

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ, ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ, ՄՇԱԿՈՒՅԹԻ և ՍՊՈՐՏԻ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

ՉԻԼԻՆԳԱՐՅԱՆ ԳԱՐՐԻ ՎԱՉԱԳԱՆԻ

ՑԱԾՐԱՄՈՒԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ՈՐՈՇ ՄԻԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՓՈԽԱԶԳԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ
ԹԵԼՈՄԵՐՆՈՅ Գ-ԶՎԱԳՐՈՒՊԼԵԶՍԱՅԻՆ ԴՆԹ-Ի ՀԵՏ

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

ՄԵՂՍԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2021

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ, НАУКИ, КУЛЬТУРЫ И СПОРТА 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 – 2021

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում

Գիտական ղեկավար՝

կեն. գիտ. թեկնածու, դոցենտ
Ա.Ա. Հովհաննիսյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝

Ֆիզ.-մաթ. գիտ դոկտոր, պրոֆեսոր
Վ.Բ. Առաքելյան

կենս. գիտ. թեկնածու
Մ.Ա. Շահինյան

Առաջատար կազմակերպություն՝


ՀՀ ԳԱԱ Միջազգային
գիտակրթական կենտրոն

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2021թ. դեկտեմբերի 8-ին ժամը 14⁰⁰-ին, Երևանի պետական համալսարանում գործող ՀՀ ԲՈԿ-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 2021 թ. հոկտեմբերի 28-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 физ.-мат. наук, профессор
В.Б. Аракелян

кандидат биол. наук
М.А. Шагинян

Ведущая организация:


Международный научно-образовательный центр НАН РА

Защита диссертации состоится 8-го декабря 2021г. в 14⁰⁰ 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 28-го октября 2021г.

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

 М.А. Парсаданян

ВВЕДЕНИЕ

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 [Moyzis 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 исследование характера взаимодействий низкомолекулярных соединений с теломерной G-квадруплексной ДНК и поиск селективно связывающихся с ними лигандов.

Для достижения поставленной цели нами были сформулированы следующие задачи:

- Провести сравнительный анализ взаимодействия кверцетина и дигидрокверцетина 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.
- Оптимизировать методологию виртуального скрининга для работы с множеством структурных форм теломерной G-квадруплексной ДНК.
- Провести виртуальный скрининг созданной библиотеки соединений и отобрать соединения, связывающиеся с большинством 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.
- Провести сравнительный анализ взаимодействия обнаруженных соединений и одного из лидирующих соединений - BRACO-19.

- Отобразить соединения, преимущественно связывающиеся с нуклеотидами петельных участков квадруплексных структур.

Научная новизна и научно-практическая значимость работы: В результате проведенных исследований были выявлены особенности взаимодействия низкомолекулярных соединений связывающихся с теломерными G-квадруплексными структурами. На основании полученных данных были обнаружены низкомолекулярные соединения потенциально связывающихся с рядом структурных форм теломерной G-квадруплексной ДНК (“hybrid-1”, “hybrid-2”, “propeller”, которые могут быть рассмотрены в качестве альтернативы известным соединениям, обладающим низкой селективностью и высокой генотоксичностью. Была разработана и оптимизирована методология для поиска и исследования особенностей взаимодействия низкомолекулярных соединений с рядом структурных форм теломерной G-квадруплексной ДНК. На примерах взаимодействий артемизинина, кверцетина и дигидрокверцетина с квадруплексной “hybrid-2” структурной формой теломерной G-квадруплексной ДНК (PDB ID: 2JSL) продемонстрирована возможность повышения селективности и понижения генотоксичности низкомолекулярных лигандов, связанное с взаимодействием соединений с петельными участками. Были обнаружены новые соединения: производные акридина, оксофлуорена и дигидроантрацена, которые взаимодействуют с петельными участками теломерной G-квадруплексной ДНК и могут быть рассмотрены в качестве альтернативы традиционным лигандам взаимодействующим с бороздками данных структур, вследствие чего обладающих низкой селективностью и высокой генотоксичностью. Получены данные об основных сайтах связывания, вовлеченности нуклеотидов петельных участков различных форм теломерной G-квадруплексной ДНК во взаимодействие с низкомолекулярными соединениями, а также энергетических характеристиках данных взаимодействий. Результаты исследования могут быть использованы для поиска и дизайна новых классов низкомолекулярных соединений, одновременно связывающихся с рядом структурных форм теломерной G-квадруплексной ДНК посредством взаимодействия с нуклеотидами петельных участков.

Полученные в данной работе результаты открывают новые возможности в области исследования взаимодействий низкомолекулярных лигандов с теломерной G-квадруплексной ДНК, в частности возможности дизайна соединений с учетом структурного полиморфизма молекулярной мишени. Полученные данные могут быть использованы в специальных лекционных курсах для студентов соответствующих кафедр ЕГУ, ЕГМУ, РАУ, а также в научных лабораториях по биофизике, молекулярной биологии и биоинформатике, занимающихся исследованием особенностей взаимодействия низкомолекулярных лигандов и бимолекулярных мишеней.

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), IV международной научной конференции Nanotechnologies and Biomedical Engineering, (Молдова, Кишинев, 2019), а также на семинарах и заседаниях кафедры Биоинженерии, биоинформатики и молекулярной биологии Института биомедицины и фармации РАУ.

Публикации: По теме диссертации опубликовано 9 работ (7 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 246 наименований. Диссертация изложена на 123 страницах, содержит 3 таблицы и 26 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).

