

Биолог. журн. Армении, 1-2 (58), 2006

УДК 577.3

## ТЕРМОДИНАМИКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ТАІРУР(4) И АgТАІРУР(4) С ДУПЛЕКСАМИ РНК

А.А. КАЗАРЯН, Е.Б. ДАЛЯН, В.И. ВАРДАНЯН, С.Г. АРУՅՈՆՅԱՆ,  
Т.В. ЧАЛИКՅԱՆ

Երևանский государственный университет, кафедра молекулярной физики, 375025  
\*Университет Торонто (Канада)

Методами кругового дихроизма и оптического поглощения исследовано взаимодействие нового мезо-тетра-(4N-аллилпиридил)порфирина [ТАІРУР(4)] и его Аg-содержащего производного [АgТАІРУР(4)] с poly(rA)poly(rU) и poly(rI)poly(rC). Показано, что ТАІРУР(4) связывается с полинуклеотидами, предпочитая интеркаляцию внешнему типу связывания, а Аg-содержащий металлопорфирин связывается только внешне. Рассчитаны константа связывания ( $K_b$ ), стехиометрия ( $n$ ) и термодинамические параметры ( $\Delta H$ ,  $\Delta G$  и  $\Delta S$ ) комплексообразования. Показано существование корреляции между этими параметрами и способом связывания.

Շրջանային դիքրոիզմի և օպտիկական կլանման մեթոդներով ուսումնասիրվել է նոր մեզո-տետրա-(4N-ալիլպիրիդիլ)պորֆիրինի [ТАІРУР(4)] և նրա Аg պարունակող ածանցյալի [АgТАІРУР(4)] փոխազդեցությունը poly(rI)poly(rC) և poly(rA)poly(rU) պոլիմուկլեինաթթուների հետ: Ցույց է տրված, որ ТАІРУР(4) պորֆիրինները կապվում են պոլիմուկլեինաթթուների հետ ինտերկալացիոն մեխանիզմով, իսկ АgТАІРУР(4) պորֆիրինները կապվում են միայն արտաքինապես: Հաշվված են կապման հաստատունը ( $K_b$ ) ու ստեքիոմետրիան ( $n$ ), ինչպես նաև կապման ջերմադինամիկական պարամետրերը ( $\Delta H$ ,  $\Delta G$  և  $\Delta S$ ): Ցույց է տրված, որ զույգություն ունի կապ այդ պարամետրերի և կապման մեխանիզմի միջև:

By using circular dichroism (CD) and light absorption spectroscopic measurements the interaction of novel meso-tetra-(4N-allylpyridyl)porphyrin [ТАІРУР(4)] and its Ag containing derivative [АgТАІРУР(4)] to the poly(rA)poly(rU) and poly(rI)poly(rC) RNA duplexes has been studied. It was shown that ТАІРУР(4) intercalate into poly(rA)poly(rU) and poly(rI)poly(rC), while АgТАІРУР(4) binds to these RNA duplexes by forming outside-bound, self-stacked aggregates. For each ligand-RNA binding event the binding constants ( $K_b$ ), the binding stoichiometry ( $n$ ) and the thermodynamic parameters ( $\Delta H$ ,  $\Delta G$  and  $\Delta S$ ) were calculated. The existence of correlation between these parameters and the binding mode was shown.

*РНК - порфирин - круговой дихроизм - термодинамические параметры*

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 взаимодействия

их с НК 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 НК (например, при фолдинге РНК) [2].

Установлено, что существует три способа связывания порфиринов с НК: интеркаляция, внешний упорядоченный (с образованием протяженных стопок из порфиринов на поверхности макромолекулы) и внешний неупорядоченный [4, 8, 12]. Исследование порфирин-ДНК комплексов показало, что для интеркаляции необходимым условием является наличие плоской структуры порфирина (т.е. имеются ограничения в толщине молекулы порфирина). Внешнее же связывание типично для порфиринов с аксиальными лигандами и/или с большими боковыми радикалами [8].

Целью данных исследований является установление способов связывания некоторых порфиринов с РНК и выявление природы механизмов, стабилизирующих эти комплексы.

**Материал и методика.** мезо-Тetra-(4N-аллилпиридил)порфирин [TAIPyP(4)] и его Ag-содержащее производное [AgTAIPyP(4)] (см. схему) были синтезированы на кафедре фармакологической химии ЕМГУ по методике, предложенной Филлом [4].

