

Физика

УДК 577.3

А. А. КАЗАРЯН, Е. Б. ДАЛЯН, С. Г. АРУТЮНЯН, Т. В. ЧАЛИКЯН

СПЕКТРАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ТАІРуР(4) И  
AgТАІРуР(4) С poly(rG)poly(rC), poly(rI)poly(rC) И poly(rA)poly(rU)

Методами кругового дихроизма и флуоресценции исследовано взаимодействие новых мезо-тетра-(4N-аллилпиридил)порфирина (ТАІРуР(4)) и его Ag-содержащей производной AgТАІРуР(4) с poly(rG)poly(rC), poly(rI)poly(rC) и poly(rA)poly(rU). Показано, что ТАІРуР(4)-порфирины связываются с poly(rG)poly(rC) двумя способами – интеркаляционно и по внешнему типу связывания с предпочтением первого, а с poly(rA)poly(rU) имеет место только внешнее связывание. С poly(rI)poly(rC) происходит как внешнее связывание, так и интеркаляция. В отличие от безметалльного, Ag-содержащий металлопорфирин связывается со всеми полинуклеотидами только внешне. По интенсивности взаимодействия с данными порфиринами полинуклеотиды можно расположить в следующий ряд: poly(rI)poly(rC) ≥ ≥ poly(rA)poly(rU) > poly(rG)poly(rC).

**Введение.** Порфирины и их металлсодержащие аналоги являются активно исследуемыми соединениями. Многие порфирины проявляют противовирусную, противогрибковую и антибактериальную активность, а благодаря своей способности избирательно накапливаться в опухолевых клетках, они успешно используются в онкологии [1]. Предполагается, что биологическая активность порфиринов определяется типом их взаимодействия с нуклеиновыми кислотами (НК). Поэтому исследование этого взаимодействия позволит понять механизмы, лежащие в основе их биологической активности.

С другой стороны, поскольку порфирины весьма чувствительны к окружающей среде, их используют как «зонды» для регистрации изменений структуры и конформационных параметров нуклеиновых кислот (например, при фолдинге РНК) [2].

Установлено, что существует три способа связывания порфиринов с НК: интеркаляция, внешний упорядоченный (с образованием протяженных стопок из порфиринов) и внешний неупорядоченный [3, 4]. Исследование комплексов порфирин–ДНК показало, что для интеркаляции необходимо существование плоской конформации порфирина (т.е. с ограниченной эффективной толщиной). Внешнее же связывание типично для порфиринов с аксиальными лигандами и (или) с большими боковыми радикалами [4].

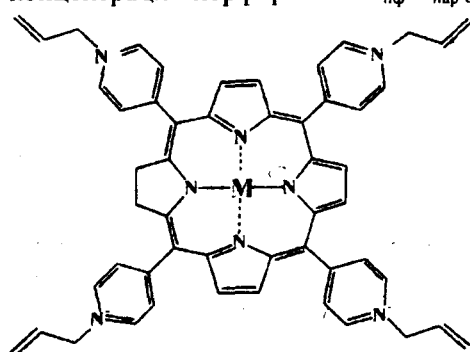
В данной работе исследовано взаимодействие мезо-тетра-(4N-аллил-пиридил)порфирина (ТАlPyP(4)) и его новой Ag-содержащей производной (AgТАlPyP(4)) с синтетическими РНК-полимерными дуплексами. Эти порфирины как биологический объект проявляют сильно выраженные антисептические свойства. Они не менее интересны и с молекулярной точки зрения, поскольку их боковые группы содержат кратную связь, благодаря которой жесткие периферийные радикалы слабо деформируются. С учетом того факта, что порфирины, содержащие Ag в центре, практически не изучены, актуальность проведенных в настоящей работе исследований становится очевидной.

**Материалы и методы.** ТАlPyP(4) и AgТАlPyP(4) (см. схему) были синтезированы на кафедре фармакологической химии ЕМГУ по методике [3].

