на правах рукописи

Ковалёва Оксана Алексеевна

Взаимодействие карбоксиметильных порфиринов с ДНК

Специальность 03.01.02. – биофизика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва 2014

Работа выполнена в Лаборатории ДНК-белковых взаимодействий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

Научный руководитель: **Калюжный Дмитрий Николаевич**, кандидат физико-математических наук

Официальные оппоненты: **Арутюнян Александр Мигранович**, кандидат физико-математических наук, заведующий лабораторией гемопротеидов Научно-исследовательского института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова

Позмогова Галина Евгеньевна, доктор химических наук, профессор, заведующая лабораторией искусственного антителогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научно-исследовательский институт физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук

Защита состоится «18» декабря 2014 г. В 15:30 часов на заседании диссертационного совета Д 501.002.11 при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 119991, ГСП-1, Москва, Ленинские горы, МГУ, физический факультет, аудитория 5 - 19

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке физического факультета МГУ.
Автореферат разослан «__» _____ 2014 г.

Ученый секретарь диссертационного совета Д 501.002.11
кандидат технических наук Сидорова А.Э.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Структура ДНК разнообразна и изменчива в различных клеточных процессах. Двойная спираль ДНК является классической мишенью действия многих противоопухолевых, противовирусных, противомикробных лекарственных соединений. Неканонические структуры ДНК играют важную регуляторную роль в жизнедеятельности клеток. Одной из таких неканонических структур является G-квадруплекс. Последовательности, способные образовывать структуры G-квадруплекса, обнаружены в теломерных областях хромосом, промоторных участках генов, в том числе онкогенов, а также в регуляторных областях мРНК. Соединения, проявляющие высокую аффинность к G-квадруплексам, стабилизируют их структуру, влияют на действие различных белковых факторов и ферментов, функционально связанных с ДНК. Образование и стабилизация G-квадруплексов теломерным однонитевым окончанием ДНК сопряжено с ингибированием фермента – теломеразы и влияет на регуляцию длины теломер. Изучение аффинности различных соединений к ДНК в разных условиях необходимо для выявления молекулярных механизмов их противоопухолевого действия.

Порфирины представляют собой широкий класс природных и вновь синтезированных соединений, обладающих довольно разнообразными свойствами. Физико-химические характеристики порфиринов позволяют рассматривать этот класс соединений как перспективный для возможного использования в терапии онкологических заболеваний. В настоящее время продолжается работа по модификации порфириновых молекул с целью усиления противоопухолевого действия и повышения селективности к опухолевым клеткам. По данным исследователей, такие соединения способны вызывать апоптоз, то есть программированную смерть клетки, который играет важную роль в нормальной жизнедеятельности организма.

Производные катионных порфиринов относятся к ряду веществ, для которых ДНК является одной из важных мишеней действия. Положительные заряды на периферии порфиринового макроцикла обеспечивают высокую аффинность порфиринов к ДНК. Высокое сродство к ДНК делает катионные порфирины перспективным классом соединений для поиска и дизайна новых противоопухолевых препаратов. Создание новых препаратов необходимо для преодоления множественной лекарственной устойчивости опухолей и уменьшения органотоксичности. Установление влияния модификаций порфиринов на их аффинность к канонической и неканонической структурам ДНК необходимо для рационального конструирования и синтеза новых соединений.

В работе установлена связь между типом взаимодействия порфиринов с ДНК и их биологической активностью. Исследования открывают перспективы для направленного дизайна молекул порфиринов – потенциальных лекарственных средств, для которых мишенью могут служить специфические структуры ДНК.

Цели и задачи исследования.

Цель данной работы – определить особенности взаимодействия карбоксиметильных порфиринов с ДНК, выяснить структурные аспекты образования комплексов, а также изучить возможность опосредованного порфиринами фотоповреждения ДНК в качестве механизма клеточной гибели.

В соответствии с указанной целью были поставлены следующие экспериментальные задачи.

1. Определить роль различных конформаций ДНК во взаимодействии с порфиринами и установить влияние модификаций порфирина на характеристики образующихся комплексов.
2. Определить влияние порфиринов на структуру и стабильность G-квадруплексов.
3. Установить эффективность производных порфирина в качестве инструмента фотоповреждения ДНК.
4. Выяснить особенности гибели опухолевых клеток, вызываемой фотодинамическим эффектом порфиринов.

Научная новизна исследований.

Впервые исследованы новые производные карбоксиметильного порфирина во взаимодействии с биологически важными конформациями ДНК. Впервые установлено влияние карбоксиметильных групп на периферии порфиринового макроцикла и включения ионов металлов Zn(II), Ni(II) в ядро порфиринового макроцикла на аффинность к ДНК, а также на тип образующихся комплексов. Впервые выявлены предпочтительные места связывания новых производных порфиринов при взаимодействии с дуплексом ДНК, а также спектрофотометрически охарактеризованы места посадки порфиринов на теломерном G-квадруплексе ДНК. Впервые установлено влияние типа образующегося комплекса порфирина с ДНК на её способность фотодеградировать. Определены механизмы гибели опухолевых клеток под действием новых производных порфирина.

Научная и практическая значимость.

Исследования вносят вклад в понимание влияния модификаций порфиринов на особенности образования комплексов молекул с ДНК различной структуры и последовательности, на молекулярно-биологическую активность порфиринов. Работа открывает перспективы для направленного дизайна потенциальных

лекарственных средств, мишенью для которых служат неканонические структуры ДНК.

Положения, выносимые на защиту.

1. Карбоксильные группы заместителя на периферии порфиринового макроцикла обусловливают предпочтительное взаимодействие порфирина с GC-богатыми участками ДНК. Порфириновые производные связываются на GC участках ДНК по интеркаляционному механизму и образуют бороздочный комплекс на участках ДНК, богатых АТ парами.
2. Порфирины в зависимости от модификаций способны при образовании комплексов с G-квадруплексом ДНК по-разному изменять его структуру и стабильность.
3. Исследованные производные порфирина обладают сходной способностью генерировать синглетный кислород, но различной эффективностью фотоповреждения ДНК. Связывание порфиринов в бороздки ДНК обеспечивает их фотоповреждающую активность.
4. Гибель опухолевых клеток, вызываемая фотодинамическим эффектом порфиринов, осуществляется в основном путем апоптоза.

Личный вклад диссертанта.

Автор лично участвовал в анализе литературных данных, постановке задачи, планировании экспериментов. Все результаты, их интерпретация и выводы получены автором на основе лично проведенных экспериментов либо при его участии. В подготовке публикаций и докладов по теме диссертационной работы автор принимал личное участие.

Апробация работы.

Работа представлена на 11 российских и международных конференциях в Москве, в Пущино, в Сорренто (Италия), в Сингапуре (Сингапур).

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 3 статьи и 11 тезисов докладов.

Структура и объем диссертации.

