

Міністерство освіти і науки України  
Національний університет «Києво-Могилянська академія»  
Факультет природничих наук  
Кафедра біології

**Кваліфікаційна робота**  
освітній ступінь - магістр

на тему **«НОВІ ПОХІДНІ ЦІАНІНУ ЯК ІНГІБІТОРИ  
ТОПОІЗОМЕРАЗИ І ТА ТЕЛОМЕРАЗИ *IN VITRO*»**

Виконав студент 2-го року навчання  
напряму підготовки

**Шведюк Іван Сергійович**

Керівники:  
Білько Н.М.  
професор, доктор медичних наук

Негруцька В. В.  
кандидат біологічних наук, старший  
науковий співробітник Інституту  
молекулярної біології і генетики НАН  
України;

Рецензент:

Кваліфікаційну роботу захищено  
з оцінкою \_\_\_\_\_

Секретар ЕК \_\_\_\_\_  
Пахаренко М. В.  
«\_\_\_\_» червня 2020 року

Київ – 2020

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	5
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	9
1.1. Ферменти сімейства топоізомераз.....	9
1.1.1. Загальна характеристика та класифікація ДНК-топоізомераз.....	9
1.1.2. Загальна характеристика топоізомераз підтипу ІВ.....	11
1.1.3. Будова топоізомерази І людини.....	13
1.1.4. Активний центр та механізм дії топоізомерази І.....	15
1.2. Ферменти сімейства теломераз.....	17
1.2.1. Загальна характеристика теломераз.....	17
1.2.2. Будова теломерази людини.....	19
1.3. Сполуки, що пригнічують активність теломерази та топоізомерази І.....	21
1.3.1. Інгібітори топоізомерази підтипу ІВ.....	21
1.3.2. Інгібування теломерази.....	22
1.3.3. Похідні ціаніну як інгібітори теломерази та топоізомерази.....	23
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	25
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	25
2.1. Матеріали та реактиви, що були використані у роботі.....	25
2.2. Матеріали, реактиви та обладнання, що було використано у роботі.....	25
2.3. Визначення активності похідних ціаніну як інгібіторів топоізомерази І...	26
2.3.1. Постановка реакції релаксації суперспіралізованої ДНК.....	26
2.3.2. Визначення концентраційної залежності інгібування топоізомерази.....	27
2.3.3. Електрофоретичне розділення продуктів реакції релаксації ссДНК.....	27
2.3.4. Візуалізація та аналіз результатів реакції релаксації ссДНК.....	27
2.3.5. Визначення способу зв'язування досліджуваних сполук з ДНК.....	28
2.4. Визначення активності похідних ціанінів як інгібіторів теломерази.....	30
2.4.1. Виділення лізату клітин із теломеразною активністю.....	30

2.4.2. Визначення інгібувальної активності досліджуваних сполук.....	30
2.4.3. Очищення від досліджуваних сполук продуктів реакції теломеризації..	31
2.4.4. Проведення ПЛР.....	31
2.4.5. Ідентифікація результатів.....	32
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	33
3.1. Дослідження впливу ціанінових похідних на активність топоізомерази I.	33
3.1.1. Дослідження біологічної активності ціанінів як інгібіторів топоізомеразної активності.....	35
3.1.2. Визначення способу зв'язування досліджуваних сполук з ДНК.....	39
3.2. Визначення способу зв'язування досліджуваних сполук з ДНК.....	45
3.2.1. Дослідження біологічної активності похідних ціаніну як інгібіторів теломеразної активності.....	45
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	47
ВИСНОВКИ.....	49
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	50

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

ссДНК	<b><u>С</u>упер<u>сп</u>іралізована ДНК</b>
FID	<b><u>F</u>luorescent <u>I</u>ntercalator <u>D</u>isplacement</b>
БЕ	<b><u>Б</u>ромистий <u>Е</u>тидій</b>
NLS	<b><u>N</u>uclear <u>L</u>ocalization <u>S</u>ignal</b>
ПААГ	<b><u>п</u>олі<u>а</u>кри<u>л</u>амідний <u>г</u>ель</b>
G4	<b><u>G</u>-Quadruplex DNA (G-квадруплекс ДНК)</b>
TRAP	<b><u>T</u>elomeric <u>R</u>epet <u>A</u>mplification <u>P</u>rotocol (протокол ампліфікації теломерних повторів)</b>

## ВСТУП

Дизайн та пошук нових біологічно активних сполук, у тому числі високоефективних лікарських засобів, передбачає комплексний підхід, у якому поєднуються хімічні, біохімічні, фізико-хімічні методи досліджень та методи молекулярного моделювання. Розробка нових терапевтичних засобів, дослідження їхньої біологічної активності й механізмів дії належать до пріоритетних напрямків сучасних біомедичних досліджень, медичної хімії та біотехнології. Ця проблема залишається актуальною, незважаючи на досягнення наук про життя останніх років. Особливо гостро вона стоїть в онкології, адже справді ефективні протипухлинні засоби до цього часу все ще не знайдені. Одною з ключових проблем тут є недостатній рівень специфічності препаратів – токсичні протипухлинні сполуки проникають не лише в пухлини, але й у нормальні органи та тканини, що обмежує їхню допустиму дозу. Додатковим ускладненням є виникнення резистентності до препаратів, що використовуються в терапії. Останніми роками загострюється й ситуація з доступністю високоефективних протимікробних засобів, передусім у зв'язку з постійним збільшенням числа патогенних мікроорганізмів, резистентних до відомих лікарських засобів[1-5].

Одним із основних шляхів розв'язання цієї складної проблеми є мішень-орієнтований пошук активних і високоспецифічних протипухлинних та протимікробних засобів. До важливих біологічних мішеней для таких лікарських препаратів належать, зокрема, ферменти системи біосинтезу нуклеїнових кислот (НК). Специфічні ліганди різних форм ДНК можуть виступати інгібіторами ферментів, що входять до цієї системи, наприклад, полімераза, геліказ, топоізомераза (ліганди дуплексної ДНК) чи теломерази (ліганди квадруплексної ДНК). Отже, спрямований пошук нових специфічних ДНК-зв'язувальних сполук є важливою задачею, вирішення якої може привести до створення новітніх протипухлинних і протимікробних препаратів.

Одною з сучасних мішеней для протипухлинних засобів нового

покоління є система фермента теломерази, до якої входять сам фермент та його субстрат – теломерна ДНК. Теломераза заново синтезує втрачені в процесі клітинного поділу теломери (послідовності ДНК на кінцях хромосом). Рівень експресії теломерази в пухлинних клітинах різко підвищена порівняно з нормальними соматичними клітинами, які позбавлені теломеразної активності [6-10]. Підвищений рівень активності теломерази спостерігається в 80-95% пухлин. Високий рівень експресії теломерази, в свою чергу, веде до неконтрольованої проліферації пухлинних клітин, інгібування ж її активності спричиняє їхню загибель. Це зробило систему теломерази й теломерної ДНК привабливою мішенню для сучасної протипухлинної стратегії. Деякі інгібітори теломерази вже знаходяться на заключних стадіях клінічних досліджень [11, 12].

Іншою важливою біологічною мішенню для створення нових лікарських засобів є топоізомерази. Топоізомерази – ключові ферменти системи біосинтезу НК, відповідальні за релаксацію молекул ДНК і, таким чином, за принципово важливі для клітини процеси реплікації, транскрипції та репарації ДНК. Можливість використання топоізомераз як молекулярних мішеней впливає з того факту, що рівень експресії вказаних ферментів значно підвищений у клітинах, що швидко діляться. Зокрема, активність топоізомераз набагато вища в пухлинних клітинах порівняно з нормальними, що дозволяє розглядати топоізомерази, зокрема, топоізомеразу I, як важливу біологічну мішень для пошуку новітніх протипухлинних засобів [12-15].

Такі протипухлинні ліганди квадруплексної ДНК, як теломестатин, порфірини чи похідні карбазоли, давно й широко вивчаються. В той же час, потенціал ціанінів як інгібіторів теломерази і топоізомерази I досліджений недостатньо, хоча геометрія молекул ціанінів дозволяє їм добре взаємодіяти з G-квартетами і двоспіральною ДНК. Таким чином, доцільно перевірити серію монометинціанінових похідних, названих нами LO (Лепідиновий Оранжевий) з різними аміно замісниками щодо їхніх інгібувальних властивостей [16].

Метою цієї роботи було визначення впливу похідних ціаніну на ферментативну активність топоізомерази I та теломерази *in vitro*.

Для досягнення мети були поставлені такі завдання:

1. визначити вплив досліджуваних похідних ціаніну на активність топоізомерази I у ферментативній системі релаксації суперспіралізованої ДНК та встановити значення  $IC_{50}$  для активних сполук;
2. визначити взаємодію досліджуваних сполук з ДНК методом Mobility Shift і спектрофотометричними методами
3. визначити вплив похідних ціаніну на активність теломерази методом TRAP.

## РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Ферменти сімейства топоізомераз

#### 1.1.1. Загальна характеристика та класифікація ДНК-топоізомераз.

ДНК-топоізомераза - представник сімейства ізомераз (99 клас, 1 підклас - за ензиматичною класифікацією) . Вона здатна змінювати топологічний стан молекули ДНК, вносячи одно- чи дволанцюгові розриви. Такі перебудови відіграють важливу роль у процесах транскрипції, реплікації, рекомбінації, транскрипції та в організації структур більш вищого порядку [13, 17-20].

В результаті зваємодії нуклеїнових кислот з гістонами та іншими білками, дії РНК-полімерази та процесів транскрипції відбувається збільшення торсійної напруги молекули ДНК, як наслідок суперспіралізація ланцюга, яка функціонально забезпечує стабільність. Ця форма має 2 варіанти: позитивна суперспіралізація (+), у якій ДНК закручена за годинниковою стрілкою (дуплекс перекручено) та негативна (-), де ДНК закручена проти годинникової стрілки ( $720^\circ$ , дуплекс недокручено). Контроль топологічного стану ДНК є важливою особливістю кожної живої клітини, адже він виступає регулятором великої кількості клітинних процесів, таких як: локальна або загальна генетична рекомбінація, міжбактеріальний кон'югаційний транспорт плазмід, індукований мутагенез, транскрипція, клітинний поділ, реплікація [20-22].

Топоізомераза бере участь у процесах переходу топологічних форм ДНК одна в одну і зняттям суперспіралізації для надання доступу до ДНК транскрипційним факторам та полімеразам. Функціями цього ферменту є каталіз зчеплення та розчеплення, сприяння ренатурації у одноланцюгових ДНК комплементарних кілець, введення (-) і (+) супервитків та реакція релаксації ДНК [23-25].

В залежності від механізму дії Топо поділяють на 2 класи:

1. ДНК-топоізомерази I (Топо I). Утворюють тимчасовий розрив ланцюга ДНК, не потребують наявності кофакторів.
2. ДНК- топоізомерази II (Топо II). Тимчасово утворюють розрив у двох ланцюг ДНК при наявності енергії у вигляді АТФ.

Топоізомерази є у прокариотів, еукаріотів та деяких вірусах. Перші спроби систематизації проводилися на основі джерела походження та біохімічних властивостей, в той час як у сучасній класифікації розподіл відбувається в залежності від первинної структури фермента. Топо I розділена на 2 підтипи: топоізомерази I-A (Топо IA), та топоізомерази I-B (Топо IB) [26].

Існує цілий ряд спільних особливостей, що виокремлюють топоізомерази у підтип IA. Всі ензими, що є представниками цього класу мають мономерну структуру (вийняток зворотня гіраза *Methanopyrus kandleri*).

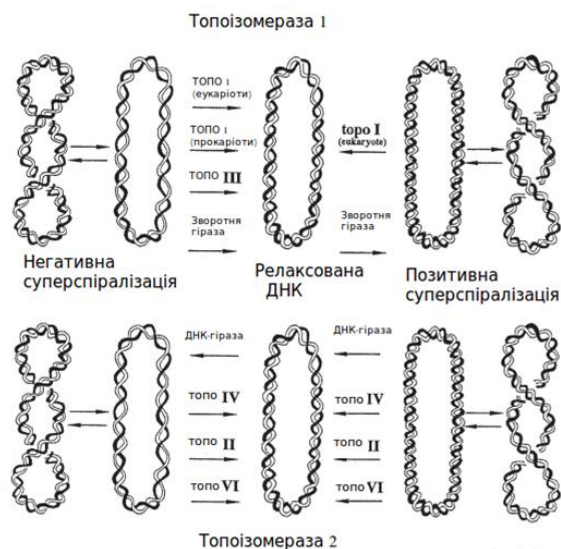


Рис. 1.1. Типи топоізомераз [20].

Додатковою умовою для здійснення каталізу є наявність йонів магнію ( $Mg^{2+}$ ). Субстратом виступають одноланцюгові ДНК, але релаксації підпадають лише (-) суперспіралізовані ділянки. Топоізомераза зв'язується з ДНК сфодієфірним зв'язком (з 5'-фосфатом нуклеотиду) у результаті гідролізу. Окрім зменшення торсійної напруги ланцюга ДНК Топо IA здатні до утворенням позитивно закрученої молекули ДНК через розщеплення двох

одноланцюгових ДНК. До представників цього підтипу відносять топо I *E. coli* та схожі структурно та функціонально Топо III, ДАМ Топо III зворотню гіразу прокариот та Топо III еукаріот [23, 27].

Бактеріальна ДНК-гіраза є топоізомеразою другого типу і здатна вносити (-) суперзакручення у замкнуті кільцеві ДНК при цьому вона потребує енергію гідролізу АТФ. Протилежну дію має оборотня ДНК-гіраза, що належить до топоізомераз першого типу і релаксує (-) ссДНК. Парна дія цих двох ензимів регулює топологічний стан геному бактерій, а отже і активність ферментів, що взаємодіють з ДНК. У еукаріотів подібних ферментів не знайдено [28].

У останні роки топоізомерази стали популярним об'єктом досліджень у контексті вивчення будови ферментів, їхньої кристалічної будови, механізму дії та, власне, пошуку інгібіторів топоізомераз [27].

**1.1.2. Загальна характеристика топоізомераз підтипу ІВ.** ІВ топоізомерази включають в себе еукаріотичні ТопоІ, топоізомерази проксивірусів та вірусу віспи (*Variola vera*). На відміну від представників підтипу ІА, топо ІВ здатні до релаксації (-) та (+) ссДНК у відсутності АТФ та йонів металу, при цьому йони магнію ( $Mg^{2+}$ ) та кальцію ( $Ca^{2+}$ ) можуть стимулюють ефективність ферментів. Прокариотична топо V (*Methanopyrus kandleri*) здатна до зв'язування 3'-кінцем ДНК та релаксації (-) та (+) ланцюгів ДНК як представник підтипу ІВ, але її відносить до ІА [29].

Топоізомерази та тирозинові рекомбінази (бактеріофагів P1 Cre, та *E. coli* XerD) мають великих коефіцієнт схожості за механізмом дії та структурно. Нуклеофільна атака фосфодиефірного зв'язку ДНК залишком тирозину, що знаходиться у активному центрі ферменту, є початком реакції релаксації. Між 3'фосфатом розщепленої ДНК та ферментом моментально утворюється фосфотирозиновий зв'язок, який зберігає енергію розриву. Механізм релаксації («контрольоване обертання») відбувається лише в конкретних частинах фермента та полягає в обертанні розміщеного на 3' кінці ДНК від сайту розщеплення частини дуплекса навколо зв'язку цілого ланцюга. Після

цього йде реакція релігірування, через атаку фосфотирозинового зв'язку 5'-гідроксильною групою розщепленого ланцюга ДНК, де і використовується збережена при розриві енергія. Після відновлення цілісності ланцюга ДНК топоізомераза має два можливі сценарії: або дисоціація із релаксованої ДНК, або повторення циклу наново [30-32].