Для поиска, идентификации и оценки взаимодействия низкомолекулярных лигандов с рядом структурных топологий теломерной G-квадруплексной ДНК была разработана и оптимизирована методология, включающая ряд широко используемых, а также оригинальных, разработанных нами, биоинформационных методов (Рис. 1)

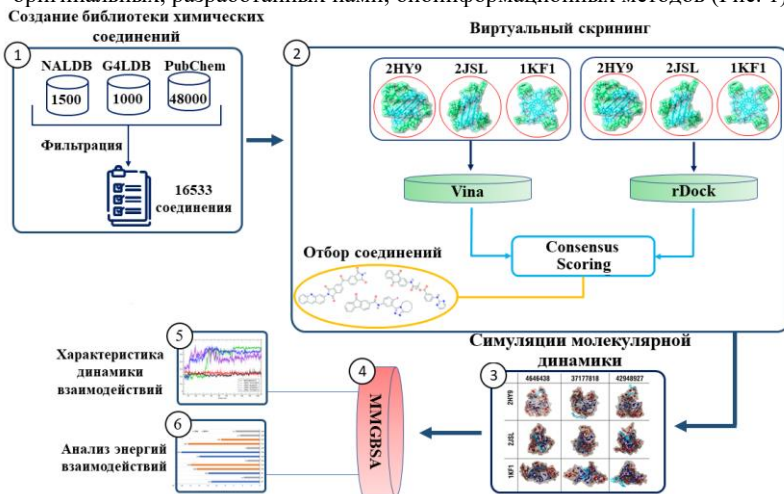


Рисунок 1. Схематическая диаграмма использованной методологии.

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 петли 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. Для проведения виртуального скрининга была разработана специальная методология, в которую были имплементированы различные методы по оптимизации и улучшению точности молекулярного докинга, в частности “consensus-scoring”. Подход “Consensus-scoring”-а подразумевает использование различных программных пакетов для виртуального скрининга (в нашем случае – AutoDock Vina и rDock) и используется для валидации результатов молекулярного докинга, что увеличивает надежность полученных результатов [Chilingaryan et al, 2021; Feher, 2006]. Виртуальный скрининг созданной библиотеки химических соединений был произведен с помощью программных пакетов AutoDockVina [Trott & Olson, 2010] и rDock [Ruiz-Carmona et al., 2014] с тремя вышеописанными структурами теломерной G-квадруплексной ДНК. AutoDockTools [Huey & Morris, 2008] был использован для конфигурации параметров симуляций. Используя данный программный пакет, были определены боксы, размер которых не превышал 27,000 Å³, а значение “exhaustiveness” - 10, что рекомендовано для проведения виртуального скрининга при малых размерах боксов [Jaghoori, 2016].

In vitro исследование взаимодействия артемизинина с геномной ДНК. Исследование прямого взаимодействия артемизинина (АРТ) (TRC, Канада) с геномной ДНК опухолевых ткани Саркомы S-180 в зависимости от концентрации проводили измерением электрофоретической подвижности В-формы ДНК в 1%-ом агарозном геле (PerfectBlue TM Horizontal Mini Gel System, PeQlab, Германия). Геномная ДНК была выделена из небольшого объема опухолевой ткани Саркома S-180 с использованием набора reqGOLD MicroSpin Комплект ДНК (PeqLab Biotechnologie GmbH, Германия) и затем равное количество ДНК было смешано с различной концентрацией АРТ в соотношении 1:1 (V/V) в течение 30 минут, 24 и 48 часов. АРТ растворяли в 10 мл диметилсульфоксида (ДМСО) до концентраций 1, 5, 10, 25, 50 и 100 мМ. Для приготовления буферных растворов использовали трис-ацетатный (Tris, Bobo Biotechnology Co., Ltd., Китай) буферный раствор (ТАЕ). Для приготовления 1×ТАЕ буфера к 20 мл концентрированного 50×ТАЕ буфера добавляли дистиллированную воду и, тщательно перемешивая, доводили до 1 л. 1

г агарозы растворяли в 100 мл 1×TAE буфера [Wangetal.,2012]. Электрофорез на агарозном геле проводили при 100 В, 60 мин, для обнаружения миграционных полос ДНК под УФ-осветителем (E-BOX VX2-VILBER LOURMAT, PeQlab, Германия). Артемизинин растворяли в 10 мл диметилсульфоксида (ДМСО) до концентраций 1, 5, 10, 25, 50 и 100 мМ.

Биологическая повторность опытов 4 – 6 кратная при проведении 2 – 3 серий опытов в каждом. 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^+ и Cl^- , 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 кинетической энергии), системы были эквilibрированы по давлению (~ 1 атм.). После эквilibрами 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 MM-PBSA 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.

Очень важным является сравнительный анализ различий в динамике и характере взаимодействия аналогов одного класса химических соединений. С этой целью были проведены молекулярно динамические симуляции (по 200 нс) кверцетина и его дигидро-аналога таксифолина с “hybrid-1” структурной формой теломерной G-квадруплексной ДНК (PDB ID: 2HY9).