РНК-овые дуплексы poly(rI)poly(rC) приобретены у Sigma-Aldrich Canada (Oakville, ON, Canada), Poly(rA)poly(rU) - у Amersham Pharmacia Biotech, Inc. (Baie d'Urfe, Quebec, Canada). Концентрацию полинуклеотидов и порфиринов определяли спектрофотометрически с использованием следующих коэффициентов экстинкции:

- $\epsilon_{260} = 5250 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  для poly(rI)poly(rC),
- $\epsilon_{260} = 6970 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  для poly(rA)poly(rU),
- $\epsilon_{410} = 2.23 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  для TAIPyP(4) и
- $\epsilon_{410} = 1.19 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  для AgTAIPyP(4).

Исследования проводили с использованием буфера 1 ВРSE (6 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 2 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 185 мМ NaCl + 1 мМ EDTA), pH 7.

В экспериментах по титрованию начальная концентрация порфирина составляла  $0.6 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ . В пределах этих концентраций абсорбция исследованных в данной работе порфиринов подчиняется закону Ламберта-Берра. Порфирины хранили за час до эксперимента, раствор хранился в темноте. Полинуклеотид добавляли из маточного раствора так,

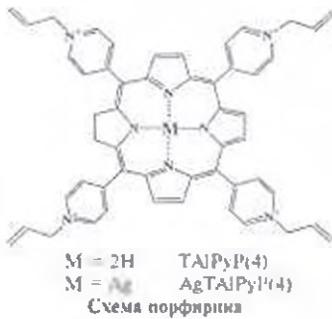
чтобы уже на первом шаге относительная концентрация  $\mu = C_{\text{порф}}/C_{\text{РНК}}$  была меньше 1.0 (т.е. Спорф < C<sub>РНК</sub>). Концентрацию РНК увеличивали до насыщения порфирина ( $\sim 1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  пар оснований.)

Все эксперименты проводили не менее трех раз. Полученные результаты усредняли с учетом их стандартных ошибок.

Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре Lambda 800 (Perkin Elmer) с температурным блоком системы Пельтье (PTP-6 Peltie Systems).

Спектры КД регистрировали на спектрополяриметре AVIV 62 DS при 25°C. (AVIV Associates, Lakewood, NJ).

**Результаты и обсуждение. Круговой дихроизм.** Результаты, полученные ранее для водорастворимого порфирина TMPyP, показывают, что КД-спектр порфирин/полинуклеотид комплекса характеризуется двумя полосами: 210-310 нм – УФ полоса, совпадающая с КД полосой полинуклеотидов, и 380-



500 нм – полоса индуцированного порфиринами КД в видимой области, где полинуклеотиды прозрачны [10]. Появление индуцированной полосы КД объясняется либо воздействием асимметричной среды, в которую попадает порфирин при связывании со спиральным полинуклеотидом, либо асимметричностью упаковки порфиринов на спиральном полинуклеотиде, как на матрице [10, 11].

Анализ индуцированной полосы КД позволяет сделать вывод о характере взаимодействия 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 [5, 8, 13]. Считается также, что высокоинтенсивный консервативный индуцированный спектр может быть следствием внешней стопкообразной упаковки порфиринов на матрице полинуклеотида [6, 9].

Механизм связывания порфиринов зависит от GC-содержания НК. Многочисленные исследования показали, что TAlPyP и некоторые его производные предпочитают интеркаляцию в GC богатые участки и внешнее связывание в AT последовательностях ДНК и РНК [5, 8, 9, 13].

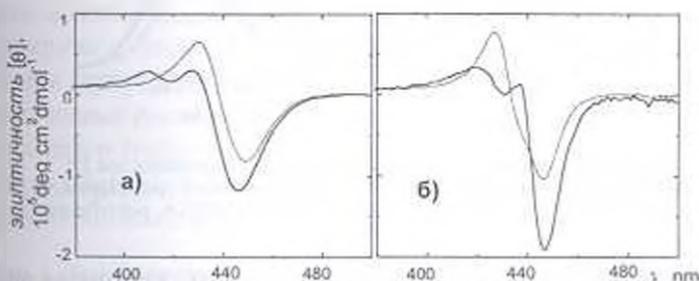


Рис. 1. Индуцированная полоса КД комплексов TAlPyP(4) (сплошная линия) и AgTAlPyP(4) (пунктирная линия) с полинуклеотидами:  
 а) poly(tA)poly(rU) ( $C_{Al} = 21 \mu\text{M}$ ,  $C_{\text{нукл}} = 7,1 \mu\text{M}$ )  
 б) poly(rI)poly(rC) ( $C_{Al} = 21 \mu\text{M}$ ,  $C_{\text{нукл}} = 7,3 \mu\text{M}$ )