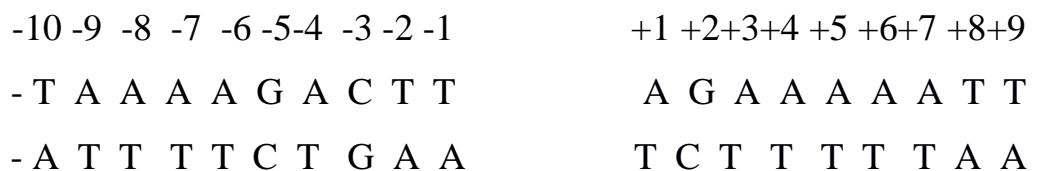
Еукаріотичні ІВ ДНК-топоізомерази є досить різноманітними за своїм складом, проте вони схожі на 90% за будовою та механізмом дії. Гомологія проявляється у структурі доменів, що беруть участь у процесах розпізнавання та мають у своєму складі активний залишок тирозину. Відмінними є частини фермента, що не беруть участь у зв'язуванні та каталізі з ДНК [21, 33-34].

Вони однаково споріднені як до (-) так і до (+) ДНК та здатні до релаксації утворюючи ковалентний зв'язок у сайті розщеплення з 3'-фосфатною групою ДНК. У зв'язаному стані із ДНК топоізомераза розміщується на площі (20 п. о.). Топо здатна розрізняти топологічні ізомери, що розрізняються у своїй будові лише на одне «зчеплення». Зразком оптимальної послідовності, яка необхідна для зв'язування ферменту з ДНК є така ділянка:

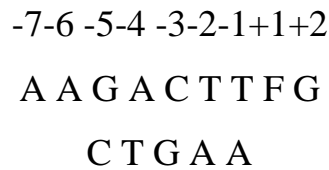


Відповідний мотив щільно асоційований з топоізомеразою 1 *in vivo* та має високу спорідненість *in vitro* [35-36].

Для того аби Топо змогла розділити ланцюг ДНК, фермент має взаємодіяти з обома частинами дуплексу. Перша ділянка знаходиться у 5' кінці розділеного ланцюга, друга розташована з 3'-кінця:



3'- кінець використовується для з'ясування ланцюга з 5'- гідроксильними кільцями. Мінімальна довжина ділянки, необхідної для впізнавання та можливості проведення реакції розчеплення, ссДНК становить 9 і 6 основ розчеплюваної та нерозчеплюваної нитки. Залежно від складу основ 5'- та 3'- кінців ланцюгів, їх відсутності чи заміни спостерігають повне чи часткове інгібування. Виглядає ця послідовність так:



Якщо у -1 основи ланцюга, що розщеплюється є піримідин (часто тимін), то його заміна або видалення не змінить каталіз. Але заміна від -2 до -7 положенні призведе до інгібування. Ферментативна активність сильно залежить від присутності залишків цитозину у послідовності ДНК та її метилюванню. При метилюванні цитозину у положенні -4 стимулюється реакція розщеплення, тоді ж як у -3 вона інгібується. Це пов'язано з наявністю метильних груп, які заважають взаємодії ліганду з ферментом. [37, 38].

**1.1.3. Будова топоізомерази I людини.** Топо I людини має 765 а.з. та складається з 4 основних доменів: N-кінцевий (до 214 а.з.), основний (215-635 а.з.), лінкерний (636-712 а.з.) та С-кінцевий (713-765 а.з.) (Рис1,2).

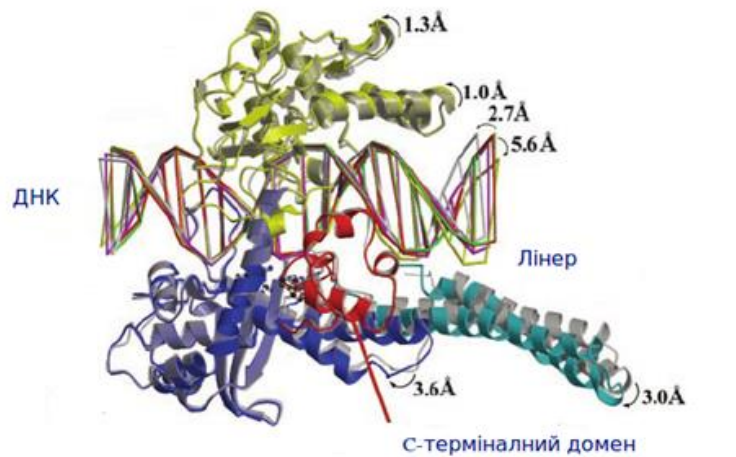


Рис. 1.2. Кристалічна структура топо I людини у комплексі з ДНК.

N-кінцевий домен відповідає за локалізацію ферменту в ядрі та взаємодію з нуклеотидом, має сигнальні пептиди, гідрофобні амінокислотні залишки, варіабельний та сильнозаряджений. Від нього залежать каталітична активність та релаксація ДНК, але він не є обов'язковим для активності Топо. Саме тут наявні 4 NLS-мотиви (сигнальні послідовності ядерної локалізації), які відповідають за транспорт ферменту в ядро та мають у складі велику кількість лізину. А саме: NLS I (59-65 а.з.), NLSII(150-156 а.з.), NLSIII(174-180 а.з.) та NLSIV(192-198 а.з.). Відомо точно, що NLSII задіяний у транспорті Топо I до ядра, а NLSIV відповідає за локалізацію фермента у ядрі [39-40].

Лінкерний домен поєднує основний та С-кінцевий домен, сприяє зв'язуванню, бере участь у релаксації ссДНК та каталізі. Не є необхідним для активності Топо.

С-кінцевий домен має активний центр, представлений залишком Тир 723, що здійснює гідроліз з ДНК з утворенням фосфодієфірного зв'язку з 3'-кінцем розщеплюваного ланцюга. При заміні Тир 723 на аналоги (з фенольною ОН-групою у пароположенні) каталітична активність не зникає. Реакція може зникнути лише при заміні на NH<sub>2</sub> чи SH групи чи переміщенні ОН-групи в різні положення ароматичного кільця. Є ключовою для активності Топо.

Основний домен складається із субдоменів I, II та III. Разом з С-кінцевим вони здатні забезпечити повну ферментативну активність, адже разом вони мають амінокислотні залишки, які формують активний центр фермента та ДНК-зв'язуючу ділянку. Субдомен I (215-232 і 320-433 а.з.) - 2  $\alpha$ -спіралі та 9  $\beta$ -ланцюгів. Субдомен II (233-319) має 5  $\alpha$ -спіралей та 2  $\beta$ -ланцюги. Субдомен III (424-635 а.з.) найбільший з всіх, має 10  $\alpha$ -спіралей та 3  $\beta$ -ланцюги. У закритій формі субдомени I та III утворюють контакти за рахунок сольового містка та 3 амінокислотних залишків від кожного з них. С-кінцевий домен має залишок тирозину у 723 положенні та складається з 5  $\alpha$ -спіралей. Закрита форма фермента має вигляд глобули з порожниною у центральній частині, що зв'язує ДНК (діаметр глобули 17-20 Å). 15 Лиз та 8 Арг а.з., що складають

порожнину, забезпечують її високий позитивний потенціал. Також з нею контактують амінокислоти, що беруть участь в каталізі [41-42].

C-кінцевий та коровий домени мають близькі контакти, через наявність контактів 3  $\alpha$ -спіралей субдомену III та гідрофобних взаємодій. Це забезпечує міцність контактів та наявність у ділянці 11 неполярних амінокислотних залишків [41].

**1.1.4. Активний центр та механізм дії топоізомерази I.** Механізм дії ДНК Топо I описано за допомогою методів PSA та термодинамічного аналізу.

Нуклеофільна атака тирозину основана на колінеарному розташуванні ОН-групи каталітичного залишку тирозина відносно О5'-Фосфоефірного зв'язку. За нею відбувається утворення ковалентного зв'язку 3'-кінця розщеплюваної ДНК з ферментом. У реакціях релігірування та розщеплення Гіс 632 та Арг 488 грають важливе значення. Вони утворюють фосфодіефірний зв'язок, взаємодіючи з атомами кисню [31].

Перехідний стан стабілізується через утворення водневого зв'язку між першим атомом кисню сіжнуклеотидної фосфатної групи та Арг 532 та 488. Паралельно до цього другий атом кисню зв'язується з Гіс 632 (між киснем та атомом N<sub>2</sub>), який відповідає за координацію розщеплюваної фосфатної групи в активному центрі Топо I. Він також може протонувати у якості кислотного каталізатора реакцію нуклеофільного заміщення 5'-атомом кисню [32].

Молекула води, через близькість до ОН-групи активного центру та можливість утворювати водневі зв'язки з гуанідиною групою Арг 590, виконує роль каталізатора у збільшенні нуклеофільності та здатності до активації каталітичної ОН-групи Тир 723. Ця група може різко змінити кислотність та знаходиться на відстані 2.5 Å. У активному центрі проходять конформаційні зміни, як наслідок можливість взаємодіяти з одним атомом кисню, щоб не брати участь в утворенні фосфоефірного зв'язку з Ліз 532.

Наявність лінкерного домену може вплинути на якість реакції. Якщо у фермента є цей домен, то конформація розщеплюваного зв'язку може мінятися. Відбувається поворот відносно С4'-С5' зв'язку на кут, який дорівнює 45°, що

призводить до оптимальної локалізації реакційних груп, тобто швидкості реакції [31, 41].

Цей процес ділять на кілька етапів. Перший - перехід від закритої форми до відкритої. При взаємодії порожнини Топо I з ДНК утворюються неспецифічні контакти, після чого Топо I переходить до закритої форми і починається пошук таргетних ділянок через «ковзання» по ланцюгам ДНК. Якщо знайдена специфічна послідовність, фермент зупиняється та утворює контакти між найближчою -1 фосфатною групою та Тир. Паралельно формуються контакти з міжнуклеозидними фосфатними групами -5 (Г) та -4 (А) ланцюгами специфічної послідовності. Додатково формуються специфічні контакти з двома фосфатними групами між -4(А), -3(Ц) та -2(Т) ланцюгами та контакти у зоні від +1(А) до +9(Т). Головною метою цього є посилення контактів та підготовка структури ДНК до каталітично активного стану [43-44].

Розрив у ланцюзі відбувається через ввігнутості ДНК-зв'язувального центру та топологічну напругу. Через контакти дуплекса з лінкерним доменом зберігається конформаційна активність ДНК. Через зміну конформації розщеплювальна фосфатна група обертається навколо С4'-С5' зв'язків, що відповідає оптимальному положенню груп активного центру. Після повороту вже наявні контакти розщеплюваної фосфоефірної групи зміцнюються, через збільшення відстані до координуючих амінокислотних залишків. Так відстань для Арг 488 зменшується з 3.2 Å до 2.7 Å, Арг 590 з 3 Å до 2.7 Å та Гіс 632 з 3.3 Å до 2.8 Å [45].

Енергія Тир-фосфатного зв'язку ковалентного інтермедіата, що утворився між ДНК та ОН-групою Тир 723 ТопоI, вище ніж енергія фосфоефірного зв'язку ДНК, що розривається, на 1 ккал/моль. Атака ОН-групи Тир 723 є термодинамічно вигідною, адже енергія, що іде на утворення розриву збільшує енергію зв'язку. Це пояснюється тим, що при реакції релігірування фосфотирозиновий зв'язок легко руйнується і відбувається заміщення атома кисню у ОН-групі Тир на 5'-ОН групи ДНК. Результатом

релаксації є зменшення топологічної напруги спіралі та ступеня ввігнутих ДНК. Після цього відбувається дисоціація ферменту.

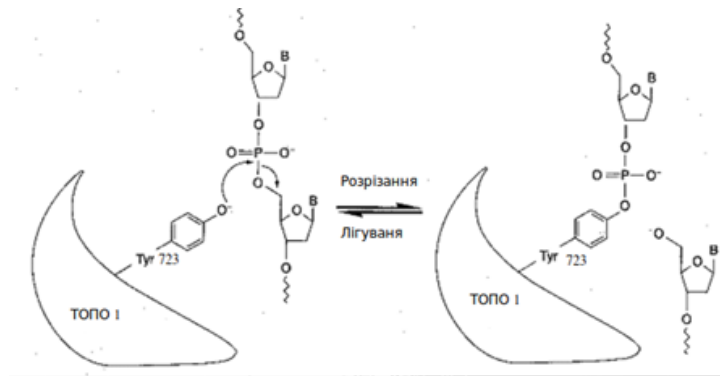


Рис. 1.3. Механізм дії топоізомерази I [46].

Є 2 можливі механізми релаксації ДНК топоізомеразою I, кожен з яких є характерним для різних підкласів. I-вільне обертання ланцюга ДНК, II-«перенос» ланцюга через вже утворений розрив. Контрольоване обертання пояснюється тим, що білок у процесі релаксації здатен до контактів з частиною ДНК яка обертається, і цим регулює процес. У конкретно даному випадку вільне обертання може мати неприємні наслідки, адже при цьому механізмі можливе зіткнення між двома  $\alpha$ -спіралями послідовності Треонін 303-Тир 338 та позитивно зарядженими ділянками лінкерного домену [31].

## 1.2 Ферменти сімейства теломераз

### 1.2.1 Загальна характеристика теломераз.

Теломеразы це представники РНК залежних ДНК-полімераз або ж інакше оборотних транскриптаз. Основною функцією цього фермента є підтримка довжини теломер, які укорочуються при реплікації ДНК. Її активність розглядають як потенційний маркер фізіологічного резерву (старіння) клітин. Чим менша її активність, тим більше клітина обмежена у кількості поділів [47].

На кінцях еукаріотичних хромосом наявні ДНК-білкові структури, які були названі теломерами. Вони захищають кінці хромосом від деградації, зливання, підтримують стабільність геному та відповідають за прикріплення

хромосом до ядерного матриксу. Тобто вони грають важливу роль у побудові особливої впорядкованості клітинного ядра. Послідовність ДНК теломер залежить від організму. У всіх ссавців він однаковий та виглядає так: 5'-TTAGGG-3'. Довжина теломерних ДНК у кожного виду своя, так у людей це близько від 2 до 20 тис. пар основ, в той час як у деяких видів мишей близько сотен тисяч [47-48].

Через не повну реплікація клітин (видалення кінцевої РНК-затравки), дію нуклеаз та інших деструктивних факторів, кожне наступне ділення клітин супроводжується вкороченням теломерної ділянки, також відомим як «проблема кільцевої недореплікації». Це вкорочення спостерігається майже у всіх типах клітин, і коли довжина теломерних ділянок стає критично-малою, подальше ділення унеможлиблюється. Така картина спостерігається лише в «смертних» клітинах, в той час як в ракових, стовбурових та інших гемопоетичних клітинах теломерна ділянка має сталу довжину. На основі цього була запропонована теорія про існування ферментативної системи, що контролює та підтримує довжину теломеразної ДНК. Лише в 1984 році Блекберном та Грайдером було виділено фермент, що синтезує теломерну ДНК – теломераза [48-49].

