



Thermodynamic Investigation of Copper Porphyrines and Phthalocyanine Interaction with Human Telomeric G-Quadruplex DNA

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Hassani L.¹ PhD,Safaei E.² PhD,Hakimian F.¹ PhD,Soufian S.^{*3} PhD

How to cite this article

Hassani L, Safaei E, Hakimian F, Soufian S. Thermodynamic Investigation of Copper Porphyrines and Phthalocyanine Interaction with Human Telomeric G-Quadruplex DNA. Modares Journal of Biotechnology. 2018;9(3):395-402.

¹Biological Sciences Faculty, Institute for Advanced Studies in Basic Sciences (IASBS), Zanjan, Iran

²Chemistry Department, College of Sciences, Shiraz University, Shiraz, Iran

³Biology Department, Basic Sciences Faculty, Arak Branch, Payam-e-Noor University, Arak, Iran

*Correspondence

Address: Biology Department, Arak Branch, Payam-e-Noor University, Ring Road, Elahie, Arak, Iran. Postal Code: 3818889581

Phone: +98 (86) 33675596

Fax: +98 (86) 33675579

s_soufian@pnu.ac.ir

Article History

Received: July 19, 2016

Accepted: July 20, 2017

ePublished: September 22, 2018

ABSTRACT

Aims The G-quadruplex structural motifs of DNA are considered a novel target for drug discovery. As potential compounds, small molecules that selectively target the G-quadruplex structures may be used for therapeutic purposes. The aim of this study was the thermodynamic investigation of copper porphyrines and phthalocyanine interaction with human telomeric G-quadruplex DNA.

Materials & Methods In the present experimental study, interaction of an anionic water-soluble phthalocyanine Cu(PcTs) and two cationic water-soluble tetrapyrrolineporphyrines, including [Cu(2,3-tmtppa)]⁴⁺ and [Cu(3,4-tmtppa)]⁴⁺ complexes with human telomeric G-quadruplex DNA was thermodynamically investigated in different concentrations of Na⁺ and K⁺ cations, using fluorescence spectroscopy. The data were analyzed via the Stern-Volmer plot and the van't Hoff plot.

Findings Fluorescent intercalator displacement indicated the displacement ability of the complexes with thiazole orange. Stern-Volmer plots of the porphyrines exhibited a slight positive deviation from a straight line, suggesting both static and dynamic quenching. In addition, the quenching effect of the two porphyrines was noticeably higher than the phthalocyanine, implying binding of Cu(PcTs) to both forms of the quadruplex was weaker compared to Cu(2,3-tmtppa) and Cu(3,4-tmtppa). Gibbs free energy (ΔG) for binding was negative, implying that the interaction between the complexes and the G-quadruplex DNA was favorable thermodynamically.

Conclusion The binding of copper porphyrines to G-quadruplex DNA is stronger than copper phthalocyanine, and their binding is favorable thermodynamically. Porphyrines have potential to be used as anti-cancer compounds and are suitable complexes for pharmaceutical studies.

Keywords Interaction; Thermodynamics; Fluorescence; Porphyrine; Phthalocyanine

CITATION LINKS

- [1] Principles of nucleic acid ... [2] Four-stranded nucleic acids: Structure, function and targeting of ... [3] Overview of formation of G-quadruplex ... [4] Human telomere, oncogenic promoter and 5'-UTR G-quadruplexes: Diverse higher order DNA and RNA targets ... [5] DNA binding and biological studies of some novel water-soluble ... [6] The interaction of water-soluble iron porphyrins with DNA films and the electrocatalytic properties for inorganic ... [7] Physiological relevance of telomeric G-quadruplex formation ... [8] Formation of porphyrins from pyrrole and ... [9] A new porphyrin synthesis, the synthesis of ... [10] A study on the binding of two water-soluble tetrapyrrolineporphyrinato ... [11] Spectroscopic investigation on the interaction of copper porphyrines and phthalocyanine with human telomeric ... [12] Binding: A polemic and ... [13] Development of a fluorescent intercalator displacement assay (G4-FID) for establishing quadruplex-DNA affinity and selectivity of ... [14] Fluorescence intercalator displacement assay for screening G4 ligands towards a variety of ... [15] Thiazole orange-induced c-di-GMP quadruplex formation facilitates a simple fluorescent detection of this ubiquitous biofilm ... [16] Exposure of tryptophanyl residues in proteins, quantitative determination by fluorescence ... [17] Some regularities of dynamic accessibility of buried fluorescent residues to external ... [18] 2-Aminop-urine as a probe for Quadruplex ... [19] Sequence and structural selectivity of nucleic acid ... [20] Thermodynamic and spectroscopic study on the binding of cationic Zn(II) and Co(II) tetrapyrrolineporphyrines to calf thymus DNA: The role of the central metal in ... [21] Thermodynamic characterization of the folding and interactions ... [22] Quadruplex nucleic acids [23] Probing the interaction of trans-resveratrol with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study ... [24] Spectroscopic studies on the interaction between carbaryl and calf thymus DNA with the use of ethidium bromide as a ... [25] Interaction between tryptophan-vanillin Schiff base ... [26] Tetramethylpyridiniumporphyrines--a new class of G-quadruplex ...

بررسی ترمودینامیک برهم‌کنش پورفیرازین و فتالوسیانین مس با DNA چهاررشته‌ای تلومر انسانی

لیلا حسنی PhD

دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه، زنجان، ایران

الهام صفایی PhD

گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

فاطمه حکیمیان PhD

دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه، زنجان، ایران

صفیه صوفیان* PhD

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد اراک، دانشگاه پیام نور، اراک، ایران

چکیده

اهداف: موتیف‌های ساختاری DNA چهاررشته‌ای به‌عنوان یک هدف جدید برای کشف داروهای جدید مطرح هستند. مولکول‌های کوچک که به‌طور اختصاصی به ساختارهای چهاررشته‌ای متصل می‌شوند، می‌توانند به‌عنوان ترکیبات بالقوه به‌منظور اهداف درمانی استفاده شوند. هدف این پژوهش بررسی ترمودینامیک برهم‌کنش پورفیرازین و فتالوسیانین مس با DNA چهاررشته‌ای تلومر انسانی بود.

مواد و روش‌ها: در پژوهش تجربی حاضر، برهم‌کنش یک فتالوسیانین آنیونی محلول در آب (Cu(PcTs) و دو ترکیب تتراپیریدینوپورفیرازین کاتیونی محلول در آب شامل $[Cu(2,3-tmtppa)]^{4+}$ و $[Cu(3,4-tmtppa)]^{4+}$ با DNA چهاررشته‌ای تلومر انسانی در غلظت‌های مختلف کاتیون‌های سدیم و پتاسیم از دیدگاه ترمودینامیک با استفاده از روش طیف‌سنجی فلورسانس بررسی شد. داده‌ها از طریق نمودار استرن-ولمر و منحنی وانت‌هوف تحلیل شدند.

