



بررسی برهم کنش پورفیرین TMPYP4 با آپتامر AS1411 با استفاده از روش های طیف سنجی

پریسا جهانگشای¹، بیژن رنجبر^{2*}، لیلا حسینی³

1. دکتری، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
2. استاد تمام، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
3. دانشیار، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه زنجان، زنجان، ایران

*نویسندگان مسئول:

صندوق پستی دانشگاه تربیت مدرس 14115111 ranjbarb@modares.ac.ir
صندوق پستی دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه زنجان 4513766731 hasani@iasbs.ac.ir

چکیده

AS1411 داکسی الیگونوکلوئوتید چهار رشته ای ویژگی های ضد سرطانی دارد که با تمایل بالا و اختصاصی به پروتئین نوکلئولین موجود در سطح سلول های سرطانی متصل می شود. AS1411 از پتانسیل کاربردی ارزشمندی برای انتقال هدفمند نانوذرات، الیگونوکلوئوتیدها، پپتیدها و مولکول های کوچک دارویی به سلول های سرطانی و همچنین تصویربرداری از این سلول ها برخوردار است. با توجه به اینکه شناخت برهم کنش دارو با مولکول هدف از موارد مهم و ضروری در مطالعات دارویی است، در این تحقیق برهم کنش نوعی حساسگر نوری پورفیرینی به نام TMPYP4 با آپتامر AS1411 بررسی شد. از روش های طیف سنجی جذبی، فلورسانس و دورنگ نمایی دورانی برای شناسایی نحوه و محل اتصال TMPYP4 به AS1411 و تغییرات ساختاری حاصل از آن استفاده شد. نتایج نشان دادند که اتصال پورفیرین نامبرده به AS1411 باعث 13 نانومتر جابه جایی قرمز و 56% هیپوکرومیسیتی در طیف جذبی می شود. همچنین، در اثر این اتصال شکل طیف نشری پورفیرین تغییر می کند و از شدت نشر آن نیز کاسته می شود. نتایج مطالعات ساختاری نشان دادند که اتصال TMPYP4 تغییر زیادی در شکل طیف دورنگ نمایی دورانی AS1411 ایجاد نمی کند، اما در غلظت های بالا به کاهش شدید شدت طیف منجر می شود. بروز این تغییرات در طیف ها ثابت می کند که TMPYP4 با قرار گرفتن در بین صفحات تتراد و اتصال به صفحات تتراد انتهایی با آپتامر چهار رشته ای برهم کنش دارد و باعث باز شدن ساختار آپتامر می شود. در جمع بندی نهایی می توان گفت که آپتامر AS1411 پتانسیل مناسبی برای انتقال ترکیبات پورفیرینی و انواع حساسگر نوری آنها دارد و می تواند در درمان نوری سلول های سرطانی استفاده شود.

کلید واژگان: آپتامر AS1411، حساسگر نوری TMPYP4، طیف سنجی

مقدمه

AS1411، داکسی الیگونوکلوئید تک رشته‌ای غنی از گوانین است و از 26 نوکلئوتید با توالی 5'-GGTGGTGGTGGTGTGGTGGTGGTGG-3' تشکیل شده است. این توالی به دلیل غنی بودن از گوانین توانایی تشکیل ساختار چهار رشته‌ای دارد [4-1]. ساختارهای چهار رشته‌ای از دو جزء اصلی هسته و حلقه تشکیل می‌شوند. هسته تترادهای گوانینی دارد و از اتصال چهار گوانین تشکیل شده است که توسط هشت پیوند هیدروژنی هوگستینی¹ در یک صفحه به هم متصل شده‌اند. حلقه، صفحات تترادی را که در طول رشته روی هم انباشته شده‌اند، به هم وصل می‌کند [5]. ساختار چهار رشته‌ای AS1411 در اتصال آن به انواع مولکول‌های دارویی، عوامل عکس‌برداری و نانوذرات مختلف کمک می‌کند. AS1411، به‌عنوان آپتامر نوکلئولین شناخته می‌شود [4-1]. نوکلئولین، پروتئینی چندکاره است که در سطح سلول‌های سرطانی به مقدار زیاد وجود دارد، اما در سطح سلول‌های طبیعی بسیار کم است [6]. AS1411 با تمایل بالا و به طور اختصاصی به سلول‌های سرطانی متصل می‌شود. به‌همین دلیل، در سال‌های اخیر در سیستم‌های انتقال هدفمند به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان آپتامر حامل دارو، استفاده شده است. مطالعات انتقال هدفمند دارو به صورت *in vivo* و *in vitro* نشان داده است که لیگندهای متصل به AS1411 به‌صورت انتخابی در سلول‌های سرطانی تجمع یافته‌اند که این امر پتانسیل استفاده از این آپتامر را به‌عنوان سیستم حامل دارو نشان می‌دهد [7-10]. انتقال دارو توسط AS1411 باعث کاهش سمیت دارو نسبت به سلول‌های طبیعی می‌شود [11-13]. همین‌طور داروهای متصل به این آپتامر می‌توانند از سد مغزی-خونی [14] و پمپ‌های مقاوم به داروهای شیمی درمانی عبور کنند [11].

حساسگرهای نوری ترکیباتی هستند که در مطالعات انتقال هدفمند توسط AS1411 مطالعه شده‌اند. این ترکیبات در فوتودینامیک‌تراپی استفاده می‌شوند. فوتودینامیک‌تراپی، روش درمانی غیرتهاجمی در درمان سرطان است که در آن از نور و یک ماده شیمیایی حساس به نور به نام ترکیب حساسگر نوری همراه با اکسیژن مولکولی برای از بین بردن یا مرگ سلول‌ها استفاده می‌شود. داروهای حساسگر نوری اختصاصیت پایینی به سلول‌های سرطانی دارند و به‌همین دلیل بیماران پس از تزریق، برای مدتی به نور حساس می‌شوند. بنابراین، بهره‌مندی از سیستم‌های انتقال هدفمند دارو باعث می‌شود عوارض جانبی کاهش و همین‌طور اثرپذیری آنها افزایش یابد [15-16].

به‌رغم رشد روزافزون گزارش‌های مرتبط با انتقال هدفمند دارو توسط AS1411 گزارش‌های اندکی درباره مطالعه میان‌کنش مولکول‌های دارویی با این آپتامر وجود دارد. برای مثال، فیگریدو² [17] از AS1411 و دو مشتق آن برای انتقال داروی C₈³ که دارویی بر پایه آکریدین است، بهره بردند. C₈ ترکیبی دارویی است که باعث پایداری ساختار چهار رشته‌ای می‌شود. این گروه علاوه‌بر بررسی انتقال هدفمند این دارو توسط آپتامر، به بررسی میان‌کنش هریک از این آپتامرها با دارو پرداختند. نتایج مطالعات آنها نشان داد که C₈ با حفظ ساختار هریک از آپتامرها باعث شد شدت طیف دورنگ‌نمایی دورانی در آن‌ها افزایش یابد. همین‌طور مطالعات فلورسانس توسط آنها بر میان‌کنش قوی بین این دارو و آپتامرها دلالت داشت [17]. شی⁴ و همکاران با بررسی توانایی AS1411 برای انتقال هدفمند حساسگر نوری TMPYP4⁵، با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی جذبی و دورنگ‌نمایی دورانی در بافر تریس حاوی 200 میلی‌مولار نمک

2. Figueiredo

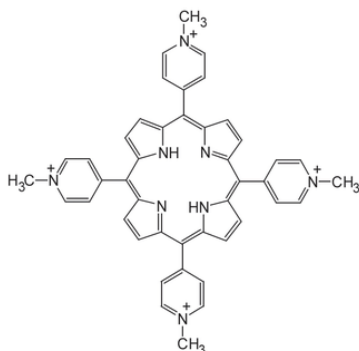
3. 10-(8-(4-iodobenzamide)octyl))-3, 6-bis(dimethylamine) acridinium iodide

4. Yen-An Shieh

5. 5,10,15,20-tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl)porphyrin

1. Hoogsteen hydrogen bond

دورنگ‌نمایی دورانی برای بررسی اثر TMPYP4 بر ساختار آبتامر AS1411 بهره گرفته شد. در این تحقیق مطالعات ترمودینامیکی اتصال پورفیرین نامبرده به آبتامر نیز بررسی و پارامترهای ترمودینامیکی اتصال محاسبه شد.



شکل 1. ساختار پورفیرین TMPYP4 [26]

مواد

الیگونوکلوئید AS1411 را شرکت متابیون آلمان سنتز و TMPYP4 از شرکت سانتاکروز بیوتکنولوژی با کد شیمیایی SC-204346 تهیه شد. کلرید سدیم و سدیم فسفات دی‌بازیک از سیگما تهیه و نمک کلرید پتاسیم از Samchun Pure Chemical و پتاسیم فسفات مونوبازیک از فلوکا خریداری شد.