Теломераза пов'язує теломерну ДНК так, що 3'-кінець вирівняний з TR-шаблоном в активному сайті, а 5'-кінець розташований всередині якірного сайту теломерази. Зворотня теломераза транскрибує область матриці (1 нт за раз), до досягнення 5'-матричного граничного елемента. На цьому етапі відбувається транслокація, переміщення на новий 3'-кінець ДНК в матриці для другого раунду синтезу теломер. Синтез теломеру відбувається шляхом послідовного додавання дезоксинуклеотидних трифосфатів (dNTP) до вільної 3'-гідроксильної групи праймера теломерної ссДНК. Вважається, що теломерний ссДНК є природним праймером для синтезу ДНК *in vivo*, опосередкованого теломеразою. Паралельні міжмолекулярні субстрати G-квадруплексу також є ефективними субстратами для циліатної теломерази *in vitro* [48].

Теломерази є привабливою мішенню для протипухлинної терапії. Протягом останніх десятиліть розроблено багато способів порушення роботи теломерази, адже це дає можливість створити малотоксичний, але ефективний в широкому спектрі протипухлинний препарат. Інгібування теломеразної активності може привезти до зниження життєздатності або апоптому пухлинних клітин [48].

**1.2.2. Будова теломерази людини.** Теломераза людини є димером, який складається з теломеразної РНК (TR- telomerase RNA) та двох копій оборотної транскриптази (TERT). Теломеразна РНК має матричну ділянку та функціонально важливі елементи вторинної структури, що беруть участь в обмеженні матричного ділянки, зв'язуванні білкової субодиниці, виконують частково-каталітичні та додаткові функції. В загальній структурі TERT можна виділити чотири функціональних домена : РНК-зв'язуючий (TRBD-домен), оборотно-транскриптазний (RT-домен), N-кінцевий та низькоконсервативний C-кінцевий домени. Структурні відмінності різних TERT в основному стосуються N- і C-кінцевих ділянок [47, 48, 50].

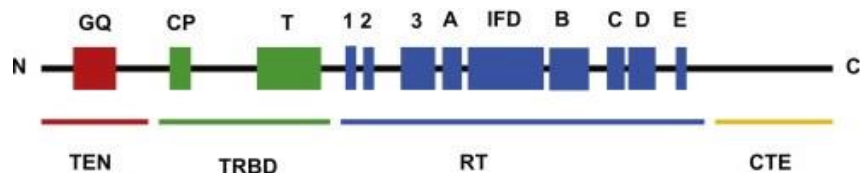


Рис 1.4 Структура доменів оборотної транскриптази TERT

N-кінцевий (TEN-домен) – необхідний для функціонування теломерази *in vitro* та *in vivo*. Тут знаходяться консервативні а.о., що групуються в борозні на поверхні домену та необхідні для каталітичної дії теломерази, участі у взаємодії з одноланцюговою ДНК для подовження теломерів. Його видалення призводить майже до значної зниження активності теломерази.

Критичною для збірки ферменту є взаємодія TRBD домену зі шпилькою Р6.1 домену CR4-CR5. РНК-зв'язуючий домен TRBD містить у своїй структурі спіральні мотиви, що є унікальною особливістю. Мотив QFP виконує

структурну функцію, в той час як консервативні CP і T мотиви беруть участь у зв'язуванні РНК. Консервативні а.о. розташовані так, аби на поверхні утворилися 2 кишені. Одна вузька, обмежена гідрофобними залишками і специфічний для зв'язування одноцепоченої РНК (Т-кишенька), інша широка та може пов'язувати РНК дуплекс (ТСР кишенька). Також у зв'язуванні 5'-граничного елемента TER, бере участь мотив CP2, що знаходиться на межі доменів TEN і TRBD [47, 50].

Оборотньо-транскриптазний (RT) домен містить сім консервативних для ДНК-полімерази мотивів і додаткову ділянку IFD. Структурно вибудований із  $\beta$ -листіків та  $\alpha$ -спіралей будовою цей домен нагадує долоню з додатковим пальцем, що відображається у назві (insert finger domain). Знаходиться в відкритій формі при відсутності ДНК субстрату. Цей домен відповідає за структурне розташування двох  $\alpha$ -спіралей hTERT, залучених в безпосередній контакт з РНК/ДНК-дуплексом. Ділянка hTERT важлива для функціонування теломерази *in vivo*. Заміна амінокислот в ньому призводять до зниження активності ферменту *in vitro* [47-48].

С-кінцевий (STE) домен є низькоконсервативним. Функція STE не дуже добре охарактеризовані, точно відомо про важливість для активності теломерази *in vitro* і *in vivo* (низькоафінне зв'язування ДНК і процесивність). STE встановлює прямий контакт з гібридом РНК-ДНК, а мотив E-1 бере участь в спорідненості зв'язування ДНК [48].

Під час подовження теломерів шаблон РНК транскрибується в зворотному порядку, використовуючи канонічне сполучення основи Уотсона-Крика для визначення теломерної послідовності. Синтез теломер відбувається шляхом послідовного додавання дезоксинуклеотидтрифосфатів (dNTPs) до вільної 3'-гідроксильної групи праймера теломерної ssDNA [48-50].

### 1.3.Сполуки, що пригнічують активність теломерази та топоізомерази I

**1.3.1. Інгібітори топоізомерази підтипу ІВ.** ДНК топоізомерази є унікальними ензимами, які здатні до топологічних змін орієнтації ДНК за допомогою релаксації торсійного стресу локальної сс ДНК. Ця особливість дає їм змогу регулювати життєздатністю здорових клітин чи при критичному пошкодженні геному викликати механізм клітинної смерті. Ось тому вони є «мішенями» для дії протипухлинних препаратів [15].

70-ті роки 20-го ст стали початковою точкою для відкриття багатьох протипухлинних препаратів, більшість з яких до нас не дійшло. За останні 25 років клінічна практика ввела 2 категорії препаратів: таксоїди та камптотецин.

Інгібітори топоізомераз поділяють на 2 класи: ««топо інгібітори» які погіршують ферментативну активність топоізомераз та ті, що стабілізують комплекс Топо I-ДНК підвищуючи рівень комплексу розщеплення (cleavage complex) - «топо-отрути» [15, 23].

«Топо-отрути» призводять до фрагментації ДНК та перетворюють топо на клітинну отруту через дисбаланс клітинного розщеплення та релітацію ДНК. Існує 2 класи цих «топо-отрут», що розрізняються механізмом дії. «Міжфазна» отрута пригнічує доступ активного сайту тирозину комплексу розщеплення при приєднанні до ДНК. «Ковалентна», або ж "окисно-відновні отрута" бере участь у ковалентному зв'язуванні з залишками ферменту, які є дистальними до активного сайту [15].

Першим відомим інгібітором топо є камптотецин - природна сполука, що виділена із рослини *Camptotheca acuminata*, відкрита Валлом та Вані у 1966. Перші клінічні випробування показали наявність протипухлинної активності. З часом з'ясували що він інгібує ТопоI блокуванням реакції розщеплення/ релігації, як наслідок накопичення проміжного ковалентного продукту реакції, розщеплюваного комплексу. Камптотецин має велику

цитотоксичну дію. Він знищує S-фази через потенційно смертельні зіткнення між висхідними вилками реплікації та розщепленими Топо І клітинами[15, 24].

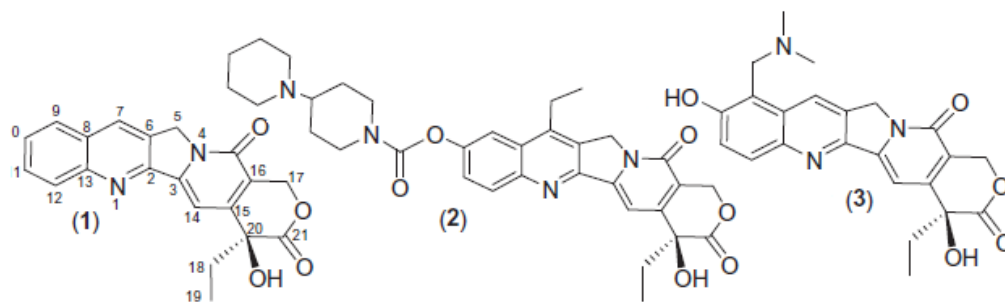


Рис. 1.2.1. Структурна формула (1) Камптотецину, (2) Іринотекану та (3) Топотекану [51].

Топотекан та Іринотекан є напівсинтетичними похідними камптотецину. Вони мають меншу побічну дію на здорові клітини організму, в порівнянні з Камптотецином [24-25].

Не останнє місце як інгібітори топоізомераз займають ціаніни та їх похідні.

**1.3.2. Інгібування теломерази.** Основні та другорядні функції теломерази дали основу для можливого створення нових інгібіторів теломерази. Для зниження теломеразної активності є кілька можливих стратегій: порушення біосинтезу теломеразного комплексу (блокування генів hTERT та hTR), зниження її стабільності, блокування функціонування. Існує кілька груп інгібіторів теломерази: I- аналоги нуклеотидів чи нуклеозидів, II- низькомолекулярні з'єднання ненуклеозидної природи, III-олігонуклеотиди [6, 52].

Препарати на основі нуклеотидів – це ті препарати що були раніше розроблені для вірусних оборотних транскриптаз та мають вплив на каталітичні субодиниці теломераз. Прикладом таких препаратів є Азидотимідин (активність залежить від наявності чи відсутності амінокислотної заміни у білку TP53).

Низькомолекулярні інгібітори діють на каталітичну активність hTERT або маскують субстрат від виявлення теломеразою. Деякі з цих препаратів

використовують у лікуванні ВІЛ-інфекції. Прикладами цих інгібіторів є Руброміцин та його похідні. Ще одним цікавим прикладом є Родаціан, який є ціаніновим фарбником. Із природних можна перерахувати Хеленалін, природний лактон, що знижують рівень мРНК каталітичної субодиниці теломерази. Ця родина має багато варіантів інгібування теломерази, так низькомолекулярні з'єднання можуть блокувати зв'язування теломерази зі своїм субстратом за рахунок стабілізації квадруплексної структури на кінцях теломер [6, 11, 52].

Третій клас інгібіторів за своєю природою відноситься до біополімерів, їх основною проблемою у використанні є їх транспортування в клітини та біологічна нестабільність. Є кілька способів як цей клас інгібіторів може порушувати функціонування теломерази. За рахунок зменшення часу життя hTR в клітині, викликаючи її спрямовану деградацію, шляхом блокування збірки теломерази або ж через пригнічення полімеразної активності теломерази *in vitro*.

Один із цікавих напрямків інгібування теломеразної активності за допомогою G-квадруплексів. Кілька теломерних повторів підряд при певних умовах здатні складатися в G-квадруплексну структуру, яка є субстратом теломерази. Деякі низькомолекулярні з'єднання можуть стабілізувати утворення G-квадруплексів та маскувати від теломераз. Ці синтезовані структури таким чином впливають на зменшення узнаваності теломеразою свого субстрату. Для додаткової стабілізації G-квадруплексів такі олігонуклеотиди можуть бути модифіковані інтеркаляторами. Але можливі деякі недоліки, так олігонуклеотидні інгібітори можуть призвести до включення альтернативного механізму «мовчазного» подовження теломер (ALT-механізм)[6-9, 11].

### **1.3.3. Похідні ціаніну як інгібітори теломерази та топоізомерази.**

Ціанін, або д1,1'-діізоаміл-4,4-ціанін йодид – це органічний, основний метиновий барвник, синтезований у 1856 р. Вільямсоном. Відноситься до сполук з ароматичними гетероциклами. Мав широке розповсюдження в

фарбувальній промисловості, зараз використовується в біології та аналітичній хімії.

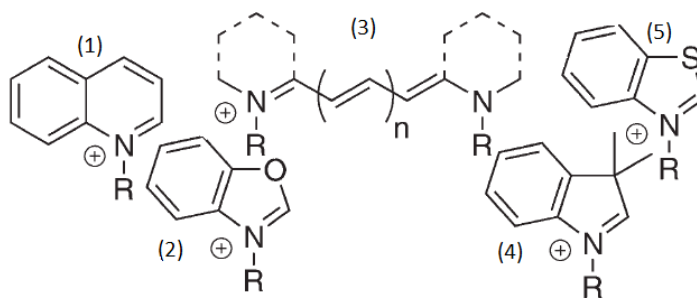


Рис 1.2.2 Загальна структура ціанінових похідних та гетероциклічні компоненти. (1) Хінолін, (2) Бензоксазолін, (3) Загальна основа похідних, (4) Індол, (5) Бензатіазол [53].

Похідні ціаніну застосовуються як флуоресцентні зонди для візуалізації біологічних об'єктів. В особливості це стосується оптичного маркування визначення амінокислот, білків, антитіл, нуклеїнових кислот, ДНК, РНК, полімерів, препаратів. Ціанінові похідні мають властивості характерні інтеркаляторам так і зв'язувачам малої борозенки. Тож не дивно що вони мають кілька можливих механізмів зв'язування характерних для цього класу катіонних сполук. Плоскі гетероцикли на кінцях барвника сприятливі до інтеркаляції, тоді як напівлегкий поліметиновий міст може дозволити скручування, необхідне для підтримання вигину малої борозенки. Тонкі зміни в структурі ціанінового похідного або ДНК послідовності може призвести до переходу від одного режиму зв'язування до іншого [14-15, 54].

Взаємодія ціанінових похідних з ДНК використовується головним чином у біотехнологічних розробках. Було виявлено, що ціаніни можуть збиратися у надмолекулярні агрегати, що використовують ДНК ланцюг як шаблон. Саме через те, що вони можуть бути інтеркаляторами ДНК, можливо їх використання як протипухлинних препаратів.

## РОЗДІЛ 2

### ОБ'ЄКТИ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1. Характеристика об'єкту дослідження

Об'єктом дослідження були нові похідні ціанінів, що тестувались як інгібітори Топо I та теломерази. Загальна особливість досліджуваних сполук є наявність хінолінового та бензімідазольного ядер.

#### 2.2. Матеріали, реактиви та обладнання, що було використано у роботі.

В роботі було використано такі реактиви:

- етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА) фірми “Helicon” (Росія);
- 2-аміно-2-гідроксиметилпропан-1,3-діол (тріс) фірми “Helicon” (Росія);
- агарозу фірми “Helicon” (Росія);
- диметилсульфоксид фірми “Sigma-Aldrich” (США);
- бичачий сироватковий альбумін фірми “Fermentas” (Латвія);
- плазміда рBR322 фірми “Fermentas” (Латвія);
- топоізомераза I із тимусу теляти фірми «Invotrogen» (США);
- бромистий етидій;
- мінеральна олія фірми “Amresco” (США);
- акріламід (N-2-пропенамід), бісакриламід (N,N'метиленбісакриламід) фірми “Amresco” (США);
- гліцерин фірми “SERVA” (США);
- детергент Tween<sup>20</sup> (“Fermentas” Литва);
- хлороформ (трихлорметан), фенол (гідроксибензол) фірми “Хімлаборреактив” (Україна);

- етанол 70 і 96 %, диметил сульфоксид (ДМСО) фірми “Sigma (США);
- N’-тетраметиледиамін (ТЕМЕД) фірми “Amresco” (США);
- бромфеноловий синій;
- SYBR Green фірми “Sigma” (США);
- додецилсульфат натрію (ДСН) та інші використані реактиви мали кваліфікацію “осч” і “хч” вітчизняного виробництва;
- дезоксинуклеозидтрифосфати (ДНТФ): АТФ, ЦТФ, ГТФ і ТТФ фірми “Eurogenetec” (США);
- TS праймер [5'-ААТССГТСГАГСАГАГТТ-3'];
- СХехт праймер [5' - GTGCCСТТАСССТТАСССТТАСССТАА-3'];
- *Taq* ДНК полімераза фірми “Fermentas” (Литва).