На рис. 1 показаны спектры КД исследованных порфиринов с poly(tA)poly(rU) (рис. 1.а) и poly(rI)poly(rC) (рис. 1.б) при одинаковой относительной концентрации порфиринов ( $\mu = 0,3$ ). Анализ спектров КД позволяет предположить, что TAlPyP(4) предпочитает интеркаляционный способ связывания, в то время как AgTAlPyP(4), по всей видимости, предпочитает связываться внешне.

**Абсорбция.** На рис. 2 приведены спектры исследованных порфиринов при титровании полинуклеотидами. Как видно из рисунка, связывание с полинуклеотидами приводит к гипохромизму полосы поглощения Soret с bathochромным сдвигом. Изменения спектров наблюдаются в определенном интервале относительных концентраций порфирина/ нуклеотид, что позволяет найти долю связанного порфирина изложенным ниже способом.

Связывание порфиринов регистрировали по изменению максимуму полосы Soret (422 нм для ТАlPyP(4) и 430 нм для AgТАlPyP(4)). Для связанного порфирина  $\alpha$  определяли, как  $\alpha = (A_i - A_0)/(A_i - A_\infty)$ , где  $A_i$  - суммарное оптическое поглощение на  $i$ -том шагу титрования, а  $A_0$  и  $A_\infty$  - оптические поглощения свободного и связанного порфирина соответственно.  $A_\infty$  определяли как поглощение при полном связывании порфирина, когда дальнейшее добавление полинуклеотида не приводит к изменению поглощения.

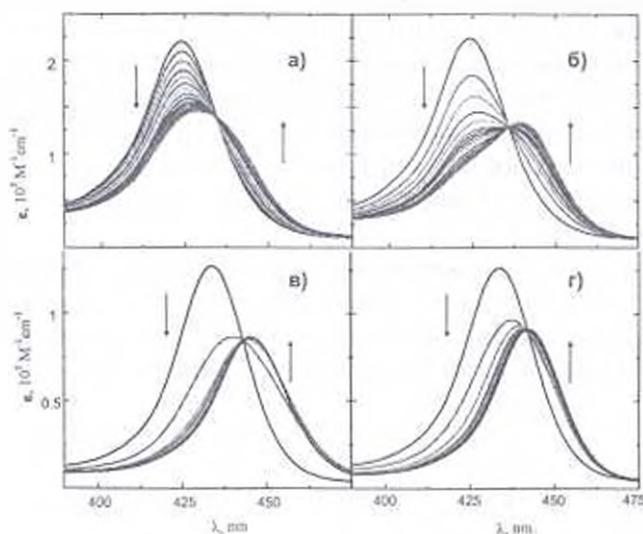


Рис. 2. Спектры титрования порфиринов полинуклеотидами при 25°  
 а) ТАlPyP(4) + poly(rA)poly(rU)      б) ТАlPyP(4) + poly(rI)poly(rC)  
 в) AgТАlPyP(4) + poly(rA)poly(rU)      г) AgТАlPyP(4) + poly(rI)poly(rC)

Концентрации свободных ( $C_f$ ) и связанных ( $C_b$ ) лигандов определяют по формулам  $C_f = (1-\alpha)C_0$  и  $C_b = \alpha C_0$  соответственно, где  $C_0$  - суммарная концентрация порфирина в растворе. Для нахождения параметров связывания использовали модель "исключенных соседних мест связывания". По данным  $r$  и  $C_f/r$  для нахождения константы связывания  $K_b$  и числа мест посадки  $n$  (число пар оснований полинуклеотида, которые становятся недоступными при связывании одного порфирина) используется формула (1), предложенная Макги и фон-Хиппелем [7].

$$\frac{r}{C_f} = K_b(1 - nr) \left[ \frac{1 - nr}{1 - (n-1)r} \right]^{n-1}, \quad (1)$$

где  $r$  - отношение концентрации связанного лиганда к концентрации центра связывания в растворе ( $r = C_b/C_{\text{ПНК}}$ ).

