексная ДНК существует в виде большого ансамбля различных структурных топологий находящихся в динамическом равновесии, что сильно затрудняет поиск и дизайн связывающих их низкомолекулярных лигандов [Parkinson et al., 2002; Bessi et al., 2017; Dalyan et al., 2017; Aslanyan et al., 2015].

Дизайн и синтез новых низкомолекулярных соединений, обладающих высокой аффинностью к G-квадруплексным структурам, необходим для модернизации существующей терапии онкологических заболеваний. Методы биоинформатики и вычислительной биологии являются неотъемлемой частью данных исследований. На сегодняшний день методы симуляции молекулярной динамики и моделирования признаны высококачественными и эффективными методами в изучении динамики фолдинга биомакромолекул и их взаимодействия с низкомолекулярными лигандами [Karplus et al., 2002; Miyazaki et al., 2012; Shalaby et al., 2010; Zhou, et al., 2009].

Первая и третья задачи могут быть решены с помощью комбинирования имеющихся структурных данных ЯМР спектроскопии и кристаллографии с методами симуляции молекулярной динамики, что предоставит более достоверные, качественные структурные данные об особенностях взаимодействия низкомолекулярных лигандов с различными формами теломерной G-квадруплексной ДНК. Для решения проблемы селективности, необходимо получить информацию об основных сайтах связывания и динамике взаимодействия лигандов с квадруплексными структурами. Взаимодействие соединения с петлями G-квадруплексных структур, сильно отражается на его селективности.

Цель и задачи исследования: Целью диссертационной работы является поиск низкомолекулярных лигандов, избирательно связывающихся с теломерной G-квадруплексной ДНК, и исследование особенностей данных взаимодействий.

Для достижения поставленной цели нами были сформулированы следующие задачи:

- Наладить методики молекулярного докинга и симуляций молекулярной динамики на модели взаимодействия кверцетина с теломерной G-квадруплексной ДНК.
- Провести сравнительный анализ взаимодействия кверцетина и таксифолина с теломерной G-ДНК.
- Провести валидацию мишени: отобрать наиболее распространенные в физиологических условиях структурные формы теломерной G-ДНК.
- Создать библиотеку низкомолекулярных лигандов потенциально связывающихся с теломерной G-квадруплексной ДНК.
- Провести виртуальный скрининг созданной библиотеки соединений и отобрать соединения, связывающиеся с рядом структурных форм теломерной G-квадруплексной ДНК.
- Провести ряд молекулярных динамических симуляций взаимодействия отобранных соединений с G-квадруплексными структурами для определения основных сайтов связывания, энергетических показателей, анализа физико-химических параметров и особенностей взаимодействий.
- Отобрать соединения, преимущественно связывающиеся с петлями квадруплексных структур.

Научная новизна и научно-практическая значимость работы: Получены данные, свидетельствующие в пользу адекватности *in silico* экспериментов для изучения взаимодействия низкомолекулярных соединений со вторичными структурами ДНК. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности учета структурного полиморфизма теломерной G-квадруплексной ДНК для поиска и дизайна стабилизирующих их лигандов. Нами была создана библиотека химических соединений, потенциально связывающихся с рядом структурных форм теломерной G-ДНК. На примерах взаимодействий артемизинина, кверцетина и дигидрокверцетина с квадруплексной ДНК продемонстрирована возможность повышения селективности и понижения генотоксичности низкомолекулярных лигандов, связанная с их взаимодействием с петельными участками. Обнаружены новые соединения (производные антрацена, акридина и флуорена), взаимодействующие с рядом структурных форм теломерной G-квадруплексной ДНК. Получены данные об основных сайтах, энергетических показателях и особенностях взаимодействия ряда неизученных ранее низкомолекулярных лигандов.

Полученные в данной работе результаты открывают новые возможности в области экспериментальной и практической биомедицины, в частности, для дальнейших *in vitro* исследований влияния структурного полиморфизма G-квадруплексной ДНК на взаимодействие с низкомолекулярными соединениями. Полученные данные могут быть использованы в специальных лекционных курсах для студентов соответствующих кафедр ЕГУ, ЕГМУ, РАУ, а также в научных лабораториях, занимающихся исследованиями в области молекулярной биологии и особенностей взаимодействия низкомолекулярных лигандов и биомолекулярных мишеней, для создания обновленных баз данных, драг-дизайне, в аппликации терапии неоплазии.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Влияние структурного полиморфизма теломерной G-квадруплексной ДНК на взаимодействие с низкомолекулярными лигандами.
- Влияние химических модификаций соединения на характер взаимодействия (сайт связывания) с теломерной G-квадруплексной ДНК.
- Аналогия взаимодействия низкомолекулярных соединений с квадруплексной структурой и В-формой ДНК и ее связь с потенциальной генотоксичностью соединений.
- Выявление низкомолекулярных лигандов способных к связыванию ряда структурных форм теломерной G-квадруплексной ДНК.

Апробация работы: Материалы диссертации были доложены на международных и республиканских конференциях: международной научной интернет-конференции «физико-химическая биология» (Россия, Ставрополь, 2016, 2018), международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2016» (Россия, Москва, 2016), международной научной конференции посвященной 70-летию СНО ЕГУ (Ереван, Армения, 2017), в рамках международного воркшопа BioExcel по биомолекулярным симуляциям (Италия, Пула, 2018), а также на семинарах и заседаниях кафедры Биоинженерии, биоинформатики и молекулярной биологии Института биомедицины и фармации РАУ.

Публикации: По теме диссертации опубликовано 10 работ (8 статей и 2 тезиса).

Структура и объем диссертации: Работа состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, заключения,

выводов, приложения и списка литературы, насчитывающего 241 наименование. Диссертация изложена на 123 страницах, содержит 5 таблиц и 25 рисунков.

## ВВЕДЕНИЕ И ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Во введении обосновывается актуальность темы исследования, представляются степень ее разработанности, объект и предмет исследования, формулируются цели и задачи, теоретические, эмпирические, методологические основания исследования, обосновывается научная новизна, формулируются основные положения, выносимые на защиту, представляется теоретическая и практическая значимость исследования, включаются апробация результатов исследования и структура работы.

В обзоре литературы приводятся: общее описание и характеристика G-квадруплексных структур, структурный полиморфизм и функциональная роль G-квадруплексов, формирующихся в теломерной области генома человека, значимость теломерной G-квадруплексной ДНК как антираковой молекулярной мишени. Отдельный раздел посвящен экспериментальным и *in silico* исследованиям взаимодействия низкомолекулярных лигандов с теломерной G-квадруплексной ДНК.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на кафедре Биоинженерии, биоинформатики и молекулярной биологии и кафедре Биотехнологии и Медицинской биохимии и биотехнологий Российско-Армянского университета (РАУ).

*Создание библиотеки химических соединений.* Для создания библиотеки химических соединений были использованы следующие базы данных химических соединений PubChem [Kim et al., 2015], NALDB [Kumar & Kumar, 2016], G4LDB [Li et al., 2012]. Из базы данных PubChem на основе субструктурного анализа были отобраны всевозможные аналоги и производные следующих соединений: антрахинона и флуоренона, акридина, хиндолина, бисиндола, перилена, порфирина, берберина и флавоноидов. Общее количество соединений библиотеки составило ~50 тыс. После фильтрации библиотеки соединений с низкими показателями адсорбции и проницаемости, основываясь на “правило пяти” Липинского, и дубликатов количество соединений составило 16533.

*Валидация молекулярной мишени.* В качестве бимолекулярных мишеней, отображающих структурный полиморфизм теломерной G-квадруплексной ДНК, были отобраны три G-квадруплексные структуры: 1) Внутримолекулярный G-квадруплекс с топологией “hybrid-1” (PDB ID 2HY9) [Dai et al., 2007] длиной 26 н., состоящий из трех G-квартетов, одной петля с конформацией “double-chain reversal” и двух латеральных; 2) Внутримолекулярный G-квадруплекс с топологией “hybrid-2” (PDB ID 2JSL) [Phan et al., 2007]: длиной 25 н., состоящей из аналогичных 2HY9 структуре параметров; 3) Внутримолекулярный G-квадруплекс с топологией “propeller” (PDB ID 1KF1) [Parkinson et al., 2002]: длиной 22 н., состоящий из трех G-квартетов и двух петель пропеллерного типа. Гибридные формы являются наиболее часто встречающимися структурами в теломерной области генома человека в условиях *in vivo* [Dai et al., 2007].