Для підготовки розчинів використовували деіонізовану та дистильовану воду.

У роботі було використано наступні реактиви та буферні розчини

- Тріс - Боратний Електродний Буфер (ТБЕ): 89мМ Тріс, 89мМ борна кислота, 2мМ ЕДТА, рН 8,4;
- буфер для лізису культури клітин: тріс НСІ - 10мМ, MgCl - 1мМ, АБФГ - 0,002 М, β - меркаптоетанол - 0,01 М, ХАПС - 0,5 %, гліцерин - 10 %, ЕДТА- 1мМ, до кінцевого об'єму доведено ДЕПК водою;
- натрій – фосфатний буфер: NaCl 137 мМ, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - 100 мМ, KCl - 2,7 мМ, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 2 мМ, рН 7.3;
- TRAP буфер (**T**elomeric **R**epeat **A**mplification **P**rotocol, буфер для реакції ампліфікації теломерних повторів): НСІ – 20 мМ (рН 8,3), KCl - 60 мМ, ЕДТА - 1мМ, MgCl - 1,5 мМ, Tween<sup>20</sup> - 0,05 % та вода ДЕПК;
- буфер нанесення: тріс-НСІ – 10 мМ (рН 7.6), ЕДТА – 60 мМ, 60% гліцерин та бромфеноловий синій 0.03%;
- реакційна суміш для реакції теломеризації: TRAP буфер, ДНТФ- 50 мкМ, TS праймер - 1,8 нг/мкл, Сехт праймер - 1,4 нг/мкл, клітинний

лізат - 0,04 мкл/реакцію, ДЕПК вода (кінц об'єм 50 мкл);

- реакційна суміш для полімеразно - ланцюгової реакції: TRAP буфер, ДНТФ- 50 мкМ, TS праймер - 1,8 нг/мкл, Сехт праймер - 1,4 нг/мкл, 2 мкл клітинного лізату, *Taq* ДНК полімераза – 2 одиниці активності/ реакцію, ДЕПК вода (кінцевий об'єм 50 мкл);

- суміш для приготування поліакриламідного гелю (12% ПААГ): бісакриламід : акриламід 19:1 - 12 %; трис - боратний буфер (ТБЕ), персульфат амонію – 0,002 %; TEMED – 0,0008 %, деіонізована вода (кінцевий об'єм 15мкл).

У роботі також було використано наступне обладнання :

- автоматичний сканер гелів фірми “ChemIDoc” (США);
- мультифункціональний мікропланшетний рідер BioTek Synergy HT (США);
- термостат (Росія);
- вертикальний електрофорез Helicon (Росія);
- ампліфікатор фірми “Терцик” (Російська Федерація);
- вортекс Velp Scientifica ZX4 (Європа).

### **2.3. Визначення активності похідних ціаніну як інгібіторів топоізомерази**

#### **2.3.1. Постановка реакції релаксації суперспіралізованої ДНК.**

Реакція релаксації ссДНК плазмиди pBR322 проводилась у безклітинній системі *in vitro* із використанням топоізомерази I за методичними рекомендаціями виробника ферменту Invitrogen. До складу реакційної суміші входять такі реагенти : 0.5 мкг ДНК плазмиди pBR322 в присутності 50 mM Tris HCl (pH 7.5), фермент топоізомераза I (1 одиниця активності), розчин BSA (30 мг\мл), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM DTT, 50 mM KCl, та деіонізована вода до загального об'єму 25мкл. Досліджувану речовину, розчинену у ДМСО,

додавали до реакційної суміші в кінцевій концентрації 50 мкМ для визначення впливу на активність топоізомерази. У якості негативного контролю (100% суперспіралізована ДНК) використовували реакційну суміш без додавання топоізомерази I та інгібітора. Активний контроль (100% релаксована ДНК) суміш за відсутності інгібітора. Кількість ДМСО у дослідних та контрольних зразках була однаковою. Реакцію проводили за температури 37° С протягом 30 хв. Зупинка реакції проводилась прогріванням при 65° С протягом 10 хв із додаванням буферу наступного складу: 0,03% бромфеноловий синій, 60% гліцерин, 1% SDS, 100 mM EDTA, pH 7,6. Суміш швидко охолоджували і аналізували за допомогою гель-електрофорезу [55].

**2.3.2. Визначення концентраційної залежності інгібування топоізомерази.** Для визначення концентраційної залежності інгібування топоізомерази I використовували метод двократного розведення сполук у ДМСО. Кінцева концентрація сполук в реакції становила 25, 12.5, 6.25, 3, 1.5 мкМ. Аналіз зразків проводили за допомогою гель-електрофорезу. Всі досліди повторювали не менше 3-х разів.

**2.3.3. Електрофоретичне розділення продуктів реакції релаксації суперспіралізованої ДНК.** Для електрофоретичного розділення продуктів реакції готували 1% агарозні гелі з використанням 0.5X Tris-Borate-EDTA (ТБЕ) буферу (Tris-основа 5.4г; Борна кислота 2.75г; 0.5M EDTA 2мл; H<sub>2</sub>O до 1 л.). Електрофоретичне розділення продуктів реакції проводили з використанням наступних параметрів напруги: 100 В та 40 мА.

**2.3.4. Візуалізація та аналіз результатів реакції релаксації суперспіралізованої ДНК.** Гель, після закінчення гель-електрофорезу, фарбували протягом 5 хвилин у розчині бромистого етидію з концентрацією 5 мкг/мл. Після цього відмивали у дистильованій воді. Детекція та візуалізація результатів проводилася у автоматичному сканері гелів фірми “ChemiDoc” за довжини хвилі 365 нм.

Розрахунок ефективності інгібування топоізомерази досліджуваними сполуками відбувалося за формулою:

$$P = \frac{CC - ЧР}{CC - ПР}$$

де: СС (суперспіралізована ДНК) – ЧР (частково-релаксована ДНК) — відстань між негативно суперспіралізованою смугою мінус відстань до центру частково релаксованої смуги; СС – ПР (повністю релаксована) — відстань між негативно суперспіралізованою смугою мінус відстань до повністю релаксованої смуги. Аналогічно вираховували Р (ступінь релаксації) для кожного продукту реакції.

Аналогічно вираховували Р (ступінь релаксації) для кожного продукту реакції.

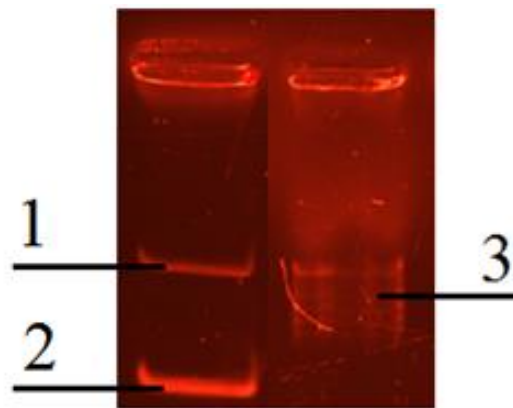


Рис. 2.1. Результати активності інгібітора топоізомерази І у 1% агарозному гелі, для вирахування  $IC_{50}$  та ступеню ігібування топоізомерази; 1 — повністю релаксована ДНК (ПР), 2 — Супер-спіралізована ДНК (СС), 3 — частково релаксована ДНК (ЧР).

Ступінь інгібування топоізомерази визначається за допомогою різниці отриманого значення Р від 1. За допомогою графіка залежності ступеня інгібування від концентрації інгібітора отримаємо значення  $IC_{50}$  (50 %

інгібування активності топоізомерази) проектуванням значення на Ось концентрації координат точки графіка, що відповідає 50 % ступеня інгібування.

### 2.3.5 Визначення способу зв'язування досліджуваних сполук з ДНК.

Спосіб звязування досліджуваних сполук з ДНК визначали за допомогою двох методів. Першим з них є метод EMSA – Electrophoretic **Mobility Shift** Assay. Цей метод ґрунтується на залежності від розміру молекул та заряду зв'язаних ДНК та РНК з білками та низькомолекулярними лігандами. При утворенні комплексів ДНК з іншими молекулами, швидкість руху смуги в гелі падає. Для реакції були приготовлені проби з загальним об'ємом 10 мкл. Проба містить ДНК з концентрацією 20 нг та досліджувану сполуку, з кінцевою концентрацією 100 мкМ. Далі суміш ДНК та барвника витримували 20 хвилин при кімнатній температурі за для утворення комплексів. Цю суміш аналізували у 0.8% агарозному гелі при наступних параметрах напруги: 100 В та 40 мА. У якості контролів виступала проба ДНК вмістом 20 нг, без додавання досліджуваної сполуки та проба з Тіазоловим Оранжевим у якості контрольного інтеркалятора. Після цього гель обробляли розчином SYBR Green I. Ідентифікація результатів проводилася у автоматичному сканері гелів фірми “ChemiDoc”.

Другим методом є спектрофотометричне дослідження, яке базується на визначенні значення екстинції вільного фарбника та його комплексу з ДНК. . Вимірювання проводили у 1мл кварцевій кюветі, при сталій кінцевій концентрації ліганда (10 мкМ) за змінній концентрації ДНК: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 та 180 мкМ. Всі досліди повторювали не менше 3-х разів. У якості контролю використовували кювету з дистильованою водою. Детекція поглинання вільного та зв'язаного ліганда відбувалася за допомогою спектрофотометру Helios Alpha™ при  $\lambda_{ex}=400$  нм,  $\lambda_{em}=600$  нм, після кожної зміни співвідношення ліганду до ДНК.

Обрахування результатів проводили через усереднення даних від 3х вимірів, від кожного значення екстинції вільного барвника та зв'язаного. Для

розрахунку використовували програми «Microsoft® Excel» та «Оріджин». На основі отриманих значень поглинання вільного фарбника та його комплексу з ДНК було вираховано значення концентрації зв'язаного ( $C_{ЗВ}$ ) та вільного ( $C_{В}$ ) фарбника за формулою:

$$C_{ЗВ} = \frac{(A_0 - A)}{(E_0 - E_{ЗВ})}$$

де:  $C_{ЗВ}$  – концентрація зв'язаного ліганду,  $A_0$  - поглинання вільного ліганду,  $A$  - поглинання комплексу ліганд-ДНК при тій же довжині хвилі,  $E_0$  - екстинція вільного ліганду,  $E_{ЗВ}$  - екстинція зв'язаного ліганду в комплексі ліганд-ДНК.

При отриманні значення концентрації зв'язаного ліганду розраховували концентрацію вільного ліганду ( $C_{В}$ ) та значення кількості зв'язаного фарбника на фосфат ДНК або пару нуклеотидів ( $r$ ) та значення кількості зв'язаного фарбника на фосфат ДНК поділене на концентрації вільного ліганду в розчині ( $r/C$ ).

За отриманими значеннями будували графік відношення кількості зв'язаного фарбника на фосфат ДНК до кількості зв'язаного фарбника на фосфат ДНК поділене на концентрації вільного ліганду в розчині.

В подальшому методом Скетчерда за графіком відношення  $r$  до  $r/C$  отриманих значень знаходили константу зв'язування, що відповідає від'ємному значенню котангенса кута нахилу отриманої прямої [56].

## **2.4 Визначення активності похідних ціанінів як інгібіторів теломерази**

### **2.4.1. Виділення лізату клітин із теломеразною активністю.** В якості джерела теломерази використовували лізат клітин, отриманий з клітинної лінії

інвазивної карциноми молочної залози людини MCF – 7, на основі інституту молекулярної біології та генетики НАН України. Приготування лізату проходило у кілька етапів. Спочатку клітини двічі промивали PBS (Натрій-фосфатний буфер) та витримували в охолодженому лізисносу буфері протягом 30 хвилин, перемішуючи вміст. Після цього центрифугували при 12000 g протягом 30 хвилин. Супернатант відбирали, фасували по епіндорфам та заморожували у рідкому азоті. Клітинний лізат зберігається при -80 °С. Визначення концентрації білка у лізаті відбувається за допомогою методу Бредфорда (1мл реагенту на 10 мкл лізату). Оптимальна концентрація лізату має бути від 1 до 0,1 мкг для клітинної лінії, якщо концентрація більше можливе інгібування Таq-полімерази [57, 58].

#### **2.4.2 Визначення інгібувальної активності досліджуваних сполук.**

Визначення інгібувальної активності проводилося з використанням методу TRAP ( протокол/ реакція ампліфікація теломерних повторів). Лізат клітин розводили у буфері для лізису. У епіндорфи вносили 2 мкл розчиненої у ДМСО досліджуваної речовини з концентрацією 2мМ. До неї додавали реакційну суміш для реакції теломеризації (буфер TRAP, СХ-праймер (С<sub>ext</sub>), TS- праймер (telomerase substrate), лізат клітин, dNTPs, вода (ДЕПК)), та залишали у термостаті при 37°С протягом 30 хвилин. У якості контролю замість досліджуваної сполуки використовували 2 мкл ДМСО [57].

**2.4.3. Очищення від досліджуваної сполуки продуктів реакції теломеризації.** Для виключення можливого інгібування Таq-полімерази проводили очищення зразків ДНК за допомогою фенолу. Для цього до продуктів реакції теломеризації додавали ДЕПК воду, у співвідношенні 1:1, та суміш Фенол-Хлороформу, у такому ж співвідношенні (1:1). Ретельного перемішування вміст та центрифугували при 12000 g протягом 4 хвилин. Після цього відбирали водну фазу у епіндорф та додавали хлороформ, у співвідношенні 1:1. Знову центрифугували 4хв при 12000 g. Водна фаза відбиралась та змішувалась із охолодженим 96% етиловим спиртом (співвідношення 1:2,5), 1/10 об'ємом Ацетату Натрію(CH<sub>3</sub>COONa) та

глікогеном з кінцевою концентрацією. Далі суміш спирту ,глікогену на ацетату натрію зберігається у холодильнику протягом 14 годин при  $-20^{\circ}\text{C}$ , за для реакції преципітації. Після цього проходить останній цикл центрифугування (12000 g, 4 хв), утворений осад двічі промивають 70% охолодженим етанолом. Коли всі залишки етанолу випарувалися до цього ж епіндорфа додають суміш для ПЛР (TRAP- буфер, TS-праймер, CX – праймер, dNTPs, , Taq- полімераза, лізат клітин, ДЕПК-ова вода) та мінеральну олію, за для запобігання випаровуванню рідини [57, 58].

**2.4.4. Проведення ПЛР.** Після додавання зразків до суміші для ПЛР, поміщали пробірки в ампліфікатор та встановлювали таку програму ампліфікації:

Таблиця 2.1

Програма ампліфікатора, що використовується у методі TRAP

94°C	2хв	1х
94°C	10сек	30х
50°C	25сек	
72°C	30сек	
94°C	15сек	1х
50°C	25сек	
72°C	1хв	

**2.4.5. Ідентифікація результатів.** Наявність продуктів ампліфікації проводили за допомогою електрофоретичного розділення у 12% ПААГ (поліакриламідному гелі: акриламід 19:1, ТБЕ, Персульфат Амонію, ТЕМЕД, Деіонізована вода). Зразки змішують із буфером для нанесення та вносять по 20мкл у комірку. При електрофорезуванні використовувались наступні параметри : спочатку при 100V, 20mA, далі при 400 V, 40 mA.