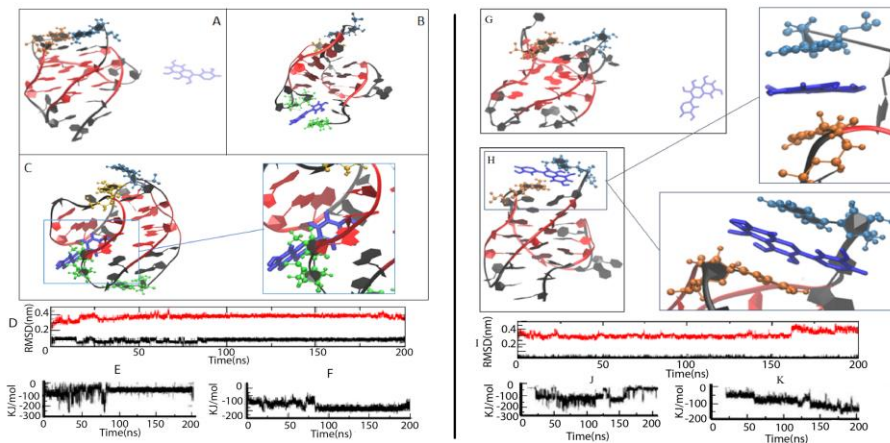


Рисунок 2. Взаимодействие кверцетина и дигидрокверцетина (таксифолина) с “hybrid-1” структурной формой теломерной G-квадруплексной ДНК. А и G - начальные точки симуляций. В) Взаимодействие кверцетина с ТТА петлей квадруплекса. С) Взаимодействие кверцетина с бороздкой. Н) Взаимодействие таксифолина с А26 и А15. D) и I) - RMSD показатели симуляций (ДНК - красный, лиганд - черный). E) и J) Электростатические показатели. F) и K) - Энергии Ван-дер-Ваальса. Длительность симуляций 200 нс.

Взаимодействие кверцетина с “hybrid-1” структурной формой теломерной G-квадруплексной ДНК проходит в два этапа: первый этап характеризуется флуктуационными движениями молекулы кверцетина от ТТА петли в сторону широкой бороздки; второй этап характеризуется стабилизацией кверцетина в глубине бороздки (Рис. 2С), взаимодействием с гуанинами в 4, 23 и 24 положениях. В отличие от кверцетина, взаимодействие таксифолина происходит с адениновым триплетом структуры (в основном с аденинами в 15 и 26 положениях, Рис. 2Н). Взаимодействие обоих соединений характеризуется стабильностью (Рис. 2D и 2I), и происходит с сопоставимыми значениями электростатической энергии и энергии Ван-дер-Ваальса (Рис. 2E, 2F, 2J и 2K).

Сравнительный анализ двух этих симуляций позволяет заключить, что небольшая химическая модификация может оказать сильное влияние на характер взаимодействия низкомолекулярного лиганда с G-квадруплексной структурой. Подавляющее количество соединений, исследуемых для взаимодействия с квадруплексными структурами, аналогично кверцетину, связываются с бороздками G-квадруплексных структур. Ввиду незначительных структурных различий между бороздками квадруплексных структур и бороздками В-формы двухцепочечной ДНК, большинство данных соединений обладают высокой генотоксичностью, что ограничивает возможность их использования в качестве терапевтических агентов. С терапевтической точки зрения, значимым выступает поиск или дизайн соединений, которые селективно 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, потенциально менее генотоксичны и обладают большим терапевтическим потенциалом.

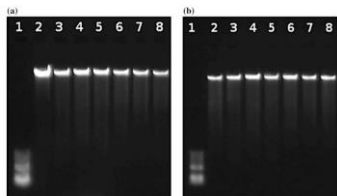


Рисунок 4. Электрофоретическая подвижность ДНК через 24 ч. (а) и 48 ч. (b) при инкубации с АРТ. 1 – маркер; 2 – геномная ДНК S-180; 3-8 – геномная ДНК S-180 с увеличением концентрации АРТ: 3 - 1 μМ, 4-5 μМ, 5-10 μМ, 6-25 μМ, 7- 50 μМ, 8 – 100 μМ.

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 форму G-квадруплексной ДНК, а ряд структурных форм.

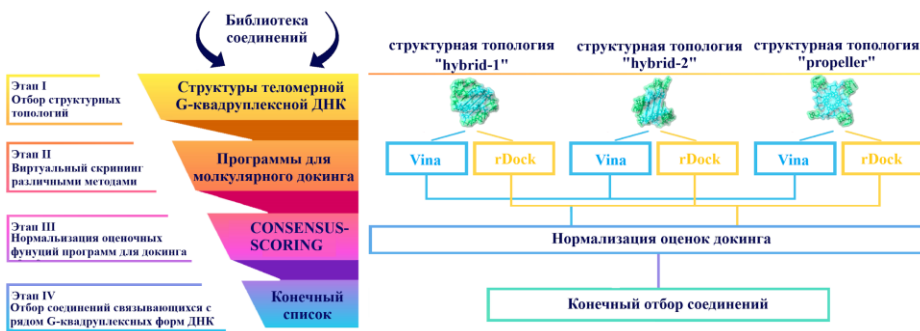


Рисунок 5. Схематическая диаграмма, отображающая все этапы процесса виртуального скрининга.

С этой целью, мы провели поиск низкомолекулярных лигандов обладающих потенциалом к взаимодействию с тремя структурными формами теломерной G-

квадруплексной ДНК (“hybrid-1”, “hybrid-2” и “propeller”), используя разработанную нами методологию [Chilingaryan et al., 2021] для виртуального скрининга, оптимизированную для работы с множеством структурных конформаций (Рис. 5).

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, перилена, 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 докинга 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-5H-[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.

В дальнейшем для более детального анализа полученных результатов были проведены молекулярно динамические симуляции обнаруженных трех соединений с тремя исследованными структурными формами теломерной G-квадруплексной ДНК (по 200 нс), а также был произведен сравнительный анализ взаимодействия обнаруженных соединений и одного из лидирующих соединений - BRACO-19.

Результаты симуляций молекулярной динамики отобранных соединений и BRACO-19 с “hybrid-1”, “hybrid-2” и “propeller” структурными формами теломерной G-квадруплексной ДНК. Все три обнаруженных соединения: 2-акридин-3-ил-5-(1,3-диоксоизоиндол-5-карбонил)изоиндол-1,3-дион (PubChem ID: 4646438), N-[4-Флуоро-3-(6,7,8,9-тетрагидро-5H-[1,2,4]триазоло [4,3-а]азепин-3-yl)фенил]-9-оксофлуорен-карбоксамид (PubChem ID: 37177818) и 1-[(9,10-Диоксо-9,10-дигидроантрацен-2-yl)карбамоил]этил,3-[(пиримидин-2-ил)амино]бензоат (PubChem ID: 42948927) продемонстрировали стабильное (RMSD < 0.2 нм) взаимодействие со всеми тремя исследованными структурными топологиями теломерной G-квадруплексной ДНК (Рис. 6).