*Виртуальный скрининг и докинг.* Метод молекулярного докинга основан на воссоздании химических потенциалов, которые определяют предпочтительную конформацию связывания соединения и свободную энергию взаимодействия. При этом рассчитывается минимум энергии и учитываются температурные данные [Gilson et al., 2007; Cha-en et al., 2007]. Виртуальный скрининг созданной библиотеки химических соединений был произведен с помощью программного пакета AutoDockVina [Trott &

Olson, 2010] с тремя вышеописанными структурами теломерной G-квадруплексной ДНК. Для проведения виртуального скрининга структуры химических соединений были оптимизированы (определение конформационной подвижности соединений, расчет зарядов для всех атомов, добавление полярных атомов водорода) посредством следующих программных пакетов: OpenBabel v2.4.0 [O'Boyle et al., 2011], Avogadro [Hanwell et al., 2012]. AutoDockTools [Huey & Morris, 2008] и Autodock Vina [Oleg et al., 2010]. Используя данные программные пакеты, были определены боксы, размер которых не превышал 27,000 Å<sup>3</sup>, а значение "exhaustiveness" - 10, что рекомендовано для проведения виртуального скрининга при малых размерах боксов [Jaghooji, 2016].

*In vitro* исследование взаимодействия артемизинина с геномной ДНК. Артемизинин (≥ 98%, Торонто, Канада); трис(гидроксиметил)аминометан (Tris, ≥ 99%, Bobo Biotechnology Co., Ltd., Шанхай, Китай); фенилбутазон (≥ 99.9%, Hubei Hengusho Chemical Co., Ltd., Хубей, Китай) были использованы для исследований. Артемизинин растворяли в 10 мл диметилсульфоксида (ДМСО) до концентраций 1, 5, 10, 25, 50 и 100 мМ. Геномная ДНК была выделена из небольшого объема ткани Саркома S-180 с использованием реqGOLD MicroSpin Комплект ДНК (PeqLab Biotechnologie GmbH Эрланген, Германия) и затем равное количество ДНК было смешано с различной концентрацией артемизинина в соотношении 1:1 (объем:объем) в течение 30 минут, 24 и 48 часов. Затем использовали 1% электрофорез в агарозном геле (PerfectBlue TM Horizontal Mini Gel System, PeqLab, Германия) для обнаружения миграционных полос ДНК под УФ-осветителем (E-BOX VX2-VILBER LOURMAT, PeqLab, Германия). Все измерения проводились три-пять раз. Данные были проанализированы с помощью одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA) и значение  $p < 0,05$  считалось значимым. Эксперименты были проведены в лаборатории токсикологии и молекулярной систематики Института физиологии им. Л. А. Орбели (НАН РА).

*Симуляции молекулярной динамики.* Симуляции были проведены с помощью программного пакета GROMACS v. 5.1, v. 2018.1 [Abraham et al., 2015]. Начальное пространственное расположение структур (координационные данные) молекул были взяты из файлов, использованных для виртуального скрининга. Молекулы воды были удалены. Файлы с топологическими параметрами G-квадруплексных структур были получены посредством модуля pdb2gmx, с использованием силового поля AMBER94 для нуклеиновых кислот. Для генерации топологий низкомолекулярных лигандов, совместимых с GROMACS и силовым полем AMBER94, были использован программный пакет асуре [Da Silva et al., 2015]. Полярные водороды были добавлены посредством программы AVOGADRO. Программный пакет асуре предназначен для автоматической генерации топологий для малых молекул и параметров для молекулярно динамических симуляций. Таким образом, были получены начальные комплексы G-ДНК/лиганд для молекулярных динамических симуляций, в координационном плане соответствующие результатам проведенного молекулярного докинга. Комплексы G-ДНК/лиганд были помещены в доэкадроновые боксы с TIP3P молекулярной моделью воды. С целью нейтрализации систем были добавлены ионы K<sup>+</sup> и Cl<sup>-</sup>, в концентрации 0.15 мкмоль, что близко к физиологической концентрации данных ионов в клетке человека. Процессы эквilibрации систем по температуре и давлению, были осуществлены с использованием стандартных ансамблей NVT и NPT. Системы были нагреты до температуры 300 К. После уравнивания систем по температуре (основываясь на кинетические энергии), системы были эквilibрированы по давлению (~ 1 атм.). После эквilibрациями систем по температуре и давлению, были проведены молекулярные динамические симуляции (в

целом 15) с длительностью 200 нс. каждая. Временной шаг симуляции - 2 фс. Для анализа результатов проведенных симуляций были использованные следующие основные программные пакеты: *g\_mmpbsa* (для осуществления ММ-ПБСА энергетических расчетов) [Kumar & Kumar 2014], *MDTraj* (библиотека python, используемая для анализа траекторий молекулярно динамических симуляций, анализа связей, углов, торсионных углов, PCA (Principal Component Analysis), RMSD расчетов и др.) [McGibbon, R. T. et al., 2015]. Для визуализации результатов использовались программы *VMD* [Humphrey et al., 1996] и *PyMOL* [DeLano, 2002].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

*Взаимодействие кверцетина и таксифолина с теломерной G-квадруплексной ДНК. С* целью исследования динамики взаимодействия низкомолекулярных лигандов с G-квадруплексной ДНК, был проведен молекулярный докинг и молекулярно динамическая симуляция взаимодействия кверцетина с теломерной G-квадруплексной ДНК (PDB ID: 2HY9). Полученные результаты молекулярного докинга свидетельствуют о том, что молекула кверцетина имеет прямое взаимодействие с G-квадруплексной ДНК. Были определены 4 сайта связывания, полученные пространственные параметры которых являются стабильными, о чем свидетельствуют полученные значения среднеквадратических отклонений RMSD <0.2 нм. Необходимо отметить, что из всех возможных сайтов связывания наиболее стабильным для взаимодействия является широкая бороздка G-квадруплекса.

Для более детального изучения процесса комплексообразования был проведен *in silico* эксперимент с учетом результатов молекулярного докинга. Молекулярно динамическая симуляция (80 нс.) была проведена с использованием программного пакета GROMACS v5.1. Согласно результатам симуляции молекулярной динамики образование комплекса происходит двумя этапами. Первый этап характеризуется флуктуационными движениями молекулы кверцетина у широкой бороздки (II) (Рис. 1, слева). После этого молекула фиксируется в глубине бороздки (Рис. 1, справа), образуя как минимум три стабильные водородные связи: 1) между атомами N2 (G4 первого квартета) и O29 (А-кольцо кверцетина) 2) между атомами N2 (G23 второго квартета) и O12 (С-кольцо кверцетина) и 3) между атомами N2 (G24 третьего квартета) и O23 (В-кольцо кверцетина).

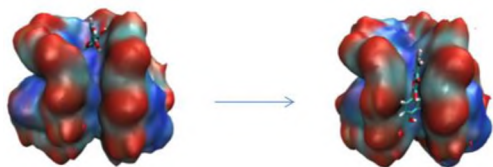


Рисунок 1. Первоначальная (слева) и конечная локализация кверцетина (справа) в глубине широкой бороздки по результатам молекулярной динамики.

Очень важным является сравнительный анализ различий в динамике и характере взаимодействия аналогов одного класса низкомолекулярных химических соединений. С этой целью были проведены молекулярно динамические симуляции (по 200 нс) кверцетина и его дигидро-аналога таксифолина с теломерной G-квадруплексной ДНК (PDB ID: 2HY9). Результаты проведенных симуляций представлены на рисунках 2 и 3.



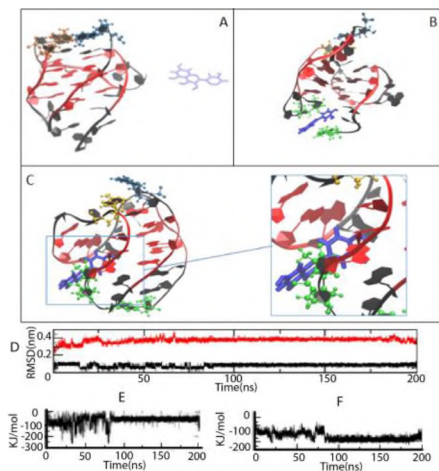


Рисунок 2. Взаимодействие кверцетина с G-квадруплексной структурой. А) Начальная точка симуляции. В) Взаимодействие с ТТА петлей квадруплекса. С) Взаимодействие с бороздкой. D)RMSD ДНК (красный), лиганда (черный). Е) Электростатические показатели. F) Энергия Ван-дер-Ваальса. Длительность симуляции 200 нс.