Після електрофоретичного розділення продуктів гель фарбували ДНК-специфічним флуоресцентним барвником (БЕ, SYBR Green). Аналізування результатів проходило на автоматичному сканері гелів ChemiDoc при довжині хвиль 497-520 нм.

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1. Дослідження впливу ціанінових похідних на активність топоізомерази I

**3.1.1. Дослідження біологічної активності ціанінів як інгібіторів топоізомеразної активності.** У якості інгібіторів топоізомерази I у цій роботі досліджували «12» сполук – похідних ціаніну, які були синтезовані у відділі синтетичних біорегуляторів Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (Рис3.1). Досліджувані сполуки мають у своїй структурі хінолінове та бензімідазольне ядро.

Тестування інгібувальної активності досліджуваних похідних ціаніну проводили за допомогою безклітинної системи релаксації топоізомеразою I суперспіралізованої плазмідної ДНК pBR322. Через дію ТопоI з ланцюга ДНК знімається торсійна напруга, суперспіралізована форма переходить в релаксовану, що добре виділяється при гель-електрофорезі. Повне блокування чи гальмування переходу суперспіралізованої форми ДНК в релаксовану можливо через дію інгібіторів топоізомерази. Ознакою інгібування є зниження кількості релаксованої форми у присутності інгібітора.

Перший етап передбачав первинний скринінг похідних ціаніну на наявність інгібувальної активності до ТопоI при однаковій концентрації, 50 мкМ. Для цього проводили дослідження сполук ILO-1, ILO-2, LO-1 LO-2 LO-3 LO-5 LO-7 LO-8, LO-12, LO-16, LO-18, LO-20 з подальшою детекцією результатів за допомогою електрофорезу у 1% агарозному гелі. (Рис 3.2)

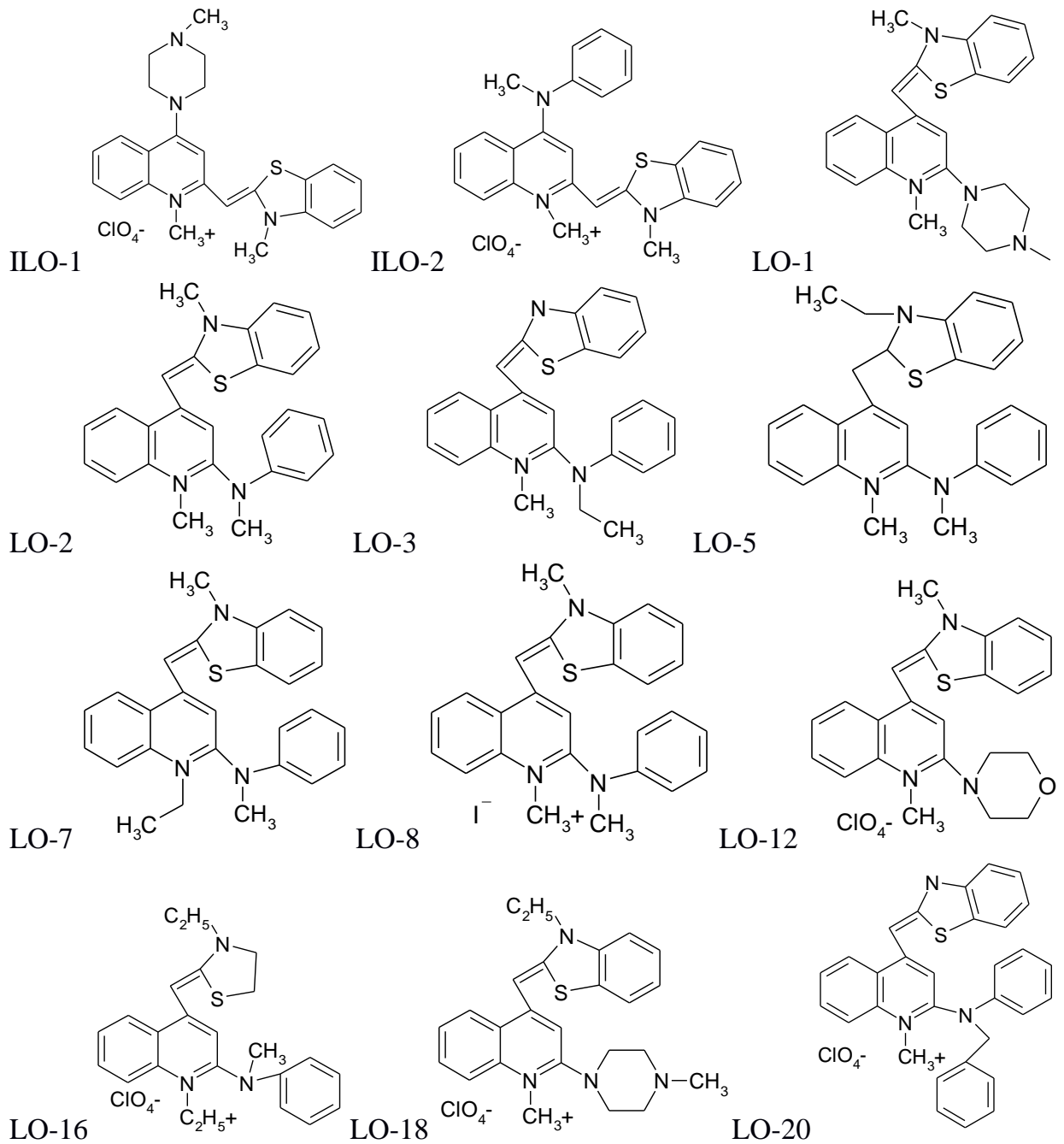


Рис 3.1 Структурні формули досліджуваних похідних ціаніну.

Оцінка проводилася при порівнянні контролів з ДНК формами досліджуваних похідних. Реакція ферментативного переходу суперспіралізованої форми ДНК у релаксовану добре візуалізується за допомогою 1% агарозного гелю.

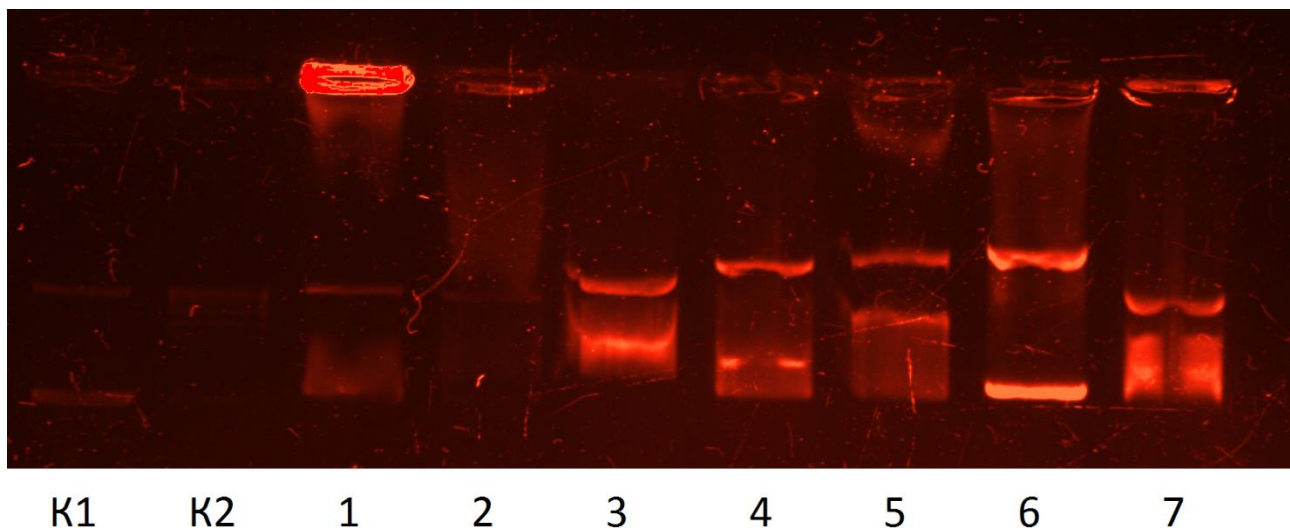


Рис 3.2 Електрофореграма продуктів реакції ферментативної релаксації ссДНК в присутності досліджуваних сполук за концентрації 50 мкМ. K1-Негативний контроль ( за відсутності досліджуваних сполук та Топо I); K2-Позитивний контроль ( за відсутності досліджуваних сполук); 1- ILO-1; 2-ILO-2, 3-LO-8, 4-LO-12, 5-LO-16, 6-LO-18, 7-LO-20.

Яскраво виражена присутність суперспіралізованої форми ДНК у сполук LO-8, LO-18, LO-20 (доріжки 3, 6 та 7 на електрофореграмі), яка відповідає негативному контролю, вказує на наявність інгібувальної дії похідних до Топо I. Дорідки 1, 4 та 5, на яких знаходяться ILO-1, LO-12, LO-16 не мають чітко-вираженої суперспіралізованої ДНК, що відповідає негативному контролю, але видно що не вся ДНК релаксована. Ці сполуки потребують подальшого дослідження для підтвердження наявності інгібувальної активності.

Відмінна картина спостерігається на доріжці 2, де знаходиться ILO-2. Тут наявна лише релаксована форма ДНК, яка відповідає позитивному контролю. Це свідчить про те, що ферментативна активність топоізомерази не була пригнічена. Основуючись на цьому можна зробити висновок: ILO-2 не пригнічує Топо I.

За результатами первинного скринінгу відібрано 11 сполук (ILO-1, LO-1, LO-2, LO-3, LO-5, LO-7, LO-8, LO-12, LO-16, LO-18, LO-20) для подальшого

виявлення концентраційної залежності інгібувальної дії та визначення їхньої інгібувальної активності ( $IC_{50}$ ).

Подальший аналіз сполук наведено на прикладі ІЛО-1 (Рис 3.3).

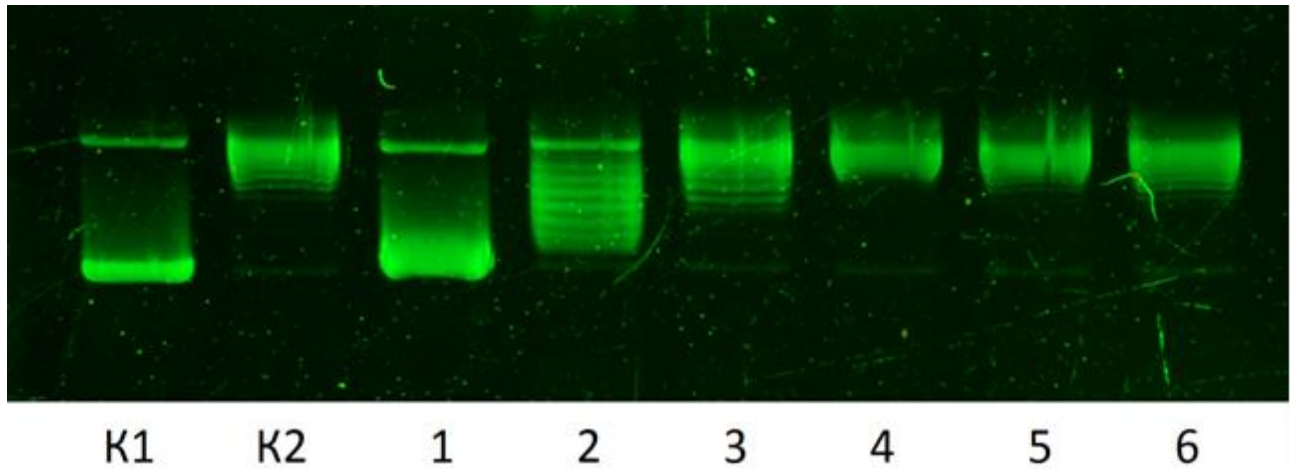


Рис 3.3 Електрофореграма продуктів реакції релаксації ссДНК досліджуваної сполуки ІЛО-1 для визначення концентраційної залежності. K1 – Негативний контроль (при відсутності Топо I та досліджуваної сполуки); K2 – Позитивний контроль (при відсутності досліджуваної сполуки); 1 – концентрація 25мкМ; 2 – концентрація 12мкМ; 3 – концентрація 6мкМ; 4 – концентрація 3мкМ; 5 – концентрація 1.5мкМ; 6 – концентрація 0,75мкМ.

Розрахунок ступеню інгібування топоізомерази вимагає враховувати відстань, пройдену а гелі різними формати ДНК в присутності ігнібітора при різних концентраціях та формами ДНК позитивного та негативного контролів.

Отриманні данні були записані та обраховані за допомогою програми Microsoft® Excel.

На основі цього у програмі «Оріджин» був побудований графік залежності ступеню інгібування від концентрації досліджуваної сполуки та обраховано значення  $IC_{50}$ .

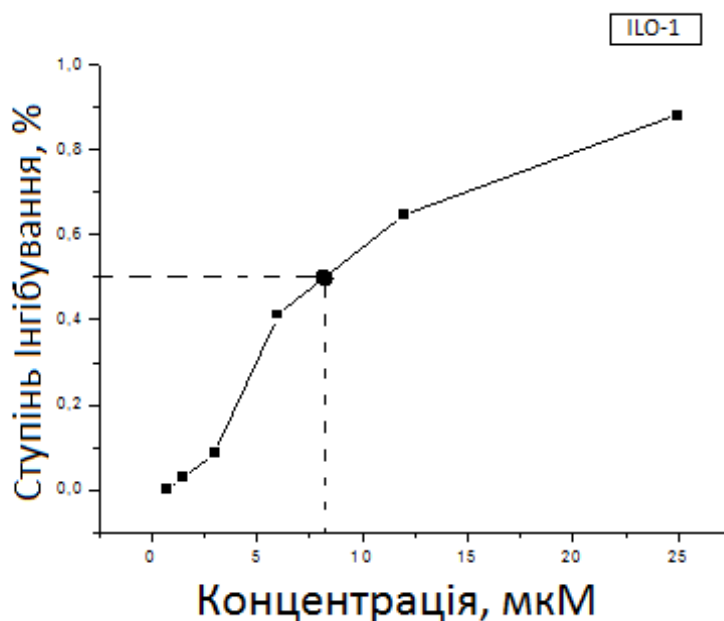


Рис.3.4 Графік залежності ступеню інгібування від концентрації досліджуваної сполуки ILO-1.