В случае структурной формы “hybrid-1” (PDB ID: 2HY9), исследованные соединения согласно показателю энергии связывания были ранжированы в следующем порядке: BRACO-19 (-198.427 ± 1.873 кДж/моль), 37177818 (-117.095 ± 1.855 кДж/моль), 42948927 (-96.099 ± 7.479 кДж/моль) и 4646438 (-41.032 ± 8.810 кДж/моль). В случае структурной формы “hybrid-2” (PDB ID: 2JSL), исследованные соединения согласно показателям энергии связывания были ранжированы в следующем порядке: 4646438 (-236.360 ± 5.576 кДж/моль), 37177818 (-198.427 ± 1.873 кДж/моль), 42948927 (-175.783 ± 13.387 кДж/моль) и BRACO-19 (-145.205 ± 4.911 кДж/моль). Со структурной формой “propeller” (PDB ID: 1KF1) из исследованных соединений наиболее низкие показатели энергии продемонстрировало соединение 4646438 (-179.806 ± 7.648 кДж/моль), остальные соединения основываясь на энергию связывания ранжированы в следующем порядке: BRACO-19 (-145.383 ± 3.614 кДж/моль), 37177818 (-131.749 ± 1.718 кДж/моль) и 42948927 (-103.343 ± 4.569 кДж/моль). Из трех исследованных структурных форм теломерной G-

квадруплексной ДНК, только в одном случае (“hybrid-1” форма) BRACO-19 продемонстрировал значительное преимущество в показателях энергии связывания. В случае двух других структурных форм (“hybrid-2” и “propeller”), отобранные соединения продемонстрировали или более низкие, или же сопоставимые с BRACO-19 показатели энергии связывания.

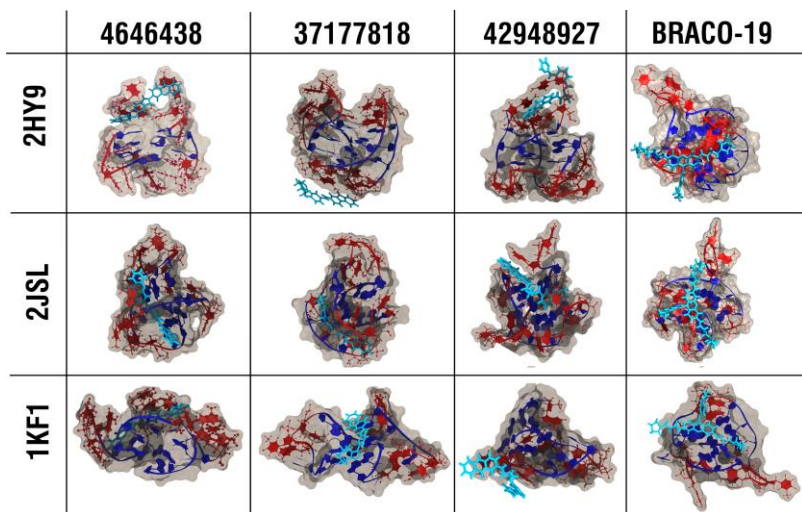


Рисунок 6. Сайты связывания обнаруженных производных акридина, оксофлуорена и дигидроантрацена и BRACO-19 (окрашены голубым цветом) с тремя структурными топологиями теломерной G-квадруплексной ДНК. Синим цветом окрашены гуанины G-квартетов, красным – нуклеотиды петельных участков.

Другим, одним из наиболее важных аспектов исследования, представляет собой изучение различий во вовлеченности нуклеотидов исследованных структурных форм теломерной G-квадруплексной ДНК в взаимодействие с отобранными соединениями и сравнение этих данных с BRACO-19. Со структурной формой “hybrid-1” (Рис. 7), BRACO-19 взаимодействует в основном с гуанинами, формирующими квартеты (G18, G22, G23 и G24), в то время как соединение 42948927 продемонстрировало исключительно низкую энергию связывания со следующими нуклеотидами петель G-квадруплексной структуры: A15, A25 и A26. Соединение 37177818 продемонстрировало относительно сильное взаимодействие с G6, G11, G12, T13, T14, A15. A25 и A26. Соединение 4646438 взаимодействует со сопоставимыми значениями энергии связывания со следующими нуклеотидами: G6, T14, A15, G18, A25 и A26.

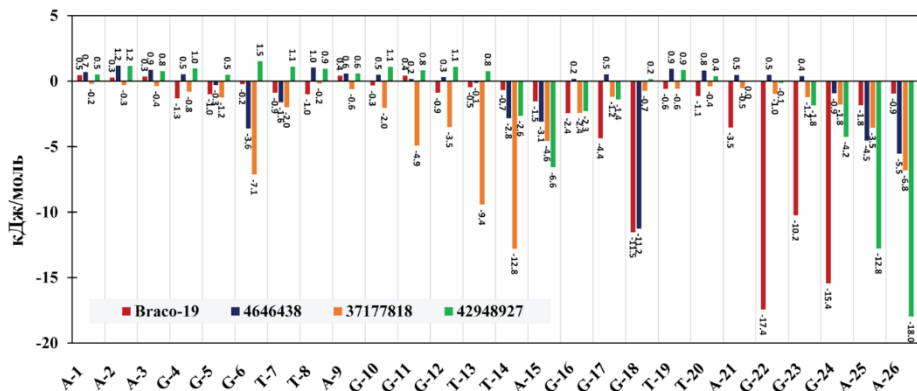


Рисунок 7. Основные нуклеотиды структурной формы “hybrid-1” (PDB ID: 2HY9) теломерной G-квадруплексной ДНК, взаимодействующие с отобранными соединениями и BRACO-19.