یافته‌ها: فلورسانس جایگزینی اینترکاله‌شونده نشان داد که کمپلکس‌ها توانایی جایگزین شدن با تiazول‌اورنژ را داشتند. منحنی‌های استرن-ولمر پورفیرازین‌ها مبین اندکی انحراف مثبت از خط راست بود که نشان‌دهنده وقوع هر دو نوع خاموشی دینامیک و استاتیک بود. به علاوه اثر خاموشی دو پورفیرازین به میزان قابل توجهی بیشتر از فتالوسیانین بود که نشان داد اتصال Cu(PcTs) به هر دو شکل چهاررشته‌ای، ضعیف‌تر از $Cu(2,3-tmtppa)$ و $Cu(3,4-tmtppa)$ بود. انرژی آزاد گیبس (ΔG) اتصال منفی بود که مبین میان‌کنش مطلوب ترمودینامیک بین کمپلکس‌ها و DNA چهاررشته‌ای بود.

نتیجه‌گیری: اتصال پورفیرازین‌های مس به DNA چهاررشته‌ای قوی‌تر از فتالوسیانین مس است و همچنین اتصال آنها از لحاظ ترمودینامیک مطلوب است. پورفیرازین‌ها پتانسیل کاربرد به‌عنوان ترکیبات ضدسرطان را دارند و کمپلکس‌های مناسبی برای مطالعات دارویی هستند.

کلیدواژه‌ها: برهم‌کنش، ترمودینامیک، فلورسانس، پورفیرازین، فتالوسیانین

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۴/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۵/۲۹

*نویسنده مسئول: s_sooifan@pnu.ac.ir

مقدمه

دزوکسی‌ریبونوکلیک‌اسید (DNA) نقش اساسی در ذخیره و بیان اطلاعات ژنتیکی سلول دارد^[1]. ترتیب متفاوت جفت‌بازها منجر به تشکیل اشکالی چون ساختارهای سرشته‌ای و چهاررشته‌ای (G_4) می‌شود^[2]. G_4 ها دارای یک هسته متشکل از بازهای گوانین هستند که ساختار صفحه‌ای جی-کوارتت (G -quartet) نامیده می‌شود و با کاتیون‌های تک‌ظرفیتی مثل آمونیوم (NH_4^+)، سدیم (Na^+) و به‌خصوص پتاسیم (K^+) پایدار می‌شود^[3]. انتهای کروموزوم‌های ژنوم در همه مهره‌داران شامل توالی‌های تکراری d (GGGTTA) است. در انسان تقریباً ۸ کیلوباز از این توالی به شکل دورشته‌ای است که به یک بخش تکرار شده ای ۲۰۰-۱۰بازی ختم می‌شود. این ساختار به‌عنوان تلومر شناخته شده است و احتمالاً

بخش تکرار شده‌ای آزاد آن "در موجود زنده" (*in vivo*) می‌تواند ساختار G_4 را تشکیل دهد. تلومرها با هر تقسیم سلولی، کوتاه‌تر می‌شوند و در نهایت آنقدر کوتاه می‌شوند که مرگ سلولی اتفاق می‌افتد. اما در سلول‌های بنیادی آنزیم خاصی به نام تلومراز وجود دارد که می‌تواند تلومرها را بازسازی و در نتیجه سلول‌ها را نامیرا کند. تلومراز به‌طور غیرعادی در ۸۵٪ همه سرطان‌ها فعال است^[4]. بنابراین جای تعجب نیست که تلومراز، یک هدف دارویی مهم محسوب می‌شود^[5, 4]. تحقیقات قابل توجهی در گسترش لیگاندهای متصل‌شونده به G_4 به‌خصوص به‌منظور هدف‌گیری تکرارهای تلومری انسانی صورت گرفته که منجر به توقف عملکرد تلومراز شده است^[6, 7].

پورفیرین‌ها گروهی از ترکیبات آلی هستند که به‌وفور در طبیعت یافت می‌شوند. پورفیرین‌ها ماکروسیکل‌های ناجورحلقه هستند که از چهار زیرواحد پیرول تغییریافته تشکیل شده‌اند و از طریق پل‌های متین (=CH-) به هم متصل می‌شوند^[8, 9]. فتالوسیانین‌ها به دلیل داشتن اتم‌های نیتروژن متصل به واحدهای پیرول از پورفیرین‌ها متفاوت‌اند. اگر چه تحقیقات قابل توجهی در مورد کاربرد پورفیرین‌ها و فتالوسیانین‌ها در ارتباط با اثرات ضدسرطانی و ضدباکتریایی و همین‌طور اتصال آنها به نوکلئیک‌اسیدها صورت گرفته، اما به تترامتیل‌متالوپورفیرازین‌ها توجه کمتری شده است^[10].

در پژوهش حسنی و همکاران محل اتصال و ثابت اتصال کمپلکس‌های مذکور به DNA چهاررشته‌ای و همچنین تغییرات ساختاری این نوع DNA در اثر اتصال به کمپلکس‌ها با روش‌های طیف‌سنجی مطالعه شده است^[11]. با توجه به اینکه مطالعات پیشین طراحی عوامل متصل‌شونده جدید به DNA به فهم کامل ترمودینامیک اتصال داروهای موجود به DNA نیاز دارد^[12]، در تحقیق حاضر از روش آشکارساز یونی‌زاسیون شعله‌ای (FID) برای بررسی اتصال کمپلکس‌های نام‌برده به H_{22} و به‌دست‌آوردن پارامترهای ترمودینامیک استفاده شد. در این تحقیق از تiazول‌اورنژ (TO) در روش FID استفاده شد، زیرا مطالعات سایر محققان نشان داده است که تiazول‌اورنژ با تمایل بالایی ($K_a=3 \times 10^4$) به DNA چهاررشته‌ای تشکیل شده از تلومر انسانی متصل می‌شود^[13]. نکته مهم‌تر این که نشر تiazول‌اورنژ بعد از برهم‌کنش با DNA چهاررشته‌ای به‌شدت افزایش می‌یابد و به حدود ۵۰۰ تا ۳۰۰۰ برابر نشر آن در محلول آزاد می‌رسد. در نتیجه، توانایی جانشینی یک لیگاند با تiazول‌اورنژ با کاهش شدت فلورسانس آن (5.39×10^9 نانومتر) بعد از برانگیختگی در ۵۰۱ نانومتر مشاهده می‌شود^[13, 14]. تiazول‌اورنژ می‌تواند با پلی‌نوکلئوتیدهایی مانند DNA دورشته‌ای از طریق شیار کوچک، قرارگرفتن بین جفت‌بازها یا اتصال به ستون فقرات فسفات قند برهم‌کنش داشته باشد، ولی فقط اتصال بین‌رشته‌ای و اتصال به شیار کوچک به افزایش نشر فلورسانس می‌انجامد^[15]. بنا بر مطالب ذکرشده، هدف پژوهش حاضر بررسی ترمودینامیک برهم‌کنش پورفیرازین و فتالوسیانین مس با DNA چهاررشته‌ای تلومر انسانی بود.