РНК-дуплексы poly(rG)poly(rC) и poly(rI)poly(rC) приобретены у «Sigma-Aldrich» (Канада), а односторонние poly(rA) и poly(rU) полимеры – у «Amersham Pharmacia Biotech» (Канада). Концентрация полинуклеотидов определялась спектрофотометрически с использованием следующих коэффициентов экстинкции:  $\epsilon_{260}=7500M^{-1}cm^{-1}$  для poly(rG)poly(rC),  $\epsilon_{266}=5250M^{-1}cm^{-1}$  для poly(rI)poly(rC) и  $\epsilon_{260}=6970M^{-1}cm^{-1}$  для poly(rA)poly(rU).

Исследования проводились в буфере 0,1BPSE (0,6мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>+0,2мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>+18,5мМ NaCl+0,1мМ EDTA).

Эксперименты по титрованию проводились в диапазоне относительных концентраций порфирина  $\gamma=C_{пф}/C_{пар осн.}$  от 0 до 0,5, вплоть до агрегации и выпадения в осадок полученного комплекса. Использовались микроколичества (по 4мкл) порфирина, взятые из маточного раствора, содержащего  $0,5 \cdot 10^{-3}M$  порфирина.



M=2H (ТАlPyP(4)); Ag (AgТАlPyP(4)).

Диапазон концентраций полинуклеотидов составлял  $6 \cdot 10^{-6}$ – $9 \cdot 10^{-6}M$  (пар оснований).

Спектры поглощения регистрировались на спектрометре AVIV14 DS UV/VIS, спектры кругового дихроизма (КД) – на спектрополяриметре AVIV 62 DS, спектры флуоресценции – на флуорометре AVIV ATP 105 (AVIV Associates, Lakewood, NJ). Все эксперименты проводились при температуре 25°C.

**Результаты.** Данные, полученные ранее для водорастворимого порфирина TMPyP, показывают, что КД-спектр комплекса порфирина–полинуклеотид характеризуется двумя полосами: 210–310нм – УФ-полоса, совпадающая с КД-полосой полинуклеотидов, и 380–500нм – полоса индуцированного порфиринами КД в видимой области, где полинуклеотиды не поглощают [5]. Появление индуцированной полосы КД объясняется двумя причинами: либо воздействием асимметричной среды, в которую попадет порфирин при связывании со спиральным полинуклеотидом, либо асимметричностью упаковки порфиринов на спиральном полинуклеотиде как на матрице [5, 6]. Анализ индуцированной полосы КД позволяет сделать вывод о характере взаимо-

действия и, следовательно, о типе связывания порфирина с ДНК. На основании такого анализа считается установленным, что отрицательный индуцированный спектр КД свидетельствует об интеркаляционном характере связывания порфирина с полинуклеотидом, тогда как положительный или консервативный спектр указывает на преимущественно внешнее связывание [4, 7, 8]. Считается также, что высокоинтенсивный консервативный индуцированный спектр может быть следствием внешней стопкообразной упаковки порфиринов на матрице полинуклеотида [9, 10]. Механизм связывания порфиринов зависит от GC-содержания НК. Многочисленные исследования показали, что ТМРур и некоторые его производные предпочитают интеркаляцию в GC-богатых участках и внешнее связывание в AT-последовательностях ДНК и РНК [4, 7, 8, 10].

На рис. 1 показаны спектры КД комплексов ТАИРур(4)-полинуклеотид (а) и АгТАИРур(4)-полинуклеотид (б) при одинаковой относительной концентрации порфиринов  $\tau=0,3$  (для удобства сравнения полученных данных).