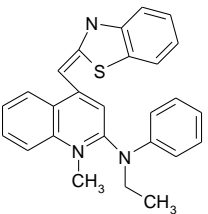
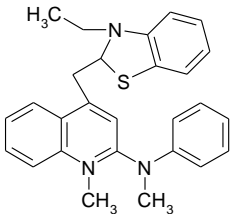
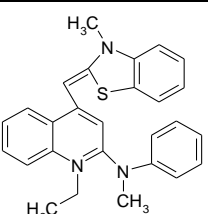
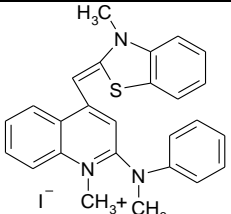
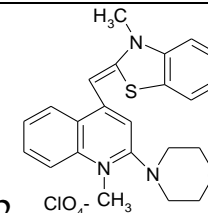
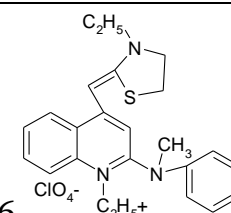
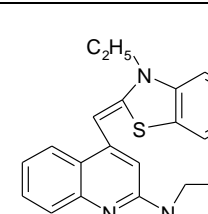
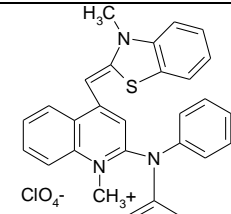
Ця схема є основою для дослідження всіх інгібіторів та визначення значення 50% інгібування топоізомерази. Отримані дані наведено в таблиці 3.1

Таблиця 3.1

Значення  $IC_{50}$  для досліджуваних похідних ціаніну

Похідні ціаніну	$IC_{50}$ (мкМ)	Похідні ціаніну	$IC_{50}$ (мкМ)
<p>ILO-1</p>	$8.3 \pm 0.5$	<p>ILO-2</p>	Н.А.
<p>LO-1</p>	$2.5 \pm 0.3$	<p>LO-2</p>	М.А

Продовження табл. 3.1

 <p>LO-3</p>	M.A	 <p>LO-5</p>	4.5 ± 0.5
 <p>LO-7</p>	M.A	 <p>LO-8</p>	0.5 ± 0.05
 <p>LO-12</p>	3.7 ± 0.3	 <p>LO-16</p>	4.5 ± 0.5
 <p>LO-18</p>	0.1 ± 0.05	 <p>LO-20</p>	2.5 ± 0.2

\* $p \leq 0,05$  ; \*\*Н.А. - активність при 50 мкМ не більше аніж 5 %, М.А. – сполука проявляє активність при концентрації менше 50 мкМ.

Таким чином, досліджувана речовина ІЛО-2 має найменшу біологічну активність  $IC_{50} \geq 50$  мкМ серед досліджуваних сполук. Сполуки ІЛО-1, LO-1, LO-3, LO-5, LO-7, LO-8, LO-12, LO-16, LO-18, LO-20 проявляють активність, значення якої знаходиться у межах від 8,3 до 0,1 мкМ. Сполуки LO-2, LO-3 та LO-7 проявляють активність при концентраціях менше 50 мкМ. Найактивнішими сполуками, серед них, є LO-8 ( $IC_{50} = 0,5 \pm 0,05$ ) та LO-18 ( $IC_{50} = 0,1 \pm 0,05$ ). ІЛО-1 має найменший показник активності інгібування з досліджених сполук ( $IC_{50} = 8,3 \pm 0,5$ ).

### 3.1.2. Визначення способу зв'язування досліджуваних сполук з ДНК.

Існує кілька можливих варіантів інгібування дії топоізомерази: прямим і не

прямим шляхом. Це можливо через 3 механізми. Перший – через зв’язування ліганду з ДНК, що унеможливорює подальшу взаємодію з топоізомеразою, другий - через зв’язування ферменту та третій – через стабілізацію комплексу ДНК-фермент. Зазвичай для того аби можна було перевірити механізм зв’язування інгібітора використовують метод заміщення флуорофора (ФІД або Fluorescent Intercalator Displacement), але через природню флуорисценцію досліджуваних похідних це неможливо. Тож для визначення механізмів біологічної активності сполук було проведено дослідження їх взаємодії з ДНК електрофоретичним методом EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) та методом спектрофотометричного дослідження.

Першим проводили аналіз зрушення електрофоретичної рухливості (Mobility Shift), який часто використовується для визначення зв’язування білків та низькомолекулярних лігандів з ДНК та РНК. Були досліджені ціанінові похідні LO-1, LO-2, LO-3, LO-5, LO-7, LO-8. Візуалізація та ідентифікація результатів відбувалася за допомогою гель-електрофорезу у 0,8% агарозному гелі з використанням у якості барвника розчин SYBR Green I.

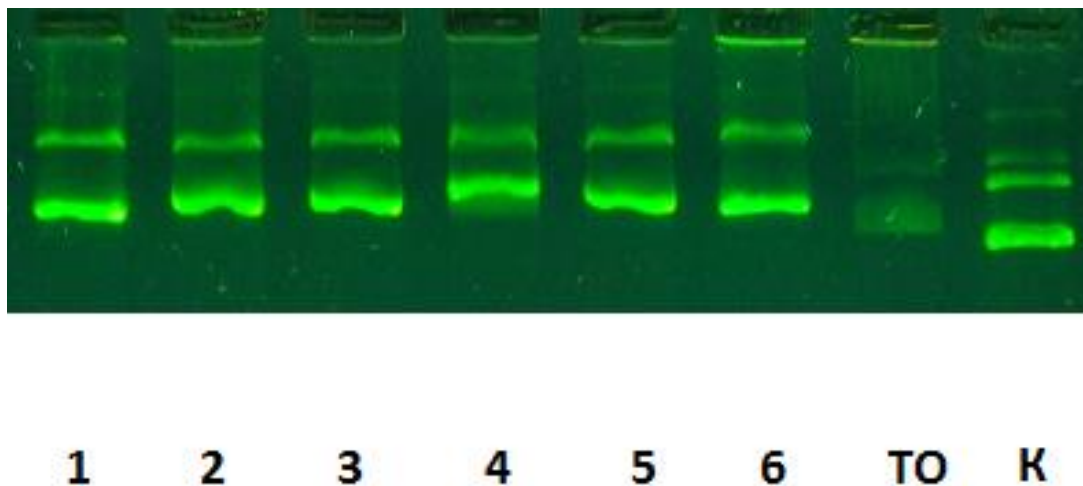


Рис 3.5 Електрофореграма інкубації ціанінових похідних з плазмідною ДНК рBR322. К-контроль (без додавання барвника), ТО- інтеркалятор Тіазоловий Оранжевий, 1- LO-1, 2-LO-2, 3-LO-3, 4-LO-5, 5-LO-7, 6- LO-8.

Первинний скринінг показав, що досліджувані сполуки, при порівнянні

з контролем, сповільнюють рух ДНК. Особливо це помітно у LO-8, LO-5 та LO-7. При порівнянні з Тіазоловим Оранжевим ( у якості інтеркалюючого барвника) видно, що похідні ціаніну мають більш високу ефективність зв'язування, адже вони мають більший вплив на рухливість ДНК в гелі.

Просування комплексу ДНК-ліганд у агарозному гелі призводить до деформації смуги ДНК. Це, ймовірно, пов'язано з нерівномірною нейтралізацією частини заряду молекул або ж зміну конформації ДНК.

Швидкість руху комплексу ліганд-ДНК у агарозному гелі, при зменшенні параметрів молярної концентрації фосфатів та ліганду (до 10), падає. Якщо ж концентрація ліганду зростає, то спостерігається деформація смуг ДНК. Це може свідчити про їх часткову денатурацію.

Другим методом є спектрофотометричне дослідження зв'язування ДНК з досліджуваним лігандом. Були досліджені такі сполуки як: LO-1, LO-2, LO-3, LO-5, LO-7, LO-8, LO-20, що проявили біологічну активність у безклітинній модельній системі релаксації суперспіралізованої плазмідної ДНК pBR322 топоізомеразою I *in vitro*. У дослідженні було використано комплекс ліганд ДНК, зі сталою концентрацією ліганду (10 мкМ) та змінною концентрацією ДНК : 10, 20, 30, 40, 50, 60,70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 та 180мкМ. Детекція поглинання вільного та зв'язаного ліганду відбувалася за допомогою спектрофотометру Helios Alpha <sup>™</sup>, після кожного додавання комплексу ліганд-ДНК. Отриманні результати опрацьовували програмами Microsoft® Excel та Оріджин.

Дані, отримані із спектрофотометричного дослідження підтверджують те, що досліджувані сполуки формують стійкий комплекс з дволанцюговою ДНК. При чому спектри поглинання ціанінових похідних в присутності ДНК вказують на наявність зсуву максимумів поглинання приблизно на 10-20 нм. Крім того спостерігається зменшення інтенсивності поглинання світла барвником у двохвильовій смузі (гіпохромний ефект).

Такі зміни свідчать про утворення комплексу ліганд-ДНК, ймовірно, інтеркаляційного типу. Наслідком збільшення концентрації досліджуваної

сполуки є зростання додатково піку при меншій довжині хвилі. Це може визначатись агрегацією барвників на ДНК. Даний ефект характерний для тих лігандів, що зв'язуються з ДНК через механізм ніпів-інтеркаляції.

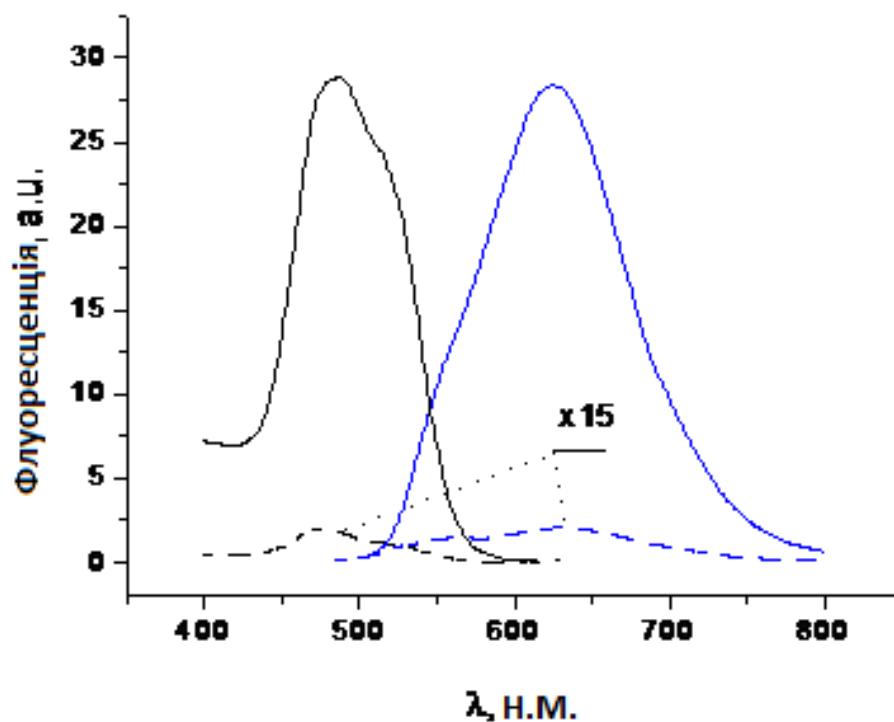


Рис. 3.6 Спектри вільного та зв'язаного в комплексі з ДНК із сперми лосося LO-7 у воді при 490 нм. Концентрація барвника та ДНК  $10^{-5}$  М. Зліва - збудження барвника, справа – флуоресценція, пунктир – вільний барвник, комплекс ДНК-ліганд – суцільна лінія.

Спектри флуоресценції підтверджують взаємодію похідних ціаніну з ДНК. Утворення комплексу ДНК-ліганд призводить до різкого зростання емісії, що супроводжується зсувом Стокса, до 140 нм.

На основі даних спектрофотометрії, отриманих методом титрування, визначили значення концентрації вільного ( $C_B$ ) та зв'язаного лігандів ( $C_{ЗВ}$ ), а також кількості зв'язаного фарбника на фосфат ДНК ( $r$ ) та кількості зв'язаного фарбника на фосфат ДНК поділене на концентрації вільного ліганду в розчині ( $r/C$ ).

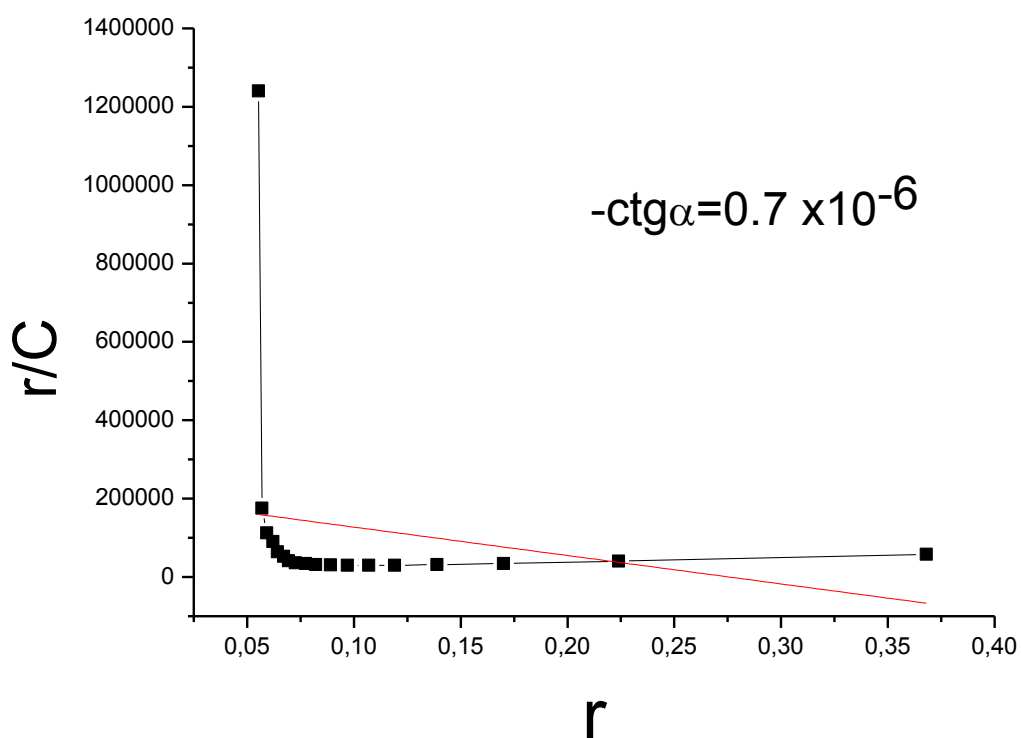
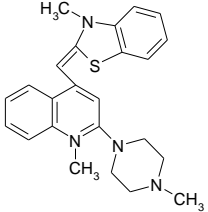


Рис 3.7 Графік залежності  $r$  від  $r/C$  досліджуваної сполуки LO-20.

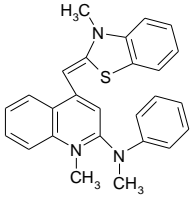
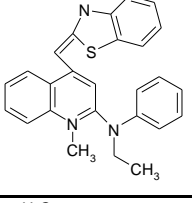
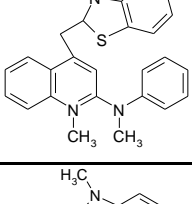
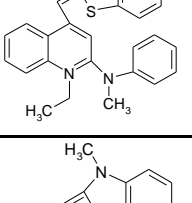
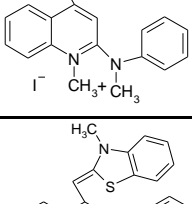
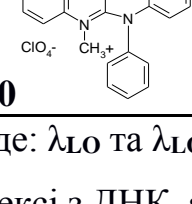
Використовуючи метод Скетчерда та графік залежності  $r$  від  $r/C$  визначили константи зв'язування ( $K_b$ ) досліджуваних похідних ціанінів, що знаходяться в межах від  $0.7-4.3 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$ . Отриманні данні занесені в таблицю 3.2

Таблиця 3.2

Спектральні властивості похідних ціаніну та їх комплексів з ДНК

Сполука	$\lambda_{LO}(\text{нм})$	$\lambda_{LO/ДНК}(\text{нм})$	$\epsilon_{LO}(\text{M}^{-1} \text{ см}^{-1})$	$\epsilon_{LO/ДНК}(\text{M}^{-1} \text{ см}^{-1})$	Константа зв'язування $K_b(\text{M}^{-1})$
 <b>LO-1</b>	480	500	49400	33400	$1.7 \times 10^{-6}$

Продовження таблиці 3.2

 <b>LO-2</b>	492	517	41400	25000	$1.3 \times 10^{-6}$
 <b>LO-3</b>	490	500	45400	31100	$1.6 \times 10^{-6}$
 <b>LO-5</b>	492	517	58800	32700	$4.3 \times 10^{-6}$
 <b>LO-7</b>	492	518	45300	26200	$1.1 \times 10^{-6}$
 <b>LO-8</b>	480	490	40400	34600	$3.7 \times 10^{-6}$
 <b>LO-20</b>	499	504	55317	41147	$0,7 \times 10^{-6}$

де:  $\lambda_{LO}$  та  $\lambda_{LO/днк}$  – максимум поглинання ціаніну у вільному стані та в комплексі з ДНК,  $\epsilon_{LO}$  та  $\epsilon_{LO/днк}$  – відповідні коефіцієнти екстинкції.