مواد و روش‌ها

در پژوهش تجربی حاضر، برهم‌کنش یک فتالوسیانین آنیونی و دو ترکیب تتراپیریدینوپورفیرازین کاتیونی محلول در آب با DNA چهاررشته‌ای تلومر انسانی در غلظت‌های مختلف کاتیون‌های سدیم و پتاسیم از دیدگاه ترمودینامیک با استفاده از روش طیف‌سنجی

بافر مد نظر تهیه و سپس در سل فلورسانس ریخته و در محل قرارگیری سل در دستگاه فلورسانس قرار داده شد. سپس حدود ۱۵ تا ۲۰ دقیقه فرصت داده شد تا دمای محلول داخل سل به دمای تنظیم‌شده برسد و پس از آن، طیف ثبت شد. در مرحله بعد DNA چهارشته‌ای به سل اضافه و بعد از ۳ دقیقه طیف آن ثبت شد. پس از این مرحله تیتراسیون لیگاند مورد نظر شروع و بعد از گذشت ۳ دقیقه از هر تزریق طیف‌ها ثبت شدند. بعد از طیف‌گیری اثر رقت اعمال و برای به‌دست‌آوردن مقدار ثابت استرن-ولمر، نمودار F_0/F نسبت به غلظت خاموش‌گر (لیگاند) رسم و مقدار ثابت استرن-ولمر (K_{SV}) به دست آمد.

مدل خاموشی استاتیک (sphere-of-action) برای نمودار استرن-ولمر با تقعر به سمت بالا پیشنهاد شده است. طبق این مدل اگر یک خاموشگر در حجم v اطراف فلوروفور باشد، یک واکنش خاموشی بلافاصله بعد از برانگیختگی با بازدهی یک رخ می‌دهد. با این فرض که خاموشگرها در این حجم مطابق با توزیع پواسون، پخش شده باشند. فرمول زیر برای ترکیب خاموشی پویا و استاتیک ارایه شده است:

$$F_0/F = (1 + K_{SV}[Q]) \exp(V[Q])$$

V ثابت خاموشی ایستا است و به‌صورت زیر تعریف می‌شود:

$$V = v \cdot N_A$$

v حجم خاموشی ایستا و N_A عدد آووگادرو است [16, 17] و در مطالعه حاضر از این فرمول‌ها برای برازش منحنی‌های استرن-ولمر مربوط به دو کمپلکس پورفیرازین استفاده شد.

نمودار استرن-ولمر برای سیستم‌هایی با دو کلاس فلوروفور که یکی حداقل به طور جزئی دور از دسترس خاموشگر است، معمولاً دارای تقعر به سمت پایین است. سیستم خاموشی هتروژنی نیز می‌تواند با رابطه زیر توصیف شود:

$$F_0/F = \sum_{i=1}^n \frac{f_i}{1 + K_{SV,i}[Q]}$$

$K_{SV,i}$ ثابت خاموشی برای گونه‌های i ام و f_i سهم کسری گونه i ام به فلورسانس کل است. به‌طور واضح برای یک سیستم با دو ترکیب رابطه زیر صدق می‌کند [18] و نمودارهای استرن-ولمر به‌دست‌آمده با تقعر پایین، در مطالعه حاضر نیز به‌خوبی با آن برازش شد:

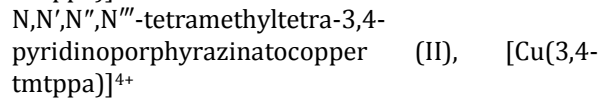
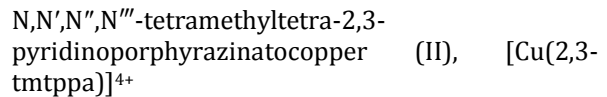
$$F_0/F = \frac{f_1}{1 + K_{SV,1}[Q]} + \frac{1 - f_1}{1 + K_{SV,2}[Q]}$$

در این تحقیق از K_{SV} برای رسم نمودار وانت‌هوف و استخراج پارامترهای ترمودینامیک استفاده و پارامترهای ترمودینامیک با استفاده از منحنی وانت‌هوف محاسبه شد.

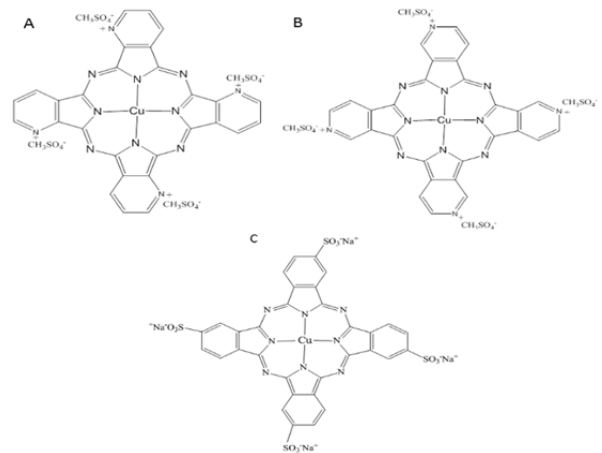
یافته‌ها

طیف‌های فلورسانس نشان دادند که طی افزودن $[Cu(2,3-tmtppa)]$ و $[Cu(3,4-tmtppa)]$ به $TO-H_{22}$ ، از طول موج ۵۴۰-۵۲۸ نانومتر (طول موج بیشینه در دماهای مختلف و در غلظت‌های مختلف یون‌های سدیم و پتاسیم متفاوت است) که مربوط به طول موج نشری $TO-H_{22}$ بود به ۵۲۱ نانومتر که مربوط به طول موج نشری تیزول‌اورنژ آزاد است، جابه‌جا شد. کمپلکس‌های پورفیرازین اینترکاله شده و تیزول‌اورنژ وارد محلول

فلورسانس بررسی شد (شکل ۱). این ترکیبات عبارت از موارد زیر بودند:



Copper phthalocyanine tetrasulfonate, $Cu(PcTs)$ (C)



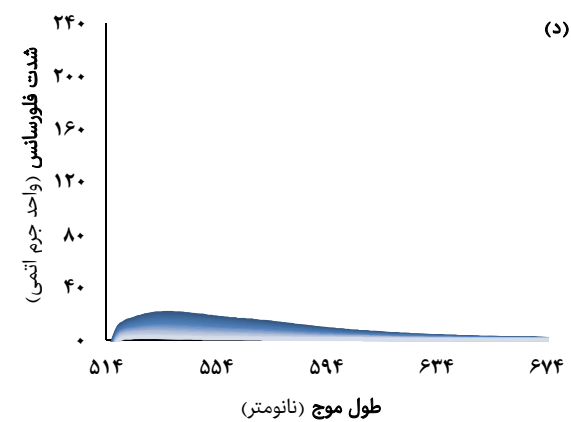
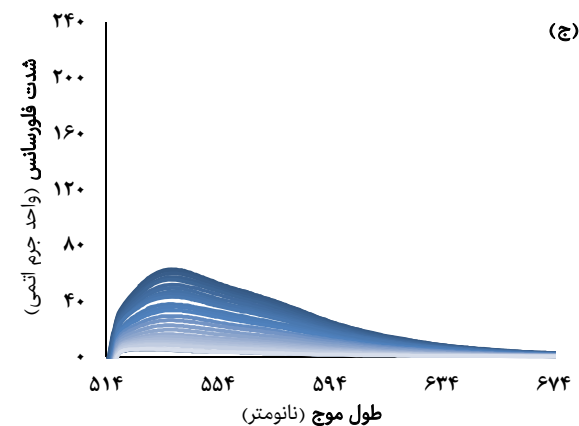
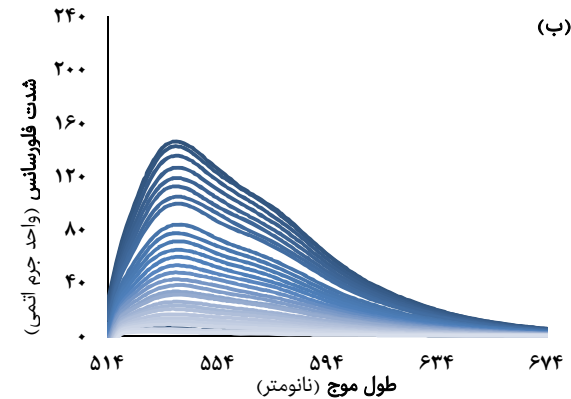
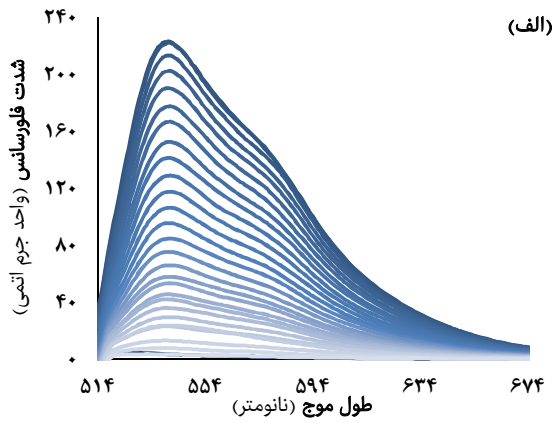
شکل ۱) ساختار DNA چهارشته‌ای تلومر انسانی در غلظت‌های مختلف کاتیون‌های سدیم و پتاسیم؛ (A) $[Cu(2,3-tmtppa)]^{4+}$ (B) $[Cu(3,4-tmtppa)]^{4+}$ (C) $Cu(PcTs)$