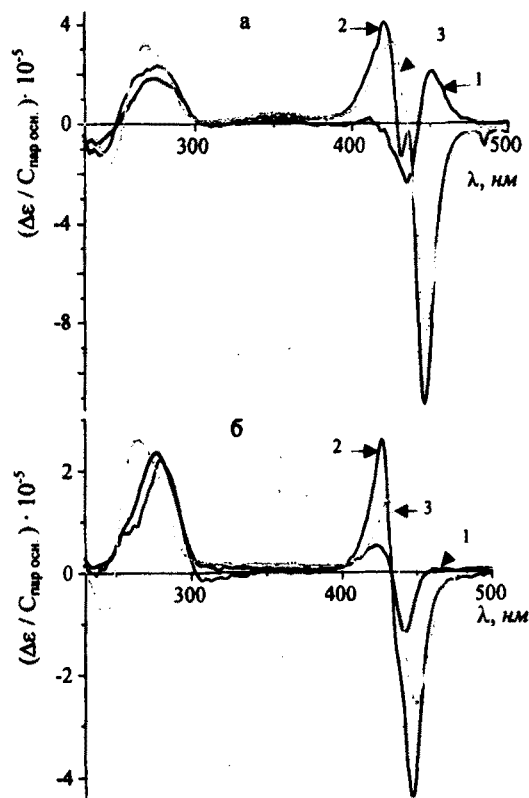


Рис. 1. Спектры КД комплексов ТАИРур(4) (а) и АгТАИРур(4) (б) с poly(rG)poly(rC) (1), poly(rI)poly(rC) (2) и poly(rA)poly(rU) (3) при относительной концентрации  $\tau=0,3$ .

Очевидно, что кривые взаимодействия этих порфиринов с разными полинуклеотидами различаются не только количественно, но и качественно. Так, например, индуцированная полоса комплекса ТАИРур(4)-poly(rI)poly(rC) отличается аномально высокоинтенсивным отрицательным пиком на 445 нм (рис. 1, а). Пики индуцированной полосы комплекса ТАИРур(4)-poly(rA)poly(rU) несколько смещены и менее интенсивны. У КД-спектра комплекса ТАИРур(4)-poly(rG)poly(rC) наблюдается инверсия индуцированной полосы, что свидетельствует о том, что способ связывания с этим полинуклеотидом принципиально отличается от остальных. В то же время, у АгТАИРур(4) инверсии индуцированной полосы не наблюдается (рис. 1, б). Величина пиков у комплекса АгТАИРур(4)-poly(rG)poly(rC) хотя и меньше, чем у комплексов с poly(rI)poly(rC) и poly(rA)poly(rU), однако положения максимумов почти совпадают.

Для исследования зависимости КД-спектров от концентрации порфирина были проведены эксперименты по титрованию полинуклеотидов порфи-

ринами (рис. 2, а и б).

Из приведенных данных видно, что кривые, соответствующие комплексам ТАlPyP(4) с poly(rG)poly(rC), отличаются от остальных следующим:

– слабой индуцированной полосой КД при относительных концентрациях порфирина от 0 до 0,25 с последующей инверсией пиков (при  $r > 0,25$ );

– выходом на насыщение при относительно большом  $r \geq 0,38$ .