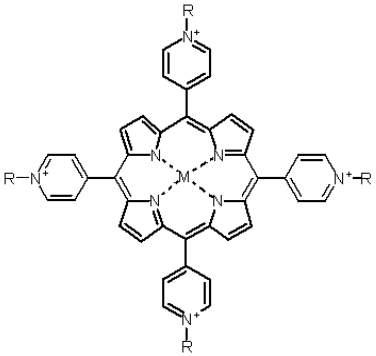
Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, методического раздела, трех глав, содержащих изложение и обсуждение результатов, а также выводы. Работа изложена на 108 страницах, включает 7 таблиц и 34 иллюстрации. Список литературы включает 153 наименования.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Первая глава посвящена анализу литературных данных о разнообразии структур ДНК, в частности, о неканонической структуре G–квадруплекса, изучению конформационных особенностей этих структур, определяющих направленный поиск противоопухолевых препаратов. Рассмотрена имеющаяся информация о порфириновых производных, на основании чего определены перспективы

использования соединений данного ряда в качестве высокоспецифичных лигандов к неканоническим структурам ДНК, а также в качестве фотосенсибилизатора для фотодинамической терапии опухолей**.**

Вторая глава посвящена описанию материалов, инструментов и методов определения механизмов взаимодействия карбоксиметильных порфиринов с ДНК. Для проведения исследования использовались новые карбоксиметильные производные порфирина: 5,10,15,20-тетракис(N-карбоксиметил-4-пиридиний)порфирин (P1), 5,10,15,20-тетракис(N-этоксикарбонилметил-4-пиридиний)порфирин (P2) синтезированные в ИГХТУ (Березин, 2007), а также модификации P1, заключающиеся в координировании ионов Zn(II) или Ni(II) в ядро порфиринового макроцикла полученные в ИНЭОС РАН (Kovaleva, 2014) (схема 1).



	R	M
P1	CH_2COOH	H_2
P2	$CH_2COOC_2H_5$	H_2
NiP1	CH_2COOH	Ni(II)
ZnP1	CH_2COOH	Zn(II)

Схема 1. Структура исследуемых производных порфирина.

В качестве модельных ДНК были выбраны ДНК тимуса теленка (ctDNA) (Sigma-Aldrich, США), олигонуклеотиды $d(AT)_{20}$ и $d(GC)_{20}$ (“Литех”, Россия), последовательность теломерного G-квадруплекса $d(TTAGGG)_4$, (“Синтол”, Россия).

Описаны методы спектроскопии, флуоресцентного анализа и кругового дихроизма, с помощью которых охарактеризованы комплексы производных порфирина с ДНК различной структуры и последовательности. Генерация активных форм кислорода модифицированными соединениями определена по деградации 1,3-дифенилизобензофурана. Фотоповреждение ДНК (одно – и двунитевые разрывы) установлено по изменению электрофоретической подвижности в 1% агарозном геле плазмиды pBR322, (Fermentas). Действие порфириновых производных на биологические объекты апробировано на ряде опухолевых клеток HCT116, K562, MCF7 и HeLa.

В третьей главе рассмотрена двойная спираль ДНК в качестве мишени для карбоксиметильных порфиринов и металлопорфиринов.

Аффинность новых производных порфирина к различным участкам двойной спирали ДНК.

Для определения термодинамических параметров образования комплексов порфиринов с дуплексами, имеющими заданный AT- и GC-состав, были построены

изотермы адсорбции этих лигандов на ДНК (Рис.1 а, б). По спектрофотометрическим данным построены изотермы адсорбции в координатах Скетчарда как r/C_f от r, где r есть среднее заполнение ДНК лигандом, т.е. количество связавшегося лиганда в расчете на пару оснований, C_f - концентрация свободного лиганда. Форма изотерм адсорбции обнаруживает антикооперативный механизм взаимодействия порфиринов P1 и P2 с ДНК, характерный для комплексов протяженных лигандов с двойной спиралью ДНК.

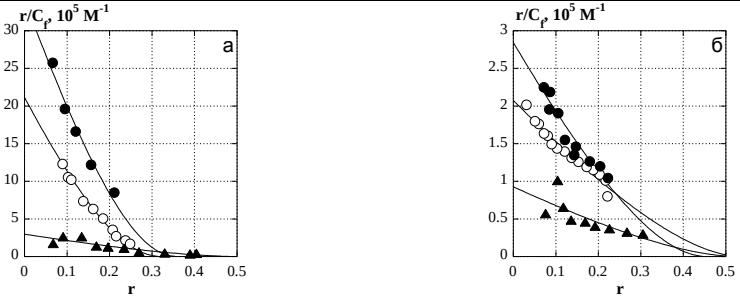


Рис. 1. Изотермы связывания порфиринов P1 и P2 с ДНК различного нуклеотидного состава, построенные по изменению спектров поглощения лигандов при титровании ДНК: ctDNA (●), GC-дуплекс (○), AT-дуплекс (▲). На рисунке (а) – P1, (б) – P2.

$$\frac{r}{C_f} = K(1-n\cdot r)\left(\frac{1-n\cdot r}{1-(n-r)\cdot r}\right)^{(n-r)} \qquad (1)$$

Аппроксимация экспериментальных изотерм адсорбции уравнением (1), описывающим взаимодействие протяженного лиганда с бесконечной линейной матрицей (Заседателев, 1971), позволила определить константы связывания и длину места связывания лиганда на матрице ДНК (Таблица 1). Видно, что более объемная боковая группа соединения P2 на периферии макроцикла уменьшает сродство порфириновых производных к ДНК по сравнению с порфирином P1. Анализ констант связывания на ДНК различной последовательности показал предпочтительное взаимодействие порфиринов с GC-дуплексом по сравнению с AT-дуплексом ДНК.

Таблица. 1. Характеристики образования комплексов порфиринов P1 и P2 с ДНК различного нуклеотидного состава.

	ctDNA		GC-дуплекс		AT-дуплекс	
	K, $10^5 M^{-1}$	N, по	K, $10^5 M^{-1}$	N, по	K, $10^5 M^{-1}$	N, по
P1	34.1±2.0	2.7±0.2	21.1±0.6	3.0±0.1	3.0±0.4	2.0±0.2
P2	2.8±0.2	2.2±0.1	2.1±0.1	1.9±0.1	1.0±0.2	1.9±0.3

Определены параметры связывания металлопорфиринов NiP1 и ZnP1 с ДНК тимуса теленка. Обнаружен антикооперативный характер связывания металлопорфиринов NiP1 и ZnP1 с двойной спиралью ДНК (Рис.2). Определены

константы связывания и длина места связывания лиганда, выраженная в парах нуклеотидов, на матрице ДНК (таблица 2). Оказалось, что ион металла в ядре порфиринового макроцикла незначительно влияет на аффинность соединений к двойной спирали ДНК. При взаимодействии металлопорфиринов с ДНК наблюдается более плотная посадка при среднем заполнении приблизительно две пары нуклеотидов на одну молекулу лиганда.

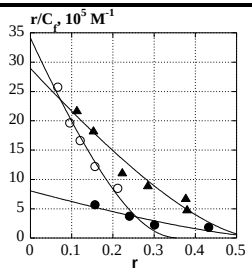


Рис. 2. Изотермы связывания P1, ZnP1 и NiP1 с тимусной ДНК: P1(○), NiP1(▲), ZnP1(●).

Таблица. 2. Характеристики образования комплексов P1, ZnP1 и NiP1 с ДНК тимуса теленка.

	K, $10^5 M^{-1}$	N, по
P1	34±2	2.7±0.2
NiP1	29±2	1.8±0.1
ZnP1	8±5	1.6±0.3

Типы комплексов порфиринов с двойной спиралью ДНК.