روش‌ها

تعیین غلظت

الیگونوکلوئید خالص در بافر تریس ده میلی‌مولار و EDTA¹ یک میلی‌مولار حل شد. غلظت آبتامر توسط روش جذب‌سنجی و از طریق قانون بیر-لامبرت اندازه‌گیری و ضریب خاموشی آبتامر با روش نزدیک‌ترین همسایه، $250800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ محاسبه شد [27]. غلظت TMPYP4 با در نظر گرفتن ضریب جذب مولی $226000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ معین شد [28].

کلرید پتاسیم، میان‌کنش آبتامر و این ترکیب پورفیرینی را بررسی کردند. نتایج طیف‌سنجی جذبی این گروه نشان داد که 6 مولکول TMPYP4 با ایتراکالیشن و اتصال به دو انتها به یک مولکول AS1411 متصل می‌شوند. با ثبت طیف دورنگ‌نمایی دورانی آبتامر ساختار موازی برای این آبتامر در بافر تریس ثبت شد [18].

TMYP4، حساسگر نوری با ساختار پورفیرینی است که در مطالعات فوتودینامیک‌تراپی استفاده می‌شود. این پورفیرین ساختاری مسطح با بار مثبت دارد. شکل 1 ساختار این پورفیرین را نشان می‌دهد [19]. بار مثبت این پورفیرین در حلال آبی می‌تواند به صورت الکتروستاتیکی، بارهای منفی موجود در بدنه چهاررشته‌ای را شناسایی کند و با آن میان‌کنش دهد [20]. TMPYP4 بیشتر به‌عنوان پایدارکننده ساختارهای چهاررشته‌ای معرفی شده است [21-23]، اما برخی مطالعات نشان می‌دهند، این پورفیرین باعث می‌شود ساختارهای چهاررشته‌ای ناپایدار شوند [24-25]. این ترکیب، اثر ناپایدارکننده روی چهاررشته‌ای‌ها با ساختار موازی دارد و برای ناپایداری ساختاری میان‌کنش قوی ایتراکالیشن لازم است [25].

با توجه به اینکه در مطالعات دارویی بررسی برهم‌کنش دارو با ناقل حائز اهمیت است، در این تحقیق میان‌کنش AS1411 به‌عنوان آبتامر ناقل دارو به سلول‌های سرطانی با TMPYP4 به‌عنوان نوعی پورفیرین حساسگر نوری بررسی شد. به‌همین دلیل از روش‌های طیف‌سنجی جذبی، نشری و دورنگ‌نمایی دورانی استفاده شد. نحوه اتصال و پارامترهای اتصال TMPYP4 به AS1411 با آنالیز طیف‌های به‌دست‌آمده بررسی شد. تعداد گونه‌های تشکیل‌شده در اثر میان‌کنش پورفیرین با آبتامر و همچنین تعداد TMPYP4 متصل‌شده به آبتامر با آزمایش‌های فلورسانس سه‌بعدی و تجزیه و تحلیل داده‌ها از طریق روش کمومتریکس محاسبه شد. همچنین، از روش

1. Ethylene diamine tetra acetic acid

تاخوردگی آبتامر

برای تاخوردگی صحیح، آبتامر در بافر فسفات سالین (pH 7/4) با غلظت مدنظر حل و به مدت 5 دقیقه در دمای 95°C حرارت داده شد. سپس به مدت دو ساعت در دمای اتاق سرد و در ادامه به مدت 24 ساعت در یخچال با دمای 4°C نگهداری شد. برای نگهداری طولانی مدت، نمونه در فریزر 20°C- ذخیره شد [27].

طیف‌سنجی دورنگ نمایی دورانی

طیف دورنگ‌نمایی دورانی به‌وسیله دستگاه اسپکتروپلاریمتر شرکت جاسکو مدل J-715 و در دمای اتاق ثبت و برای ثبت طیف از سل کوارتز با طول 0/1 سانتی‌متر استفاده شد. سرعت اسکن 100 نانومتر در دقیقه و پهنای باند 1 نانومتر در نظر گرفته شد. غلظت AS1411 12 میکرومولار بود و پورفیرین با غلظت 1 میلی‌مولار به‌تدریج به آبتامر تیترو و پس از مکث 1 دقیقه-ای بعد از هر تیترو طیف ثبت شد. بیضی‌واری مولی از رابطه زیر محاسبه شد:

$$1 \quad [\theta] = (MRW \times 100 \times \theta) / cl$$

MRW، میانگین وزن نوکلئوتیدها در توالی AS1411 است که 330/8 محاسبه شد. θ بیضی‌واری مولی بر حسب میلی‌درجه است، c غلظت آبتامر بر حسب mg/mL و l طول مسیر نور بر حسب سانتی‌متر است. واحد درجه بیضی‌واری $degree.cm^2.dmol^{-1}$ است [29].

طیف‌سنجی جذبی مرئی - فرابنفش

طیف جذبی به‌وسیله دستگاه طیف‌سنجی جذبی مدل SP-UV500VDB و در دمای اتاق ثبت شد. طول مسیر سل یک سانتی‌متر بود. تیتراسیون با اضافه‌کردن مرحله‌ای AS1411 با غلظت چهل میکرومولار به سل حاوی پورفیرین با غلظت دو میکرومولار انجام شد. پس از

هر بار اضافه‌کردن آبتامر، دو دقیقه زمان برای تکمیل برهم‌کنش در نظر گرفته شد. تیتراسیون تا ثابت‌شدن تغییرات طیف ادامه پیدا کرد.

درصد هیپوکرومیسیتی از فرمول زیر محاسبه شد:

$$2 \quad \text{Hypochromicity (\%)} = \frac{|\epsilon_f - \epsilon_b|}{\epsilon_f} \times 100$$

ϵ_f و ϵ_b به‌ترتیب متناظر با ضریب جذب مولی لیگاند اتصال یافته و آزاد هستند [30].

طیف‌سنجی فلورسانس

در طیف‌سنجی فلورسانس TMPYP4 با غلظت دو میکرومولار در سل با طول یک سانتی‌متر ریخته و سپس آبتامر با غلظت 40 میکرومولار به آن تیترو شد و تیتراسیون تا اشباع کامل ادامه یافت. طول موج تحریک 433 نانومتر و طول موج تهییج از 550-850 در نظر گرفته شد [31]. پهنای شکاف‌های تحریک و نشر 5 نانومتر، کنترل اسکن متوسط، صاف‌کردن نوع ساویزکی-گلی فاکتور 19 و نمایانگر ولتاژ PMT¹ برای دستگاه انتخاب شد.

برای به‌دست‌آوردن ثابت خاموشی از معادله استرن-ولمر² (معادله 3) استفاده شد.

$$3 \quad K_{SV} = k_q \tau_0 \quad \text{و} \quad F_0 = 1 + \frac{F_0}{F} K_{SV}[Q]$$

شدت فلورسانس مشاهده‌شده در غیاب و حضور خاموش‌گر هستند. [Q] غلظت خاموش‌گر و K_{SV} ثابت خاموشی استرن-ولمر است. در ساده‌ترین حالت، نمودار F_0/F در مقابل [Q] به یک خط مستقیم با شیب K_{SV} منجر می‌شود [32].

برای مطالعات کموتری طیف‌گیری فلورسانس به‌صورت سه‌بعدی انجام و پارامترهای غلظت و حجم مشابه طیف‌سنجی دوبعدی فلورسانس در نظر گرفته شد. برای ثبت طیف سه‌بعدی ناحیه طول موج تحریک 350-

1 . Photomultiplier tubes

2 . stern-volmer equation

550 با فواصل 5 نانومتر و ناحیه نشری 550-850 نانومتر انتخاب شد.

بررسی ترمودینامیکی اتصال TMPYP4 به AS1411

در این پژوهش، برهم کنش AS1411 با TMPYP4 از دیدگاه ترمودینامیک با استفاده از روش طیف-سنجی فلورسانس بررسی شد. طیف فلورسانس در شش دمای مختلف (از 10-37° c با فواصل 5 درجه) ثبت و دمای سل حاوی پورفیرین با استفاده از دستگاه سیرکیولیتور روی دمای مورد نظر تنظیم شد.

برای فهم میان کنش اتصال بین TMPYP4 با AS1411، ثابت اتصال از داده‌های فلورسانس به دست آمد. در مواردی که بیش از یک محل اتصال احتمالی در توالی وجود داشته باشد، می‌توان معادله دو لگاریتمی زیر را اعمال کرد [33-34]:

$$\text{Log} \frac{(F_0-F)}{F} = \text{Log} K_b + n \text{Log} [Q] \quad 4$$

رسم نمودار $\text{Log} \frac{(F_0-F)}{F}$ علیه $\text{Log} [Q]$ یک خط مستقیم می‌دهد که شیب آن برابر با n و عرض از مبدأ نشانگر $\text{Log} K_b$ است. n تعداد جایگاه اتصال و K_b ثابت اتصال در حالت تعادل است.