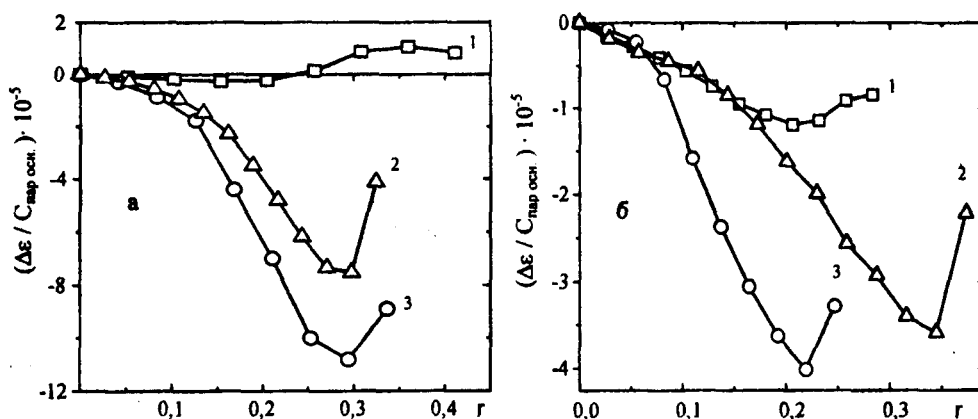


Рис. 2. Кривые зависимости КД комплексов при 447nm от относительной концентрации порфиринов ТАlPyP(4) (а) и AgТАlPyP(4) (б). Обозначения следующие: 1 – с poly(rG)poly(rC), 2 – с poly(rI)poly(rC), 3 – с poly(rA)poly(rU) (кривые приведены для одинаковых концентраций полинуклеотидов).

Как указано выше, знак КД определяется способом связывания. Из рис. 2,а следует, что ТАlPyP(4) связывается с poly(rG)poly(rC) несколькими способами. Предполагается, что при  $r=0-0,2$  преобладает внешнее связывание, которое выходит на насыщение, и начиная с  $r=0,25$  преобладающим механизмом связывания становится интеркаляция. Второй способ предоставляет дополнительные места связывания на poly(rG)poly(rC), вследствие чего выход на насыщение происходит при относительно большой  $r \geq 0,38$ .

Для всех других комплексов интеркаляция если и возможна, то не является преобладающим типом связывания. Так, anomalно интенсивные консервативные полосы КД у комплексов порфиринов с poly(rI)poly(rC) и poly(rA)poly(rU) свидетельствуют о внешнем типе связывания, при котором образуются протяженные стопки порфиринов на матрице РНК. При этом стопки порфиринов, повторяя спиральную структуру полинуклеотидов, сами образуют псевдоспираль, что приводит к значительному увеличению интенсивности полос КД [8]. Возможно, преобладание высокоинтенсивной отрицательной полосы у комплексов ТАlPyP(4)–poly(rI)poly(rC) над положительной полосой свидетельствует о наличии интеркаляции как параллельного механизма связывания. В пользу этой гипотезы говорит также отсутствие 2-амино группы у IC, что уменьшает стерические ограничения для порфиринов и делает этот участок более доступным для интеркаляции [7, 11].

У комплексов полинуклеотидов с Ag-содержащим порфирином интенсивность пиков КД (рис. 2, б) в несколько раз меньше, что может быть след-

ствием меньшей константы связывания. По всей видимости, аксиальные лиганды этого порфирина не только препятствуют интеркаляции, но и мешают образованию внешних стопок.

Для проверки сделанных предположений нами были проведены аналогичные эксперименты методом флуоресценции. Длина волны возбуждающего света определялась предварительным сканированием (400 нм для ТАlPyP(4) и 418 нм для AgТАlPyP(4)). ТАlPyP(4) и AgТАlPyP(4) имеют пик флуоресценции в интервале 600–800 нм. При комплексообразовании с НК интенсивность этого пика уменьшалась, что свидетельствовало о тушении флуоресценции у связанного порфирина.

На рис. 3, а и б приведены зависимости интенсивности флуоресценции  $f$  при 666 нм от относительной концентрации  $\gamma$  порфиринов. Из приведенных данных видно, что, в отличие от безметалльного порфирина, у AgТАlPyP(4) наблюдается соизмеримость интенсивностей спектров флуоресценции, что, по всей видимости, свидетельствует об идентичности типа связывания у этих комплексов. Предположение о том, что, в отличие от ТАlPyP(4), аксиальные лиганды AgТАlPyP(4) мешают интеркаляции и приводят к единственно возможному типу взаимодействия – внешнему связыванию, согласуется с этими результатами.