По спектрам кругового дихроизма (КД) порфиринов с ДНК охарактеризованы типы образующихся комплексов. Знак наведенного кругового дихроизма порфиринов в полосе Соре характеризует тип посадки молекул на двойной спирали ДНК (Pasternack, 2003). Данные КД свидетельствуют о том, что соединение P1 связывается по бороздке на AT-дуплексе; а на GC-дуплексе – интеркалирует (Рис. 3а). Взаимодействие с тимусной ДНК смешанного AT, GC состава приводит к образованию комплексов двух типов и характеризуется наличием положительной и отрицательной полос в спектре КД (Рис. 3а, (●)). Соединение P2 в комплексе с дуплексом обладает аналогичными характеристиками. Внедрение металла в ядро порфиринового макроцикла влияет на тип комплекса с ДНК. Ион Zn(II) делает соединение бороздочным лигандом, в то время как ион Ni(II) – интеркалятором (Рис. 3б).

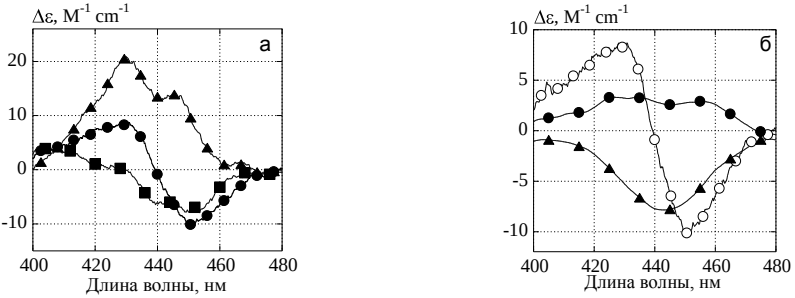


Рис. 3. (а) – спектры КД комплексов P1 с ДНК тимуса теленка (●), AT-дуплекс (▲), GC-дуплекс (■); (б) – КД спектры комплексов пофиринов NiP1(▲), ZnP1(●), P1(○) с ctDNA.

Флуоресцентные характеристики комплексов порфиринов P1 и P2 с ДНК различной последовательности.

Комплексы изучаемых порфириновых производных с ДНК обладают различными флуоресцентными характеристиками, которые зависят от нуклеотидного состава участков связывания (Рис.4). Интенсивность полос спектров флуоресценции порфиринов P1 и P2 при связывании с тимусной ДНК мало отличается от интенсивности спектров флуоресценции свободного лиганда. В то же время происходит значительное изменение формы спектра флуоресценции:

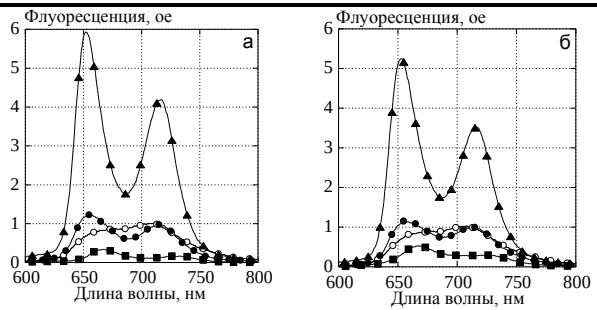


Рис. 4. Нормированные спектры флуоресценции адсорбированных на ДНК и свободных порфиринов (а) – P1, (б) – P2: (○) флуоресценция свободных порфиринов; (●) – в комплексе с ctDNA; (■) – в комплексе с GC-дуплексом; (▲) – в комплексе с AT-дуплексом.

наблюдается перераспределение интенсивности флуоресценции между полосами на длинах волн 655 нм и 715 нм. Появление более выраженных максимумов в спектре флуоресценции характеризует ограничение колебательных степеней свободы флуорофоров при связывании с ДНК.

При адсорбции порфиринов P1 и P2 на GC-дуплексе происходит образование слабо флуоресцирующего комплекса. Это характерно для лигандов-интеркаляторов, которые тушатся гуанином при образовании комплекса с переносом заряда. При взаимодействии соединений с AT-дуплексом интенсивность флуоресценции лигандов увеличивается в 5-6 раз относительно свободного соединения.

Квантовый выход и длительность флуоресценции комплексов порфиринов P1 с ДНК.

Абсолютный квантовый выход флуоресценции молекул порфирина P1 (q_o) определен по отношению к известному квантовому выходу флуоресценции карбоксифлуоресцеина и составляет q_o = 0.0093. Определены значения квантовых выходов флуоресценции порфирина P1 в комплексе с ДНК различного нуклеотидного состава (q) (таблица 3).

Таблица. 3. Длительность и квантовый выход флуоресценции свободных порфиринов в растворе и в комплексе с ДНК различного нуклеотидного состава.

	τ_1, нс	a_1	τ_1/τ_o	τ_2, нс	a_2	$\tau 2/\tau_o$	q/q_o
Свободный	4.8	1	1.00	-	-	-	1
AT дуплекс	10	1	2.08	-	-	-	2.2
GC дуплекс	0.7	0.65	0.15	5.3	0.35	1.10	0.28
ctDNA	0.7	0.47	0.15	10	0.53	2.08	0.85

Видно, что при связывании с ДНК смешанного нуклеотидного состава квантовый выход флуоресценции комплексов изменяется незначительно. Величина относительного квантового выхода (q/q_o) порфирина в комплексе с АТ-дуплексом увеличивается примерно в 2 раза, а в комплексе с GC-дуплексом уменьшается в 3.5 раза. На основании данных о квантовом выходе флуоресценции сделан вывод о том, что образование комплекса порфирина Р1 с GC-парами в значительной степени приводит к тушению флуоресценции. Аналогичные результаты получены для Р2.

Для выяснения природы тушения и разгорания флуоресценции порфиринов при взаимодействии с ДНК различного нуклеотидного состава изучена кинетика затухания флуоресценции (рис. 5). Условия эксперимента были подобраны так, что концентрация адсорбированного лиганда соответствовала среднему заполнению r=0.04-0.05, при этом концентрация свободного лиганда Р1 не превышала 2%.

Характеристика кривых затухания флуоресценции получена деконволюцией экспериментальных кривых и аппроксимацией одно- или двух-экспоненциальным уравнением затухания. Рассчитанные времена затухания флуоресценции первой и второй компоненты (τ_1 и τ_2) и доли этих компонент (a_1 и a_2), зависящие от концентрации флуоресцирующих молекул каждой компоненты, приведены в таблице 3. Для сравнения с квантовым выходом флуоресценции (q/q_o) в таблице 3 дополнительно приведены значения τ_i/τ_o этих комплексов, рассчитанные относительно τ_o свободного лиганда в растворе.

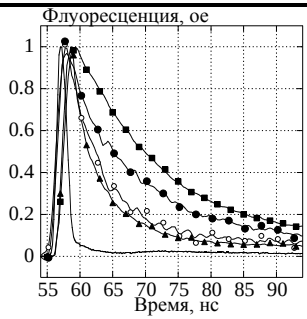


Рис. 5. Кривые затухания флуоресценции порфирина Р1 в свободном состоянии и в комплексе с ДНК: непрерывная кривая – отклик прибора (IRF); (○) флуоресценция свободного соединения; (●) ctDNA; (▲) GC-дуплекс; (■) АТ-дуплекс. Интенсивности флуоресценции в максимуме кривых затухания приняты за единицу.

Времена жизни возбужденных состояний свободных молекул Р1 и Р2 не различаются в пределах ошибки эксперимента, τ_o=4.8±0.1 нс и τ_o=4.6±0.1 нс, соответственно.