پارامترهای ترمودینامیکی میان کنش TMPYP4 با AS1411 از طریق معادله وانت-هوف (معادله 5) محاسبه شد. به این منظور نمودار $\ln K_b$ علیه $\frac{1}{T}$ رسم شد.

$$\ln K_b = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad 5$$

K_b ثابت اتصال در دمای T در مقیاس کلوین که از طریق رابطه 4 محاسبه شد و R ثابت عمومی گازها است. تغییرات آنتالپی (ΔH) پیوند لیگاند-آپتامر از شیب نمودار وانت-هوف و تغییرات آنتروپی (ΔS) پیوند هم از عرض از مبدأ آن به دست آمد. برای محاسبه تغییرات انرژی آزاد (ΔG) از معادله عمومی زیر استفاده شد [35].

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad 6$$

نتایج

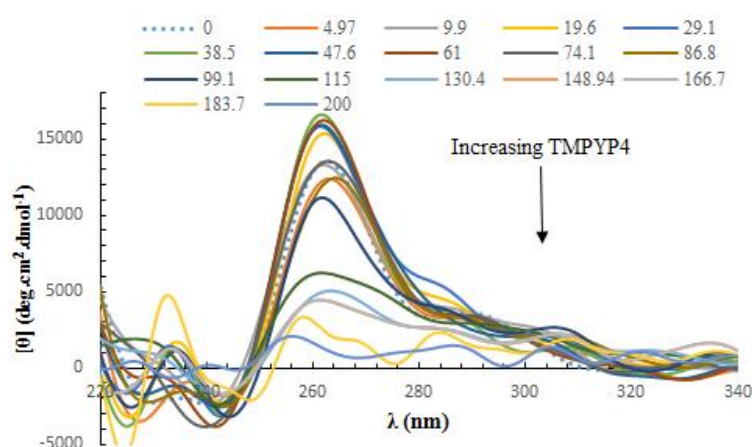
دورنگ‌نمایی دورانی

طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی دورانی روشی برای بررسی ساختاری پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک است [36-37]. طیف دورنگ‌نمایی دورانی آپتامر در بافر فسفات سالین با pH=7/4، در حضور غلظت‌های مختلف TMPYP4 در شکل 2 نشان داده شده است. با توجه به شکل، AS1411 ویژگی ساختار چهاررشته‌ای موازی را نشان می‌دهد که با یک پیک مثبت در 264 نانومتر و یک پیک ضعیف منفی در 240 نانومتر مشخص می‌شود [38]. همچنین، یک شانه کوچک مثبت در 295 نانومتر مشخص است که نشانه‌ای از وجود گونه‌های اندک با توپولوژی چهاررشته‌ای ناموازی است [39]. مطالعه دقیق ساختار AS1411 با کمک روش کروماتوگرافی تفکیک از طریق اندازه¹ توسط دیلی و همکاران [40]، چندشکلی ساختاری این آپتامر را ثابت کرده است. آنها وجود هشت جزء با فراوانی مونومر راست گرد موازی و مقدار کمتر مونومر چپ گرد ناموازی را مشخص کردند که وجود شانه کوچک در 295 را توجیه می‌کند. با توجه به شکل، بعد از تیتراسیون لیگاند، شکل کلی طیف حفظ و به شدت طیف کاهش یافته است؛ این امر نشان می‌دهد فشردگی ساختار تغییر کرده است. با توجه به شکل 2 ب مشاهده می‌شود، شدت طیف دورنگ‌نمایی دورانی در مراحل اولیه تیتراسیون تا نسبت مولی پورفیرین به آپتامر 1:2 افزایش یافته است. روند کاهش شدت طیف دورنگ‌نمایی دورانی AS1411 از نسبت غلظتی پنج به یک پورفیرین به آپتامر شروع می‌شود. افزایش شدت در مراحل ابتدایی تیتراسیون، افزایش فشردگی ساختار چهاررشته‌ای را نشان می‌دهد. همان‌طور که می‌دانیم انباشتگی بازها درون ساختارهای مارپیچی تأثیر مهمی بر شدت طیف دورنگ‌نمایی دورانی دارد. صفحات آب‌گریز بازها باعث انباشتگی بازها روی هم و تشکیل ساختار مارپیچ می‌شوند.

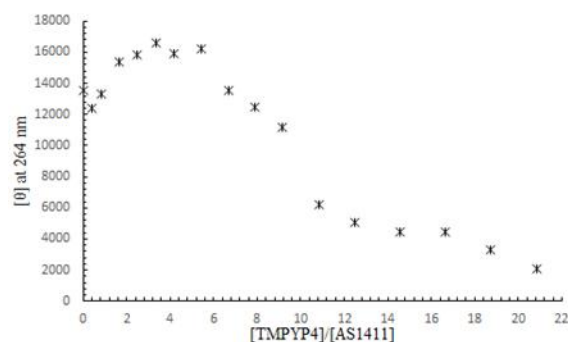
آب‌گریز از هم دور شده‌اند که می‌تواند به دلیل اینترکالیشن باشد. با ادامه تیتراسیون، شدت طیف تقریباً به صفر نزدیک می‌شود که احتمالاً به دلیل فاصله‌گرفتن صفحات تتراد از همدیگر است. به نظر می‌رسد مولکول‌های پورفیرین بین صفحات تتراد قرار می‌گیرند و باعث جداشدن این صفحات از همدیگر می‌شوند.

در این وضعیت، انتقالات الکترونی در بازهای مجاور اتفاق می‌افتد و باعث افزایش شدت طیف می‌شود [41]. پورفیرین ساختار مسطح و بار مثبت دارد. احتمالاً پورفیرین ابتدا از طریق میان‌کش الکتروستاتیک به آبتامر با بار منفی نزدیک و سپس با اتصال خارجی و انباشته‌شدن در دو انتها باعث افزایش شدت طیف می‌شود. کاهش شدت طیف نشان می‌دهد، فشردگی ساختار کم شده است و بازهای

الف



ب



شکل 2. الف - طیف دورنگ‌نمایی دورانی آبتامر AS1411 فولد شده در بافر فسفات سالین با $\text{pH} = 7.4$ در حضور و عدم حضور TMPYP4. آبتامر در عدم حضور TMPYP4 با نقطه چین مشخص شده است. آبتامر در حضور غلظت‌های مختلف پورفیرین (میکرومولار) با نوارهای رنگی مشخص شده است. ب - نمودار بیشینه شدت طیف دورنگ‌نمایی دورانی آبتامر در طول موج 264 نانومتر علیه نسبت مولی AS1411/TMPYP4

ساختار چهاررشته‌ای است. در شکل 3 طیف جذبی تیتراسیون TMPYP4 با AS1411 نشان داده شده است. تغییرات طیف جذبی TMPYP4 بعد از افزودن

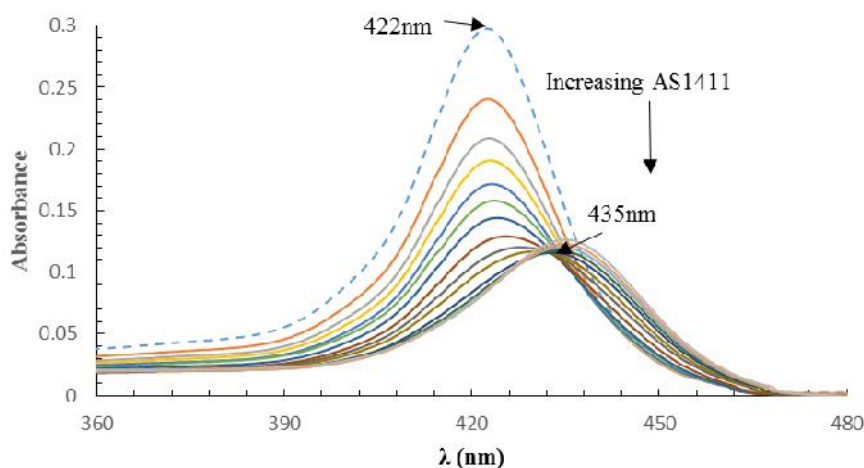
طیف‌سنجی جذبی مرئی-فرابنفش

تیتراسیون جذبی مرئی-فرابنفش روشی نسبتاً ساده و مفید برای بررسی کمی و کیفی میان‌کنش پورفیرین با

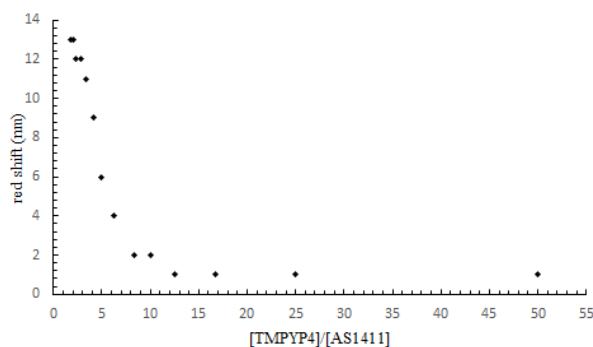
که جابه‌جایی قرمز مشاهده می‌شود، اینترکالیشن کامل بین بازهای آپتامر و TMPYP4 ایجاد می‌شود. جابه‌جایی قرمز از نسبت پورفیرین به آپتامر 5 مشاهده و با نسبتی که کاهش شدت طیف دورنگ‌نمایی دورانی شروع می‌شود، هم‌خوانی دارد. همان‌طور که در شکل مشخص است، نقطه ایزوبستیک برای AS1411 در 435 نانومتر مشاهده شد. نقاط ایزوبستیک تعادل بین پورفیرین آزاد و متصل‌شده به آپتامر را نشان می‌دهند [45,42]. در شکل 3 ب نمودار میزان جابه‌جایی قرمز در طول موج بیشینه علیه نسبت مولی پورفیرین به آپتامر مشاهده می‌شود. با توجه به شکل مشاهده می‌شود، با کاهش نسبت مولی پورفیرین به آپتامر میزان جابه‌جایی قرمز افزایش می‌یابد. میزان جابه‌جایی قرمز تا نسبت مولی 1:8 روندی تدریجی دارد، ولی از نسبت 1:5 میزان جابه‌جایی افزایش پیدا می‌کند تا اینکه در نسبت 1:2 بی‌تغییر باقی می‌ماند.