از دستگاه اسپکتروفلوریمتر (کری‌اکلیپس؛ استرالیا) دارای لامپ پالسی زنون با فرکانس ۸۰ هرتز برای ثبت طیف‌های فلورسانس استفاده شد. پهنای هر کدام از شکاف‌های تحریک و نشر، ۵ نانومتر و برای صاف‌کردن (Smoothing) نوع ساویزکی-گلی فاکتور ۲۵ انتخاب شد.

کلریدسدیم، تیزول‌اورنژ، دی‌متیل‌سولفوکسید (DMSO)، نمک‌های مونو و دی‌بازیک فسفات سدیم، اتیلن‌دی‌آمین‌تترااستیک‌اسید (EDTA؛ شرکت سیگما؛ آلمان) و مس (II) فتالوسیانین مس، نمک مونو و دی‌بازیک فسفات پتاسیم (شرکت فلوکا؛ سوئیس) تهیه شد. برای تهیه DNA الیگونوکلوئوتید (H_{22}) AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG برای سنتز به شرکت تکاپوزیست سفارش داده شد. دو کمپلکس پورفیرازین نیز به روش ذکرشده تهیه شد [10].

فولد اولیگونوکلوئوتید به ساختار چهارشته‌ای: H_{22} در بافر مد نظر حل و به مدت ۵ دقیقه در حمام آب گرم در دمای $95^{\circ}C$ قرار داده شد. سپس نمونه‌ها خارج و یک ساعت در دمای اتاق قرار گرفته و در یخچال در دمای $4^{\circ}C$ نگهداری شدند. آزمایشات حداقل پس از گذشت ۱۰ ساعت از زمان نگهداری نمونه‌ها در یخچال صورت گرفت.

بررسی ترمودینامیک برهم‌کنش کمپلکس‌ها با H_{22} : در این تحقیق با اندازه‌گیری وابستگی دمایی ثابت تعادل، مطالعه ترمودینامیک برهم‌کنش بین کمپلکس‌های پورفیرازین و فتالوسیانین با DNA چهارشته‌ای انجام شد. آزمایش‌ها در چهار دمای ۱۰، ۲۵، ۳۷ و $50^{\circ}C$ و در بافر فسفات سدیم یک میلی‌مولار بدون نمک و حاوی نمک ۱۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم و همچنین بافر فسفات پتاسیم یک میلی‌مولار با نمک کلریدپتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار انجام شد. محلول تیزول‌اورنژ از طریق رقیق کردن محلول مادر حل شده در DMSO در



نمودار ۱ اثر خاموشی کمپلکس $[Cu(3,4-tmtppa)]^{4+}$ بر نشر کمپلکس G4-TO در دماهای مختلف در عدم حضور نمک: الف) دمای $10^{\circ}C$ ، ب) دمای $25^{\circ}C$ ، ج) دمای $37^{\circ}C$ ، د) دمای $50^{\circ}C$

شد. در غلظت یک میلی مولار، کاتیون های سدیم و پتاسیم نشر $TO-H_{22}$ به طور قابل توجهی بیشتر از نشر آن در غلظت 10^{-4} میلی مولار این کاتیون ها بود (جدول ۱). هر چه دما افزایش یافت، نشر $H_{22}-TO$ کم شد و همچنین در حضور کاتیون بیشتر در مقایسه با حالتی که کاتیون کمتری در محیط موجود بود، طول موج بیشینه به سمت طول موج های کوتاه تر جابه جا شد (شیفت آبی؛ جدول ۱؛ نمودار ۱).

منحنی استرن-ولمر مرتبط با یکی از کمپلکس های پورفیرازین در حضور دو نمک سدیم و پتاسیم، خطی نبود و تقعر رو به بالا داشت. در مورد کمپلکس دیگر پورفیرازین نیز تغییرات به همین صورت بود که نتایج آن دوباره آورده نشد (نمودار ۲). نمودار استرن-ولمر فتالوسیانین، بر خلاف دو پورفیرازین مس، تقعر رو به پایین داشت (نتایج نشان داده نشده است).

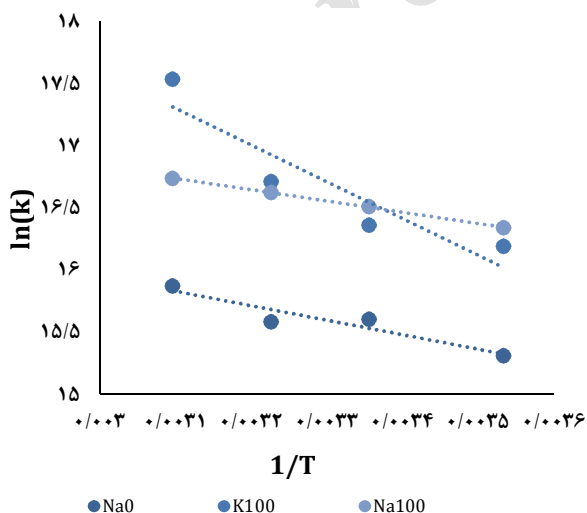
نمودار وانت هوف مربوط به کمپلکس $[Cu(2,3-tmtppa)]$ رسم و پارامترهای ترمودینامیک استخراج شد (جدول ۲؛ نمودار ۳). منحنی وانت هوف مربوط به دو کمپلکس دیگر نیز برای محاسبه پارامترهای ترمودینامیک رسم شد (نمودارها نشان داده نشده است).