Кривые затухания флуоресценции порфиринов, связанных с АТ-дуплексом, хорошо описываются одной экспонентой. Время жизни флуоресценции (τ) увеличивается приблизительно в два раза относительно τ_o свободных молекул порфиринов, и соответствует 10±0.2 нс для порфирина Р1 и 8.6±0.1 нс для порфирина Р2. Возрастание времени жизни флуоресценции в два раза коррелирует с увеличением квантового выхода флуоресценции и объясняется ограничением колебательных степеней свободы адсорбированных флуорофоров и их экранированием от молекул растворителя.

Кривые затухания флуоресценции комплексов порфиринов с GC-дуплексом хорошо описываются двухэкспоненциальным уравнением. Время затухания короткоживущей компоненты комплексов порфиринов P1 и P2 с GC-дуплексом равно τ_1^{P1}=0.7±0.1 нс и τ_1^{P2}=0.6±0.1 нс соответственно, и характеризуется высоким весовым коэффициентом содержания короткоживущей компоненты (60-65%). Время жизни долгоживущей компоненты затухания флуоресценции (τ_2) порфиринов P1 и P2, адсорбированных на GC-дуплексе (5.3 нс и 4.2 нс, соответственно), близко к τ_o свободных лигандов в растворе. Появление короткоживущей компоненты свидетельствует в пользу модели интеркаляционного комплекса с переносом заряда между GC-парой и интеркалированным порфирином.

Кривые затухания флуоресценции порфиринов при взаимодействии с ДНК тимуса теленка характеризуются наличием двух типов комплексов. Одна компонента имеет короткое время жизни флуоресценции (0.7 и 0.6 нс соответственно), что не противоречит взаимодействию лиганда с GC-участками ДНК и образованию комплекса с переносом заряда. Долгоживущие компоненты кривых затухания флуоресценции порфиринов P1 и P2 на тимусной ДНК характеризуются временем жизни флуоресценции τ_2^{P1}=10 нс и τ_2^{P2}=8 нс, соответственно и совпадают со временем жизни флуоресценции τ комплексов порфиринов с AT-дуплексом (см. Табл. 3). Несмотря на то, что вероятность тандемного расположения GC богатых участков относительно мала, более высокая константа связывания именно с такими участками объясняет примерно одинаковый вес двух компонентов комплексов на тимусной ДНК.

Таким образом, флуоресцентные характеристики порфиринов различаются при связывании с участками ДНК различной последовательности, что определяет гетерогенный тип связывания порфиринов с ДНК смешанной последовательности.

Фоторазрушение двойной спирали ДНК.

Исследуемые соединения являются перспективными для фотодинамической терапии (ФДТ) онкологических заболеваний, ключевую роль в которой играют активные формы кислорода. Генерация модифицированными соединениями активных форм кислорода определена по деградации 1,3-дифенилизобензофурана (DPBF) в присутствии порфиринов под действием света в растворе диметилсульфоксида (ДМСО) (Рис.6). Раствор ДМСО, содержащий DPBF (25 мкМ) и порфирин (1 мкМ) облучали в течение 20 мин белым светом с использованием галогенной лампы (Zhang, 2005).

На рис. 6 представлены нормированные кривые фотодеградации DPBF. Характерное время деградации DPBF (τ) определено аппроксимацией экспериментальных зависимостей уравнением $ABS=e^{-t/\tau}$, где ABS – поглощение DPBF при облучении образца в течение времени t. Таблица 4 характеризует способность соединений разрушать DPBF. Явным преимуществом обладают соединения P1 и ZnP1. Отметим, что скорость деградации DPBF пропорциональна

молярному поглощению порфириновых соединений.

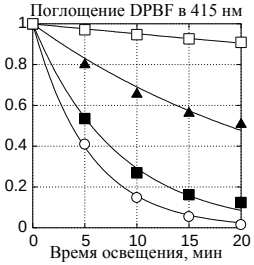
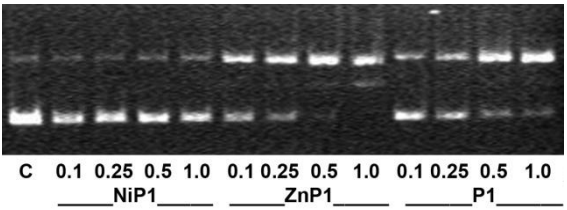


Рис. 6. Фотодеградация DPBF в присутствии порфиринов
▲ – NiP1, ■ – ZnP 1, ○ – P1, □ – Без порфиринов.

Таблица. 4. Характерное время деградации DPBF (τ).

Порфирин	Время τ, мин.
NiP1	27.0±1.3
P1	5.4±0.1
ZnP1	8.1±0.3
Без порфиринов	201.0±5.6

Так как исследуемые порфирины способны взаимодействовать с ДНК и являются генераторами активных форм кислорода под действием света, изучена возможность фотодинамического повреждения двойной спирали ДНК. Фотоповреждение ДНК изучили на кольцевой замкнутой ДНК (плазмида pBR322). Несмотря на сравнимую способность соединений P1 и ZnP1 генерировать синглетный кислород, оказалось, что эти соединения качественно по-разному разрушают ДНК под действием света (Рис.7).



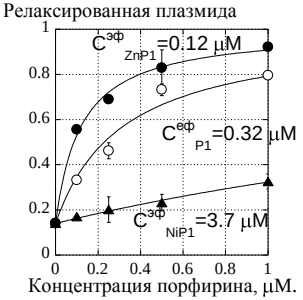


Рис. 7. Зависимость фоторазрушения плазмиды pBR322 от концентрации порфиринов: слева – агарозный 1% гель плазмиды pBR322 облученной белым светом в присутствии различной концентрации порфиринов. справа – зависимость релаксированной формы плазмиды от концентрации порфиринов.

Нативная плазмида находится в суперскрученной форме. При повреждении одной из нитей плазмида релаксирует и переходит в открытую кольцевую форму. При повреждении обеих нитей ДНК плазмида переходит в линейную форму. После освещения образцов плазмиды в течение часа в присутствии порфиринов подвижность плазмиды изменяется. Расположение полос плазмиды в присутствии NiP1 аналогично их расположению в контроле, что указывает на то, что соединение не приводит к изменениям формы плазмиды. P1 и ZnP1 переводят плазмиду в открытую кольцевую форму. Эффективная концентрация соединения, необходимая для фоторазрушения 50% плазмиды, приведена на рис. 7. Несмотря на большую константу связывания, в присутствии соединения P1 наблюдаются меньшие

повреждения, чем с соединением ZnP1, в то время как соединение NiP1 практически не изменяет суперскрученной формы плазмиды. Наибольшая активность металлопорфирина ZnP1 при разрушении ДНК под действием света, видимо, связана с геометрией комплекса и большей доступностью молекулы ZnP1 растворителю при расположении металлопорфирина в бороздке ДНК.

В четвертой главе описаны механизмы образования комплексов карбоксиметильных порфиринов с G-квадруплексами ДНК.

Изотермы адсорбции P1 и P2 на антипараллельном теломерном квадруплексе.