AS1411 به خوبی مشهود است. یک جابه‌جایی به سمت طول موج‌های بلند (جابه‌جایی قرمز) از 422 نانومتر به 435 نانومتر (13 نانومتر) همراه با هیپوکرومیستی 56 درصدی مشاهده می‌شود. - هیپوکرومیستی و جابه‌جایی قرمز دلالت بر این دارد که TMPYP4 به آپتامر متصل شده است. درباره اتصال لیگاند به DNA دورشته‌ای، جابه‌جایی قرمز، بیش از 15 نانومتر و هیپوکرومیستی بیشتر از 35% نشان‌دهنده اینترکالیشن است [42] و درباره اتصال لیگاند به DNA چهاررشته‌ای جابه‌جایی قرمز حتی کمتر در حدود 11 نانومتر هم نشان‌دهنده اینترکالیشن است [42-44]. کاهش شدت طیف جذبی و جابه‌جایی قرمز در طیف، بر میان‌کنش الکتروستاتیک و هم‌پوشانی بین بخش قطبی TMPYP4 و بازهای آپتامر دلالت می‌کند. به نظر می‌رسد پس از نزدیک شدن لیگاند به آپتامر شرایط اتصال لیگاند به دو انتهای آپتامر فراهم و در مرحله بعد

الف



ب



شکل 3. الف - طیف جذبی TMPYP4 در حضور و عدم حضور آپتامر AS1411 فولدشده در بافر فسفات سالین با pH=7/4، TMPYP4 در عدم حضور آپتامر با نقطه چین مشخص شده است. ب - میزان جابه‌جایی قرمز در طول موج بیشینه علیه نسبت مولی پورفیرین به آپتامر.

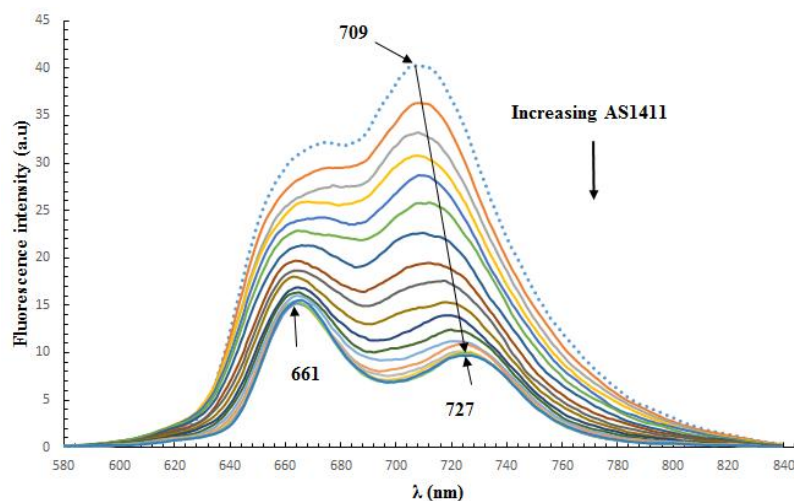
نتایج حاصل از طیف‌سنجی فلورسانس

بررسی برهم‌کنش TMPYP4 با AS1411 با استفاده از روش طیف‌سنجی فلورسانس انجام شد. طیف‌سنجی فلورسانس روش حساسی برای بررسی برهم‌کنش لیگاند با DNA است. در شکل 4 (الف) طیف نشری پورفیرین در حضور آپتامر نشان داده شده است. براساس شکل، پورفیرین دو طیف نشری دارد که با هم هم‌پوشانی دارند. طیف اول در طول موج 640 تا 680 نانومتر $Q(0,0)$ و طیف دوم در محدوده 700 تا 740 نانومتر $Q(0,1)$ با یک قله نشری در 709 نانومتر مشاهده می‌شود. طیف نشری TMPYP4 به دلیل جفت‌شدگی اولین حالت برانگیخته پورفیرین¹ (S_1) با انتقال الکترون درون‌مولکولی² (CT) و همچنین درجه بالای آزادی چرخش رخ می‌دهد. انتقال الکترون درون‌مولکولی به انتقال الکترون از سیستم π ماکروسیکل مرکزی به گروه پیریدینیوم پورفیرین به عنوان پذیرنده الکترون اشاره می‌کند [46-47]. با توجه به شکل 4-الف کاهش شدت نشر TMPYP4 در هر دو قله نشری و جابه‌جایی قرمز فقط در قله 709 نانومتر مشاهده شد. کاهش شدت قله‌های نشری نشان می‌دهد که احتمالاً الکترون‌ها از گوانین‌هایی که در حالت پایه قرار دارند و

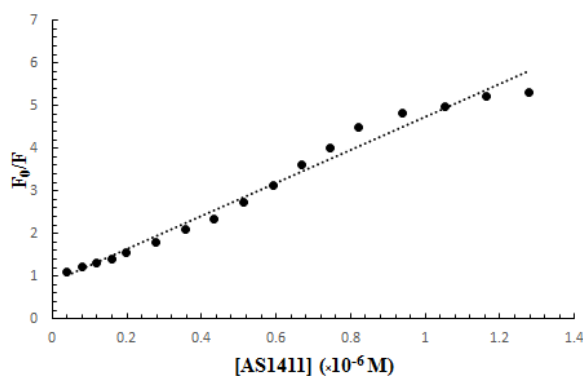
به‌عنوان دهنده الکترون عمل می‌کنند، به گروه‌های پیریدیل پورفیرین، منتقل و باعث خاموشی حالت تهییج تکتایی پورفیرین می‌شوند [48-50]. از آنجاکه TMPYP4 و آپتامر چهاررشته‌ای ساختار آروماتیک دارند، می‌توانند از طریق حالت استک‌شدن با هم میان‌کنش داشته باشند. جابه‌جایی قرمز در مواردی رخ می‌دهد که لیگاند بین تترادهای گوانینی ایتراکالیت می‌شود [51]. با توجه به شکل، دو قله نشری $Q(0,0)$ و $Q(0,1)$ بعد از اتصال TMPYP4 به آپتامر از هم جدا و هم‌پوشانی آنها کمتر می‌شود. کاهش قطبیت محیط باعث جدایی دو قله می‌شود. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت پورفیرین در محیط غیر قطبی بین بازهای آپتامر قرار گرفته است [43]. در نتیجه‌گیری نهایی می‌توان گفت، کاهش نشر و تفکیک پیک‌های طیف نشری به ترتیب می‌تواند دلیلی بر اتصال خارجی به دو انتهای تتراد و ایتراکالیشن باشد.

1. Excited Singlet state
2. Charge transfer

الف



ب



شکل 4. الف- طیف نشری TMPYP4 در حضور و عدم حضور آپتامر AS1411 فولدشده در بافر فسفات سالین با pH=7/4، TMPYP4 در عدم حضور آپتامر با نقطه چین مشخص شده است، ب- نمودار استرن-ولمر

خواهد بود [52]. اگر رسم نمودار تغییر یافته استرن-ولمر که از رسم نمودار $F_0/F_0 - F$ علیه $1/Q$ و از طریق رابطه 7 محاسبه می‌شود نیز خطی باشد خاموشی از نوع ایستا است [53]. در این حالت ثابت خاموشی با ثابت اتصال متناظر خواهد بود [25]. مقدار ثابت استرن-ولمر M^{-1} $3/86 \times 10^6$ محاسبه شد.

$$F_0/F_0 - F = 1/f_a + 1/f_a k_a [Q] \quad 7$$

در رابطه بالا به f_a و k_a به ترتیب کسری از فلورسانس در دسترس و ثابت خاموشی مؤثر برای فلوئوروفورهای

شکل 4-ب نمودار استرن-ولمر متناظر با طیف تیتراسیون نشری پورفیرین با آپتامر را نشان می‌دهد که از طریق رابطه 4 ترسیم شده است. با توجه به شکل مشاهده می‌شود که نمودار خطی است. شیب خط متناظر با ثابت خاموشی استرن-ولمر است. در حالت کلی نمودار خطی استرن-ولمر بر وجود نوعی فلوئوروفور دلالت می‌کند که به صورت یکسان در دسترس خاموش‌گر قرار می‌گیرد. در غلظت‌های حقیقی اگر نوع خاموشی فقط به صورت خاموشی پویا یا ایستا باشد، نمودار استرن-ولمر خطی