Начиная с несвязанного положения таксифолин находит свой конечный сайт связывания в течении 55 нс. симуляции. Таксифолин взаимодействует с вершиной G-квадруплексной структуры, что приводит к конформационным изменениям AAA петли, в частности аденинов в положении 15, 26. Взаимодействие характеризуется стабильностью до конца симуляции. Согласно электростатическим показателям и энергии Ваан-Дер-Ваальса, связывание происходит в большей степени за счет электростатических взаимодействий (Рис. 3).

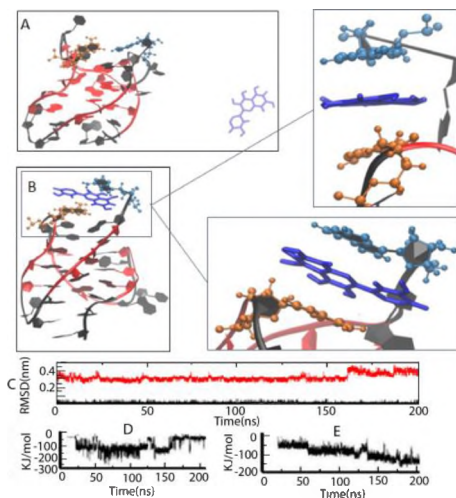


Рисунок 3. Взаимодействие таксифолина с теломерной G-квадруплексной ДНК. А) Начальная точка симуляции В) Конечная пространственная конформация таксифолина; Взаимодействие таксифолина с А26 и А15. С) RMSD (ДНК - красный, лиганд - черный). D) Электростатические показатели. Е) Энергия Ван-дер-Ваальса. Длительность симуляции 200 нс.

В результате данного эксперимента были исследованы сайты связывания кверцетина и таксифолина с теломерной G-квадруплексной ДНК (PBD ID 2HY9). Была рассмотрена и описана динамика взаимодействий. Сравнительный анализ двух этих симуляций позволяет заключить, что небольшая химическая модификация может оказать

сильное влияние на динамику взаимодействия низкомолекулярного лиганда с G-квადруплексной структурой. Большое количество соединений, связывающихся с G-квадруплексными соединениями, являются интеркаляторами, как в случае кверцетина и для квадруплексной, и для и геномной двуцепочечной ДНК и соответственно обладают высокой генотоксичностью, что ограничивает возможность их использования в качестве терапевтических агентов. С терапевтической точки зрения, значимым выступает поиск или дизайн соединений, которые специфически взаимодействуют с G-квадруплексной ДНК, в частности с петлями, как в случае таксифолина. Дигидрокверцетин (таксифолин), по сравнению с кверцетином, обладает меньшими токсическими и мутагенными свойствами и широко используется в фармацевтике. Из поставленных экспериментов следует, что низкомолекулярные лиганды, специфически связывающиеся с петельными структурами G-квадруплексной ДНК, менее предрасположены к интеркаляции, соответственно, менее генотоксичны и потенциально могут быть рассмотрены для использования в терапии. Аналогичная картина наблюдается при взаимодействии артемизинина с геномной и G-квадруплексной ДНК.

Взаимодействие артемизинина, ДГА И ДДГА с G-квадруплексной ДНК и артемизинина с Б-формой ДНК. Данные эксперименты были проведены для изучения взаимодействия артемизининов с канонической и неканонической формами геномной ДНК. Результаты молекулярного докинга показали, что все три соединения связываются с двумя сайтами теломерной G-квадруплексной ДНК (Рис. 4), где артемизинин (АРТ) и димер дигидроартемизинина (ДДГА) связываются с энергиями -30.9, и -35.1 кДж/моль, соответственно, а дигидроартемизинин (ДГА) связывается с энергией -29.7 кДж/моль. ДДГА взаимодействует с аденином в 14 положении, который является частью петли ТГА (13-15 н.) [Phan et al., 2007]. На втором сайте ДГА связывается с бороздкой, расположенной между гуанином в 5 и 23 положениях. Эта бороздка одна из двух “средних” одинаковых по размеру бороздок, свойственных этой структуре. Энергия взаимодействия ДГА с теломерной G-квадруплексной ДНК -29.7 кДж/моль. LigPlot+ анализ показал, что между ДГА и квадруплексом возможно формирование четырех водородных связей с гуанином 23 и гидрофобное взаимодействие с гуанином 5. Эти два гуанина являются частью нижнего G-квартета структуры. Энергия взаимодействия ДДГА значительно выше, чем у АРТ и ДГА. Подобное взаимодействие может привести к стабилизации G-квадруплексной структуры.

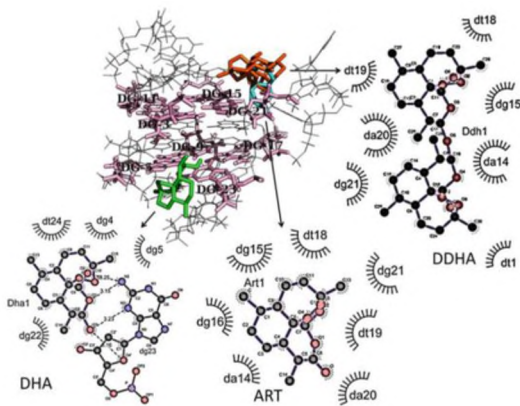


Рисунок 4. Результаты докинга теломерной G-квадруплексной ДНК с ДГА (DHA, зеленый), АРТ (ART, голубой). ДДГА (DDHA, оранжевый; Гуанины G-квартетов отображены розовым цветом.

Артемизинин, при взаимодействии с глюкокортикоидным рецептором, может быть импортирован в ядро. Поэтому чрезвычайно важным является исследование прямого взаимодействия артемизинина с геномной двуспиральной B-формой ДНК, что было проверено методом ретардации ДНК [Wang et al., 2012].

Для исследования прямого взаимодействия геномной ДНК раковой клеточной линии S-180 с артемизинином использовались различные концентрации артемизининов (1-100  $\mu\text{M}$ ) и инкубационное время до 48 ч. (Рис. 5). Полученные результаты соответствуют экспериментальным данным об отсутствии прямого взаимодействия между артемизинином и двуцепочечной геномной ДНК [O'Neill et al., 2010].

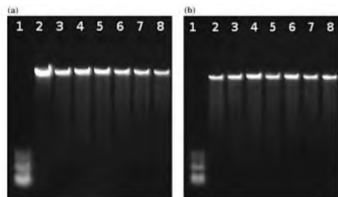


Рисунок 5. Электрофоретическая подвижность ДНК через 24 ч. (a) и 48 ч. (b) при инкубации с АРТ. 1 – маркер; 2 – геномная ДНК S-180; 3-8 – геномная ДНК с S-180 с увеличением концентрации АРТ: 3 - 1  $\mu\text{M}$ , 4-5  $\mu\text{M}$ , 5-10  $\mu\text{M}$ , 6-25  $\mu\text{M}$ , 7- 50  $\mu\text{M}$ , 8 – 100  $\mu\text{M}$ .

Противоопухолевые эффекты АРТ ассоциируются либо с непосредственным повреждением ДНК, либо опосредованным воздействием на некоторые сигнальные пути, участвующие в канцерогенезе. В литературе имеются противоречивые данные о взаимодействии АРТ с геномной ДНК [Cai, H.H. et al., 2009]. Данные об опосредованном повреждении ДНК встречается чаще, чем о прямом. Проведенные нами эксперименты свидетельствуют об отсутствии прямых взаимодействий АРТ с геномной ДНК клеток S-180. Взаимодействие АРТ с теломерной G-квадруплексной ДНК может быть одним из механизмов его действия. Высокая энергия взаимодействия ДДГА с теломерной G-квадруплексной ДНК также коррелирует с экспериментальными данными *in vitro* о более выраженной противоопухолевой активности димеров ДГА [Stockwin, L.H. et al., 2009].