По спектрофотометрическим данным получены изотермы связывания (Рис. 8) соединений с теломерным G-квадруплексом (TelQ). Взаимодействие порфиринов с G-квадруплексной структурой ДНК можно описать моделью независимой посадки нескольких молекул лиганда. Параметры связывания определяли аппроксимацией экспериментальных изотерм уравнением, описывающим модель независимых мест связывания лиганда на G-квадруплексе (Crothers, 1968):

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

где C_f - концентрация свободного соединения, r - среднее заполнение, K_i – константы связывания, N_i – число мест связывания с i-ой константой на одной молекуле G-квадруплекса, n – количество типов комплексов.

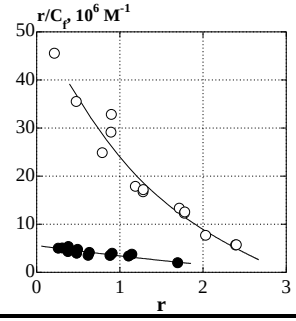


Рис. 8. Изотермы адсорбции порфиринов P1 (○) и P2 (●) на TelQ. Образцы содержат 10мМ Na – фосфатный буфер, 100мМ NaCl при t=20°C. Непрерывной линией показана аппроксимация экспериментальных точек, параметры Ki и Ni приведены в таблице 6.

Изотермы связывания соответствуют взаимодействию трех молекул лиганда с молекулой TelQ при образовании двух типов комплексов. Определены константы связывания соединений P1 и P2 с теломерным квадруплексом TelQ приведенные в таблице 6.

Таблица. 6. Параметры образования двух типов комплексов порфиринов P1 и P2 с антипараллельным TelQ квадруплексом.

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

Анализ констант связывания порфириновых производных с теломерным G-квадруплексом свидетельствует о том, что наличие у соединения P1 карбоксильных групп обусловливает высокое сродство лиганда к TelQ, квадруплексу; объемные заместители в боковых группах молекулы P2 ослабляют взаимодействие с G-квадруплексной ДНК.

Характеристики мест связывания P1 и P2, определенные методом флуоресценции.

Спектры флуоресценции молекул порфиринов P1 и P2 в комплексе с антипараллельным квадруплексом (TelQ) регистрировали в условиях малого заполнения ($r \sim 1$), когда молекулы исследуемых порфиринов практически полностью связаны с TelQ (Рис. 9а).

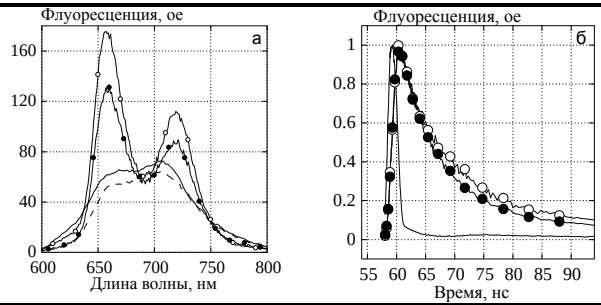


Рис. 9. (а) Спектры флуоресценции свободного и адсорбированного на TelQ квадруплексе порфирина P1 и P2; **(б)** Кривые затухания флуоресценции порфиринов P1 и P2 в комплексе с TelQ: (-) кривая отклика системы (IRF)

Спектры флуоресценции свободных и связанных с TelQ порфиринов P1 и P2 различаются незначительно. У адсорбированных молекул возрастает интенсивность флуоресценции в полосах с максимумами 660 и 720 нм. Появление более выраженных полос флуоресценции указывает на ограничение колебательных степеней свободы молекул порфиринов при взаимодействии с TelQ. Наблюдаемые изменения в спектрах флуоресценции аналогичны обнаруженным ранее изменениям для комплексов P1 и P2 с AT-дуплексом ДНК. Вероятно, адсорбция молекул P1 и P2 при малом заполнении ($r \leq 1$) происходит в основном на TTA-петлях квадруплекса.

Таблица. 7. Длительность флуоресценции комплексов P1 с TelQ в зависимости от заполнения.

	τ_1, нс	a_1	τ_2, нс	a_2
P1 (r=1)	0.9±0.1	0.32±0.05	8.03±0.07	0.68±0.02
P1 (r=2.5)	1.0±0.1	0.55±0.15	7.2±0.6	0.45±0.15

Чтобы объяснить природу флуоресценции порфиринов в комплексе с TelQ, изучали кинетику затухания флуоресценции комплексов P1 с TelQ. На рис. 9б приведены кривые затухания флуоресценции порфирина P1 в комплексе с TelQ при заполнении r = 1 и 2.5. Кинетика затухания этих кривых хорошо описывается биэкспоненциальным уравнением с коротким и длинным временем жизни флуоресценции (табл. 7). При повышении концентрации адсорбированного лиганда вплоть до r ~ 2 кинетика затухания флуоресценции несколько изменялась. Наблюдали увеличение доли короткоживущей компоненты флуоресценции. Данные

о времени затухания флуоресценции комплексов порфирина с квадруплексом указывают на наличие двух типов мест связывания. Долгоживущая компонента характеризует комплекс с AT участками квадруплекса, а короткоживущая с G-квартетными участками. При низком заполнении (r ≤ 1) преобладают места связывания с TTA петлями (70–80%), при высоком заполнении (r ~ 2) половина адсорбированных молекул связана с G-квартетами. Эти данные согласуются с изотермами адсорбции для двух типов комплексов. P2 проявляет схожие свойства в комплексе с квадруплексом. Таким образом, уточнена природа двух типов комплексов производных порфирина P1 и P2 с антипараллельным теломерным квадруплексом: первый тип комплексов P1 и P2 с высокими константами связывания можно отнести к взаимодействию на TTA-петлях с образованием долгоживущей флуоресцирующей компоненты; второй, более слабый комплекс, который является потушенным – к связыванию с G-квартетами.

Изменение конформации квадруплексной структуры под действием модифицированных порфиринов.

Влияние образования комплекса с новыми производными порфирина на конформацию теломерного квадруплекса изучали по спектрам кругового дихроизма (КД) в УФ-области. Спектр КД молекул TelQ (рис. 10) соответствует вторичной структуре, образованной сворачиванием олигонуклеотида $d(TTAGGG)_4$ в антипараллельный G-квадруплекс в присутствии NaCl (рис 10а) и смешанный 3+1 G-квадруплекс в присутствии KCl (рис 10б).

Образование комплекса с G-квадруплексом в присутствии ионов натрия и калия происходит с некоторыми конформационными изменениями ДНК. Спектр КД TelQ в буфере, содержащем Na^+ (рис.10а) соответствует структуре, образованной сворачиванием $d(TTAGGG)_4$ олигонуклеотида TelQ в антипараллельный внутримолекулярный G-квадруплекс состоящий из трех G-квартетов, двух боковых петель и одной диагональной петли (Pattel, 2007). При титровании такого G-квадруплекса молекулами порфиринов наблюдалось уменьшение интенсивности положительной полосы с максимумом в 295 нм и отрицательной в 265 нм.