در دسترس است. بقیه پارامترها با رابطه 3 مشابه هستند. در این مطالعه نمودار تغییر یافته استرن-ولمر نیز خطی بود که بر خاموشی ایستا دلالت می‌کند (شکل آورده نشده است). در خاموشی ایستا یک کمپلکس بین فلوروفور و خاموش گر تشکیل و باعث می‌شود فلورسانس خاموشی شود. در مواردی که کمپلکس تشکیل می‌شود، خاموشی رخ داده به دلیل برانگیخته شدن فلوروفورها است. بنابراین، خاموشی ایستا غلظت مولکول‌های برانگیخته را کاهش می‌دهد و در این حالت شدت فلورسانس تغییر می‌کند. ولی نیمه عمر تغییری نمی‌کند. تغییر نکردن نیمه عمر به این دلیل است که فلوروفورهایی که کمپلکس تشکیل نداده‌اند و می‌توانند بعد از برانگیخته شدن نشر داشته باشند، خواص حالت برانگیخته عادی را دارند. علت کاهش نشر کاهش تعداد مولکول‌های نشرکننده در اثر حضور خاموش گر است [54].

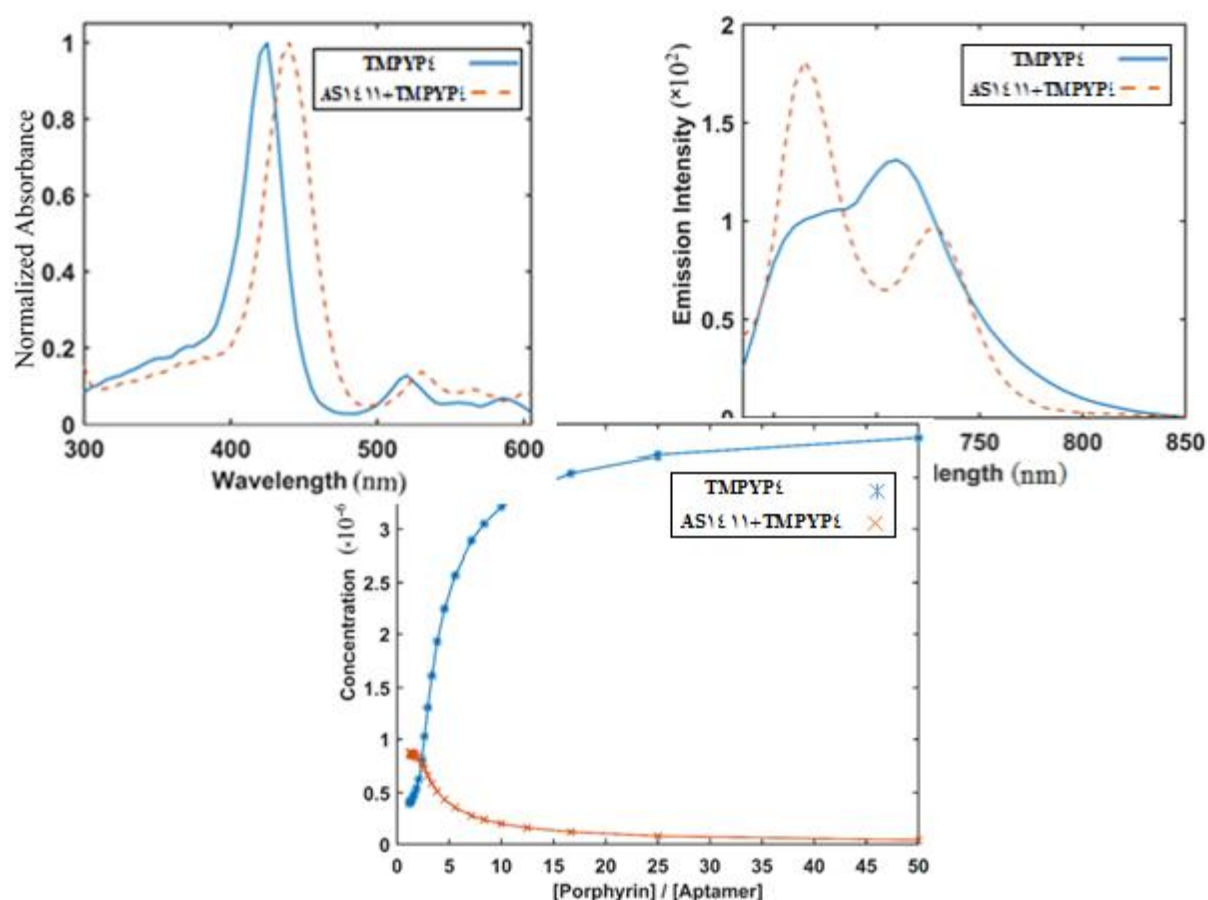
تجزیه و تحلیل طیف فلورسانس به روش کموتری

در شکل 5 آنالیز طیف‌های سه بعدی با استفاده از روش پارافک رسم شده است. در شکل (5 الف) طیف خالص نشری TMPYP4 و کمپلکس تشکیل شده در اثر برهم کنش TMPYP4 با AS1411 در نسبت مولی 1:4 پورفیرین به آبتامر نشان داده شده است. طیف نشری TMPYP4 (خط ممند) دو قله نشری با پیکی پهن دارد. بیشینه نشر قله اول TMPYP4 در محدوده 640-680 نانومتر و بیشینه نشر قله دوم در طول موج 710 نانومتر قرار دارد. طیف نشری کمپلکس تشکیل شده در اثر برهم کنش TMPYP4 با AS1411 (خط چین) نیز دو قله دارد؛ با این تفاوت که قله‌ها از هم تفکیک شده‌اند و بیشینه قله اول به طور مشخص تر در 661 نانومتر قرار دارد و در قله دوم جابه‌جایی قرمز به میزان 20 نانومتر مشاهده می‌شود. نتایج حاصل از این بخش با نتایج به دست آمده از مطالعه فلورسانس مطابقت دارد.

شکل (5 ب) شدت نرمال جذب TMPYP4 و کمپلکس تشکیل شده در اثر برهم کنش TMPYP4 با AS1411 را نشان می‌دهد. براساس شکل، طول موج تحریک بیشینه TMPYP4 در 425 نانومتر و طول موج تحریک کمپلکس تشکیل شده در 440 نانومتر مشاهده می‌شود. به عبارت دیگر، طول موج تحریک به میزان 15 نانومتر جابه‌جایی به سمت طول موج بلند داشته است.

در شکل (5 ج) نمودار تغییرات غلظت پورفیرین آزاد و کمپلکس تشکیل شده (در اثر میان کنش پورفیرین با آبتامر) علیه نسبت مولی پورفیرین به آبتامر مشاهده می‌شود. در این آزمایش آبتامر در مراحل مختلف به پورفیرین تیترا شده است. با توجه به نمودار (از راست به چپ) در مراحل اولیه تیتراسیون غلظت پورفیرین در مقایسه با غلظت کمپلکس بیشتر است. با ادامه تیتراسیون و با افزایش غلظت آبتامر نسبت مولی پورفیرین به آبتامر کاهش می‌یابد؛ به عبارت دیگر با افزایش غلظت آبتامر و کاهش نسبت پورفیرین به آبتامر (از راست به چپ)، غلظت پورفیرین کاهش و غلظت کمپلکس افزایش می‌یابد تا اینکه در نسبت مولی 1:4 پورفیرین به آبتامر یک نقطه تلاقی بین نمودار غلظت پورفیرین آزاد و غلظت کمپلکس تشکیل شده، ایجاد می‌شود. نقطه تلاقی مشاهده شده منعکس کننده تعداد پورفیرین متصل شده به آبتامر است.

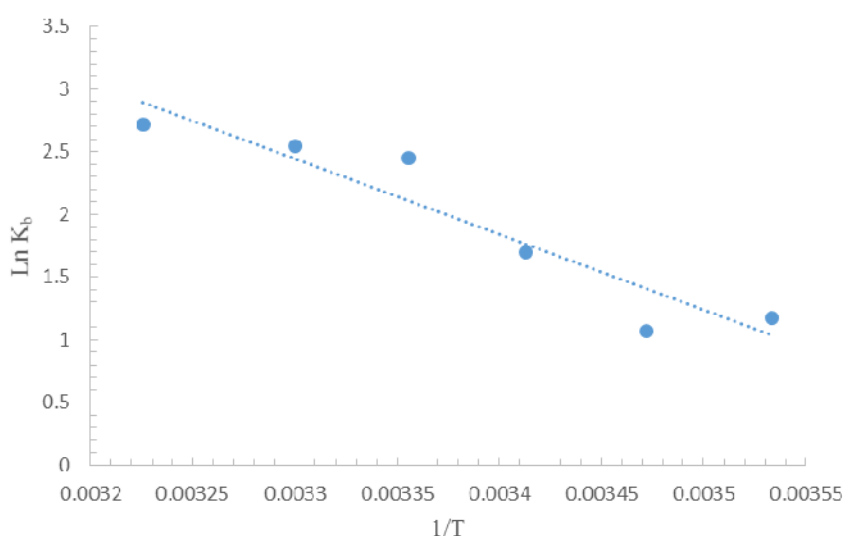
در کل نتایج حاصل از کموتریکس با نتایج حاصل از طیف سنتزی جذبی و فلورسانس ذاتی از نظر جابجایی قرمز و کاهش میزان جذب و نشر مطابقت دارد. با توجه به شکل 5 مشاهده می‌شود که میان کنش آبتامر با پورفیرین یک سیستم دوحالتی وجود دارد؛ یعنی در محیط فقط پورفیرین آزاد یا احتمالاً پورفیرین متصل به آبتامر وجود دارد.