*In silico* скрининг низкомолекулярных лигандов, с учетом структурного полиморфизма теломерной G-квадруплексной ДНК. Структурный полиморфизм G-квадруплексной ДНК, оказывает большое влияние на характер взаимодействия данных структур с низкомолекулярными лигандами. В теломерной области генома данный феномен имеет еще большее значение, ввиду протяженности теломер и одноцепочечного концов, что предоставляет возможность для формирования большого ряда структурных топологий, включая межмолекулярные и внутримолекулярные G-квадруплексы. Так как G-квадруплексы существуют в *in vivo* условиях в виде ансамблей структурных топологий, большой интерес представляет собой поиск низкомолекулярных лигандов, обладающих свойством специфически связывать не одну конкретную структурную топологию G-квадруплексной ДНК, а ряд структур.

С этой целью, мы провели виртуальный скрининг небольшой базы данных (G4LDB [Li et al., 2012]), содержащей экспериментальные данные о химических структурах (934 соединения) взаимодействующих с G-квадруплексными ДНК и РНК.

В качестве мишеней были отобраны структуры: PDB IDs: 1KF1, 2HY9, 2S JL. Согласно результатам проведенного виртуального скрининга было обнаружено два соединения, связывающихся с тремя структурами теломерной G-квадруплексной ДНК. На рисунке 6 показано взаимодействие одного из дериватов дикарбоксоамида с тремя исследованными G-квадруплексными структурами.

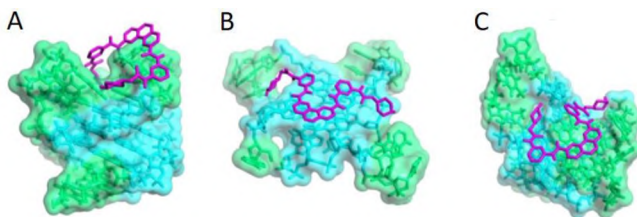


Рисунок 6. Взаимодействие N, N'-Bis(2-(piperazin-1-yl)-acetamido-6-pyridyl)-1,10-phenanthroline-2,9-dicarboxamide с тремя теломерными G-квадруплексными структурами: А) “hybrid-1” 2HY9 В) “propeller” 1KF1 С) “hybrid-2” 2JSL.

По результатам молекулярного докинга N, N'-Bis(2-(piperazin-1-yl)-acetamido-6-pyridyl)-1,10-phenanthroline-2,9-dicarboxamide взаимодействует со всеми исследованными структурами. Значение ЭС в случае 2HY9 = - 39,74 кДж/моль, 1KF1 = - 38,91 кДж/моль и 2JSL = - 40,58 кДж/моль.

Результаты проведенного виртуального скрининга свидетельствуют о наличии низкомолекулярных соединений, способных одновременно взаимодействовать с различными структурными формами теломерной G-квадруплексной ДНК с высокими энергиями связывания.

Поиск низкомолекулярных лигандов взаимодействующих с рядом структурных топологий теломерной G-квадруплексной ДНК. Основываясь на вышеизложенные данные и результаты было проведено более широкомасштабное исследование с целью поиска и анализа низкомолекулярных лигандов, взаимодействующих с рядом структурных топологий теломерной G-квадруплексной ДНК.

Для создания библиотеки данных химических соединений нами были взяты данные об известных соединениях, взаимодействующих с G-квадруплексными структурами из двух вторичных баз данных NALDB [Kumar & Kumar., 2016] и G4LDB [Li et al., 2012]. Также библиотека была дополнена всевозможными аналогами и производными флуоренона, акридина, хиндолина, бисиндола, перилтена, порфирина, берберина и флавоноидов на основе субструктуры соединений, взятых из базы данных PubChem [Kim et al., 2015]. В дальнейшем библиотека была отфильтрована от соединений с низкими показателями адсорбции и проницаемости, правилу Лепинского и очищена от дубликатов. Общее количество соединений в конечной библиотеке составило 16533. В качестве молекулярных мишеней были использованы следующие структуры: PDB ID: 1KF1, 2HY9, 2JSL.

В результате виртуального скрининга и последующего докинг анализа библиотеки соединений нами было обнаружено и отобрано 3 соединения: 1) 2-акридин-3-ил-5-(1,3-диоксоизоиндол-5-карбонил)изоиндол-1,3-дион (PubChem CID: 4646438); 2) N-[4-Флуоро-3-(6,7,8,9-тетрагидро-5Н-[1,2,4]триазоло[4,3-а]азепин-3-yl)фенил]-9-оксофлуорен-карбоксамид (PubChem CID: 37177818); 3) 1-[(9,10-Диоксо-9,10-дигидроантрацен-2-yl)карбамоил]этил 3-[(пиримидин-2-ил)амино]бензоат (PubChem CID: 42948927), обладающих потенциалом к взаимодействию с тремя структурными формами теломерной G-квадруплексной ДНК и входящими в топ 50. В дальнейшем для более качественного анализа полученных результатов были проведены молекулярно динамические симуляции трех соединений с каждой из использованных структур (по 200 нс).

Взаимодействие производного акридина (PubChem CID: 4646438) с теломерной G-квартуплексной ДНК. Соединение 4646438 связывается с высокой энергией связывания со всеми тремя исследованными структурными топологиями теломерной G-квартуплексной ДНК (Рис. 7). Показатели RMSD на протяжении всей длины симуляций для всех исследованных взаимодействий <0.2 нм.

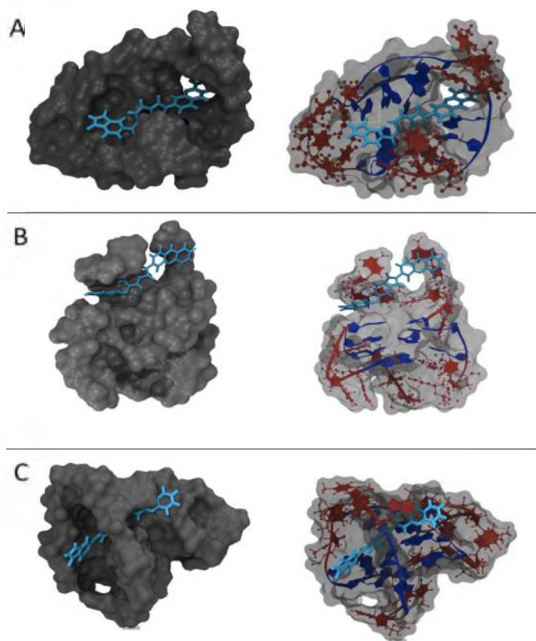


Рисунок 7. Взаимодействие соединения 4646438 с А) 1KF1 В) 2HY9 С) 2JSL структурными топологиями теломерной G-квартуплексной ДНК. Красным отображены нуклеотиды, входящие в состав петель, синим – гуанины, входящие в состав G-квартетов.

Соединение 4646438 взаимодействует с тремя исследованными структурами по величине энергии связывания в следующем порядке 2JSL (-236.360 +/- 5.576 кДж/моль) < 1KF1 (-179.806 +/- 7.648 кДж/моль) < 2HY9 (-41.032 +/- 8.810 кДж/моль).

Взаимодействие соединения 4646438 с 1KF1 структурой происходит за счет гуанинов (G8 и G14), входящих в состав G-квартета и аденинов (A7 и A13), входящих в состав петель. При этом энергетические показатели энергий связывания для гуанинов и аденинов относительно близки. Равноценный вклад во взаимодействие соединения 4646438 с 2JSL также вносят гуанины G-квартета данной структуры и нуклеотиды петли (G21, G22 и T12, T13, соответственно). В случае связывания соединения 4646438 со 2HY9 структурой, основной вклад во взаимодействие вносят три аденина (A15, A25, A26).

Взаимодействие производного флюорена (PubChem CID: 37177818) с теломерной G-квартуплексной ДНК. Соединение 37177818 также связывается с высокой энергией связывания со всеми тремя исследованными структурными топологиями теломерной G-

квадруплексной ДНК (Рис. 8). Показатели RMSD на протяжении всей длины симуляций для всех исследованных взаимодействий <0.2 нм. и характеризуются стабильностью.

Соединение 37177818 взаимодействует с тремя исследованными структурами, по величине энергии связывания в следующем порядке по величине энергии связывания: 2JSL (-198.427 +/- 1.873 кДж/моль) < 1KF1 -131.749 +/- 1.718 кДж/моль) < 2НУ9 (-117.095 +/- 1.855 кДж/ моль).