جدول ۱ طول موج نشر بیشینه و شدت فلورسانس آن در حضور کمپلکس های مس و یون های سدیم و پتاسیم در دماهای مختلف

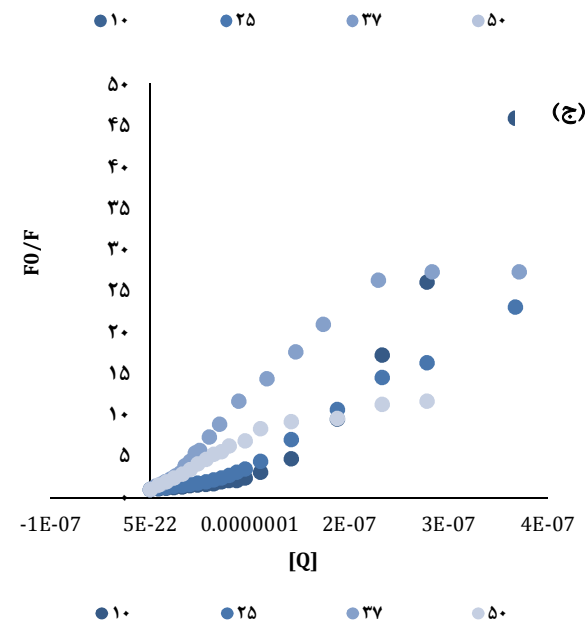
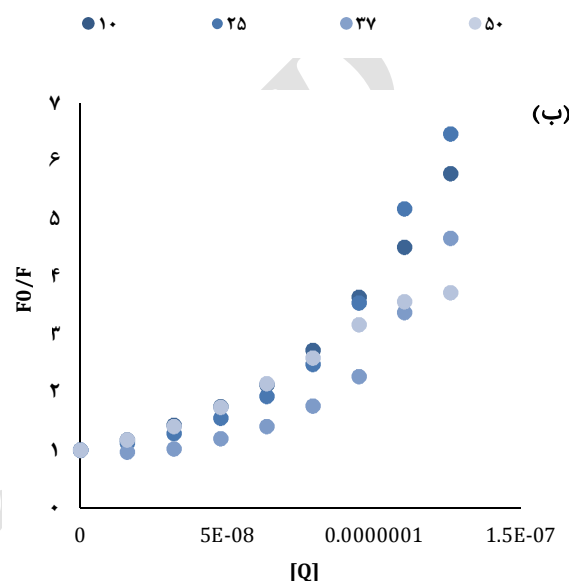
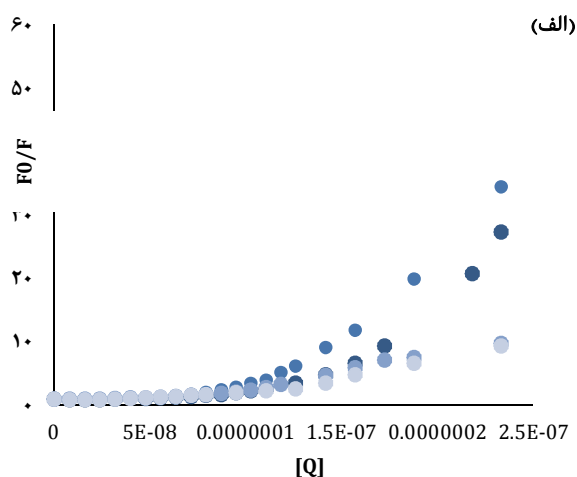
شدت $TO-H_{22}$	λ_{max} (نانومتر)	دما (درجه کلوین)	کمپلکس، نوع نمک و غلظت نمک
۲۲۳	۵۴۰	۲۸۳	$[Cu(3,4-tmtppa)]^{4+}$, ($Na^{+}0mM$)
۱۴۶	۵۳۹	۲۹۸	
۶۲	۵۳۸	۳۱۰	
۲۰	۵۳۶	۳۲۳	$[Cu(2,3-tmtppa)]^{4+}$, ($Na^{+}0mM$)
۲۰۴	۵۴۰	۲۸۳	
۱۳۳	۵۳۹	۲۹۸	
۶۰	۵۳۸	۳۱۰	$Cu(PcTs)$, ($Na^{+}0mM$)
۱۴	۵۳۵	۳۲۳	
۱۸۶	۵۳۹	۲۸۳	
۱۳۴	۵۳۹	۲۹۸	$Cu(PcTs)$, ($Na^{+}100mM$)
۷۰	۵۳۷	۳۱۰	
۲۱	۵۳۶	۳۲۳	
۷۲	۵۳۶	۲۸۳	$Cu(PcTs)$, ($Na^{+}100mM$)
۳۷	۵۳۳	۲۹۸	
۲۵	۵۳۲	۳۱۰	
۱۳	۵۳۱	۳۲۳	$Cu(PcTs)$, ($K^{+}100mM$)
۶۹	۵۳۵	۲۸۳	
۵۱	۵۳۴	۲۹۸	
۴۱	۵۳۴	۳۱۰	$[Cu(3,4-tmtppa)]^{4+}$, ($K^{+}100mM$)
۲۸	۵۳۲	۳۲۳	
۶۸	۵۳۵	۲۸۳	
۴۹	۵۳۵	۲۹۸	$[Cu(3,4-tmtppa)]^{4+}$, ($K^{+}100mM$)
۳۳	۵۳۴	۳۱۰	
۱۵	۵۲۸	۳۲۳	
۶۸	۵۳۶	۲۸۳	$[Cu(2,3-tmtppa)]^{4+}$, ($Na^{+}100mM$)
۳۶	۵۳۴	۲۹۸	
۲۲	۵۳۳	۳۱۰	
۷	۵۳۳	۳۲۳	$[Cu(2,3-tmtppa)]^{4+}$, ($Na^{+}100mM$)
۶۵	۵۳۷	۲۸۳	
۳۹	۵۳۴	۲۹۸	
۲۳	۵۳۳	۳۱۰	$[Cu(3,4-tmtppa)]^{4+}$, ($Na^{+}100mM$)
۱۲	۵۳۱	۳۲۳	
۵۸	۵۳۴	۲۸۳	
۴۹	۵۳۴	۲۹۸	$[Cu(2,3-tmtppa)]^{4+}$, ($K^{+}100mM$)
۳۹	۵۳۳	۳۱۰	
۲۵	۵۳۱	۳۲۳	