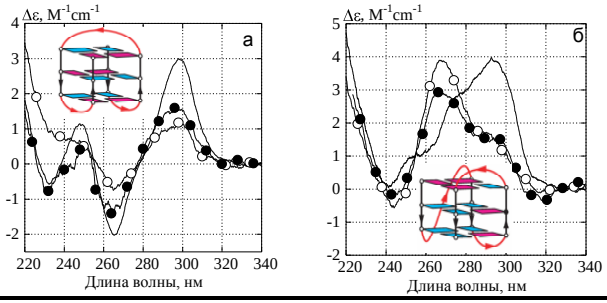


Рис. 10. Спектры КД TelQ свободного (-) и в комплексе с порфиринами P1 (○) и P2 (●) фосфатном буфере pH 7.8: (а) 100 мМ NaCl (б) 100 мМ KCl

Следует отметить, что при связывании порфиринов с G-квадруплексом, наведенный сигнал КД в области полосы Соре порфиринов (420 - 480 нм) был

незначительным. Это свидетельствует об отсутствии эффекта наведенного дихроизма в УФ-области. Таким образом, наблюдаемые изменения спектра КД отражают конформационные перестройки ДНК. Изменения в спектре КД указывают на частичное разрушение G-квартетов при образовании комплексов с молекулами порфирина.

В буфере с KCl спектр КД в присутствии соединений соответствует структуре смешанного «3+1» G-квадруплекса, в котором три блока гуанинов параллельны друг другу, а один антипараллелен. При этом блоки соединены двумя боковыми TTA петлями и одной «пропеллерной» петлей, переворачивающей направление блоков гуанина. В присутствии ионов K^+ связывание молекул порфиринов приводит к уменьшению интенсивности полосы в 295нм и увеличению интенсивности положительной полосы в 265 нм (Рис. 10б). В этом случае изменение конформации ДНК при связывании лиганда можно объяснить также разрушением одного квартета. В структуре смешанного «3+1» квадруплекса каждые два квартета имеют либо одинаковую, либо противоположную ориентацию (Gray, 2008). Разрушение квартета около 5'-конца квадруплекса приведет к потере стекинга квартетов с разной ориентацией. Положительная полоса в 265 нм убедительно выявляет стекинг гуаниновых квартетов с одинаковой ориентацией. Таким образом, структура квадруплекса в комплексе с двумя молекулами лиганда содержит два квартета в одинаковой полярности.

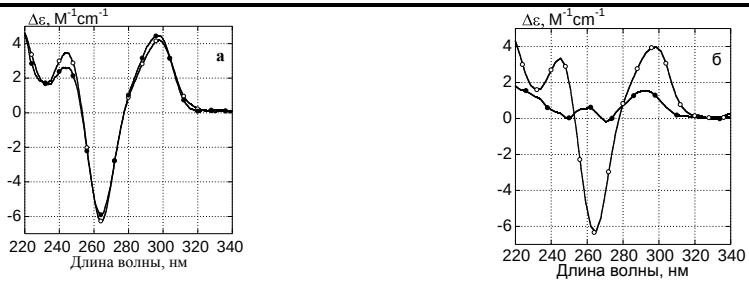


Рис.11. Спектры КД TelQ при образовании комплексов с порфириновыми производными (а) - ZnP1, (б) - NiP1

Наличие металлов в порфириновом макроцикле незначительно влияет на аффинность соединений к теломерному G-квадруплексу. Данные КД (Рис. 11) позволяют выявить структурные перестройки, происходящие при образовании комплекса металлопорфиринов с ДНК. При взаимодействии с ZnP1 спектр КД практически не меняется (Рис. 11а). Связывание с порфирином NiP1, напротив, приводит к значительному изменению спектра КД (Рис. 11б). Наблюдается уменьшение амплитуды как положительной полосы в 295 нм, так и отрицательной в 265 нм. При взаимодействии с соединением NiP1 положение максимума 295 нм положительной полосы КД смещается в 290 нм. Спектр наведенного кругового дихроизма становится похож на КД-спектр дуплекса ДНК в комплексе с

интеркалятором, что говорит о возможном образовании шпильки при взаимодействии квадруплекса с лигандом NiP1. Аналогичный спектр наблюдался для неквадруплексной структуры, образованной мутантной теломерной последовательностью d(TTAGGGTTAG**A**GTTAGGGTTAGGG) в комплексе с порфирином NiP1. Таким образом, NiP1 вызывает значительное изменение структуры G-квадруплекса с перестройкой в шпилечную структуру с не-уотсон-криковскими GG парами оснований.

Термостабильность теломерного квадруплекса в комплексе с порфиринами.

Методом плавления по FRET исследована стабилизация теломерного G-квадруплекса Gtel22-DA (FAM-5'-d(AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG)-3'-BHQ1) и конкуренция за связывание с лигандом между G-квадруплексной структурой Gtel22-DA и двойной спиралью ДНК (Mergny, 2005). В качестве модели двойной спирали ДНК была выбрана шпилька, образованная самокомплементарным олигонуклеотидом ds26 5'-d(CAATCGGATCGAATTCGATCCGATTG)-3'.

Высокую стабилизацию квадруплекса наблюдали в присутствии порфиринов. Порфирины P1 и NiP1– увеличивали температуру плавления квадруплекса на 25°C; P2 и ZnP1 стабилизировали квадруплекс в меньшей степени - примерно на 15°C (рис 12). Различия в стабилизации квадруплекса хорошо коррелируют с константами связывания порфиринов с G-квадруплесным олигонуклеотидом.

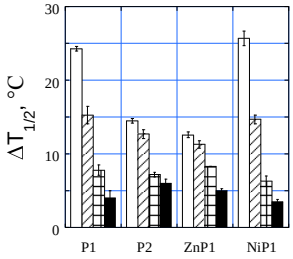


Рис. 12. Увеличение температуры плавления комплексов TelQ22-DA с порфиринами P1, P2, NiP1, ZnP1 и вытеснение лиганда увеличением концентрации альтернативной мишени связывания – шпилечной структуры ДНК ds26 (0; 0.2; 0.9 и 2.5 мкМ(олигонуклеотидов).

Плавление квадруплексной структуры, стабилизированной порфиринами, в присутствии двойной спирали ДНК позволяет оценить избирательность связывания на G-квадруплексной структуре. Наибольшей предпочтительностью связывания на G-квадруплексе по сравнению со связыванием на дуплексе обладают P2, ZnP1. Таким образом, для исследованных модификаций порфиринов за увеличение избирательности к квадруплексу ответственно не повышение сродства к квадруплексу, а снижение сродства к дуплексу.

Пятая глава посвящена исследованию действия тетракарбоксиметильных порфиринов на опухолевые клетки. Данная часть работы выполнена лично автором в Лаборатории механизмов гибели клеток Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина» Российской академии медицинских наук.

Исследования темновой токсичности порфиринов с использованием анализа оценки жизнеспособности клеток по определению активности дегидрогеназы митохондрий (МТТ-теста) на ряде линий опухолевых клеток: HCT116, K562, MCF7 и HeLa – показали низкую цитотоксичность данных соединений. Концентрация соединения, при которой погибала половина клеток (IC_{50}) была более 50мкМ. Дальнейшие результаты получены анализом сравнения темнового и светового действия соединений на клеточную линию HeLa.

Фрагментация клеточной ДНК под действием света в присутствии карбоксиметильных порфиринов.

Методом проточной цитометрии изучено действие порфиринов P1, ZnP1, NiP1 на содержание ДНК в клетках линии HeLa, не подвергнутых облучению светом и инкубированных после облучения. Клетки HeLa ($1{,}5x10^6$ в 3 мл культуральной среды) рассеивали в чашки Петри. Затем прикрепленные клетки инкубировали в течение часа в присутствии соединений при концентрации 50мкМ. После воздействия белого света галогеновой лампы мощностью 1,7 J/см^2 клетки инкубировали в течение суток. Для проведения анализа содержания ДНК, клетки лизировали буфером, содержащим иодид пропидия, который окрашивал ДНК в лизированных клетках. Полученный лизат клеток анализировали на проточном цитофлуориметре. Результат анализа представлен на рис. 13.