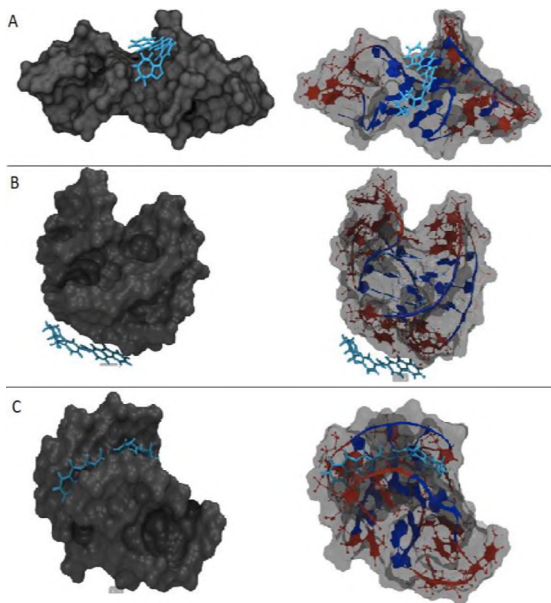


Рисунок 8. Взаимодействие соединения 37177818 с А) 1KF1 В) 2НУ9 С) 2JSL структурными топологиями теломерной G-квадруплексной ДНК. Красным отображены нуклеотиды, входящие в состав петель, синим – гуанины, входящие в состав G-квартетов.

Взаимодействие производного антрацена (PubChem CID: 42948927) с теломерной G-квадруплексной ДНК. Соединение 42948927 также связывается с высокими показателями энергии связывания со всеми тремя исследованными структурными топологиями теломерной G-квадруплексной ДНК (Рис. 9). Показатели RMSD на протяжении всей длины симуляций для всех исследованных взаимодействий <0.2 нм и характеризуются стабильностью.

Соединение 42948927 взаимодействует с тремя исследованными структурами в следующем порядке по величине энергии связывания : 2JSL (-175.783 +/-13.387 кДж/моль) <1KF1 -103.343 +/- 4.569 кДж/моль) < 2НУ9 (-96.099 +/- 7.479 кДж/ моль). Согласно показателям энергий взаимодействий нуклеотидных оснований следует, что взаимодействие соединения 42948927 со структурами 1KF1 и 2НУ9 в основном происходит с участием нуклеотидов, участвующих в формировании петель: T12, A13 и A15, A25, A26, соответственно. Во взаимодействии со структурой 2JSL нуклеотиды петли (A2, A13) также вносят наибольший вклад, наряду с гуанинами квартетов G3, G21 и G22.

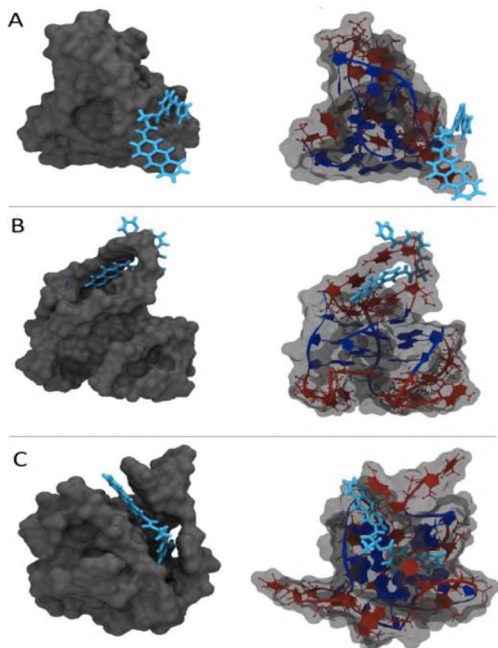


Рисунок 9. Взаимодействие соединения 42948927 с А) 1KF1 В) 2HY9 С) 2JSL структурными топологиями теломерной G-квадруплексной ДНК. Красным отображены нуклеотиды, входящие в состав петель, синим – гуанины, входящие в состав G-квартетов.

Энергетические показатели взаимодействия, включая энергии ван-дер-ваальса, электростатические, полярную энергию растворителя и энергию поверхности доступной для растворителя и суммарную энергию связывания, представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Энергетические показатели взаимодействия соединения 42948927 с теломерной G-квадруплексной ДНК (кДж/моль).

CID/PDB ID	Энергия Ван-дер-Вальса	Электростатическая энергия	Гидрофобная энергия	SASA энергия	Энергия связывания
42948927/1KF1	-126.966 ± 0.973	-55.444 ± 1.441	90.160 ± 4.591	-10.827 ± 0.119	-103.343 ± 4.569
42948927/2HY9	-192.449 ± 6.303	-2.684 ± 1.397	113.561 ± 4.610	-14.249 ± 0.455	-96.099 ± 7.479
42948927/2JSL	-175.499 ± 11.632	-13.878 ± 1.428	27.876 ± 2.091	-13.471 ± 0.888	-175.783 ± 13.387

Согласно энергетическим показателям нуклеотидов, непосредственно участвующих во взаимодействии с исследуемым соединением, видно, что взаимодействие между лигандом и структурой 1KF1 происходит в основном за счет гуанинов G-квартета (G4, G10 и G22). В случае структуры, 2JSL во взаимодействии участвуют как гуанины квартетов, так и нуклеотиды петель (G3, G16, G22, G23 и T7, A8, T24 T25). В случае 2HY9: G6, T13, T14 и A26.

В итоге все 3 соединения продемонстрировали потенциал к связыванию трех структурных топологий теломерной G-квадруплексной ДНК. Три отобранных соединения связываются со структурами с относительно высокими показателями энергии связывания, кроме взаимодействия соединения 4646438, которое продемонстрировало сравнительно низкую энергию связывания с одной из гибридных топологий теломерной G-квадруплексной ДНК (2JSL).

Исследованные соединения в рамках одной структурной топологии теломерной G-квадруплексной ДНК, показали что в случае разных соединений непосредственно вовлеченные во взаимодействие с соединением нуклеотиды отличны друг от друга, так например в случае взаимодействия параллельной структурной топологии теломерной G-ДНК (1KF1) с соединением 4646438 взаимодействие в основном протекает за счет следующих нуклеотидов: A7, A13, G8, G14; в случае взаимодействия 37177818 с 1KF1: G4, G10, G22 ; в случае 42948927/1KF1: T12, T13. При этом Врасо-19 в основном взаимодействует со следующими нуклеотидами структурной топологии 1KF1: G10, T17, G21.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные нами симуляции молекулярной динамики взаимодействий кверцетина и дигидрокверцетина с “hybrid-1” структурной топологией теломерной G-квадруплексной ДНК и их сравнительный анализ продемонстрировали, что дигидрокверцетин в отличие от кверцетина связывается с петлей квадруплексной структуры, а не с бороздкой. Из литературы известно, что дигидрокверцетин в сравнении с кверцетином обладает более низкими показателями генотоксичности. Учитывая факт того, что кверцетин взаимодействует с бороздкой квадруплексной структуры, оно аналогичным образом взаимодействует и с геномной двуцепочечной ДНК, что приводит к высоким показателям генотоксичности. Отсутствие одной двойной связи в структуре дигидрокверцетина приводит к связыванию соединения с петлей квадруплексной структуры, что возможно является одной из причин низких показателей генотоксичности дигидрокверцетина в сравнении с кверцетином.

Молекулярный докинг артемизинина, дигидроартемизинина, димера дигидроартемизинина со структурной топологией “hybrid-2” теломерной G-квадруплексной ДНК продемонстрировал, что артемизинин и димер дигидроартемизинина взаимодействуют с петельным участком структуры, в то время как дигидроартемизинин взаимодействует с бороздкой квадруплексной структуры. Эксперименты относительно взаимодействия ДНК раковой клеточной линии S-180 с артемизинином методом ретардации ДНК продемонстрировали отсутствие прямого взаимодействия между двуцепочечной ДНК и артемизинина.

В результате проведенных исследований можно предположить, что низкомолекулярные соединения, не связывающиеся с бороздками квадруплексных структур, являются потенциально менее генотоксичными.

В результате виртуального скрининга и симуляций молекулярной динамики из 16533 соединений нами было обнаружено и отобрано 3 соединения: 2-акридин-3-ил-5-



(1,3-диоксоизоиндол-5-карбонил)изоиндол-1,3-диона (PubChem CID: 4646438; N-[4-Флуоро-3-(6,7,8,9-тетрагидро-5H-[1,2,4]триазоло[4,3-a]азепин-3-yl)фенил]-9-оксофлуорен-карбоксамид (PubChem CID: 37177818); 1-[(9,10-Диоксо-9,10-дигидроантрацен-2-yl)карбамоил]этил,3-[(пиримидин-2-ил)амино]бензоата (PubChem CID: 42948927), обладающих потенциалом к взаимодействию с тремя структурными формами теломерной G-квадруплексной ДНК (“hybrid-1”, “hybrid-2”, “propeller”).