Інгібувальна активність похідних ціаніну серії LO щодо Топо I, виходячи з отриманих даних, може визначатися через зв'язування з ДНК, ймовірно, за рахунок інтеркаляції. Це може призводити до інгібування активності топоізомерази, адже в такому випадку фермент не має змоги взаємодіяти із дволанцюговою ДНК.

### 3.2. Дослідження впливу новосинтезованих похідних ціаніну на активність теломерази

**3.2.1 Дослідження біологічної активності похідних ціанінів як інгібіторів теломерної активності.** З метою оцінки активності ціанінових похідних як інгібіторів теломерази та їх зв'язування було проведено тестування за допомогою ферментативного методу ампліфікації теломерних повторів (TRAP, Telomeric Repeat Amplification Protocol). Цей метод дає можливість визначити активність теломерази (*in vitro*) та оцінити на неї вплив інгібіторів.

Дослідження біологічної активності ціанінових похідних проводили у 3 етапи. Перший етап - нарощення теломерних повторів (TTAGGG) на основі олігонуклеотидного праймера (TS) теломеразою, що міститься в лізаті клітинної лінії карциноми молочної залози людини MCF-7. За для визначення біологічної активності на цьому ж етапі додавали досліджувані сполуки (LO-1, LO-2, LO-3, LO-5, LO - 7, LO-8, LO-12, LO -18, LO-20, ІЛО-2). Другий етап являє ампліфікацію методом ПЛР (Полімеразна Ланцюгова Реакція) продуктів теломеразної реакції. Ампліфікація здійснюється за допомогою ферменту *Taq*-ДНК-полімерази, при внесенні праймеру СХ. Для виключення інгібування дії *Taq*-ДНК-полімерази перед ПЛР проводили фенольне очищення зразків від досліджуваних сполук. Послідовності використаних у ПЛР праймерів виглядають так:

Праймер TS: 5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'

Праймер СХ: 5'-CCCTTACCCTTACCCTTACCCTAA-3'

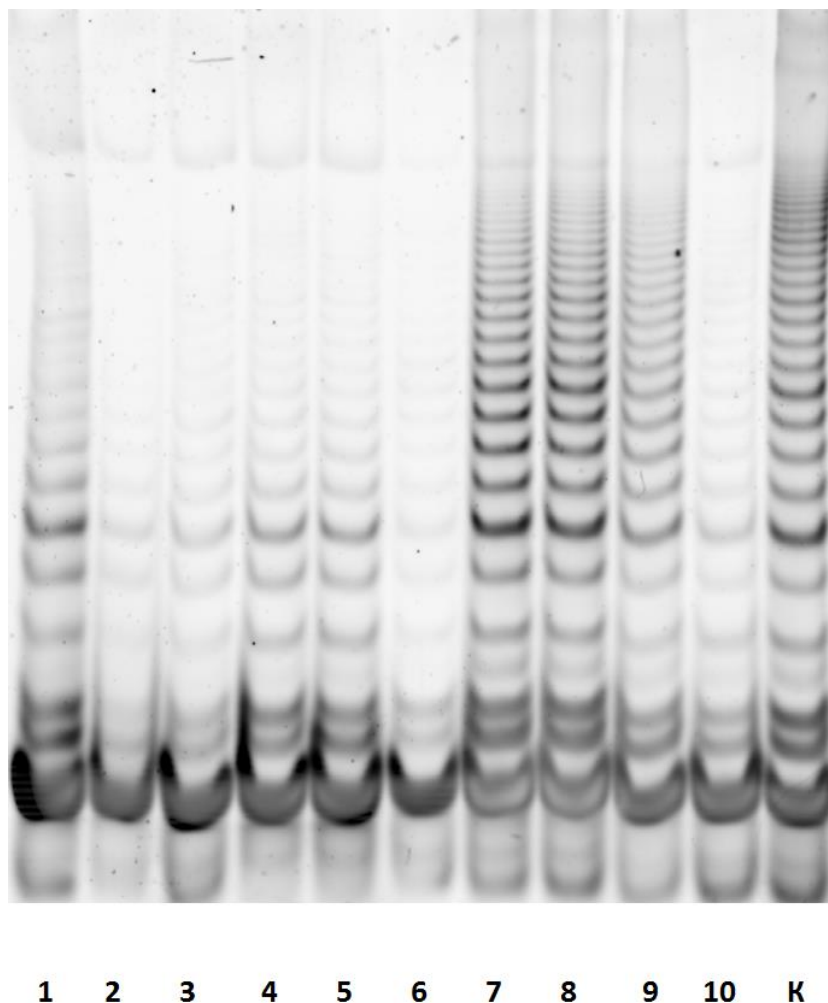


Рис 3.8 Електрофореграма продуктів реакції теломеризації при додаванні досліджуваних похідних ціанінів при концентрації 20 мкМ. 1 – LO-1, 2 – LO-12, 3 – LO-3, 4 – LO-2, 5 – LO -18, 6 – LO-20, 7 – LO-5, 8 – ІЛО-2, 9 – LO - 7, 10 - LO-8, К – контрольна реакція без додавання інгібітора.

Третій етап включає в себе детекцію та ідентифікацію продуктів реакції елонгації телімеризуючого праймера за допомогою електрофорезу в 12% ПААГ (поліакриламідному гелі). Візуалізація ДНК відбувається за допомогою флуорисцентного барвника SYBR Green I. У якості контролю використали зразки без додавання досліджуваної речовини (100% продуктів реакції)

Первинний скринінг показав, що всі досліджувані похідні ціаніну проявляють інгібувальну активність до теломерази при мікромольних концентраціях (40мкМ). Такі сполуки як LO-12 та LO-20 зберігають цю

активність і при 20 мкМ. LO-8 активний і при 10 мкМ.

Можна зробити висновок, що досліджувані похідні ціаніну, маючи високу константу зв'язування, стабілізують G-квадруплекс теломерної ділянки ДНК, що унеможлиблює ферментативну дію теломерази. Загалом ці сполуки, маючи катіонний характер, забезпечують хорошу взаємодію з ДНК, і це дозволяє їм взаємодіяти з G-квадруплексами ДНК через  $\pi$ -електронні системи або ж борозенки.

Для кращого розуміння механізмів дії ціанінових барвників серії LO необхідно подальше дослідження.

## УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Сполуки родини ціанінів добре відомі як флуоресцентні та нефлуоресцентні барвники, що широко застосовуються в молекулярно-біологічних, біохімічних і медичних дослідженнях Їх сферами використання є в першу чергу флуоресцентне мічення біомолекул різних класів, візуалізація білків і нуклеїнових кислот в електрофоретичних гелях та гомогенна детекція в розчині. До сполук ряду ціанінів належать, наприклад, такі широковідомі комерційні реагенти як монометинціаніни YO (Оксазоловий Оранжевий) і TO (Тіазоловий Оранжевий) та їхні димери YOYO та TOTO, SYBR Green I та II, PicoGreen, три- та пентаметинціаніни Cy3 та Cy5, що використовуються насамперед для мічення нуклеїнових кислот, барвники для мічення білків SYTO, SYPRO Ruby та ін. Багато похідних ціанінів ефективно взаємодіють із дуплексною ДНК. Їхнє зв'язування часто супроводжується різким зростанням флуоресценції, що й лежить в основі як гетеро-, так і гомогенної флуоресцентної детекції дуплексної ДНК. Серед ціанінів виявлено й ефективні ліганди G4-структур. В той же час, структура ціанінів надає широкі можливості для дизайну молекул, що ефективно зв'язуються із ДНК-мішенями [2-3, 7, 10-11].

Структури монометинціанінів, що містять хінолінове та бензімідазольні ядро, близькі до структур ряду активних інгібіторів топоізомерази із одним розімкнутим кільцем. Виходячи з цього, ціаніни також могли би бути інгібіторами цього фермента. Тим більше що розкриття одного циклу в ціаніні (якщо порівнювати з камптотецином, берберином та подібними сполуками) може сприяти більшій гнучкості молекули й відповідно оптимальній її “підгонці” до структури топоізомеразного комплексу [13-14, 59]. Як і очікувалось, серед похідних ціанінів виявлено сполуки, що повністю інгібують фермент в мікромольних концентраціях. Було виявлено, що сполука ILO-2 має найменшу біологічну активність  $IC_{50} > 50$  мкМ серед досліджуваних похідних. Для інших сполук, а саме ILO-1, LO-5, LO-8, LO-12,

LO-16, LO-18, LO-20 значення  $IC_{50}$  знаходиться у межах від 8.3 до 0.1 мкМ. Особливо активними ціанінами є LO-18 та LO-8, що діють у субмікромолярних концентраціях ( $IC_{50}$  0.1-0.5 мкМ). Значення  $IC_{50}$  для найрозповсюдженого інгібітора топоізомерази — іринотекану становить від 15.8 мкМ для клітин лінії LoVo і 5,17 мкМ для HT-29 клітин (рак прямої кишки епітеліальної природи). Враховуючи це, дані сполуки є перспективними для подальшої перевірки їх протипухлинної та протимікробної активності.

Досліджено деякі аспекти механізму біологічної дії активних інгібіторів. Електрофоретичним методом Mobility Shift показано, що ціаніни серії LO ефективно взаємодіють з ДНК, гальмуючи її рух в гелі внаслідок утворення стійких флуоресцентних комплексів, що, серед іншого, дає можливість використовувати їх для візуалізувати ДНК в електрофоретичних гелях. Спектри поглинання ціанінів у присутності ДНК різко змінюються (червоний зсув на 18-22 нм та значний гіпохромізм довгохвильової смуги). Це свідчить про те, що інгібуюча активність ціанінів щодо ТопоI (топоізомераза не може нормально взаємодіяти зі своїм субстратом (ДНК), з яким взаємодіє ліганд, що й веде до інгібування її активності) може визначатися їхнім зв'язуванням з ДНК, ймовірно, шляхом інтеркаляції. За рахунок цього зв'язування, можливо, й відбувається пригнічення фермента [56]. Підтвердженням цього є високі значення констант зв'язування досліджуваних сполук, які знаходиться в межах  $0.7-4.3 \times 10^{-6} M^{-1}$ . Найбільшим цей показник у LO-8 ( $K_b 3.7 \times 10^{-6} M^{-1}$ ) та LO-5 ( $K_b 4.3 \times 10^{-6} M^{-1}$ ).

Такі протипухлинні ліганди квадруплексної ДНК, як теломестатин, порфірини чи похідні карбазоли, давно й широко вивчаються. В той же час, потенціал ціанінів як інгібіторів теломерази досліджений недостатньо, хоча геометрія молекул ціанінів дозволяє їм добре взаємодіяти з G-квартетами. Виходячи з даних літератури щодо структури відомих лігандів G-квадруплексів, нами було запропоновано структури ціанінів, що поєднують елементи ціанінів TO і SYBR Green I [7, 10-11, 60].

Вплив нових похідних ціанінів, як потенційних лігандів G4-ДНК й

інгібіторів теломерази, досліджували *in vitro* в ферментативній тест-системі TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol, метод ампліфікації теломерних повторів). Серед цих сполук виявлено інгібітори фермента, активні в мікромольних концентраціях (10-40 мкМ). Найактивнішими серед них є LO-8, LO-12 та LO-20. Можна стверджувати що активність LO-8 зберігається і при 10 мкМ.

Молекули цих сполук мають катіонний характер і додатково містять основний аміно-замісник, що забезпечує хорошу взаємодію лігандів із поліаніонами НК. Вони мають загальну структуру, яка дозволяє їм перекриватися з  $\pi$ -електронними системами G-квартетів або ж взаємодіяти з борозенками G-квадруплексів [60].

Таким чином, виявлені у перспективі, після відповідної оптимізації структури, зможуть значно підвищити ефективність і специфічність дії та знайти використання в медицині для терапії онкологічних захворювань.

## ВИСНОВКИ

1. У результаті проведеного біологічного тестування препаратів у тест-системах вперше показано інгібувальну активність похідних ціанінів серії LO щодо топоізомерази I та теломерази *in vitro*.

2. Виявлено 8 сполук, що інгібували процес релаксації суперспіралізованої ДНК топоізомеразою I у мікромольних концентраціях ( $IC_{50} \leq 9 \mu\text{M}$ ). Найвищу активність у наномольному діапазоні концентрацій виявили ціаніни LO-8 та LO-18 (значення  $IC_{50}$  відповідно 0,8 та 0,1  $\mu\text{M}$ )

3. Досліджені похідні ціанінів серії LO інгібують теломеразу в мікромольних концентраціях, LO-8, LO-12 і LO-20 зберігають біологічну активність і в концентрації 10  $\mu\text{M}$ .

4. Електрофоретичним і спектрометричними методами показано, що ціаніни серії LO утворюють стійкий ліганд-ДНК комплекс. Це свідчить про те, що інгібуюча активність ціанінів щодо ТопоI може зумовлюватись їхнім зв'язуванням з ДНК.