В случае структурной формы “hybrid-2” теломерной G-квадруплексной ДНК (Рис. 8), BRACO-19 аналогичным образом преимущественно взаимодействует с гуанинами четвертов: G3, G21, G22, G23. Соединение 42948927 продемонстрировало относительно сильное взаимодействие со следующими нуклеотидами G-квадруплексной структуры: T1, G3, G4, T13, A14, G15, G21, G22, G23, T24. Соединение 37177818 продемонстрировало взаимодействие с G3, T7, A8, G9, G23, T24, T25. Соединение 4646438 продемонстрировало исключительно низкие показатели энергии связывания с A2, G3, T12, G11, а также относительно низкие показатели энергии с G4, T13, G21 и G22.

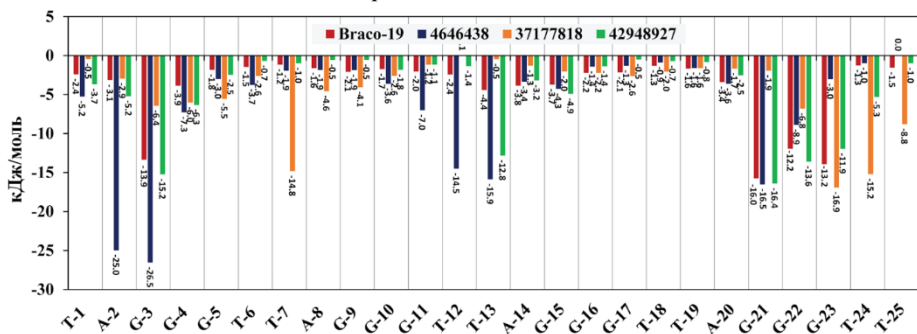


Рисунок 8. Основные нуклеотиды структурной формы “hybrid-2” (PDB ID: 2JSL) теломерной G-квадруплексной ДНК, взаимодействующие с отобранными соединениями и BRACO-19.

В случае структурной формы “propeller” теломерной G-квадруплексной ДНК (Рис. 9), BRACO-19 преимущественно взаимодействует с исключительно низкими показателями энергии связывания с гуанинами четвертов: G10, G21, G22 и также взаимодействует с некоторыми нуклеотидами петли: T17 и T18. Соединение 42948927 продемонстрировало относительно сильное взаимодействие со следующими нуклеотидами G-квадруплексной структуры: T11, T12, A13 и G14. Соединение 37177818 продемонстрировало

взаимодействие с G4, T5, G10, G16, A19, G20, G22. Соединение 4646438 продемонстрировало относительно низкие показатели энергии связывания с T5, A7, G8, T11, T12, A13, G14, и G15.

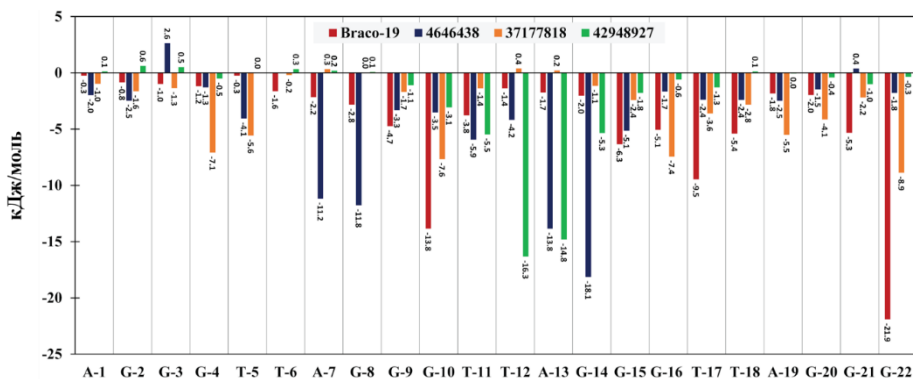


Рисунок 9. Основные нуклеотиды структурной формы “propeller” (PDB ID: 1KF1) теломерной G-квадруплексной ДНК, взаимодействующие с отобранными соединений и BRACO-19.

Таким образом, все 3 соединения продемонстрировали потенциал к связыванию трех структурных топологий теломерной G-квадруплексной ДНК. Три отобранных соединения связываются со всеми структурами с относительно низкими показателями энергии связывания, кроме соединения 4646438, которое продемонстрировало сравнительно слабую энергию связывания с одной из структурных топологий теломерной G-квадруплексной ДНК (“hybrid-1”, PDB ID: 2HY9).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для поиска, идентификации и исследования взаимодействия низкомолекулярных соединений с теломерной G-квадруплексной ДНК была разработана оптимизированная методология, включающая ряд принятых, а также оригинальных, разработанных нами, биоинформационных методов (Рис. 1 и 5). 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 посредством интеркаляции, он аналогичным образом взаимодействует и с двухцепочечной В-формой ДНК, что приводит к проявлению генотоксичности. Отсутствие одной двойной связи и смещение гидроксильной группы в структуре дигидрокверцетина приводит к связыванию соединения с петлей квадруплексной структуры, что возможно является одной из причин значительно более низких показателей генотоксичности дигидрокверцетина в сравнении с кверцетином. К аналогичному выводу приводит корреляция между различиями в сайтах связывания АРТ, ДГА и ДДГА с “hybrid-2” структурной формой теломерной G-квадруплексной ДНК и различиях в генотоксичности этих соединений.