کمپلکس‌ها	دما (درجه کلونین)	$\ln K$ (M ⁻¹)	ΔG° (kJ mol ⁻¹)	ΔH° (kJ mol ⁻¹)	ΔS° (J mol ⁻¹ K ⁻¹)
[Cu(2,3-tmtppa)] ⁴⁺ , (K ⁺ 100mM)	۲۸۳	۱۶	-۳۷/۷	-۳۷/۹	۳۰/۴
	۲۹۸	۱۵/۳	-۳۷/۹	-۳۸/۵	۲۹/۵
	۳۱۰	۱۵	-۳۸/۵	-۴۳/۴	۳۰/۳
[Cu(3,4tmtppa)] ⁴⁺ , (K ⁺ 100mM)	۲۸۳	۱۶/۲	-۳۸/۱	-۴۰/۵	۳/۲۲۱
	۲۹۸	۱۶/۴	-۳۸/۱	-۴۳/۱	۲۱۸/۴
	۳۱۰	۱۶/۷	-۴۳/۱	-۴۷/۱	۲۱۸/۱
Cu(PcTs), (K ⁺ 100mM)	۲۸۳	۱۱/۲	-۲۶/۳	-۲۶/۴	۳۲/۴
	۲۹۸	۱۰/۶	-۲۶/۴	-۲۷/۶	۳۱/۳
	۳۱۰	۱۰/۷	-۲۷/۶	-۲۷/۳	۳۳/۸
[Cu(2,3-tmtppa)] ⁴⁺ , (Na ⁺ 100mM)	۲۸۳	۱۵/۶	-۳۶/۷	-۴۰/۶	۳۰۵/۷
	۲۹۸	۱۶/۴	-۴۰/۶	-۴۵/۹	۳۰۳/۳
	۳۱۰	۱۷/۸	-۴۵/۹	-۴۸/۴	۳۰۸/۸
[Cu(3,4-tmtppa)] ⁴⁺ , (Na ⁺ 100mM)	۲۸۳	۱۶/۳	-۳۸/۴	-۴۰/۹	۳۰۴
	۲۹۸	۱۶/۵	-۴۰/۹	-۴۵	۱۶۲/۵
	۳۱۰	۱۶/۶	-۴۲/۸	-۴۵	۱۶۲/۶
Cu(PcTs), (Na ⁺ 100mM)	۲۸۳	۱۳/۳	-۳۱/۳	-۳۲/۵	۴۴/۲
	۲۹۸	۱۳/۱	-۳۲/۵	-۳۲/۸	۴۶/۲
	۳۱۰	۱۲/۷	-۳۲/۸	-۳۳/۱	۴۵/۳
[Cu(2,3-tmtppa)] ⁴⁺ , (Na ⁺ 1mM)	۲۸۳	۱۴/۳	-۳۳/۶	-۳۷/۲	۲۳۲/۵
	۲۹۸	۱۵	-۳۷/۲	-۳۹/۷	۲۳۳
	۳۱۰	۱۵/۴	-۳۹/۷	-۴۳	۲۳۲/۲
[Cu(3,4-tmtppa)] ⁴⁺ , (Na ⁺ 1mM)	۲۸۳	۱۵/۳	-۳۶	-۳۸/۶	۱۶۱/۶
	۲۹۸	۱۵/۶	-۳۸/۶	-۴۰/۱	۱۶۲/۳
	۳۱۰	۱۵/۶	-۴۰/۱	-۴۲/۶	۱۶۰/۹
Cu(PcTs), (Na ⁺ 1mM)	۲۸۳	۱۲/۵	-۲۹/۵	-۳۲	۱۴۶/۶
	۲۹۸	۱۲/۹	-۳۲	-۳۳/۸	۱۴۷/۴
	۳۱۰	۱۳/۱	-۳۳/۸	-۳۳/۸	۱۴۷/۶

و [Cu(3,4-tmtppa)]⁴⁺, [Cu(2,3-tmtppa)]⁴⁺ به ترتیب به کمپلکس‌های Cut و Cu3,4-Cu2,3
 Cu(PcTs) اعداد بعد از Na⁺ و K⁺ به غلظت‌های این دو یون بر حسب میلی‌مولار اشاره دارد



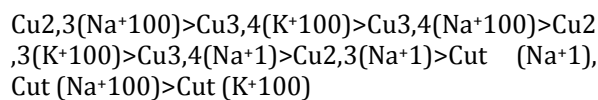
نمودار ۳) نمودار وانت هوف اتصال H22 به کمپلکس [Cu(3,4-tmtppa)]⁴⁺ در غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم و پیتاسیم و در عدم حضور کلرید سدیم



نمودار ۴) نمودار استرن-ولمر خاموشی G4-TO توسط [Cu(2,3-tmtppa)]⁴⁺ در بافر فسفات یک میلی‌مولار و ۱۰۰ میلی‌مولار EDTA در دماهای مختلف: الف) عدم حضور نمک، ب) حضور یون پیتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار، ج) حضور یون سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار. غلظت تیاژول اورنژ ۵/۰ و غلظت G4 ۲۵/۰ میکرومولار

نتایج به دست آمده از تحقیقات ترمودینامیک را می توان در موارد زیر خلاصه کرد:

۱- تفاوت انرژی آزاد گیبس (ΔG°) اتصال همه کمپلکس ها به H_{22} در همه دماها مقادیری منفی بود که نشان دهنده مطلوب بودن و خودبه خودی بودن واکنش ها بود. قدر مطلق انرژی آزاد گیبس طبق روند زیر کاهش یافت (جدول ۲):



قدر مطلق ΔG° برای $[Cu(2,3-tmtppa)]$ در ۱۰۰ میلی مولار سدیم از همه بزرگتر و قدر مطلق مقدار ΔG° برای $Cu(PcTs)$ در ۱۰۰ میلی مولار پتاسیم از همه کوچکتر بود.

۲- ΔG° اتصال فتالوسیانین کمتر از پورفیرازین ها بود و ΔG° اتصال پورفیرازین ها تفاوت زیادی با هم نداشتند. همچنین، تفاوت انرژی آزاد اتصال در دماهای مختلف چندان زیاد نبود و می توان گفت که اتصال کمپلکس ها به H_{22} وابستگی شدیدی به دما نداشت.

۳- تغییرات آنتالپی $Cu(PcTs)$ در غلظت ۱۰۰ میلی مولار کاتیون های سدیم و پتاسیم و تغییرات آنتالپی $[Cu(2,3-tmtppa)]$ در حضور نمک ۱۰۰ میلی مولار پتاسیم، منفی و تغییرات آنتالپی در موارد دیگر مثبت بود (جدول ۲). تغییرات آنتروپی مربوط به اتصال $Cu(PcTs)$ در غلظت ۱۰۰ میلی مولار کاتیون های سدیم و پتاسیم نسبت به موارد دیگر به طور قابل توجهی کمتر بود. به طور کلی محدوده مقادیر آنتروپی (ΔS) گسترده تر از آنتالپی بود و به استوکیومتری رشته، ماهیت و طول لوپ ها بستگی داشت.

بحث

پژوهش حاضر با هدف بررسی ترمودینامیک برهم کنش پورفیرازین و فتالوسیانین مس با DNA چهار رشته ای تلومر انسانی انجام شد. در آزمایشاتی که با استفاده از طیف سنجی فلورسانس انجام شد، از فلوروفور تیزاول اورنژ استفاده شد و همان طور که اشاره شد نشر این ترکیب در اثر اتصال به DNA افزایش می یابد و در صورتی که کمپلکس های نام برده جایگزین تیزاول اورنژ شوند، انتظار می رود که نشر آن کاهش یابد، لذا از تغییرات نشر تیزاول اورنژ در اثر اضافه شدن کمپلکس ها به محلول می توان اطلاعاتی در مورد اتصال آنها به DNA به دست آورد. طبق یافته ها در غلظت یک میلی مولار کاتیون های سدیم و پتاسیم نشر $TO-H_{22}$ از نشر آن در غلظت ۱۰۰ میلی مولار بیشتر بود. در توجیه این نتیجه می توان گفت که یون ها با اینترکاله شدن تیزاول اورنژ تداخل می کنند. کاهش نشر مشاهده شده می تواند به این دلیل باشد که با افزودن $[Cu(2,3-tmtppa)]$ و $[Cu(3,4-tmtppa)]$ به $TO-H_{22}$ ، تیزاول اورنژ از H_{22} بیرون رانده می شود و پورفیرازین ها جای آن را می گیرند و نشر $TO-H_{22}$ به دلیل خروج تیزاول اورنژ از بین بازها و قرار گرفتن آن در معرض مولکول های آب به طور کامل خاموش می شود [15].