Из проведенных молекулярно динамических симуляций были получены структурные данные о сайтах связывания, динамике процесса взаимодействия, рассчитаны энергетические показатели, в том числе энергетический вклад отдельных нуклеотидов во взаимодействие.

Производное акридина (4646438) связывается со структурной топологией “propeller” (1KF1) теломерной G-квадруплексной ДНК с энергией связывания  $-179.806 \pm 7.648$  кДж/моль. Равноценный вклад во взаимодействие вносят гуанины в 8 и 14 и аденины в 7 и 13 положениях структуры. Связывание происходит за счет Ван-дер-Ваальсовых и других электростатических взаимодействий. Со структурной топологией “hybrid-1” (2HY9) соединение связывается с относительно низкой энергией ( $-41.032 \pm 8.810$  кДж/ моль). Основной вклад во взаимодействие вносит адениновый (A15, A25, A26) триплет структуры. Со структурной топологией “hybrid-2” (2JSL) соединение связывается с высокой энергией связывания  $236.360 \pm 5.576$  кДж/моль. Взаимодействие происходит за счет гуанинов квартета и тиминов петли (G21, G22 и T12, T13). Связывание происходит за счет Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий.

Производное флуорена (37177818) связывается со структурной топологией “propeller” теломерной G-квадруплексной ДНК с энергией связывания  $-131.749 \pm 1.718$  кДж/моль. Взаимодействие между лигандом и структурой 1KF1 происходит в основном за счет гуанинов G-квартета (G4, G10 и G22). Связывание происходит за счет Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий. Со структурной топологией “hybrid-1” соединение связывается с энергией  $-117.095 \pm 1.855$  кДж/ моль. Основной вклад во взаимодействие вносят нуклеотиды пет ли (T13, T14 и A26) и гуанин G6. Связывание происходит за счет Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий. Со структурной топологией “hybrid-2” соединение связывается с высокой энергией связывания  $-198.427 \pm 1.873$  кДж/моль. Связывание происходит за счет Ван-дер-Ваальсовых и других электростатических взаимодействий, с участием следующих нуклеотидов структуры: G3, G16, G22, G23 и T7, A8, T24 T25.

Производное антрацена (42948927) связывается со структурной топологией “propeller” теломерной G-квадруплексной ДНК с энергией связывания  $-103.343 \pm 4.569$  кДж/моль. Связывание происходит за счет Ван-дер-Ваальсовых и других электростатических взаимодействий. Значительный вклад во взаимодействие вносят нуклеотиды петли T12, A13. Со структурной топологией “hybrid-1” соединение связывается с энергией  $-96.099 \pm 7.479$  кДж/ моль. Основной вклад во взаимодействие вносят аденины петли (A15, A25, A26). Связывание происходит за счет Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий. Со структурной топологией “hybrid-2” соединение связывается с высокой энергией связывания  $-175.783 \pm 13.387$  кДж/моль. Связывание происходит за счет Ван-дер-Ваальсовых взаимодействии, с участием следующих нуклеотидов структуры: A2, A13, G3, G21 и G22.

Одно из лидирующих в данной области соединений BRACO-19 было разработано с помощью компьютерного моделирования на основе замещения молекулы акридина с учетом уникальных структурных особенностей G-квадруплексной ДНК, а именно, возможности взаимодействия с тремя бороздками G-квадруплекса, помимо стэкинга на терминальных G-квартетах (Рис. 10А) [Read et al., 2001]. В отличие от BRACO-19,

выявленные нами соединения, в частности соединение 42948927 (Рис. 10В), взаимодействуют преимущественно с петлями теломерных квадруплексных структур, что потенциально повышает их селективность и снижает генотоксичность.

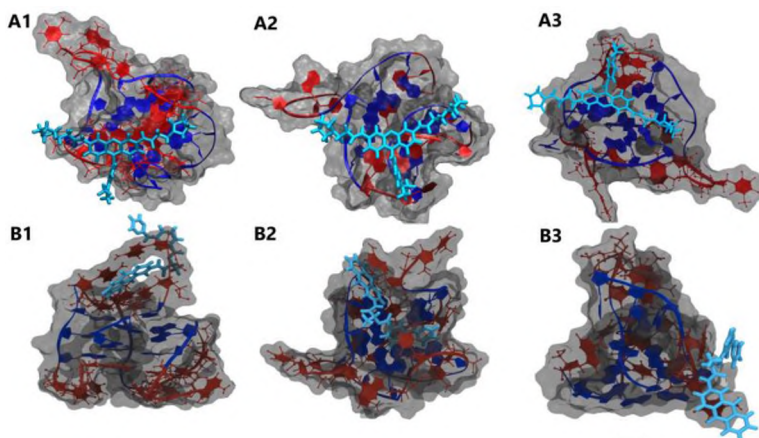


Рисунок 10. А) Взаимодействие BRACO-19 с А1) “hybrid-1” (2HY9), А2) “hybrid-2” (2JSL), А3) “propeller” (1KF1) структурными топологиями теломерной G-квадруплексной ДНК. В) Взаимодействие соединения 42948927 с теми же структурными топологиями.

Целью настоящей работы является поиск низкомолекулярных лигандов избирательно связывающихся с рядом структурных форм теломерной G-квадруплексной ДНК. Нами были обнаружены три соединения, которые по результатам докинг анализа и молекулярно динамических симуляций связываются с теломерной G-квадруплексной ДНК. Все три соединения взаимодействуют с относительно высокой энергией связывания. Ряд обнаруженных соединений специфически связываются преимущественно с нуклеотидами петель G-квадруплексных структур, но в некоторых - преимущественно с гуанинами G-квartetов.

В современной антираковой терапии существует большая необходимость обнаружения и создания новых антипролиферативных агентов, обладающих альтернативными молекулярными механизмами действия. Одним из наиболее потенциальных подобных механизмов является подавление теломеразы в раковых клетках посредством стабилизации G-квадруплексных структур, формирующихся на концах теломерных участков генома человека.

Обнаруженные и отобранные нами соединения, специфически взаимодействующие с петлями G-квадруплексных структур, потенциально не взаимодействуют непосредственно с двуцепочечной ДНК, обладают низкой цито- и генотоксичностью, однако эти данные нуждаются в дальнейшей апробации лабораторными методами.

Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о наличии низкомолекулярных лигандов, способных к одновременному связыванию ряда разных структурных форм теломерной G-квадруплексной ДНК.

## ВЫВОДЫ

1. Кверцетин взаимодействуют с бороздкой “hybrid-1” структурной топологией теломерной G-квадруплексной ДНК, а дигидрокверцетин взаимодействует с петельным участком, состоящим из триплета аденина, что возможно является причиной меньшей по сравнению с кверцетином генотоксичности дигидрокверцетина.
2. Артемизинин и димер дигидроартемизинина взаимодействуют с нуклеотидами петли структурной топологии “hybrid-2” теломерной G-квадруплексной ДНК, при этом артемизинин не связывается с В-формой ДНК.
3. Выявленные соединения, а именно: 2-акридин-3-ил-5-(1,3-диоксоизоиндол-5-карбонил)изоиндол -1,3-дион, N-[4-Флуоро-3-(6,7,8,9-тетрагидро-5Н-[1,2,4]триазоло[4,3-а]азепин-3-yl)фенил]-9-оксофлуорен-карбоксамид и 1-[(9,10-Диоксо-9,10-дигидроантрацен-2-yl)карбамоил]этил 3-[(пиримидин-2-ил)амино]бензоат, связываются с тремя исследованными структурными формами теломерной G-квадруплексной ДНК (“hybrid-1”, “hybrid-2”, “propeller”) с высокой энергией связывания. Связывание происходит как с петлями, так и с гуанинами G-квартетов.
4. Взаимодействие обнаруженных низкомолекулярных соединений с теломерной G-квадруплексной ДНК происходит в большей степени за счет Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий.
5. В отличие от BRACO-19, 1-[(9,10-Диоксо-9,10-дигидроантрацен-2-yl)карбамоил]этил-3 [(пиримидин-2-ил)амино]бензоат (PubChem ID: 42948927) преимущественно взаимодействует с нуклеотидами петель теломерной G-квадруплексной ДНК, что указывает на потенциально более высокую селективность соединения и низкую генотоксичность.