На основании полученных результатов нами было решено провести поиск низкомолекулярных соединений, обладающих потенциалом к одновременному связыванию нескольких структурных форм теломерной G-квадруплексной ДНК, посредством взаимодействия с нуклеотидами петельных участков. Для этой цели нами было проведено исследование с использованием различных биоинформатических методов и подходов для поиска и дизайна лекарственных соединений, в том числе оригинальных методов, разработанных в рамках данной работы. В результате проведенных исследований нами было обнаружено три подобных 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]зепин-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 топологическими структурами теломерной G-квадруплексной ДНК (“propeller”, “hybrid-1”, “hybrid-2”).

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. Сравнительный анализ полученных данных с показателями одного из наиболее изученных лигандов, трехзамещенного акридинового амида (BRACO-19), продемонстрировал большой потенциал отобранных соединений в качестве новых низкомолекулярных соединений способных к взаимодействию с рядом структурных форм теломерной G-квадруплексной ДНК. Усредненное значение энергии связывания BRACO-19 с тремя структурными формами теломерной G-квадруплексной ДНК (“hybrid-1”, “hybrid-2” и “propeller”) составляет -152 кДж/моль, в то время как отобранные соединения взаимодействуют со следующими усредненными значениями энергии связывания: -152 кДж/моль (PubChem CID: 4646438), -149 кДж/моль (PubChem CID: 37177818) и -125 кДж/моль (PubChem CID: 42948927). Сопоставимые значения энергий связывания отобранных соединений с BRACO-19 говорят о их потенциальной высокой аффинности по отношению к теломерной G-квадруплексной ДНК. При этом наиболее важным отличием между отобранными соединениями и BRACO-19 являются сайты связывания с теломерной G-квадруплексной ДНК. В то время как BRACO-19 был специально разработан для взаимодействия преимущественно с бороздками квадруплексных структур, отобранные соединения взаимодействуют преимущественно с нуклеотидами петельных участков. Недостаточные различия в физико-химических и структурных параметрах между бороздками формирующимися в квадруплексных структурах и В-форме ДНК отражаются на относительно более высокой генотоксичности классических низкомолекулярных соединений, в том числе BRACO-19, взаимодействующих с данными участками. Отобранные нами соединения (PubChem CIDs: 4646438, 37177818 и 42948927) взаимодействуют преимущественно с нуклеотидами петельных участков, уникальных для квадруплексных структур и отсутствующих в В-форме ДНК. Ввиду данных особенностей, разработанный подход к поиску низкомолекулярных соединений, взаимодействующих с теломерной G-квадруплексной ДНК предоставляет возможность для нахождения соединений, обладающих большей селективностью к квадруплексным структурам и меньшим риском ассоциированным генотоксичностью.

Данный подход предоставляет альтернативу поиска классическим соединениям, которые в подавляющем большинстве разрабатываются для взаимодействия с бороздками квадруплексных структур.

Таким образом, на основании проведенных исследований и полученных результатов, была разработана эффективная методология для поиска и идентификации низкомолекулярных соединений взаимодействующих преимущественно с петельными участками теломерной G-квадруплексной ДНК. Такой подход увеличивает количество потенциальных противоопухолевых лекарственных препаратов, уменьшает время поиска и предоставляет альтернативный подход для дизайна новых классов низкомолекулярных соединений, одновременно связывающихся с рядом структурных форм теломерной G-квадруплексной ДНК посредством взаимодействия с нуклеотидами петельных участков.

ВЫВОДЫ

1. Кверцетин взаимодействует 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. Ввиду несущественных различий в структурных и физико-химических параметрах бороздок G-квадруплексных структур и канонической В-формы ДНК, низкомолекулярные лиганды, взаимодействующие с бороздками данных структур, обладают низкой селективностью и высокой генотоксичностью.

4. Взаимодействие низкомолекулярных соединений с петельными участками, специфичными для теломерной G-квадруплексной ДНК, повышает их селективность по отношению к данным структурам, а также снижает потенциальную генотоксичность из-за предотвращения возможности интеркаляции.

5. В отличие от лидирующего соединения BRACO-19, 2-акридин-3-ил-5-(1,3-диоксоизоиндол-5-карбонил)изоиндол-1,3-дион, N-[4-Флуоро-3-(6,7,8,9-тетрагидро-5H-[1,2,4]триазоло[4,3-a]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 преимущественно с нуклеотидами петельных участков трех структурных форм теломерной G-квадруплексной ДНК (“hybrid-1”, “hybrid-2”, “propeller”) с высокой энергией связывания.

6. Определены новые группы производных акридина, флуорена и дигидроантрацена обладающие высокой аффинностью к теломерной G-квадруплексной ДНК и потенциалом в качестве противоопухолевых препаратов.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. **Chilingaryan, G.**, Abelyan, N., Sargsyan, A., Nazaryan, K., Serobian, A., & Zakaryan, H. Combination of consensus and ensemble docking strategies for the discovery of human dihydroorotate dehydrogenase inhibitors. *Scientific Reports*, 11, 11417 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91069-7>

2. Ginosyan S., **Chilingaryan G.**, Grabski, H., Ghulikyan L., Ayvazyan M., Tiratsuyan S. Mode of Artemisinins’ Action on Oxidative Stress, Genomic and G-Quadruplex DNA. In the 4th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering, Springer, Cham, Chisinau, Moldova, 2020, 77, 543-548. https://doi.org/10.1007/978-3-030-31866-6_97.