نشر $TO-H_{22}$ در حضور $Cu(PcTs)$ برخلاف دو پورفیرازین مس به خصوص در غلظت ۱۰۰ میلی مولار یون های سدیم و پتاسیم به طور کامل خاموش نمی شود. به نظر می رسد $Cu(PcTs)$ نمی تواند مانند پورفیرازین های مس اینترکاله شود و تیزاول اورنژ را بیرون براند، بلکه از طریق اتصال خارجی به H_{22} متصل می شود. در این حالت فتالوسیانین تا حدی به مولکول های آب اجازه می دهد که به تیزاول اورنژ نزدیک شود و بدین دلیل نشر $TO-H_{22}$ تا حدی

خاموش می شود. در غلظت های بالای $Cu(PcTs)$ احتمالاً تجمع این کمپلکس روی H_{22} ، مانع از دسترسی مولکول های آب به تیزاول اورنژ می شود و کاهش نشری مشاهده نمی شود. در غلظت های ۱۰۰ میلی مولار یون های سدیم و پتاسیم بعد از اضافه کردن $Cu(PcTs)$ ، کاهش نشر کمتری نسبت به حالتی که نمک در محیط وجود ندارد، دیده شد که احتمالاً به این دلیل است که در حضور این کاتیون ها مقداری از بار منفی $Cu(PcTs)$ خنثی و تجمع در غلظت های پایین تر فتالوسیانین تشکیل می شود و مولکول های آب امکان کمتری برای خاموش کردن نشر تیزاول اورنژ دارند.

طبق یافته ها افزایش دما نشر $H_{22}-TO$ را کم کرد و در حضور کاتیون بیشتر، طول موج بیشینه به سمت طول موج های کوتاه تر جابه جا شد احتمالاً شیفیت آبی می تواند به دلیل رقابت کاتیون ها با تیزاول اورنژ باشد. در واقع کاتیون ها برای اینترکاله شدن با تیزاول اورنژ رقابت می کنند و امکان اینترکاله شدن تیزاول اورنژ کم می شود و لذا تعداد زیادی از مولکول های تیزاول اورنژ در محلول باقی می ماند و محیط را غیرقطبی می کند [15]. منحنی استرن-ولمر کمپلکس پورفیرازین با دو نمک سدیم و پتاسیم تقعر رو به بالا داشت. یک نمودار استرن-ولمر غیرخطی، وجود سیستم فلورسانس هتروژن را نشان می دهد. نمودار استرن-ولمر با تقعر به بالا نشان دهنده تشکیل هر دو کمپلکس استاتیک و پویا است.

در بررسی نتایج به دست آمده از تحقیقات ترمودینامیک، احتمالاً دلیل مطلوب تر بودن واکنش ها در غلظت های بیشتر پورفیرازین ها، نقش تیزاول اورنژ است. با توجه به طیف ها و نشر آنها، در غلظت کم نمک (یک میلی مولار) در مقایسه با غلظت زیاد نمک برهم کنش تیزاول اورنژ با H_{22} شدیدتر است، زیرا در غلظت زیاد نمک، کاتیون ها برای اتصال به H_{22} و اینترکاله شدن با تیزاول اورنژ رقابت می کنند و احتمال اینترکاله شدن تیزاول اورنژ را کاهش می دهند و نشر کاهش می یابد. در این شرایط، کمپلکس ها باید با تیزاول اورنژ اینترکاله شده کمتری رقابت کنند و در نتیجه در غلظت های زیاد، شدت برهم کنش $[Cu(2,3-tmtppa)]^{4+}$ و $[Cu(3,4-tmtppa)]^{4+}$ بیشتر است و واکنش مطلوب تر است. ولی در مورد Cut چون اتصال آن از نوع خارجی است و اینترکاله نمی شود و به صورت انباشته شدن خارجی نشر تیزاول اورنژ را خاموش می کند، غلظت کم و زیاد کاتیون اثر چندانی در رقابت بین تیزاول اورنژ و کمپلکس ندارد.

همان طور که قبلاً نیز گفته شد فهم دقیق نیروهای بین مولکولی موثر در پایداری کمپلکس دارو- DNA نیازمند مطالعات ترمودینامیک و سینتیکی است [18-20]. همچنین در همه مواردی که در جدول ۲ مشاهده شد، آنتروپی واکنش های اتصال، مثبت بود. یکی از دلایل آن می تواند آزاد شدن مولکول های آب متصل و وارد شدن آنها به محلول باشد. آنتالپی منفی به دلیل انباشتگی سطوح آروماتیک وسیع مانند انباشتگی $Cu(PcTs)$ با تترادها، انباشتگی باز-باز که با برهم کنش های الکتروستاتیک و واندروالس تسهیل می شود، پیوند هیدروژنی هوگستینی و نیز برهم کنش های کاتیون-دوقطبی است. همچنین بی حرکت شدن آب و حذف آب ساختاری با آزاد شدن گرما همراه است [21, 22]. آنتالپی مثبت نشان دهنده برهم کنش های آب گریز است و در این موارد به نظر می رسد که عامل اصلی در پایدار کردن کمپلکس لیگاند- H_{22} آنتروپی است. تغییر آنتروپی منفی و تغییر آنتالپی منفی نشان می دهد که پیشران برهم کنش $[Cu(2,3-tmtppa)]$ در کلرید پتاسیم و $[Cu(3,4-tmtppa)]$ در کلرید سدیم با H_{22} عمدتاً