شکل 5. الف - طیف نشری TMPYP4، ب - طیف جذبی TMPYP4 و ج - تغییر غلظت TMPYP4 و گونه تشکیل شده در اثر برهم‌کنش TMPYP4 با AS1411 (فولدشده در بافر فسفات سالین pH 7/4) علیه نسبت غلظتی پورفیرین به آپتامر

استفاده از رابطه 6 ثابت اتصال در حالت تعادل محاسبه و سپس نمودار وانت-هوف رسم شد. در شکل 6 نمودار وانت-هوف نشان داده شده است. پارامترهای استخراج شده از این نمودار در جدول 1 مشاهده می‌شود.

بررسی ترمودینامیکی برهم‌کنش TMPYP4 با AS1411
فهم دقیق نیروهای بین‌مولکولی مؤثر در پایداری کمپلکس دارو-DNA به مطالعات ترمودینامیکی و سینتیکی نیازمند است [55]. برای محاسبه پارامترهای ترمودینامیکی، ابتدا با



شکل 6. نمودار وانت-هوف اتصال پورفیرین به آپتامر در بافر فسفات سالین با pH=7/4

جدول 1. ثابت اتصال (K_b) و پارامترهای ترمودینامیکی اتصال TMPYP4 به AS1411 در دماهای مختلف

T(K)	$K_b (10^6 M^{-1})$	$\Delta G_b (kcal mol^{-1})$	$\Delta H_b (kcal mol^{-1})$	$\Delta S_b (cal mol^{-1} K^{-1})$
283	3/22	-0/58		
288	2/9	-0/8		
293	5/48	-1/03		
298	11/63	-1/25	12/05	45
303	12/75	-1/47		
310	15/1	-1/79		

با توجه به نتایج جدول مشاهده می‌شود، ثابت اتصال با افزایش دما افزایش می‌یابد. تفاوت انرژی آزاد گیبس اتصال TMPYP4 به AS1411 در همه دماها مقادیری منفی است که مطلوب بودن و خودبخودی بودن واکنش را نشان می‌دهد. البته باید توجه کرد که قدر مطلق انرژی آزاد اتصال با افزایش دما روند افزایشی دارد؛ این امر نشان می‌دهد با افزایش دما، برهم‌کنش رخ داده به لحاظ ترمودینامیکی مطلوب‌تر می‌شود. به عبارتی دیگر، در دماهای بالاتر کمپلکس پایدارتری بین آپتامر و پورفیرین تشکیل می‌شود. تغییرات آنتالپی اتصال TMPYP4 به AS1411 مثبت است و نشان می‌دهد برهم‌کنش گرماگیر است. بنابراین، عامل اصلی در پایدارکردن ترکیب آپتامر-

نیروهای میان‌کنشی بین مولکول‌های کوچک و بیومولکول‌ها چهار حالت دارد: 1. پیوندهای آب‌گریز، 2. اتصالات هیدروژنی، 3. نیروهای وان‌دروالس، 4. میان‌کنش‌های الکتروستاتیک. رز و سابرامانیان علائم و بزرگی پارامترهای ترمودینامیکی را با انواع میان‌کنش‌ها مشخص کرده‌اند. به این صورت که اگر $\Delta H > 0$ و $\Delta S > 0$ باشد نیروی پیشران میان‌کنش، آب‌گریز است، اگر $\Delta H < 0$ و $\Delta S < 0$ میان‌کنش‌های وان‌دروالسی و اتصالات هیدروژنی نقش بیشتری در واکنش دارند و نیروهای الکتروستاتیکی زمانی مهم می‌شوند که $\Delta H < 0$ و $\Delta S > 0$ باشد [56].

پورفیرین آنتروپی است [57]. تغییرات آنتروپی مثبت باعث افزایش مقدار TAS- و در نتیجه تغییرات انرژی آزاد منفی می‌شود. تغییرات آنتروپی اتصال مثبت است که بر افزایش بی‌نظمی دلالت می‌کند. تغییرات مثبت آنتروپی احتمالاً به دلیل بازشدن ساختار آبتامر در اثر میان‌کنش با پورفیرین است که به آزادشدن مولکول‌های آب و یون-های متصل به آن منجر می‌شود و در نتیجه بی‌نظمی افزایش می‌یابد. [58-59]. تغییرات مثبت آنتالپی و آنتروپی مثبت نشان می‌دهد که میان‌کنش بین TMPYP4 با AS1411 از نوع آب‌گریز است [35,60]. برهم‌کنش‌های آب‌گریز می‌تواند از ایتراکلیشن پورفیرین بین صفحات تتراد و همچنین قرارگرفتن آن روی صفحات تتراد انتهای نشئت گرفته باشد.

بحث

همان‌طور که گفته شد آبتامر AS1411 به‌طور فزاینده‌ای به‌عنوان سیستم انتقال هدفمند و مؤثر برای انتقال انتخابی طیف وسیعی از داروها به سلول‌های سرطانی پیشنهاد شده است. در مطالعات انتقال دارو، ورود دارو به درون سلول سرطانی مرحله‌ای ضروری است، زیرا باعث کاهش پراکندگی داروی ضد سرطانی در بیرون سلول توموری می‌شود و پتانسیل درمان را افزایش می‌دهد. به‌همین منظور بررسی اتصال پایدار دارو به ناقل، تأثیر دارو بر ساختار آبتامر ناقل و تعداد داروی متصل‌شده به آن و همین‌طور میزان تمایل دارو به آبتامر ضروری است. در این مطالعه میان‌کنش بین TMPYP4 و AS1411 به‌عنوان حامل هدفمند این حساسگر نوری به سلول‌های سرطانی بررسی شد.

نتایج کسب‌شده از دورنگ‌نمایی دورانی، اسپکتروسکوپی جذبی و فلورسانس مشخص کرد که پورفیرین توانایی اتصال از نوع ایتراکلیشن و اتصال به دو انتهای آبتامر چهاررشته‌ای را دارد. اتصال از طریق

ایتراکلیشن باعث برهم‌خوردن استاکینگ $\pi-\pi$ بین تترادهای گوانینی می‌شود [25] و به‌همین دلیل ساختار چهاررشته‌ای را باز می‌کند. قرارگرفتن پورفیرین بین تترادهای آبتامر باعث می‌شود فاصله بین آنها افزایش یابد. این تغییر در ساختار آبتامر باعث کاهش شدت طیف دورنگ‌نمایی دورانی و ایجاد جابه‌جایی قرمز در مطالعات طیف‌سنجی جذبی و فلورسانس می‌شود. بازشدن ساختار چهاررشته‌ای آبتامر در حضور پورفیرین با روش دورنگ‌نمایی دورانی تأیید شد. پارامترهای اتصال محاسبه شده توسط آزمایش تیتراسیون جذبی مانند هیپوکرومیسیتی، جابجایی قرمز و ثابت اتصال نیز نشان‌دهنده دو حالت اتصال است که توسط آزمایش تیتراسیون دورنگ‌نمایی دورانی پشتیبانی می‌شود. مطالعات طیف‌سنجی جذبی و فلورسانس نشان دادند که جابه‌جایی قرمز در هر دو روش از نسبت غلظتی 1:5 پورفیرین به آبتامر اتفاق می‌افتد. این نسبت غلظتی با نسبت غلظتی به‌دست‌آمده از مطالعات دورنگ‌نمایی دورانی در رابطه با بازشدن ساختار بعد از نسبت اشاره‌شده هم‌خوانی دارد. مطالعات فلورسانس همچنین خاموشی طیف فلورسانس پورفیرین در حضور آبتامر را نشان داد و پارامترهای اتصال محاسبه شده نشان می‌دهد که تشکیل کمپلکس ایستا بین آبتامر و پورفیرین در حال وقوع است. همچنین، نتایج حاصل از دورنگ‌نمایی دورانی نشان داد، ساختار غالب آبتامر در بافر فسفات سالین از نوع موازی است که با گزارش‌های منتشرشده تطابق دارد. برای مثال، باقری و همکاران با بررسی ساختار AS1411 در حضور یون‌های K^+ و Pb^{2+} تأیید کردند که در حضور این یون‌ها ساختار AS1411 بیشتر به‌صورت موازی است [61]. همین‌طور مطالعه ساختار آبتامر در نمک سدیم [62] و پتاسیم [18] نیز ساختاری مشابه با ساختار مشاهده‌شده در این تحقیق را نشان داده است. همان‌طور که اشاره شد نتایج تحقیق ساختاری نشان داد، از نسبت مولی 1:5 پورفیرین به آبتامر

3676-3685.