3. **Chilingaryan G.**, Tiratsuyan S., Hovhannisyan A. Interaction of Small Molecules with Telomeric G-Quadruplex DNA. Abstract book of 5th International Conference on Biotechnology and Health 2020, Yerevan, Armenia, October 29–31, 2020, 45. ISBN 978-9939-67-254-0.
4. 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 4th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering, 2019, Chisinau, Moldova. p.135.
5. **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, 141-149.
6. **Chilingaryan 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, 57-61.
7. **Чилингарян Г.**, Оганесян А., Гиносян С., Тирацуюн 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, 9-12.
8. **Чилингарян Г.**, Абелян Н., Тирацуюн 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, 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 2016, 1, 128-134.

ՑԱԾՐԱՄՈՒԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ՈՐՈՇ ՄԻԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ
ՓՈԽԱԶԳԵՅՈՒԹՅՈՒՆԸ ԹԵԼՈՄԵՐԱՅԻՆ G-ՔՎԱԴՐՈՒՊԼԵԶՍԱՅԻՆ ԴՆԹ-Ի ՀԵՏ
ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Բանալի բառեր` G-քվադրուպլեքս, թելոմեր, կառուցվածքային պոլիմորֆիզմ, վիրտուալ սքրինինգ, 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 ակտիվության վրա, ինչը հանգեցնում է հակապրոլիֆերատիվ ազդեցության: Թելոմերային հատվածներում մի քանի G-քվադրուպլեքսային կառուցվածքների միաժամանակյա ձևավորումը ակտիվացնում է ԴՆԹ-ի վնասման ճանաչման մոլեկուլային մեխանիզմները, ինչը հանգեցնում է տրանսֆորմացված բջիջների աճի ընտրովի արգելակմանը: Հետևաբար, ժամանակակից հակաքաղցկեղային հետազոտություններում մարդու գենոմի թելոմերային G-քվադրուպլեքսային ԴՆԹ-ն հանդիսանում է մոլեկուլային նոր թիրախ: Փորձնականորեն ցույց է տրվել նաև, որ այդ կառուցվածքների փոխազդեցությունը ցածրամոլեկուլային միացությունների հետ հանգեցնում է դրանց կառուցվածքի կայունացմանը: Վիրտուալ սկրինինգի, մոդելավորման և մոլեկուլային դինամիկայի սիմուլյացիայի մեթոդները ճանաչվում են որպես կենսամակրոմոլեկուլների փաթեթավորման և ցածրամոլեկուլային լիգանդներով փոխազդեցության ուսումնասիրության բարձրորակ և արդյունավետ մեթոդներ: Սույն աշխատանքի նպատակն է ուսումնասիրել ցածրամոլեկուլային լիգանդների փոխազդեցությունը թելոմերային G-քվադրուպլեքսային ԴՆԹ-ի հետ` օգտագործելով ժամանակակից կենսատեղեկատվական և հաշվողական կենսաբանության մեթոդների առավելությունը այդ կենսամակրոմոլեկուլների կառուցվածքային պոլիմորֆիզմի համատեքստում: Այդ նպատակով նախագծվել և օպտիմալացվել են համակարգչային հետազոտության մի շարք մեթոդներ` G-քվադրուպլեքս կապող դեղամիջոցների նախագծման, բացահայտման, նույնականացման և դրանց փոխազդեցությունների վերլուծության համար:

Թելոմերային G-քվադրուպլեքսների հետ որոշակի միացությունների (քվեթրետին, տաքսիֆոլին, արտեմիզինին) փոխազդեցության առանձնահատկությունները բացահայտելու և օգտագործված հաշվարկային մեթոդաբանությունների ճշգրտման նպատակով իրականացվել են *in silico* ուսումնասիրություններ, որոնց արդյունքները համադրելով գրականության փորձնական տվյալների հետ, արվել են համապատասխան եզրակացություններ:

- ցածրամոլեկուլային միացությունները լիգանդները, որոնք կապվում են G-քվադրուպլեքսային կառուցվածքների ակոսների հետ, ամենայն հավանականությամբ, կապվում են նաև գենոմային երկշղթա ԴՆԹ-ի հետ և շատ դեպքերում ինտերկալյացիայի եղանակով:

- լիգանդները, որոնք կապվում են G-քվադրուպլեքսների հանգույցների հետ, ավելի քիչ են հակված ինտերկալյացիայի եղանակով փոխազդել ԴՆԹ կրկնակի պարույրի հետ:

- ցածրամոլեկուլային միացությունների քիմիական ձևափոխությունները կարող են հանգեցնել թիրախների` G-քվադրուպլեքսների հետ փոխազդեցության եղանակների և կայքերի փոփոխության վրա:

Համապատասխան լիգանդների նախագծումն ու նույնականացումը հակաքաղցկեղային թերապիայում ունի կիրառական մեծ նշանակություն:

Թեզի շրջանակներում իրականացվել են G-քվադրուպլեքսային ԴՆԹ-ի մի քանի կառուցվածքային ձևերի (“hybrid-1” – PDB ID: 2HY9, “hybrid-2” – PDB ID 2JSL, “propeller”