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Ginosyan S., **Chilingaryan G.**, Grabski, H., Ghulikyuan L., Ayvazyuan M., Tiratsuyan S. Mode of Artemisinins' Action on Oxidative Stress, Genomic and G-Quadruplex DNA. In 4<sup>th</sup> International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering, Springer, Cham, Chisinau, Moldova, 2019, pp. 543-548.
2. Ginosyan S., **Chilingaryan G.**, Grabski H., Ghulikyuan L., Aivazyuan N., Tiratsuyan S. Mode of artemisinins' action on oxidative stress, genomic and G-quadruplex DNA. Abstract book of 4<sup>th</sup> International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering, 2019, Chisinau, Moldova. p.135.
3. **Чилингарян Г.**, Абелян Н. Моделирование взаимодействия таксифолина с человеческой теломерной гибридной G-квадруплексной ДНК с помощью метода молекулярной динамики. Вестник РАУ, Физико-Математические и Естественные Науки, № 1, Ереван, 2019, стр. 141-149.
4. **Chiligaryan G.** Comparative Analysis of Quercetin and Taxifolin Interaction with Human Telomeric G-quadruplex DNA Hybrid form based on Molecular Dynamic Simulations. Biological Journal of Armenia, 70 (4). Yerevan, 2018, pp. 57-61.
5. **Chilingaryan G.** "In-silico screening of telomeric G-DNA binding small molecules" Collection of scientific articles of YSU SSS 1.1 (24), Yerevan, Armenia, 2018, p.224-230.
6. **Чилингарян Г.**, Оганесян А., Гиносян С., Тирацуйан С. Теломерные G-квадруплексные мотивы ДНК как потенциальная мишень новых антималярийных препаратов. Физико-химическая биология, Материалы VI международной научной интернет-конференции. Изд-во СтГМУ, Ставрополь, 2018, стр. 9-12.
7. **Чилингарян Г.**, Грабский О., Унанян Л. *In silico* исследование взаимодействия кверцетина с теломерной G-квадруплексной ДНК. Физико-химическая биология, материалы IV международной научной интернет-конференции. Изд-во СтГМУ, Ставрополь, 2016, стр. 119-123.
8. **Чилингарян Г.**, Абелян Н., Тирацуйан С., Унанян Л., Вардапетян Г. *In silico* скрининг низкомолекулярных лигандов, стабилизирующих теломерные G-квадруплексные ДНК. Вестник РАУ, Физико-Математические и Естественные Науки № 2, Ереван, 2017, стр. 112-121.
9. Унанян Л., Грабский О., **Чилингарян Г.**, Вардапетян Г. Выявление возможных сайтов связывания кверцетина с теломерной G-квадруплексной ДНК // Вестник РАУ, Физико-Математические и Естественные Науки № 1, Ереван, 2016, стр. 128-134.
10. **Чилингарян Г.** Выявление возможных сайтов связывания кверцетина на G-квадруплексной ДНК. Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2016»: Секция «Биоинформатика». [https://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov\\_2016/data/8303/uid111971\\_report.pdf](https://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2016/data/8303/uid111971_report.pdf)

ՑԱՄԸՄԱՍՈՒԿՈՒԱՅԻՆ ՈՐՈՇ ՄԻԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ  
ԹԵԼՈՄԵՐԱՅԻՆ Գ-ՔՎԱԴՐՈՒՊԼԵՔՍԱՅԻՆ ԴՆԹ-Ի շԵՏ  
ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

**Քանալի բառեր`** G-քվադրուպլեքս, թելոմեր, կառուցվածքային պոլիմորֆիզմ, վիրսուս պրինիպ, մոլեկուլային դինամիկ մոդելավորում:

*In vitro* և *in vivo* ուսումնասիրությունները ցույց են տվել, որ մարդու գենոմի թելոմերային շրջանում G-քվադրուպլեքսային կառուցվածքների ձևավորումը ազդում է քաղցկեղային բջիջներում թելոմերազ ֆերմենտի գործունեության վրա, ինչը հանգեցնում է հակապրոլիֆերատիվ ազդեցության: Թելոմերային հաստվածներում մի քանի G-քվադրուպլեքսային կառուցվածքների միաժամանակյա ձևավորումը ակտիվացնում է ԴՆԹ-ի վնասման մոլեկուլային մեխանիզմները, ինչը հանգեցնում է չարորակ առանաֆորմացված բջիջների աճի ընտրովի արգելակմանը: Հետևաբար, մարդու գենոմի թելոմերային G-քվադրուպլեքսային ԴՆԹ-ն ժամանակակից հակաքաղցկեղային հետազոտություններում համարվում է մոլեկուլային նոր թիրախ:

Փորձնականորեն ցույց է արվել նաև, որ այդ կառուցվածքների փոխազդեցությունը ցածրամոլեկուլային միացությունների հետ հանգեցնում է դրանց կայունացմանը: Վիրսուս սկրինինգի, մոդելավորման և մոլեկուլային դինամիկայի սիմուլյացիայի մեթոդները ճանաչվում են որպես կենսամակրոմոլեկուլների փաթեթավորման և ցածրամոլեկուլային լիզանդերով փոխազդեցության ուսումնասիրության բարձրորակ և արդյունավետ մեթոդներ: Ներկայումս դրանք լայնորեն կիրառվում են ինչպես գիտական հետազոտություններում, այնպես էլ արդյունաբերության մեջ:

Մույն աշխատանքի նպատակն է ուսումնասիրել ցածրամոլեկուլային լիզանների փոխազդեցությունը թելոմերային G-քվադրուպլեքսային ԴՆԹ-ի հետ` օգտագործելով ժամանակակից կենսատեղեկատվական և հաշվողական կենսաբանության մեթոդների առավելությունը այդ կենսամակրոմոլեկուլների կառուցվածքային պոլիմորֆիզմի համատեքստում:

Թելոմերային G-քվադրուպլեքսի հետ որոշակի միացությունների (քլեբեստին, տաքսիֆոլին, արտեմիսին) և փոխազդեցության առանձնահատկությունները հասկանալու և օգտագործված հաշվարկային մեթոդաբանությունների ճշգրտելու նպատակով իրականացվել է *in silico* ուսումնասիրություններ: *in silico* փորձերի արդյունքները համադրելով զրականության փորձնական տվյալների հետ ի արվել են մի քանի եզրակացություններ. ցածրամոլեկուլային այն լիզանները, որոնք կապվում են G-քվադրուպլեքսային կառուցվածքների ակունների հետ, ամենայն հավանականությամբ, կապվում են նաև գենոմային երկշրջա ԴՆԹ-ի հետ և շատ դեպքերում ինտերկալացիայի միջոցով: Այդ միացությունների քիմիական ձևափոխությունները կարող են ազդել G-քվադրուպլեքսաների հետ միացման եղանակի/կայքերի վրա, , որոնք կապվում են G-քվադրուպլեքսաների կառույցների հանգույցների հետ, ավելի քիչ են հակված փոխազդել ԴՆԹ կրկնակի պարույրի հետ ինտերկալացիայի եղանակով , հետևաբար, ունեն ավելի մեծ բուժական ներուժ ու նշանակություն:

Թելոմերային G-քվադրուպլեքսային ԴՆԹ-ի մի քանի կառուցվածքային ձևերի հետ (“hybrid-1” – PDB ID: 2HY9, “hybrid-2” – PDB ID 2JSL, “propeller” – PDB ID 1KF1) հետ միաժամանակ փոխազդող լիզանների ընտրության նպատակով , իրականացվել է վիրսուս պրինիպ, AutoDock Vina ծրագրային փաթեթի միջոցով: Այս փորձերի արդյունքները ցույց են տվել, որ կան միացություններ, որոնք կարող են կապել G-քվադրուպլեքսի երեք տարբեր կառուցվածքային ձևեր, ուսումնասիրված

միացություններից երկուսը (դիկառբոկսիամիդի ածանցյալները) ցուցաբերել են կապվելու ունակություն ուսումնասիրված բոլոր երեքկառուցվածքների հետ:

Կուտակված փորձարարական տվյալների հիման վրա կատարվել է ևս մեկ վիրտուալ սքրինինգ: Այս անգամ քիմիական միացությունների գրադարանը կազմվել է տվյալների երկու բազաներից (NALDB, G4LDB), որոնք պարունակում են G-քվադրուպլեքսները կապող լիզանդների վերաբերյալ փոխկապակցված տվյալներ: Բացի այդ, գրադարանը համալրվել է անալոզներով և միացությունների ածանցյալներով, որոնք ուսումնասիրվել կամ հիշատակվել են գրականության մեջ, որպես G-քվադրուպլեքսների հետ կապվող պոտենցիալ միացություններ, ինչպիսիք են ֆլորենոնային, ակրիդինային, հինդոլինային, բիսինդոլային շարքերը, պոբֆիդինը, բերբերինը և ֆլավոնոիդները, որոնք վերցվել են PubChem տվյալների բազայից: Գրադարանում միացությունների քանակը ցածր կանման, կրկնօրինակների, Լեպինակու հինգ կանոնի համաձայն ֆիլտրելուց հետո կազմել է 16533: Այդ միացությունները ստուգվել են *in vivo* պայմաններում թեթմերային հատվածներում հանդիպող G-քվադրուպլեքսային երեք կառուցվածքային պոլիմորֆ ձևերը (“hybrid-1”, “hybrid-2”, “propeller”) կապելու ունակությամբ, հատվածներում:

Արդյունքում, մենք հայտնաբերեցինք երեք միացություններ, որոնք կապվում են ուսումնասիրված բոլոր երեք պոլիմորֆ կառույցների հետ: Դրանից հետո մենք իրականացրեցինք այդ միացությունների մոլեկուլային դինամիկայի սիմուլյացիաներ GROMACS ծրագրային փաթեթի միջոցով՝ յուրաքանչյուր կառուցվածքի հետ առանձին-առանձին: Հետազոտված միացություններից երեքը՝ ակրիդինի (PubChem ID: 4646438), ֆլուորենի (PubChem ID: 37177818), անտրացենի (PubChem ID: 42948927) ածանցյալները ցուցաբերեցին բարձր կապման էներգիաներով կանխատեսվող փոխազդեցություններ: Մոլեկուլային դինամիկայի սիմուլյացիաների ուսումնասիրությունը և դրանց վերլուծությունը ցույց են տվել, որ ակրիդինի և ֆլուորենի ածանցյալները կապվում են թեթմերային G-ԴՆԹ-ի հետ՝ փոխազդելով G-քվադրուպլեքսների հանգույցների և քվադրուպլեքսների գուանինների հետ, մինչդեռ անտրացենի ածանցյալը գլխավորապես կապվում է թեթմերային G-ԴՆԹ-ն, հանգույցների հետ:

Բազմաթիվ փորձերի արդյունքում կարելի է ենթադրել, որ ցածրամոլեկուլային միացությունները, որոնք չեն փոխազդում G-քվադրուպլեքսային կառուցվածքների ակոսի հետ, ունեն պոտենցիալ ցածր գենատոքսիկություն: Իրականացրած մոլեկուլային դինամիկայի սիմուլյացիաների տվյալների համաձայն ստացվել են փոխազդեցության կառուցվածքային կայքերի, դինամիկայի և էներգետիկ ցուցանիշները, ինչպես նաև առանձին նուկլեոտիդների էներգետիկ ներդրումը: Ուսումնասիրությունների արդյունքում ձեռք են բերվել նոր տվյալներ՝ ցածրամոլեկուլային միացությունների թեթմերային G-քառաշղթա ԴՆԹ-ի հետ փոխազդեցության առանձնահատկությունների վերաբերյալ, վերջիններիս կառուցվածքային պոլիմորֆիզմի համատեքստում, ինչը մեծ նշանակություն ունի պոտենցիալ դեղամիջոցների որոնման, դիզայնի և մոդելավորման գործընթացում՝ ժամանակակից հակաքաղցկեղային թերապիայի մոդեռնիզացման նպատակով:

GARRI CHILINGARYAN  
INTERACTION OF SOME LOW MOLECULAR WEIGHT COMPOUNDS WITH G-  
QUADRUPLEX DNA  
SUMMARY

**Key words:** G-quadruplex, telomere, structural polymorphism, virtual screening, molecular dynamics simulations.

*In vitro* and *in vivo* studies showed that the formation of G-quadruplex structures in telomere region of human genome affects functioning of telomerase enzyme in cancer cells, which leads to antiproliferative effect. Simultaneous formation of several G-quadruplex structures on telomere region activates molecular mechanisms of DNA damage response, which leads to selective inhibition of cell growth in cancer cells. Therefore, telomere G-quadruplex DNA of human genome is considered as new molecular target in modern anticancer studies. Also, it has been shown experimentally, that interaction of these structures with low molecular weight compounds leads to their stabilization. The methods of virtual screening, molecular dynamics simulation and modeling are recognized as very effective methods in the studying of the dynamics of biomacromolecules' folding and their interaction with low molecular weight ligands. Today they are widely used in both scientific investigations and in industry.

The goal of thesis is studying interaction of low molecular weight ligands with telomeric G-quadruplex DNA using methods and advantages of modern bioinformatics and computational biology tools in the context of high structural polymorphism of these biomolecules.

*In silico* experiments of the interaction of several compounds (quercetin, taxifolin, artemisinin) with telomeric G-quadruplex were conducted with the goals of understanding peculiarities of interactions and adjustment of used computational methodologies. As a results of these *in silico* experiments and their corroboration with experimental evidences from existing literature several conclusions were drawn: low molecular weight ligands that bind G-quadruplex structures in grooves are more likely to also bind with double helix genomic DNA and in a lot of cases through intercalation, chemical modifications of these compounds can affect on binding mode (sites) of compounds on G-quadruplex structures, ligands that bind loops of G-quadruplex structures are less predisposed to intercalation to double helix genomic DNA and therefore have bigger potential therapeutic value as less genotoxic.

Virtual screening was conducted, using AutoDock Vina virtual screening tool, in order to investigate if there are ligands that have potential to simultaneously bind several telomeric G-quadruplex structural forms ("hybrid-1" – PDB ID: 2HY9, "hybrid-2" – PDB ID 2JSL, "propeller" – PDB ID 1KF1). Results of this experiments showed that there are ligands that have potential to bind three different G-quadruplex structural forms, and two of studied compounds (dicarboxamide derivatives) showed potential to bind to all three studied structures.

Based on accumulated experimental results one more virtual screening procedure was performed. This time library of chemical compounds was assembled from two data bases (NALDB, G4LDB), that contain affiliated data on G-quadruplex-binding ligands. Also, library was supplemented by analogues and derivatives of compounds that have been studied or mentioned in literature as potential G-quadruplex binders, such as: fluorenone, acridine, quindoline, bisindole, porhyrin, berberine and flavonoids, which were taken from PubChem data base. After filtering library from compounds with low adsorption, duplicates, Lepinski rule of 5 etc., the number of compounds in library were 16533. These compounds were screened for three telomeric G-quadruplex structural forms ("hybrid-1", "hybrid-2", "propeller"), that represent majority of different variations of G-quadruplex structures that

occur in telomeric region in *in vivo* conditions. As a result, we found 3 compounds that bind to all three studied structure. After that we performed molecular dynamics simulations of these compounds with each of structures separately, using GROMACS molecular dynamics software. Three of studied compounds: acridine derivate (PubChem ID: 4646438), fluorene derivate (PubChem ID: 37177818) and anthracene derivate (PubChem ID: 42948927) confirmed predicted interactions with high binding energies. Molecular dynamics simulations studies and their analysis showed that acridine and fluorene derivates bind to telomeric G-DNA through interacting with both: nucleotides of loops, and guanines of G-quartets, when anthracene derivate binds telomeric G-quadruplex DNA mostly through interacting with nucleotides of the molecule's loops.

Based on the conducted studies, it can be assumed that low molecular weight compounds that do not bind to the grooves of quadruplex structures are potentially less genotoxic. High-resolution structural data on the dynamics of the interaction processes, binding sites of compounds, energy indices, including the energy contribution of individual nucleotides to the interaction, were calculated and obtained from performed molecular dynamics simulations. As a result of the studies, new data were obtained on the features of the interaction of low molecular weight compounds with telomeric G-quadruplex DNA in the context of structural polymorphism of these biomolecules, which is of great value for research in the search, drug-design and modeling of potential drug compounds with the goal of improving current anticancer therapy.