5. Визначено константи зв'язування сполук з дволанцюговою ДНК. Високе значення  $K_b$  ( $0.7-4.3 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$ ) свідчить про високу афінність до ДНК.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. Richard C Mohsa, Nigel H Greig. Drug discovery and development: Role of basic biological research. *Alzheimers Dement (N Y)*. [Internet]. 2017 Nov [cited 2017 Nov 11]; 3(4): 651–657. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5725284/>
2. Blass BE. Basic Principles of Drug Discovery and Development. *Elsevier – Academic Press, Amsterdam-Boston-Heidelberg*, 2015. – 580 PP.
3. Wang T, Wu MB, Zhang RH, Chen ZJ, Hua C, Lin JP, Yang LR. Advances in computational structure-based drug design and application in drug discovery. *Curr. Top. Med. Chem.* [Internet]. 2016 [cited 2016 Mar]; 16(9):901-16. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26303430>.
4. Kirsch P, Hartman AM, Hirsch AKH, Empting M. Concepts and core principles of fragment-based drug design. *Molecules*. [Internet]. 2019 [cited 2019 Nov 26]; 24(23). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31779114>
5. . Baig MH, Ahmad K, Roy S, Ashraf JM, Adil M, Siddiqui MH, Khan S, Kamal MA, Provazník I, Choi I. Computer aided drug design: success and limitations. *Curr. Pharm. Des.* [Internet]. 2015 Now [cited 2016 21 Jan]; 22(5):572-81. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26601966>
6. Chen Y, Zhang Y. Functional and mechanistic analysis of telomerase: An antitumor drug target. *Pharm. Ther.* [Internet]. 2016 Apr [cited 2016 Jul]; 163:24-47. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27118336>
7. Islam MK, Jackson PJ, Rahman KM, Thurston DE. Recent advances in targeting the telomeric G-quadruplex DNA sequence with small molecules as a strategy for anticancer therapies. *Future Med. Chem.* [Internet]. 2016 May [cited 2016 Jul 21]; 8(11):1259-90. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27442231>
8. . Neidle S. Quadruplex nucleic acids as targets for anticancer therapeutics. *Nat. Rev. Chem.* [Internet]. 2017 May [cited 2017 Jul]; 1:0041. Available from:

[https://www.researchgate.net/publication/317139801\\_Quadruplex\\_nucleic\\_acids\\_as\\_targets\\_for\\_anticancer\\_therapeutics](https://www.researchgate.net/publication/317139801_Quadruplex_nucleic_acids_as_targets_for_anticancer_therapeutics)

9. Schrank Z, Khan N, Osude C, Singh S, Miller RJ, Merrick C, Mabel A, Kuckovic A, Puri N. Oligonucleotides targeting telomeres and telomerase in cancer. *Molecules*. [Internet]. 2018 Jun [cited 2018 Sep]; 5;23(9). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30189661>

10. Asamitsu S, Obata S, Yu Z, Bando T, Sugiyama H. Recent progress of targeted G-quadruplex-preferred ligands toward cancer therapy. *Molecules*. [Internet]. 2019 Feb [cited 2019 Jan 24]; 24(3): 429. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6384606/>

11. Ferreira R, Artali R, Benoit A, Gargallo R, Eritja R, Ferguson DM, Sham YY, Mazzini S. Structure and stability of human telomeric G-quadruplex with preclinical 9-aino aridines. *PLoS One*. [Internet]. 2013 Jan [cited 2013 Mar 15]; 8(3):e57701. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3598906/>

12. Schrank Z, Khan N, Osude C, Singh S, Miller RJ, Merrick C, Mabel A, Kuckovic A, Puri N. Oligonucleotides targeting telomeres and telomerase in cancer. *Molecules*. [Internet]. 2018 Jun [cited 2018 Sep 5]; 23(9): 2267. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6225148/>

13. Kathiravan MK, Khilare MM, Nikoomanesh K, Chothe AS, Jain KS. Topoisomerase as target for antibacterial and anticancer drug discovery. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem*. [Internet]. 2012 Mar 1 [cited 2013 Jun 28]; 28(3):419-35. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22380774>

14. Pommier Y. Drugging topoisomerases: lessons and challenges. *ACS Chem. Biol*. [Internet]. 2013 Jan 4 [cited 2013 Jan 18]; 8(1):82-95. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23259582>

15. Xu Y, Her C. Inhibition of topoisomerase (DNA) I (TOP1): DNA damage repair and anticancer therapy. *Biomolecules*. [Internet]. 2015 Jun 22 [cited 2015 Aug 3]; 5(3):1652-70. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26287259>

16. Capranico G, Marinello J, Chillemi G. Type I DNA topoisomerases. *J. Med. Chem.* [Internet]. 2017 Mar 23 [cited 2017 Jan 24]; 60(6):2169-2192. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28072526>
17. Wang JC. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* [Internet]. 2002 Jun [cited 2002 Sep 17];4(6):430-40. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrm831> DOI: 10.1038/nrm831
18. Champoux JJ. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem.* [Internet]. 2001 May [cited 2002 Feb 1];70(1):369-413. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11395412>
19. Merino A, Madden KR, Lane WS, Champoux JJ, Reinberg D. DNA topoisomerase I is involved in both repression and activation of transcription. *Nature.* [Internet]. 1993 Sep [cited 1995 Oct 24];365(6443):227–32. Available from: <https://www.nature.com/articles/365227a0> doi:10.1038/365227a0
20. Kato S, Kikuchi A. DNA topoisomerase: the key enzyme that regulates DNA super structure. *Nagoya J Med Sci.* [Internet]. 1998 May [cited 2004 Mar 16];61(1-2):11-26. Available from: [https://www.med.nagoyau.ac.jp/medlib/nagoya\\_j\\_med\\_sci/6112/NJ610102011](https://www.med.nagoyau.ac.jp/medlib/nagoya_j_med_sci/6112/NJ610102011).
21. Muller MT. Quantitation of eukaryotic topoisomerase I reactivity with DNA. Preferential cleavage of supercoiled DNA. *Biochim Biophys Acta.* [Internet]. 1985 Mar 20 [cited 1991 Mar 25];824(3):263-7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0167478185900570>
22. Wang JC. Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine. *Q Rev Biophys.* [Internet]. 1998 May [cited 1999 Feb 2];31(2):107-44. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9794033>
23. Singh P, Bhardwaj A. Mechanism of action of key enzymes associated with cancer propagation and their inhibition by various chemotherapeutic agents. *Mini Rev Med Chem.* [Internet]. 2008 Apr [cited 2009 Mar 20 ];8(4):388-98. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18473929>

24. Feun L, Savaraj N. Topoisomerase I inhibitors for the treatment of brain tumors. *Expert Rev Anticancer Ther.* [Internet]. 2008 May [cited 2010 Jun 15];8(5):707-16. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18471044>
25. Beretta GL, Perego P, Zunino F. Targeting topoisomerase I: molecular mechanisms and cellular determinants of response to topoisomerase I inhibitors. *Expert Opin Ther Targets.* [Internet]. 2008 Oct [cited 2009 Sep 10];12(10):1243-56. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18781823>
26. Sekiguchi J, Shuman S. Stimulation of vaccinia topoisomerase I by nucleoside triphosphates. *J Biol Chem.* [Internet]. 1994 Nov [cited 1998 Sep 15];269(47):29760-4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7961968>
27. Giles GI, Sharma RP. Topoisomerase enzymes as therapeutic targets for cancer chemotherapy. *Med Chem.* [Internet]. 2005 Jul [cited 2007 Jan 30]; 1(4):383-94. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16789895>
28. Wilson RJ. Progress with parasite plastids. *J Mol Biol.* [Internet]. 2002 May [cited 1997 Sep 17]; 319(2):257-74. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12051904>
29. Slesarev AI, Stetter KO, Lake JA, Gellert M, Krah R, Kozyavkin SA. DNA topoisomerase V is a relative of eukaryotic topoisomerase I from a hyperthermophilic prokaryote. *Nature.* [Internet]. 1993 Aug [cited 1995 Mar 28];364(6439):735-7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8395022>
30. Forterre P, Gribaldo S, Gadelle D, Serre MC. Origin and evolution of DNA topoisomerases. *Biochimie.* [Internet]. 2007 Apr [cited 2008 Feb11];89(4):427-46. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17293019>
31. Stewart L, Redinbo MR, Qiu X, Hol WG, Champoux JJ. A model for the mechanism of human topoisomerase I. *Science.* [Internet]. 1998 Mar [cited 1998 Jul 15]; 279(5356):1534-41. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9488652>

32. Yang Z, Champoux JJ. The role of histidine 632 in catalysis by human topoisomerase I. *J Biol Chem.* [Internet]. 2001 Jan [cited 1998 Jul 15];276(1):677-85. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9488652>
33. Tanizawa A, Kohn KW, Pommier Y. Induction of cleavage in topoisomerase I c-DNA by topoisomerase I enzymes from calf thymus and wheat germ in the presence and absence of camptothecin. *Nucleic Acids Res.* [Internet]. 1993 Nov 11 [cited 1995 Sep 12]; 21(22):5157–5166. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC310631/>
34. Camilloni G, Di Martino E, Caserta M, di Mauro E. Eukaryotic DNA topoisomerase I reaction is topology dependent. *Nucleic Acids Res.* [Internet]. 1988 Jul 25 [cited 1992 Jul 11];16(14B):7071-85. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2841648>
35. Been MD, Burgess RR, Champoux JJ. Nucleotide sequence preference at rat liver and wheat germ type 1 DNA topoisomerase breakage sites in duplex SV40 DNA. *Nucleic Acids Res.* [Internet]. 1984 Apr 11 [cited 1992 Jul 11];12(7):3097-114. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6326051>
36. Bonven BJ, Gocke E, Westergaard O. A high affinity topoisomerase I binding sequence is clustered at DNAase I hypersensitive sites in Tetr Tetrahymena R-chromatin. *Cell.* [Internet]. 1985 Jun [cited 1992 Feb 15];41(2):541-51. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2985282>
37. Stevnsner T, Mortensen UH, Westergaard O, Bonven BJ. Interactions between eukaryotic DNA topoisomerase I and a specific binding sequence. *J Biol Chem.* [Internet]. 1989 Jun 15 [cited 1991 Mar 25];264(17):10110-3. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2542321>
38. Leteurtre F, Kohlhagen G, Fesen MR, Tanizawa A, Kohn KW, Pommier Y. Effects of DNA methylation on topoisomerase I and II cleavage activities. *J Biol Chem.* [Internet]. 1994 Mar 18 [cited 1997 Feb 24];269(11):7893-900. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8132507>
39. Stewart L, Ireton GC, Champoux JJ. The domain organization of human topoisomerase I. *J Biol Chem.* [Internet]. 1996 Mar 29 [cited 1998 Jun

15];271(13):7602-8. Available from:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8631794>

40. Alsner J, Svejstrup JQ, Kjeldsen E, Sørensen BS, Westergaard O. Identification of an N-terminal domain of eukaryotic DNA topoisomerase I dispensable for catalytic activity but essential for in vivo function. *J Biol Chem*. [Internet]. 1992 Jun 25 [cited 1996 Jul 16];267(18):12408-11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1319995>

41. Redinbo MR, Stewart L, Kuhn P, Champoux JJ, Hol WG. Crystal structures of human topoisomerase I in covalent and noncovalent complexes with DNA. *Science*. [Internet]. 1998 Mar 6[cited 1999 Feb 1];279(5356):1504-13. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9488644>

42. Stewart L, Ireton GC, Champoux JJ. Reconstitution of human topoisomerase I by fragment complementation. *J Mol Biol*. [Internet]. 1997 Jun 13[cited 1999 Mar 17];269(3):355-72. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9199405>

43. Redinbo MR, Champoux JJ, Hol WG. Novel insights into catalytic mechanism from a crystal structure of human topoisomerase I in complex with DNA. *Biochemistry*. [Internet]. 2000 Jun 13[cited 2001 Jul 18];39(23):6832-40. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10841763>

44. Bugreev DV, Buneva VN, Nevinskiĭ GA. The mechanism of specific cleavage of supercoiled DNA by human DNA topoisomerase I: the effect of ligand structure on the catalytic step of reaction. *Mol Biol (Mosk)*. [Internet]. 2003 Mar-Apr [cited 2004 Sep 19];37(2):325-39. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12723479>

45. Stivers JT, Shuman S, Mildvan AS. Vaccinia DNA topoisomerase I: single-turnover and steady-state kinetic analysis of the DNA strand cleavage and ligation reactions. *Biochemistry*. [Internet]. 1994 Jan 11[cited 1995 Nov 1];33(1):327-39. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8286354>

46. Chazin EL, Reis R, Junior WT, Moor LF, Vasconcelos TR. An overview on the development of new potentially active camptothecin analogs against cancer.

*Mini Rev Med Chem*. [Internet]. 2014 May [cited 2016 Apr 26];14(12):953-62. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25355593>

47. Jerry W. Shay, Woodring E. Wright. Telomeres and telomerase: three decades of progress. *Nature Reviews Genetics* 20. [Internet]. 2019 Feb [cited 2019 May 13]; 10.1038/s41576-019-0099-1. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30760854>

48. Zvereva MI, Shcherbakova DM, Dontsova OA. Telomerase: structure, functions, and activity regulation. *Biochemistry (Mosc)*. [Internet]. 2010 Oct [cited 2010 Dec]; 75(13):1563-83. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21417995>

49. Christian Bär, Maria A Blasco. Telomeres and telomerase as therapeutic targets to prevent and treat age-related diseases. *Version 1*. [Internet]. 2015 Nov [cited 2016 Jan 20]; 10.12688/f1000research.7020.1. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4815611/>

50. Yu-Sheng Cong, Woodring E Wright, Jerry W Shay. Human Telomerase and Its Regulation. *Microbiol Mol Biol Rev*. [Internet]. 2002 Sep [cited 2003 Jan ];66(3): 407–425. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC120798/>

51. Martino E, Della Volpe S, Terribile E, Benetti E, Sakaj M, Centamore A, Sala A, Collina S. The long story of camptothecin: From traditional medicine to drugs. *Bioorg Med Chem Lett*. [Internet]. 2016 Dec 31 [cited 2017 Feb 15]; 27(4):701-707. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28073672>

52. Klaus Damm, Ulrike Hemmann, Pilar Garin-Chesa, Norbert Huel, Iris Kauffmann, Henning Priepe, Claudia Niestroj, Christine Daiber, Barbara Enenkel, Bernd Guilliard, Ines Lauritsch, Elfriede Müller, Emanuelle Pascolo, Gabriele Sauter, Milena Pantic, Uwe M. Martens, Christian Wenz, Joachim Lingner, Norbert Kraut, Wolfgang J Rettig, and Andreas Schnapp. A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation. *EMBO J*. [Internet]. 2017 Sep [cited 2017 Dec 17]; 20(24): 6958–6968. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC125790/>

53. Lixia Wang, Junfeng Xiang, Hongxia Sun, Qianfan Yang, Lijia Yu, Qian Li, Aijiao Guan, Yalin Tang. Controllable cy3-MTC-dye aggregates and its applications served as a chemosensor. *Dyes and Pigments*. [Internet]. 2015 June 2 [cited 2015 Nov]; 122(5):282-388. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0143720815002867?via%3Dihub>

54. Xin H. Telomeric repeat amplification protocol: measuring the activity of the telomerase. *Methods Mol Biol*. [Internet]. 2011 Jan [cited 2011 Mar 07]; 10.1007/978-1-61779-092-8\_10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21461815>

55. Bansal S, Sinha D, Singh M, Cheng B, Tse-Dinh YC, Tandon V. 3,4-dimethoxyphenyl bis-benzimidazole, a novel DNA topoisomerase inhibitor that preferentially targets Escherichia coli topoisomerase I. *J Antimicrob Chemother*. [Internet]. 2012 Dec [cited 2013 Apr 8];67(12):2882-91. Available from: doi: 10.1093/jac/dks322.

56. Lance M Hellman and Michael G Fried. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) for Detecting Protein-Nucleic Acid Interactions. *Nat Protoc*. [Internet]. 2007 [cited 209 Oct 9]; 2(8): 1849–1861. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2757439/>

57. Ilgen Mender, Jerry W Shay. Telomerase Repeated Amplification Protocol (TRAP). *Bio Protoc. Author manuscript*. [Internet]. 2016 May [cited 2015 Nov 20]; 5(22): e1657 Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4863463/>

58. Xin H. Telomeric repeat amplification protocol: measuring the activity of the telomerase. *Methods Mol Biol*. [Internet]. 2011 Jan [cited 2011 Mar 07]; 10.1007/978-1-61779-092-8\_10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21461815>

59. Olsen S. Color in Bridge-Substituted Cyanines. *The Journal of Physical Chemistry A*. [Internet]. 2016 Nov 21 [cited 2016 Dec 15];120(51):10245-51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27977203/>

60. Dale L Boger, Brian E Fink, Steven R Brunette, Winston C, Michael P Hedrick. A Simple, High-Resolution Method for Establishing DNA Binding Affinity and Sequence Selectivity. *J. Am. Chem. Soc.* [Internet]. 2001 May [cited 2001 Jun 27]; 2001;123:5878-91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11414820/>