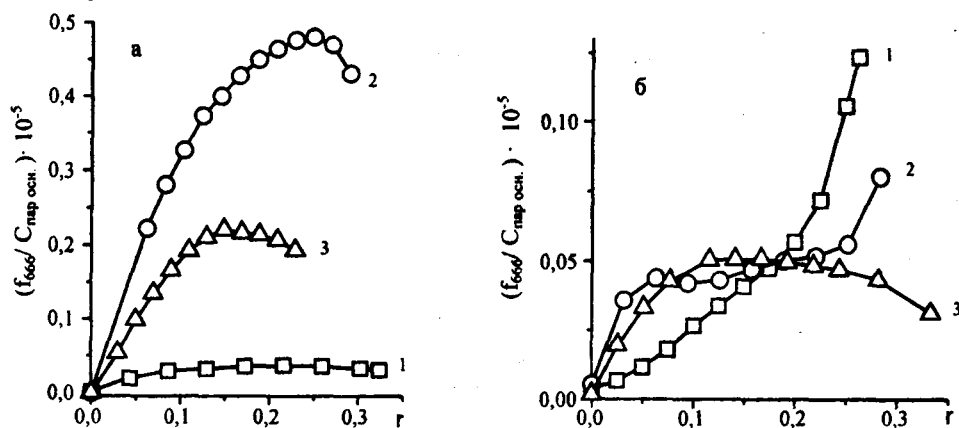


Рис. 3. Зависимость интенсивности флуоресценции при 666 нм для комплексов ТАlPyP(4) (а) и AgТАlPyP(4) (б) с poly(rG)poly(rC) (1), poly(rI)poly(rC) (2) и poly(rA)poly(rU) (3) от  $\gamma$ .

Обработка полученных данных показала, что, как и в случае со спектрами КД, результаты, полученные для комплексов ТАlPyP(4)–poly(rG)poly(rC), резко отличаются от остальных. Интенсивность флуоресценции этого комплекса на порядок слабее, чем у других. У комплексов AgТАlPyP(4) с полинуклеотидами интенсивности спектров флуоресценции соизмеримы друг с другом, но на порядок меньше, чем у комплексов с ТАlPyP(4).

Таким образом, данные, полученные методом флуоресценции, подтверждают выводы, сделанные на основании изучения спектров КД исследуемых комплексов.

В заключение отметим следующую закономерность: по интенсивности взаимодействия с обоими порфиринами полинуклеотиды можно расположить

в следующий ряд:  $\text{poly}(\text{rI})\text{poly}(\text{rC}) \geq \text{poly}(\text{rA})\text{poly}(\text{rU}) > \text{poly}(\text{rG})\text{poly}(\text{rC})$ , что, по всей видимости, является следствием аналогичного соотношения между соответствующими константами связывания.

*Работа выполнена при поддержке грантов NATO LST.CLG. 979777, ISTC #A-301.2 и CRDF #12027.*

*Кафедра молекулярной физики*

*Поступила 05.04.2005*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Bown S.G., Tralau C.J., Smith P.D., Akdemir D., Wieman T.J. – J. Cancer, 1986, v. 54, № 1, p. 43–52.
2. Celander D.W., Nussbaum J.M. – Biochemistry, 1996, v. 35, p. 12061–12069.
3. Fiel R.J., Howard J.C., Mark E.H., Datta-Gupta N. – Nucl. Acid. Res., 1976, v. 6, № 9, p. 3093–3118.
4. Pasternak R.F. – Chirality, 2003, v. 15, p. 329–332.
5. Tamiaki H., Matsumoto N., Tsukube H. – Tetrahedron Lett., 1997, v. 38, p. 4239–4242.
6. Tamiaki H., Unno S., Takeuchi E., Tameshige N., Shinoda S., Tsukube H. – Tetrahedron Lett., 2003, v. 59, p. 10477–10483.
7. Uno T., Hamasaki K., Tanigawa M., Shimabayashi S. – Inorg. Chem., 1997, v. 36, p. 1676–1683.
8. Lee S., Lee Y.-A., Lee H.M., Kim D.H. – Biophysical Journal, 2002, v. 83, p. 371–381.
9. Lee Y.-A., Lee S., Lee H.M., Lee C.-S., Kim S.K. – The Japanese Biochemical Society, 2003, v. 133, p. 343–349.
10. Pasternack R.F., Goldsmith J.I., Szep S., Gibbs E.J. – Biophysical Journal, 1998, v. 75, p. 1024–1031.
11. Uno T. et al. – Biochemistry, 2002, v. 41, p. 13059–13066.