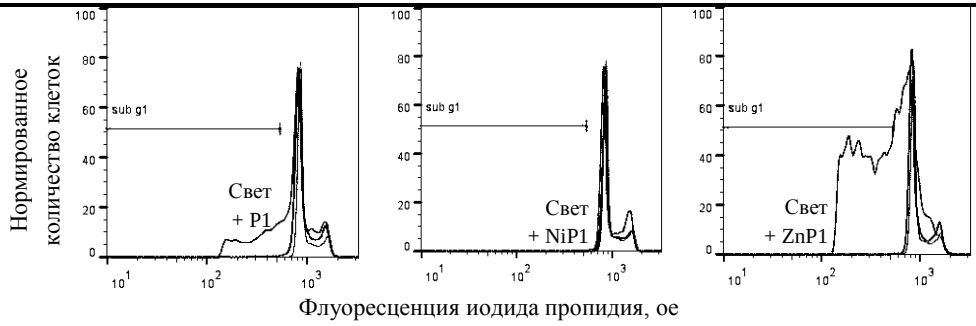


Рис.13. Распределение клеток HeLa по содержанию ДНК. Профили гистограмм клеток, инкубированных без соединений, и клеток, инкубированных в присутствии 50мкМ соединений без облучения светом, совпадают. Гистограммы клеток, подвергнутых облучению в течение 20мин в присутствии порфиринов, и инкубированные сутки после облучения указывают на наличие в них фрагментированной ДНК.

По флуоресценции иодида пропидия установлено распределение клеток по фазам клеточного цикла (Лобанов, 2013). Определено, что без облучения светом соединения не влияют на соотношение фаз клеточного цикла. Обнаружено, что под действием света соединения P1 и ZnP1 вызывают появление клеток в sub g1 фазе, что соответствует клеткам с фрагментированной ДНК. Определена доля клеток с фрагментированной ДНК (рис 14). Оказалось, что соединение ZnP1 в концентрации 50мкМ при облучении белым светом приводит к появлению около 50% клеток с

фрагментированной ДНК, в то время как для соединения P1 около 30%. Соединение NiP1 не вызывало заметной фрагментации ДНК в клетках.

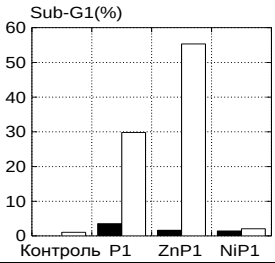


Рис.14. Диаграмма зависимости доли клеток с фрагментированной ДНК в ядре (белым обозначены клетки, подвергнутые освещению белым светом, черным цветом обозначены клетки, инкубированные в отсутствие света).

Наблюдаемая фрагментация ДНК может быть связана как с её прямым повреждением, так и с отложенным действием, вызываемым запуском процесса апоптотической гибели клеток. Следует отметить, что анализ содержания ДНК в клетках в течение часа после освещения не показал появления sub g1 фазы, характерной для клеток с фрагментированной ДНК. Это дает основание заключить, что соединения ZnP1, P1 вызывают отложенную фрагментацию ДНК, характерную для апоптотического пути гибели клеток.

Появление расщепленной формы поли(АДФ)рибозополимеразы в ответ на повреждение ДНК.

Деградация ДНК, характерная при запуске процесса апоптотической гибели клеток, может в частности осуществляться доставленными в ядро клетки и связавшимися с ДНК молекулами лиганда посредством генерации активных форм кислорода, разрушающих нуклеиновую кислоту. В ответ на значительное повреждение ДНК, возникает гиперэкспрессия белка позднего апоптоза PARP.

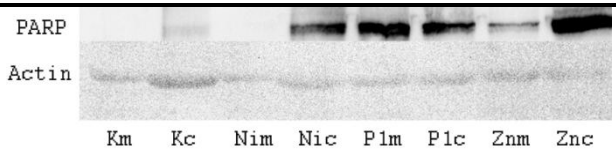


Рис. 15. Вестерн блот расщепленной поли(АДФ)рибозополимеразы (PARP) выделенной из клеток после освещения в присутствии порфиринов.

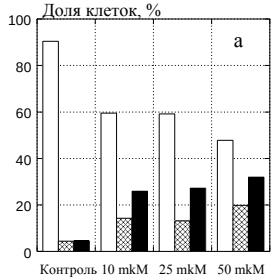
Известно, что расщепление белка PARP каспазами на ранней стадии апоптоза отделяет ДНК-связывающий домен от каталитического, таким образом инактивируя фермент. Он перестает выполнять функцию репарации. ДНК-связывающий фрагмент, образуя комплекс с межнуклеосомной ДНК, препятствует доступу ферментов репарации к участку повреждения. Достоверным подтверждением апоптотической гибели клеток считается рост концентрации инактивированной, расщепленной формы белка PARP. Мы провели соответствующий тест на линии клеток HeLa. Его результаты показаны на рис. 15. Полученные данные свидетельствуют о том, что в присутствии порфиринов и под действием света значительно увеличивается концентрация расщепленной формы белка PARP для

соединения ZnP1, что характеризует запуск апоптотического пути гибели опухолевых клеток (Лобанов, 2013).

Выявление механизма гибели опухолевых клеток.

Для ZnP1, проявляющего наиболее выраженную активность, методом проточной цитофлуориметрии была исследованна концентрационная зависимость соотношения путей гибели клеток линии HeLa.

Дифференцирование типа гибели клеток определяли по степени одновременного прокрашивания клеток анексином-V и иодидом пропидия (Лобанов, 2013). По специфическому связыванию анексина V/FITC с фосфотидилсерином, который появляется на поверхности апоптотических клеток, определяли ранний апоптоз. По окрашиванию иодидом пропидия определяли наличие клеток с повреждениями мембраны, через которые пропидий проникает в клетку и окрашивает ДНК. Такой тип клеток можно отнести к клеткам поздних стадий апоптоза или к некротическим клеткам.



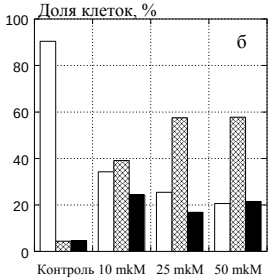


Рис. 16. Диаграмма зависимости доли апоптотических (×), некротических (▒) и живых (□) клеток HeLa от концентрации ZnP1: (а) – в отсутствии света и (б) – под действием белого света галогеновой лампы.

Обнаружена прямая зависимость типа гибели клеток от концентрации порфирина ZnP1 (Рис 16). Следует отметить, что доля неповрежденных клеток (белые столбики) после освещения клеток значительно меньше, чем без освещения. После действия света, менее 10 мкМ порфирина ZnP1 необходимо для уменьшения числа неповрежденных клеток в 2 раза, в то время как без освещения около 50 мкМ. Полученные данные согласуются с результатами МТТ-теста на разных клеточных линиях без освещения клеток. Без облучения светом через сутки после добавления соединений главным образом наблюдается повреждение клеточной мембраны, которое имеет большой потенциал для восстановления. Поэтому МТТ-тест, имея время инкубации трое суток, не показывает значительной гибели клеток. Напротив, после облучения светом, наблюдалась значительная доля клеток, проявляющих апоптотическую гибель. При высоких концентрациях соединения ZnP1 доля апоптотических клеток, прокрашенных только анексином V/FITC, достигает 60%.