В данной работе мы нашли более целесообразным использовать трансцендентную форму уравнения (1), предложенную Корреа с соавт. [3].

$$C_f = -\frac{r}{K_b} \left[ \frac{nr - 1}{nr - r - 1} \right]^{-n} (nr - r - 1), \quad (2)$$

Для решения нашей задачи формула (2) имеет ряд преимуществ по сравнению с (1). Во-первых, в ней не используется отношение  $\gamma/C_r$ , где умножаются, а значит амплифицируются возможные экспериментальные ошибки  $C_r$  и  $\gamma$ . И, во-вторых, оно легче поддается анализу компьютерных алгоритмов по нахождению параметров методом наименьших квадратов. Отметим, что результаты, полученные с использованием формул (1) и (2), различаются не больше, чем на 5%.

На рис. 3 приведен пример использования уравнения (2) для нахождения параметров связывания  $\text{AgTAiP}(\text{P}(4))$  с  $\text{poly}(\text{rA})\text{poly}(\text{rU})$  при  $25^\circ$ . Константа связывания  $K_b = 747922$  и число мест посадки  $n = 1.008$  определяли подгонкой теоретической кривой к экспериментальным данным по методу наименьших квадратов с использованием компьютерной программы Graphpad Prism.

Полученное для  $\text{AgTAiP}(\text{P}(4))$  значение  $n-1$  находится в хорошем согласии с предположением о неинтеркаляционном способе связывания этого порфирина с полинуклеотидами, поскольку при интеркаляции обычно  $n > 1$ .

Аналогичные расчеты для  $K_b$  и  $n$  были проведены для всех четырех типов комплексов (табл. 1). Результаты показывают, что оба порфирина, независимо от способа связывания, почти в 3 раза сильнее взаимодействуют с  $\text{poly}(\text{rA})\text{poly}(\text{rU})$ , чем с  $\text{poly}(\text{rI})\text{poly}(\text{rC})$ .

Таблица 1. Термодинамические параметры связывания порфиринов с РНК.

Порфирин	РНК	$n$	$K_b$ $\times 10^4 \text{ M}^{-1}$	$\Delta G_b$ ккал $\text{M}^{-1}$	$\Delta H_b$ ккал $\text{M}^{-1}$	$\Delta S_b$ кал $\text{M}^{-1} \text{K}^{-1}$
$\text{TAiP}(\text{P}(4))$	$\text{poly}(\text{rA})\text{poly}(\text{rU})$	$4.1 \pm 0.5$	$3.2 \pm 0.1$	$-7.5 \pm 0.1$	$-1.9 \pm 0.3$	$18.8 \pm 1.1$
	$\text{poly}(\text{rI})\text{poly}(\text{rC})$	$2.5 \pm 0.2$	$0.72 \pm 0.01$	$-6.6 \pm 0.1$	$-3.0 \pm 0.4$	$12.1 \pm 1.4$
$\text{AgTAiP}(\text{P}(4))$	$\text{poly}(\text{rA})\text{poly}(\text{rU})$	$1.06 \pm 0.02$	$7.3 \pm 0.2$	$-8.0 \pm 0.1$	$9.6 \pm 0.5$	$58.9 \pm 1.8$
	$\text{poly}(\text{rI})\text{poly}(\text{rC})$	$1.1 \pm 0.04$	$2.7 \pm 0.2$	$-7.4 \pm 0.04$	$8.1 \pm 0.5$	$52.1 \pm 1.9$

\* усреднено по 18, 25, 35, и  $45^\circ$ .

Были рассчитаны также энтальпия и энтропия связывания этих порфиринов с  $\text{poly}(\text{rA})\text{poly}(\text{rU})$  и  $\text{poly}(\text{rI})\text{poly}(\text{rC})$ . Энтальпия связывания  $\Delta H_b$  была найдена по методу Вант-Хоффа. С этой целью эксперименты по титрованию проводили при температурах 18, 25, 35 и  $45^\circ$  и константы связывания рассчитывали при этих температурах. Затем были построены зависимости  $\ln(K_b)$  от обратной температуры для всех четырех комплексов (рис. 4а и 4б). Экспериментальные точки аппроксимировались прямыми линиями и по их наклону определяли  $\Delta H_b = -R[\text{d} \ln K_b / \text{d}(1/T)]_T$ . Была рассчитана также энтропия связывания по формуле  $\Delta S_b = (\Delta H_b - \Delta G_b) / T'$ , где

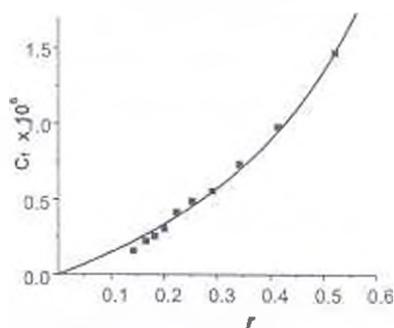


Рис. 3. Зависимость  $C_1$  от  $r$ , полученная по результатам титрования  $\text{AgTAiP}(\text{P}(4))$  с  $\text{poly}(\text{rA})\text{poly}(\text{rU})$  при  $25^\circ$  (точки) и теоретически рассчитанная по формуле (2) кривая ( $K_b = 747922$  и  $n = 1.008$ ).