5. Sannohe, Yuta, and Hiroshi Sugiyama. (2010) "Overview of formation of G-quadruplex structures." *Current protocols in nucleic acid chemistry*. 40.1, 17-2.

6. W. Jia, Z. Yao, J. Zhao, Q. Guan, L. Gao. (2017) New perspectives of physiological and pathological functions of nucleolin (NCL). *Life sciences*. 186, 1-10.

7. T. Le Trinh, G. Zhu, X. Xiao, W. Puszyk, K. Sefah, Q. Wu, W. Tan, C. Liu. (2015) A synthetic aptamer-drug adduct for targeted liver cancer therapy. *PLoS One*. 10(11), e0136673.

8. S.H. Rajabnejad, A. Mokhtarzadeh, K. Abnous, S.M. Taghdisi, M. Ramezani, B.M. Razavi, (2018) Targeted delivery of melittin to cancer cells by AS1411 anti-nucleolin aptamer. *Drug development and industrial pharmacy*. 44(6), 982-987.

9. F.S.M. Tekie, M. Soleimani, A. Zakerian, M. Dinarvand, M. Amini, R. Dinarvand, E.

Arefian, F. Atyabi. (2018) Glutathione responsive chitosan-thiolated dextran conjugated miR-145

nanoparticles targeted with AS1411 aptamer for cancer treatment. *Carbohydrate polymers*. 201,

131-140.

10. R. Zhang, S.-B. Wang, W.-G. Wu, R.K. Kankala, A.-Z. Chen, Y.-G. Liu, J.-Q. (2017) Fan, Codelivery of doxorubicin and AS1411 aptamer by poly (ethylene glycol)-poly (β -amino esters)

polymeric micelles for targeted cancer therapy. *Journal of Nanoparticle Research*. 19,

224.

11. Liao, Zi-Xian, et al. (2015) "An AS1411 aptamer-conjugated liposomal system containing a bubble-generating agent for tumor-specific chemotherapy that overcomes multidrug resistance." *Journal of controlled release*. 208, 42-51.

12. Li, Xin, et al. (2015) "Targeted delivery of anticancer drugs by aptamer AS1411 mediated Pluronic F127/cyclodextrin-linked polymer composite micelles." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 11.1, 175-184.

ساختار آبتامر باز می‌شود، بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت برای حفظ ساختار آبتامر بهتر است نسبت مولی 1:4 رعایت شود. در نسبت‌های بالاتر پورفیرین به آبتامر اینترکالیشن و استک شدن انتهایی پورفیرین رخ می‌دهد که باعث باز شدن ساختار در اثر افزایش فاصله بین صفحات تتراد می‌شود. نتایج بررسی‌های ترمودینامیک نیز نشان دادند نیروهای آب‌گریز ناشی از برهم‌کنش حلقه‌های پورفیرین با بازهای گوانین صفحات تتراد، نقش مهمی در اتصال بازی می‌کنند.

تشکر و قدردانی: از شورای پژوهشی دانشگاه تربیت

مدرس برای پشتیبانی مالی از این پژوهش تشکر و قدردانی به عمل می‌آید. از دانشکده علوم زیستی دانشگاه تحصیلات تکمیلی زنجان به دلیل در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاهی تشکر می‌شود. همچنین، نویسندگان از سرکار خانم نگار ندافی برای سهم درخور توجه ایشان تشکر ویژه می‌کنند. از جناب آقای دکتر سعید باقری به دلیل کمک در آنالیز بخش کمومتری تشکر می‌شود.

منابع

1. P.J. Bates, D.A. Laber, D.M. Miller, S.D. Thomas, J.O. Trent. (2009) Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer. *Exp Mol Pathol*. 86, 151-164.

2. P.J. Bates, J.B. Kahlon, S.D. Thomas, J.O. Trent, D.M. Miller. (1999) Antiproliferative activity of G-rich oligonucleotides correlates with protein binding. *The Journal of biological chemistry*. 274, 26369-26377.

3. V. Dapic, V. Abdomerovic, R. Marrington, J. Peberdy, A. Rodger, J.O. Trent, P.J. Bates. (2003)

Biophysical and biological properties of quadruplex oligodeoxyribonucleotides. *Nucleic Acids*

Res. 31, 2097-2107.

4. Dapić V, Bates PJ, Trent JO, Rodger A, Thomas SD, M. DM. (2002) Antiproliferative activity of G-quartet-forming oligonucleotides with backbone and sugar modifications. *Biochemistry*. 41,

- in leukemia cells." *Tumor Biology*. 37.7, 9967-9977.
24. Ofer, Noa, et al. (2009) "The quadruplex r (CGG) n destabilizing cationic porphyrin TMPyP4 cooperates with hnRNPs to increase the translation efficiency of fragile X premutation mRNA." *Nucleic acids research*. 37.8, 2712-2722.
25. Singh, Anju, Savita Joshi, and Shrikant Kukreti. (2020) "Cationic porphyrins as destabilizer of a G-quadruplex located at the promoter of human MYH7 β gene." *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 38.16, 4801-4816.
26. Andrew, Elizabeth J., et al. (2013) "Pentose phosphate pathway function affects tolerance to the G-quadruplex binder TMPyP4." *PloS one*. 8.6, e66242.
27. Cantor, C. R., Warshaw, M. M., & Shapiro, H. (1970). Oligonucleotide interactions. III. Circular dichroism studies of the conformation of deoxyoligonucleolides. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*. 9(9), 1059-1077.
28. Zhang, H., Xiao, X., Wang, P., Pang, S., Qu, F., Ai, X., & Zhang, J. (2009). Conformational conversion of DNA G-quadruplex induced by a cationic porphyrin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 74(1), 243-247.
29. Dehghani, K.M. (2010) A comprehensive description of Biophysics. 1st ed.
30. Wei, Chunying, et al. (2006) "A spectroscopic study on the interactions of porphyrin with G-quadruplex DNAs." *Biochemistry*. 45.21, 6681-6691.
31. Le, Vu H., Narayana Nagesh, and Edwin A. Lewis. (2013) "Bcl-2 promoter sequence G-quadruplex interactions with three planar and non-planar cationic porphyrins: TMPyP4, TMPyP3, and TMPyP2." *PloS one*. 8.8, e72462.
32. Lakowicz, J. R. (Ed.). (2013) Principles of fluorescence spectroscopy. *Springer science & business media*.
33. Zhao, L., Liu, R., Zhao, X., Yang, B., Gao, C., Hao, X., & Wu, Y. (2009) New strategy for the evaluation of CdTe quantum dot toxicity targeted to
13. Peng, Li-Hua, et al. (2015) "Cell membrane capsules for encapsulation of chemotherapeutic and cancer cell targeting in vivo." *ACS applied materials & interfaces*. 7.33, 18628-18637.
14. Gao, Huile, et al. (2012) "Precise glioma targeting of and penetration by aptamer and peptide dual-functioned nanoparticles." *Biomaterials*. 33.20, 5115-5123.
15. Dolmans, D.E., Fukumura, D. and Jain, R.K. (2003) Photodynamic therapy for cancer. *Nature reviews cancer*. 3, 380-387.
16. Cao, Z., Tong, R., Mishra, A., Xu, W., Wong, G.C., Cheng, J. and Lu, Y. (2009) Reversible Cell-Specific Drug Delivery with Aptamer-Functionalized Liposomes. *Angewandte Chemie International Edition*. 48(35), 6494-6498.
17. Carvalho, Josué, et al. (2019) "Aptamer-based targeted Delivery of a G-quadruplex Ligand in Cervical Cancer Cells." *Scientific reports*. 9.1, 1-12.
18. Y.A. Shieh, S.J. Yang, M.F. Wei, M.J. Shieh. (2010) Aptamer-based tumor-targeted drug delivery for photodynamic therapy. *ACS nano*. 4, 1433-1442.
19. Wei, Chunying, et al. (2006) "A spectroscopic study on the interactions of porphyrin with G-quadruplex DNAs." *Biochemistry*. 45.21, 6681-6691.
20. Zhang, HuiJuan, et al. (2008) "Interactions between meso-tetrakis (4-(N-methylpyridiumyl)) porphyrin TMPyP4 and DNA G-quadruplex of telomeric repeated sequence TTAGGG." *Science in China Series B: Chemistry*. 51.5, 452-456.
21. Cogoi, Susanna, and Luigi E. Xodo. (2006) "G-quadruplex formation within the promoter of the KRAS proto-oncogene and its effect on transcription." *Nucleic acids research*. 34.9, 2536-2549.
22. Waller, Zoë AE, et al. (2016) "Control of bacterial nitrate assimilation by stabilization of G-quadruplex DNA." *Chemical Communications*. 52.92, 13511-13514.
23. Zidanloo, Saeedeh Ghazaey, et al. (2016) "Downregulation of the WT 1 gene expression via TMPyP4 stabilization of promoter G-quadruplexes