Обобщая полученные результаты можно сказать, что порфириновые соединения могут взаимодействовать с ДНК, под действием света способны генерировать активные формы кислорода, которые вызывают повреждения ДНК, что инициирует апоптотический путь клеточной гибели.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Установлено, что константа связывания с ДНК у карбоксиметильного порфирина P1 ($K=3.4\times10^6 M^{-1}$) на порядок выше, чем у этоксикарбонилметильного производного P2. Впервые показано, что карбоксильные группы заместителя в порфирине P1 обусловливают предпочтительные взаимодействия порфирина P1 с GC-богатыми участками ДНК. Порфириновые производные связываются на GC участках ДНК по интеркаляционному механизму и образуют бороздочный комплекс на участках ДНК, богатых AT парами.

2. Выявлена зависимость характера взаимодействия металлопорфиринов с ДНК от координированного металла. NiP1 интеркалирует в двойную спираль ДНК, а ZnP1 связывается в бороздке. Впервые установлено, что тип комплекса ДНК-металлопорфирин играет решающую роль при фотоповреждении ДНК: бороздочный лиганд ZnP1 индуцирует бóльшие повреждения, чем интеркалирующий NiP1.

3. Обнаружено высокое сродство изученных тетракарбоксиметильных производных порфиринов P1, P2, ZnP1, NiP1 к G-квадруплексным участкам ДНК. Предпочтительность порфиринов P2 и ZnP1 к G-квадруплексу определяется меньшим сродством к дуплексу ДНК.

4. Впервые обнаружены и охарактеризованы структурные изменения теломерного G-квадруплекса при образовании комплексов с порфиринами: NiP1 переводит теломерный G-квадруплекс в шпильку, безметальный порфирин P1 вызывает частичное нарушение стекинга одного из квартетов, при этом стабилизируя свернутую структуру G-квадруплекса. Порфирин ZnP1 не приводит к структурным изменениям теломерного G-квадруплекса.

5. Установлено, что фотоповреждение ДНК под действием ZnP1 сопровождается гибелью клеток преимущественно по пути апоптоза.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. *Kovaleva O., Tsvetkov V., Mamaeva O., Ol'shevskaya V., Makarenkov A., Dezhenkova L., Semeikin A., Borisova O., Shtil A., Shchyolkina A., Kaluzhny D.* Preferential DNA photocleavage potency of Zn(II) over Ni(II) derivatives of carboxymethyl tetracationic porphyrin: the role of the mode of binding to DNA // *European Biophysics Journal* — 2014. — С. 1-10.
2. *Ковалева О.А., Щелкина А.К., Мамаева О.К., Ольшевская В.А., Макаренков А.В., Семейкин А.С., Штиль А.А., Борисова О.Ф., Калюжный Д.Н.* Комплексы антипараллельного теломерного G-квадруплекса $d(TTAGGG)_4$ с карбоксиметильными тетракатионными порфиринами // *Молекулярная биология*. — 2013. — Т. 47, № 3, — С. 513-521.
3. *Kovaleva O., Tsvetkov V., Shchyolkina A., Borisova O., Ol'shevskaya V., Makarenkov A., Semeikin A., Shtil A. and Kaluzhny D.* The role of carboxymethyl substituents in the interaction of tetracationic porphyrins with DNA // *European Biophysics Journal*. — 2012. — Vol. 41, no. 9, — P. 723-732.

Тезисы докладов на научных конференциях

1. Ковалёва О.А., Глазунова В.А., Макаренков А.В., Ольшевская В.А., Штиль А.А., Калюжный Д.Н. *Гибель опухолевых клеток при фотоактивации модифицированных порфиринов.* Труды 56-й научной конференции МФТИ - Всероссийской научной конференции «Современные проблемы фундаментальных и прикладных наук». – М.: МФТИ, **2013**. стр. 26-27.
2. Ковалёва О.А., *Влияние модификаций порфирина ТМРуР4 на его взаимодействие с ДНК*. Труды XX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2012", Биология, Молекулярная Биология. – М.: МГУ, **2013.** – стр. 227.
3. Ковалёва О.А., Мамаева О.К., Борисова О.Ф., Макаренков А.В., Семейкин А.С., Калюжный Д.Н. *Взаимодействие модифицированных тетракатионных порфиринов с теломерной последовательностью ДНК*. Тезисы XXV Зимней молодёжной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», **2013.** стр. 28.
4. Ковалёва О.А., Мамаева О.К., Борисова О.Ф., Макаренков А.В., Семейкин А.С., Калюжный Д.Н. *Изменение структуры теормерного квадруплекса при образовании комплекса с катионными порфиринами.* Труды 17-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА» – Пущино, 2**013** с. 126.
5. Kovaleva O.A., Mamaeva O.K., Makarenkov A.V., Shchyolkina A.K., Ol'shevskaya V.A., Livshits M.A., Shtil A.A., Borisova O.F., Kaluzhny D.N. *Conformational Rearrangements in Telomeric G-Quadruplex Induced by Tetracationic Carboxymethyl Porphyrins.* 4th International Meeting on G-quadruplex Nucleic Acids., Singapore, **2013**, p. 70.
6. Ковалёва О.А., Д.Н. Калюжный, О.Ф. Борисова, А.К. Щёлкина *Производные катионного порфирина в комплексе с ДНК различной последовательности и структуры.* Труды 55-й

научной конференции МФТИ - Всероссийской научной конференции «Современные проблемы фундаментальных и прикладных наук». – М.: МФТИ, **2012**. – стр. 104-105.

7. Ковалёва О.А. *Взаимодействие производных тетракатионного порфирина с G-квадруплексом ДНК промоторного участка c-Myc онкогена.* Труды XIX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2012", Биология, Молекулярная Биология. – М.: МГУ, **2012**. – стр. 188.
8. Ковалёва О.А., Щелкина А.К., Мамаева О.К., Штиль А.А., Борисова О.Ф., Калюжный Д.Н. *Роль боковых заместителей тетракатионного порфирина во взаимодействии с квадруплексом c-Myc.* Труды научной конференции молодых ученых «Молекулярная медицина и постгеномная биология». – М.: ФГБУН НИИ Эфферентной и физико-химической медицины ФМБА России, **2012**, №2, стр. 29.
9. Kovaleva O.A., Shchyolkina A.K, Borisova O.F., Shtil A.A., Kaluzhny D.N. *Novel carboxylic analogues of TMPyP4 porphyrin: interaction with G-quadruplex DNA.* 3th International Meeting on G-quadruplex Nucleic Acids., Sorrento (Italy), 2011, poster 65
10. Ковалёва О.А., Щёлкина А.К., Борисова О.Ф., Макаренков А.В., Семейкин А.С., Калюжный Д.Н. *Влияние модификаций катионного 5,10,15,20-тетракис(4-N-метилпиридиний)порфирина на взаимодействие с квадруплексными структурами* ДНК. Труды XXIII Международной зимней молодежной научной школы ИБХ РАН «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» **2011**, стр. 124.
11. Ковалёва О.А., *Влияние модификаций порфирина TMPyP4 на стабилизацию структуры G-квадруплексов* Труды XVIII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2012", Физика, Биофизика. – М.: МГУ, **2011**. – стр. 23.