– PDB ID 1KF1) հետ մեր կողմից մշակված օպտիմալացված վիրտուալ զննումներ: Փորձերի արդյունքները ցույց են տվել, որ կան լիզանդներ, որոնք կարող են կապվել G-քվադրուպլեքի երեք տարբեր կառուցվածքային ձևերի հետ, և ուսումնասիրված միացություններից երկուսը (դիկարբոքսամիդային ածանցյալներ) ցույց են տվել ընտրված երեք թիրախ կառույցների հետ կապվելու ունակություն: 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-քվադրուպլեքները կապող լիզանդների վերաբերյալ փոխկապակցված տվյալներ: Բացի այդ, գրադարանը համալրվել է անալոզներով և միացությունների ածանցյալներով, որոնք ուսումնասիրվել կամ հիշատակվել են գրականության մեջ, որպես G-քվադրուպլեքների հետ կապվող պոտենցիալ միացություններ, ինչպիսիք են ֆլորենոնային, ակրիդինային, հինդոլինային, բիսինդոլային շարքերը, պորֆիրինները, բերբերինները և ֆլավոնոիդները, որոնք վերցվել են PubChem տվյալների բազայից: Գրադարանում միացությունների քանակը ցածր կլանման, կրկնօրինակների, Լեպինսկուի հինգ կանոնի համաձայն ֆիլտրելուց հետո կազմել է 16533: Այդ միացությունները *in silico* պայմաններում ստուգվել են թելոմերային հատվածներում հանդիպող G-քվադրուպլեքային երեք կառուցվածքային պոլիմորֆ ձևերի հետ (“hybrid-1”, “hybrid-2”, “propeller”) կապվելու ունակությամբ:

Ստացված արդյունքների հիման վրա, հայտնաբերել ենք երեք միացություն՝ ակրիդինի (PubChem ID: 4646438), ֆլուորինի (PubChem ID: 37177818) և անտրացենի (PubChem ID: 42948927) ածանցյալներ, որոնք կապման բարձր էներգիաներով փոխազդում են ուսումնասիրված բոլոր երեք պոլիմորֆ կառույցների հետ: Դրանից հետո իրականացվել է այդ միացությունների մոլեկուլային դինամիկայի սիմուլյացիաներ GROMACS ծրագրային փաթեթի միջոցով՝ յուրաքանչյուր կառուցվածքի հետ առանձին-առանձին: Փոխազդեցության գործընթացների դինամիկայի, միացությունների պարտադիր տեղանքների, էներգիայի ինդեքսների, այդ թվում առանձին նուկլեոտիդների էներգիայի ներդրումը և փոխազդեցության վերաբերյալ տվյալները հաշվարկվել ու ստացվել են կատարված մոլեկուլային դինամիկայի սիմուլյացիաների շնորհիվ: Բացահայտված միացությունների և առաջատար միացության (BRACO-19) մոլեկուլային դինամիկայի սիմուլյացիաները և դրանց վերլուծությունը ցույց են տվել, որ հայտնաբերված միացությունները հիմնականում փոխազդում են թելոմերային G-քվադրուպլեքների ԴՆԹ-ի հանգույցների հետ, իսկ BRACO-19-ը՝ որպես դասական G-քվադրուպլեքների հետ փոխազդող լիզանդ, կապվում է ԴՆԹ-ի ակոսների հետ: Ուսումնասիրությունների արդյունքում ստացված նոր տվյալները յույս են սփռում ցածրամոլեկուլային միացությունների թելոմերային G-քվադրուպլեքային ԴՆԹ-ի հետ, դրանց կառուցվածքային պոլիմորֆիզմի համատեքստում, փոխազդեցության առանձնահատկությունների վերաբերյալ ունեցած գիտական տեղեկատվության վրա, ինչը մեծ նշանակություն ունի բուժական ակտիվություն ունեցող պոտենցիալ դեղամիջոցների հետազոտության դժվարին գործում:

Իրականացված ուսումնասիրությունների հիման վրա կարելի է ենթադրել, որ ցածրամոլեկուլային միացությունները, որոնք չեն փոխազդում G-քվադրուպլեքային կառուցվածքների ակոսների հետ, այլ մեծ ընտրողականությամբ կապվում են հանգույցների նուկլեոտիդների հետ, պակաս գեներատոքսիկ են: Կատարված ուսումնասիրությունները ժամանակակից հակաքաղցկեղային թերապիայի մոդեռնիզացման նպատակով նոր հնարավորություններ են բացում դեղամիջոցների նախազգծման/դիզայնի, մոդելավորման, G-քվադրուպլեքների հետ կապվող լիզանդների հայտնաբերման գործընթացում:

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 the telomere region of the human genome affects the functioning of telomerase enzyme in cancer cells, which leads to antiproliferative effects. Simultaneous formation of several G-quadruplex structures on the 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 the human genome is considered as a 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. Computer-aided drug design and discovery methods are recognized as very effective in the study 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 the thesis was the study of 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. For this purpose, computer-aided drug design and discovery pipeline was designed and optimized for the identification of G-quadruplex binding small molecules and analysis of their interactions.

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 groves 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 binding modes of these 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 more selective and less genotoxic compounds.

Virtual screening was conducted using optimized virtual screening pipeline developed within the scope of the thesis with the goal of finding 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 these 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 the library of chemical compounds was assembled from two databases (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, porphyrin, berberine and flavonoids, which were taken from PubChem database. After filtering the library from compounds with low adsorption, duplicates, Lepinski rule of 5 etc., the number of compounds in the library was 16533. These compounds were screened for three telomeric G-quadruplex structural forms ("hybrid-1", "hybrid-2", "propeller"),

that represent the 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 structures: acridine derivative (PubChem ID: 4646438), fluorene derivative (PubChem ID: 37177818) and anthracene derivative (PubChem ID: 42948927). After that we performed molecular dynamics simulations of these compounds with each of the structures separately, using GROMACS molecular dynamics software. 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 the performed molecular dynamics simulations. Molecular dynamics simulations of identified compounds and lead-compound (BRACO-19) and their analysis showed that identified compounds predominantly interact with the loops of telomeric G-quadruplex DNA, while BRACO-19, as the most of classical G-quadruplex-binding small molecules interact with the grooves. 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. Based on the conducted studies, it can be assumed that low molecular weight compounds that predominantly interact with the loops' nucleotides, instead of grooves, of quadruplex structures are potentially more selective and less genotoxic. Performed study opens new opportunities for drug design and discovery of novel potent G-quadruplex binding small molecules.