$\Delta G_n$  - свободная энергия ( $\Delta G_n = -RT \ln K_n$ ), а  $T = 25^\circ$ . В табл. 1 суммированы результаты, полученные для всех четырех комплексов.

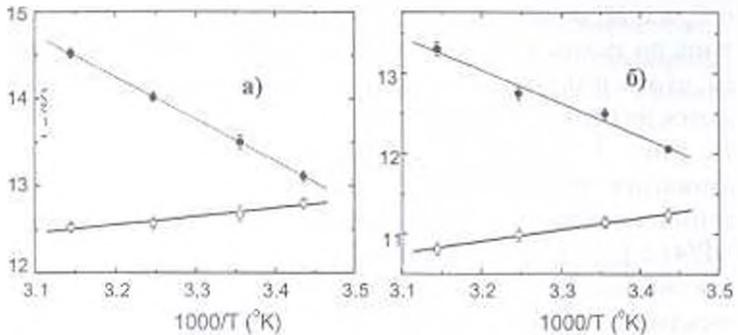


Рис. 4. Зависимость  $\ln(K)$  от  $1/T$  для TAIRyP(4) (•) и AgTAIRyP(4) (○) взаимодействующих с а) poly(rA)poly(rU) и б) poly(rI)poly(rC)

Очевидно, что в отличие от TAIRyP(4), невыгодная ( $\Delta H > 0$ ) энтальпия связывания AgTAIRyP(4) с исследованными полинуклеотидами компенсируется большим выигрышем в энтропии ( $T\Delta S \approx +16$  ккал моль<sup>-1</sup>). Аномально большое значение  $\Delta S$ , скорее всего, является следствием высвобождения противоионов и связанной воды из гидратного слоя РНК при внешнем связывании AgTAIRyP(4). В отличие от него, интеркаляция TAIRyP(4) приводит к повышению жесткости цепи полинуклеотида и, следовательно, к меньшим значениям  $\Delta S$ . Полученный результат указывает на существование корреляции между способом связывания и термодинамическими параметрами взаимодействия порфиринов с нуклеиновыми кислотами.

Работа выполнена в рамках проектов NATO LST.CLG. #979777, ISTC #A-301.2 и NFSAT #MB 078-02 / CRDF #12027.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Bown S.G., Tralau C.J., Smith P.D., Akdemir D., Wieman T.J. J.Cancer. 54(1), 43, 1986.
2. Celandier D.W., Nussbaum J.M. Biochemistry, 35, 12061, 1996.
3. Correia, J.J., Chaires J.B. Methods in Enzymology, 240, 593, 1994.
4. Fiel R.J., Howard J.C., Mark E.H., Dana-Gupta N. Nucl. Acid. Res., 6(9), 3093, 1976.
5. Lee S., Lee Y.-A., Lee H.M., Kim D.H. Biophysical Journal, 83, 371, 2002.
6. Lee Y.-A., Lee S., Lee H.M., Lee C.-S., Kim S.K. The Japanese Biochem. Soc., 133, 343, 2003.
7. McGhee J.D., von Hippel P.H. J. Mol. Biol, 86, 469, 1974.
8. Pasternak R.F. Chirality, 15, 329, 2003.
9. Pasternack R.F., Goldsmith J.I., Szep S., Gibbs E.J. Biophys. Journal, 75, 1024, 1998.
10. Tamiaki H., Matsumoto N., Tsukube H. Tetrahedron Lett., 38, 4239, 1997.
11. Tamiaki H., Unno S., Takeuchi E., Tameshige N., Shinoda S., Tsukube H. Tetrahedron, 59, 10477, 2003.
12. Uno T. et al. Biochemistry, 41, 13059, 2002.
13. Uno T., Hamasaki K., Tanigawa M., Shimabayashi S. Inorg. Chem., 36, 1676, 1997.

Поступила 21.1.2006