Ա. Ա. ՂԱԶԱՐՅԱՆ, Ե. Բ. ԴԱԼՅԱՆ, Ս. Գ. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ, Տ.Վ. ՉԱԼԻԿՅԱՆ

ՄԵԶՈ-ՏԵՏՐԱ-(4N-ԱԼԻԼՊԻՐԻԴԻԼ) ՊՈՐՖԻՐԻՆՆԵՐԻ ՀԵՏ  
 $\text{poly}(\text{rI})\text{poly}(\text{rC})$ -ի,  $\text{poly}(\text{rA})\text{poly}(\text{rU})$ -ի ԵՎ  $\text{poly}(\text{rG})\text{poly}(\text{rC})$ -ի  
ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՍՊԵԿՏՐԱԼ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ

#### Ամփոփում

Շրջանային դիքրոիզմի և ֆլուորեսցենցիայի մեթոդներով ուսումնասիրվել է TAlPyP(4)-ի և AgTAlPyP(4)-ի փոխազդեցությունը  $\text{poly}(\text{rI})\text{poly}(\text{rC})$ ,  $\text{poly}(\text{rA})\text{poly}(\text{rU})$ ,  $\text{poly}(\text{rG})\text{poly}(\text{rC})$  պոլիմուկլեինաթթուների հետ: Մետաղ չպարունակող պորֆիրինները կապվում են GC-պոլիմուկլեինաթթուների հետ երկու մեխանիզմով՝ ինտերկալացիոն և արտաքին կապման՝ առաջինի գերակայությամբ, իսկ AU-պոլիմուկլեինաթթուների հետ կապվում են միայն արտաքինապես: IC-պոլիմուկլեինաթթուների հետ փոխազդեցությունը տեղի է ունենում և արտաքին, և ինտերկալացիոն մեխանիզմներով: Ի տարբերություն դրան, Ag պարունակող մետաղապորֆիրինները կապվում են միայն արտաքինապես բոլոր ուսումնասիրված պոլիմուկլեինաթթուների հետ: Ըստ պորֆիրինների հետ փոխազդեցության ինտենսիվության՝ պոլիմուկլեինաթթուները կարելի է ներկայացնել հետևյալ շարքով.  $\text{poly}(\text{rI})\text{poly}(\text{rC}) \geq \text{poly}(\text{rA})\text{poly}(\text{rU}) > \text{poly}(\text{rG})\text{poly}(\text{rC})$ :

A. A. GHAZARYAN, Ye. B. DALYAN, S. G. HAROUTIUNIAN, T. V. CHALIKIAN

SPECTRAL STUDIES OF INTERACTION OF MESO-TETRA-(4N-  
-ALLYLPYRIDYL)PORPHYRINS WITH poly(rG)poly(rC), poly(rI)poly(rC)  
AND poly(rA)poly(rU)

Summary

The interaction of TAlPyP(4) and AgTAlPyP(4) with poly(rG)poly(rC), poly(rI)poly(rC) and poly(rA)poly(rU) was studied by the CD and fluorescence spectral changes. Nonmetalloporphyrins bind to poly(rG)poly(rC) with two modes, preferring the intercalation to the external mode. They bind to poly(rA)poly(rU) preferentially in an outside manner and bind to poly(rI)poly(rC) in two types of binding modes. In contrast Ag-containing metalloporphyrin bind with the studied RNAs via outside mode. By the intensity of the interaction with porphyrins the studied RNAs can be placed in the following order: poly(rI)poly(rC)  $\geq$  poly(rA)poly(rU)  $>$  poly(rG)poly(rC).