43. Wei, Chunying, et al. (2009) "Evidence for the binding mode of porphyrins to G-quadruplex DNA." *Physical Chemistry Chemical Physics*. 11.20, 4025-4032.
44. Arora, Amit, and Souvik Maiti. (2008) "Effect of loop orientation on quadruplex– TMPyP4 interaction." *The Journal of Physical Chemistry B*. 112.27, 8151-8159.
45. Pasternack, Robert F., and Esther J. Gibbs. (1989) "Interaction of porphyrins and metalloporphyrins with nucleic acids." 59-73.
46. Kalayanasundaram, K. (1984). Photochemistry of water-soluble porphyrins: Comparative study of isomeric tetrapyrrolyl-and tetrakis (N-methylpyridiniumyl) porphyrins. *Inorganic Chemistry*, 23, 2453-2459.
47. Sazanovich, I. V., & Chirvonyi, V. S. (2005). Deactivation of the S1 state of a water-soluble porphyrin cation in a complex with DNA studied by the method of picosecond absorption spectroscopy. *Quantum Electronics*, 35(8), 756.
48. Zhang, HuiJuan, et al. (2008) "Interactions between meso-tetrakis (4-(N-methylpyridiniumyl)) porphyrin TMPyP4 and DNA G-quadruplex of telomeric repeated sequence TTAGGG." *Science in China Series B: Chemistry*. 51.5, 452-456.
49. Makarska-Bialokoz, Magdalena. (2012) "Spectroscopic study of porphyrin-caffeine interactions." *Journal of fluorescence*. 22.6, 1521-1530.
50. Sazanovich, Igor'V., and Vladimir Sergeevich Chirvonyi. (2005) "Deactivation of the S1 state of a water-soluble porphyrin cation in a complex with DNA studied by the method of picosecond absorption spectroscopy." *Quantum Electronics*. 35.8, 756.
51. Airolidi, Marta, et al. (2014) "Interaction of doxorubicin with polynucleotides. A spectroscopic study." *Biochemistry*. 53.13, 2197-2207.
52. Ranjan, M., Diffley, P., Stephen, G., Price, D., Walton, T. J., & Newton, R. P. (2002). Comparative study of human steroid 5 α -reductase isoforms in prostate and female breast skin tissues: bovine serum albumin. *Science of the total environment*. 407.18, 5019-5023.
34. Suryawanshi, V. D., Walekar, L. S., Gore, A. H., Anbhule, P. V., & Kolekar, G. B. (2016) Spectroscopic analysis on the binding interaction of biologically active pyrimidine derivative with bovine serum albumin. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6.1, 56-63.
35. Asadi, M., Safaei, E., Ranjbar, B., & Hasani, L. (2004) Thermodynamic and spectroscopic study on the binding of cationic Zn (II) and Co (II) tetrapyrrolylporphyrins to calf thymus DNA: the role of the central metal in binding parameters. *New journal of chemistry*. 28.10, 1227-1234.
36. Ranjbar, B., & Gill, P. (2009). Circular dichroism techniques: biomolecular and nanostructural analyses-a review. *Chemical biology & drug design*, 74(2), 101-120.
37. Carvalho, J., Queiroz, J.A., Cruz, C. (2017) Circular Dichroism of G-Quadruplex: a Laboratory Experiment for the Study of Topology and Ligand Binding. *J. Chem. Educ.* 94, 1547–1551.
38. Do, N.Q., Chung, W.J., Hong, T., Truong, A., Heddi, B., Phan, A.T. (2017). G-quadruplex structure of an anti-proliferative DNA sequence. *Nucleic Acids Res.* 1–7.
39. Le, Vu H., Narayana Nagesh, and Edwin A. Lewis. (2013) "Bcl-2 promoter sequence G-quadruplex interactions with three planar and non-planar cationic porphyrins: TMPyP4, TMPyP3, and TMPyP2." *PloS one*. 8.8, e72462.
40. M.M. Dailey, M.C. Miller, P.J. Bates, A.N. Lane, J.O. Trent. Resolution and characterization of the structural polymorphism of a single quadruplex-forming sequence, *Nucleic Acids Res.* **2010**; 38: 4877-4888.
41. Dai, J.; Carver, M.; Yang, D. (2008) Polymorphism of human telomeric quadruplex structures. *Biochimie*. 90, 1172.
42. Pasternack, Robert F., Esther J. Gibbs, and Joseph J. Villafranca. (1983) "Interactions of porphyrins with nucleic acids." *Biochemistry*. 22.23, 5409-5417.

- "Thermodynamic investigation of manganese (III) 5-(1-(4-carboxybutyl) pyridinium-4-yl) 10, 15, 20-tris-(1-methylpyridinium-4-yl) porphyrin with calf thymus DNA." *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* 13.08n09, 964-972.
59. Dezhampannah, Hamid, and Soghra Fyzolahjani. (2013) "Study on interaction of cationic porphyrine with synthetic polynucleotides." *Analytical Cellular Pathology* 36.5, 6 125-132.
60. Olsen, C. M. (2008) *Thermodynamic characterization of the folding and interaction of G-quadruplex*. Ph.D. Dissertation, University of Nebraska Medical Center.
61. Z. Bagheri, B. Ranjbar, H. Latifi, M.I. Zibaii, T.T. Moghadam, A. Azizi. (2015) Spectral properties and thermal stability of AS1411 G-quadruplex. *International journal of biological Macromolecules*. 72, 806-811.
62. Fan, Xinmeng, et al. (2016) "Bioactivity of 2'-deoxyinosine-incorporated aptamer AS1411." *Scientific reports*. 6.1, 1-12.
- sensitivity to inhibition by finasteride and epristeride. *Life sciences*, 71(2), 115-126.
53. Wang, Y. Q., Zhang, H. M., & Zhou, Q. H. (2009). Studies on the interaction of caffeine with bovine hemoglobin. *European journal of medicinal chemistry*, 44(5), 2100-2105.
54. Lakowicz J.R. (2006) Principles of Fluorescence Spectroscopy. Springer, Boston, MA. 331-351.
55. Ren, J.; Chaires, J. B. (1999) Sequence and structural selectivity of nucleic acid binding ligands. *Biochemistry*. 38, 16067.
56. Ross, Philip D., and S. Subramanian. (1981) "Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability." *Biochemistry* 20.11, 3096-3102.
57. Hassani, L., et al. (2018) "Thermodynamic Investigation of Copper Porphyrines and Phthalocyanine Interaction with Human Telomeric G-Quadruplex DNA." *Modares Journal of Biotechnology*. 9.3, 395-402.
58. Dezhampannah, Hamid, Abdol-Khalegh Bordbar, and Shahram Tangestaninejad. (2009)

Investigation of TMPYP4 porphyrin interaction with AS1411 aptamer using spectroscopic methods

Parisa Jahangoshai¹, Bijan Ranjbar^{2*}, Leila Hasani^{3*},

1. Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares
2. Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3. Department of Biological Sciences, Institute for Advanced Studies in Basic Sciences (IASBS), Zanzan, Iran

*, Corresponding authors: ranjbarb@modares.ac.ir. hasani@iasbs.ac.ir.

Abstract

AS1411 is an anticancer four-stranded deoxyoligonucleotide with high affinity and specificity to a putative surface biomarker, nucleolin, which is an overexpressed protein on numerous cancer cells. AS1411 has valuable functional potential for the targeted delivery of nanoparticles, oligonucleotides, peptides and small drug molecules to cancer cells as well as imaging of these cells. Considering that understanding interaction of drug with target molecule is important and necessary for pharmaceutical studies. In the present study, the interaction of a porphyrin photosensitizer called TMPYP4 was evaluated by aptamer AS1411. Absorption and fluorescence spectroscopy and circular dichroism technique were used to identify how and where TMPYP4 binds to AS1411 and the resulting structural changes. The results showed that binding of the porphyrin to AS1411 caused 13 nm red shift and 56% hypochromicity in the absorption spectrum; in addition, due to this binding, the emission spectrum of porphyrin is changed and its emission intensity is reduced. The results of structural studies showed that the binding of TMPYP4 does not significantly change the shape of the AS1411 circular dichroism spectrum, but at high concentrations leads to an intense decrease in the intensity of the spectrum. These changes in the spectra indicate that TMPYP4 binds to the aptamer through intercalation between tetrad planes and end-staking and causes to opening of the aptamer structure. As a conclusion, it can be proposed that AS1411 aptamer has appropriate potential for delivery of porphyrin compounds and their photosensitizer types and can be used in photodynamic therapy of cancer cells.

Keywords: Interaction, AS1411 Aptamer, TMPYP4 photosensitizer, Spectroscopy