- function and targeting of G-quadruplexes. *Chem Soc Rev*. 2008;37(7):1375-84.
- 3- Sannohe Y, Sugiyama H. Overview of formation of G-quadruplex structures. *Curr Protoc*. 2010;40(1):17.2.1-17.
- 4- Patel DJ, Phan, AT, Kuryavvi V. Human telomere, oncogenic promoter and 5'-UTR G-quadruplexes: Diverse higher order DNA and RNA targets for cancer therapeutics. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(22):7429-55.
- 5- Kumar RS, Arunachalam S, Periasamy VS, Preethy CP, Riyasdeen A, Akbarsha MA. DNA binding and biological studies of some novel water-soluble polymer-copper(II)-phenanthroline complexes. *Eur J Med Chem*. 2008;43(10):2082-91.
- 6- Chen SM, Chen SV. The interaction of water-soluble iron porphyrins with DNA films and the electrocatalytic properties for inorganic and organic nitro compounds. *Electrochimica Acta*. 2003;48(27):4049-60.
- 7- Oganessian L, Bryan TM. Physiological relevance of telomeric G-quadruplex formation: A potential drug target. *Bioessays*. 2007;29(2):155-65.
- 8- Rothmund P. Formation of porphyrins from pyrrole and aldehydes. *J Am Chem Soc*. 1935;57(10):2010-1.
- 9- Rothmund P. A new porphyrin synthesis, the synthesis of porphin. *J Am Chem Soc*. 1936;58(4):625-7.
- 10- Asadi M, Safaei E, Ranjbar B, Hasani L. A study on the binding of two water-soluble tetrapyrrolineporphyrinato copper(II) complexes to DNA. *J Mol Struct*. 2005;754(1-3):116-23.
- 11- Hassani L, Hakimian F, Safaei E. Spectroscopic investigation on the interaction of copper porphyrins and phthalocyanine with human telomeric G-quadruplex DNA. *Biophys Chem*. 2014;187-188:7-13.
- 12- Garbett NC, Chaires JB. Binding: A polemic and rough guide. *Methods Cell Boil*. 2008;84:3-23.
- 13- Monchard D, Allain C, Teulade-Fichou MP. Development of a fluorescent intercalator displacement assay (G4-FID) for establishing quadruplex-DNA affinity and selectivity of putative ligands. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006;16(18):4842-5.
- 14- Tran PL, Lary E, Hamon F, Teulade-Fichou MP, Mergny JL. Fluorescence intercalator displacement assay for screening G4 ligands towards a variety of G-quadruplex structures. *Biochimie*. 2011;93(8):1288-96.
- 15- Nakayama S, Kelsey I, Wang J, Roelofs K, Stefane B, Luo Y, et al. Thiazole orange-induced c-di-GMP quadruplex formation facilitates a simple fluorescent detection of this ubiquitous biofilm regulating molecule. *J Am Chem Soc*. 2011;133(13):4856-64.
- 16- Eftink MR, Ghiron CA. Exposure of tryptophanyl residues in proteins, quantitative determination by fluorescence quenching studies. *Biochemistry*. 1976;15(3):672-80.
- 17- Bushueva TL, Busel EP, Burstein EA. Some regularities of dynamic accessibility of buried fluorescent residues to external quenchers in proteins. *Arch Biochem Biophys*. 1980;204(1):161-6.
- 18- Gray RD, Pettracone L, Buscaglia R, Chaires JB. 2-Aminopurine as a probe for Quadruplex loop structures. *Methods Mol Biol*. 2010;608:121-36.
- 19- Ren J, Chaires JB. Sequence and structural selectivity of nucleic acid binding ligands. *Biochemistry*. 1999;38(49):16067-75.
- 20- Asadi M, Safaei E, Ranjbar B, Hasani L. Thermodynamic and spectroscopic study on the binding of cationic Zn(II) and Co(II) tetrapyrrolineporphyrins to calf thymus DNA: The role of the central metal in

برهم‌کنش‌های واندروالس و پیوندهای هیدروژنی است [23]. همچنین آنتروپی منفی نشان‌دهنده اتصال بین‌رشته‌ای (اینترکالیشن) کمپلکس‌ها به H₂₂ است [24]. آنتروپی منفی نشان می‌دهد که درجه آزادی کمپلکس بعد از متصل شدن به H₂₂ کاهش یافته و آزادی ساختار H₂₂ نیز بعد از اتصال کمپلکس به آن کاهش می‌یابد [25]. از منفی بودن و بزرگ بودن انرژی‌های آزاد گیبس مشخص است که برهم‌کنش کمپلکس‌های مس و H₂₂ از نظر انرژی بسیار مطلوب و پیشران اتصال آنتالپی است. در مواردی که تغییرات آنتروپی مثبت است، احتمالاً یکی از نیروهای پیشران در برهم‌کنش‌ها نیروهای کلومبیک بین پورفیرازین‌ها دارای بار مثبت و DNA دارای بار منفی است. این برهم‌کنش می‌تواند به تغییرات در چگالی بار سطحی DNA منجر و سبب آزاد شدن یون‌های مخالف از سطح آن شود. بنابراین با آزاد شدن مولکول‌های آب یا یون‌های مخالف، بی‌نظمی سیستم افزایش یافته و آنتروپی مثبت می‌شود [10, 20].

همان‌طور که به تفصیل اشاره شد، در تحقیق حاضر میان‌کنش یک فتالوسیانین آنیونی و دو پورفیرازین کاتیونی که هر سه از ترکیبات تتراپیرولی هستند با DNA چهاررشته‌ای تلومر از جنبه ترمودینامیک مطالعه شد. در مورد برهم‌کنش پورفیرازین‌ها با DNA چهاررشته‌ای به‌جز یک مورد که برهم‌کنش پورفیرازین روی با DNA تلومر به‌طور موزجی بررسی شده، اطلاع دیگری در دست نیست [26]. نتایجی که از تحقیق حاضر به دست آمد، گامی برای شناخت بیشتر این ترکیبات بود. محدودیتی برای این پژوهش ذکر نشده است.

نتیجه‌گیری

اتصال پورفیرازین‌های مس به DNA چهاررشته‌ای قوی‌تر از فتالوسیانین مس است و همچنین اتصال آنها از لحاظ ترمودینامیک مطلوب است. پورفیرازین‌ها پتانسیل کاربرد به‌عنوان ترکیبات ضدسرطان را دارند و کمپلکس‌های مناسبی برای مطالعات دارویی هستند.

تشکر و قدردانی: از معاونت پژوهشی دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه زنجان به‌منظور حمایت از این پژوهش تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

تاییدیه اخلاقی: تاییدیه اخلاقی در این کار مورد نیاز نبوده است.

تعارض منافع: نویسندگان با هیچ گروه یا فردی تعارض منافع ندارند.

سهم نویسندگان: لایلا حسنی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۴۰٪)؛ الهام صفایی (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۲۰٪)؛ فاطمه حکیمیان (نویسنده سوم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی (۳۰٪)؛ صفیه صوفیان (نویسنده چهارم)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر کمکی (۱۰٪)

منابع مالی: منابع مالی این پژوهش توسط مرکز تحصیلات تکمیلی دانشگاه زنجان تامین شده است.

منابع

- 1- Parish JH. Principles of nucleic acid structure. *Biochem Educ*. 1985;13(2):92.
- 2- Huppert JL. Four-stranded nucleic acids: Structure,

- 24- Zhang G, Hu X, Fu P. Spectroscopic studies on the interaction between carbaryl and calf thymus DNA with the use of ethidium bromide as a fluorescence probe. *J Photochem Photobiol B*. 2012;108:53-61.
- 25- Zhang Y, Wang X, Ding L. Interaction between tryptophan-vanillin Schiff base and herring sperm DNA. *J Serb Chem Soc*. 2010;75(9):1191-201.
- 26- Gonçalves DP, Rodriguez R, Balasubramanian S, Sanders JK. Tetramethylpyridiniumporphyrazines--a new class of G-quadruplex inducing and stabilising ligands. *Chem Commun (Camb)*. 2006;(45):4685-7.
- binding parameters. *New J Chem*. 2004;28(10):1227-34.
- 21- Olsen CM. Thermodynamic characterization of the folding and interactions of G-quadruplexes [Dissertation]. Omaha: University of Nebraska Medical Center; 2008.
- 22- Neidle S, Balasubramanian S, editors. *Quadruplex nucleic acids*. London: Royal Society of Chemistry; 2006.
- 23- Xiao JB, Chen XQ, Jiang XY, Hilczer M, Tachiya M. Probing the interaction of trans-resveratrol with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study with Tachiya model. *J Fluoresc*. 2008;18(3-4):671-8.

Archive of SID