

ТЕМПЕРАТУРНА ДЕНАТУРАЦІЯ МОЛЕКУЛЯРНИХ КОМПЛЕКСІВ ОДНОЛАНЦЮГОВОЇ РНК ТИЛОРОНОМ

Проведено изучение тепловой денатурации молекулярных комплексов, образующихся при взаимодействии одноцепочечной РНК бактериофага MS2 с тилороном. Обнаружено некоторое повышение $T_{пл}$ (на $1,1^{\circ}$) и сужение интервала плавления ΔT комплексов (на $5,6^{\circ}\text{C}$) по сравнению с исходной РНК. Величина гиперхромного эффекта комплексов увеличивается практически в два раза. Сделан вывод об образовании в структуре одноцепочечной РНК значительного количества стабильных двухспиральных участков под действием связывания с тилороном. Полученные результаты рассматриваются как дополнительное подтверждение сделанного ранее предположения о том, что при комплексообразовании одноцепочечной РНК с тилороном последний стабилизирует спонтанно образующиеся двухспиральные участки РНК.

Однією із суттєвих характеристик природних і синтетичних дволанцюгових рибополінуклеотидів, здатних індукувати синтез інтерферону, вважають ступінь їх термостабільності, критерієм якої є температура плавлення ($T_{пл}$) подвійної спіралі молекули [1]. При цьому величина $T_{пл}$ у певних межах корелює із здатністю біополімерів індукувати синтез інтерферону.

Тилорон — 2,7-біс-[2-(діетиламіно-етокси)-флуорен]-9-ОН-дигідрохлорид — є індуктором інтерферону, що має протівірусну активність із широким спектром дії [2]. Раніше нами було встановлено, що його взаємодія з одноланцюговою РНК супроводжується характерним комплексоутворенням зі зміною конформації нуклеїнового компонента у бік виникнення двоспіральних фрагментів [3]. Комплексам РНК—тилорон при таманна при цьому інтерфероніндукуюча дія в умовах *in vivo* та *in vitro* [4, 5].

Метою даного дослідження було вивчення параметрів теплової денатурації молекулярних комплексів одноланцюгової РНК з тилороном.

Матеріали і методи

У досліджах використовували препарати одноланцюгової РНК бактериофагу MS2 та гідрохлорид тилорону («Serva», Німеччина). Для отримання вихідних розчинів речовини розчиняли у $0,01\times\text{SSC}$ -буфері ($1\times\text{SSC}$ містить $0,15\text{ M NaCl}$ та $0,015\text{ M}$ цитрат Na). Молекулярний комплекс РНК — тилорон готували змішуючи вихідні розчини, згідно з методикою, описаною нами раніше [3], при співвідношенні тилорон : РНК фосфат — $1:10$ (М/М). Температурну денатурацію РНК та її комплексу з

тилороном проводили у термостатованих комірках спектрофотометра Beckman DU-88 (Австрія) з автоматичною реєстрацією даних при безперервному підвищенні температури зі швидкістю 0,1 °С за хвилину (точність реєстрації температури $\pm 0,1$ °С). Використовували кювети з довжиною оптичного шляху 1 см. Денатураційну криву комплексу отримували у диференційному режимі, додаючи в кювету порівняння таку саму кількість тилорону, як і у складі комплексу. Для характеристики процесу денатурації молекулярних комплексів РНК—тилорон визначали величину $T_{пл}$ як таку, що відповідає половині зміни УФ-поглинання ($\lambda=260$ нм) розчину при плавленні. Інтервал плавлення (ΔT) розраховували за нахилом дотичної до кривої плавлення у її середині [6]. Оскільки оптична густина тилорону в інтервалі 25–55 °С практично не змінюється, то гіперхромний ефект (Н) розраховували за загальновідомою формулою [7]:

$$H, \% = [(A^T - A^{25}) / A^{25}] \times 100\%,$$

де A^{25} та A^T - оптичні густини розчинів РНК та її комплексу з тилороном за 25 °С та температури повної денатурації відповідно.

Результати та обговорення

Загальновідомо, що за температурної денатурації двоспиральних полінуклеотидів, на відміну від одноланцюгових, спостерігається швидке підвищення абсорбції в УФ-діапазоні світла у відносно вузькому інтервалі температур, що свідчить про розрив водневих зв'язків між комплементарними основами спіралей і кооперативний перехід полімеру в стан клубка. Як випливає з рисунка, денатураційна крива фагової РНК має типовий вигляд для одноланцюгових полінуклеотидних структур. Вона показує, що процес плавлення відбувається, принаймні, у дві стадії. Подальшу оцінку $T_{пл}$ цього препарату проводили на першій стадії плавлення, вважаючи її суттєвою для даних дослідів.

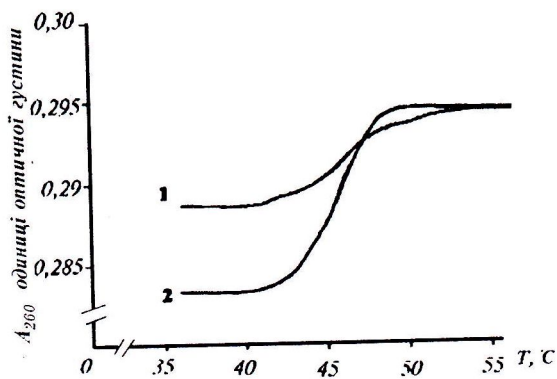
Денатураційна крива комплексу РНК — тилорон істотно відрізняється від денатураційної кривої РНК. Взаємодія тилорону з РНК за температур нижче 40 °С спричинює зменшення поглинання світла в ультрафіолетовому діапазоні (гіпохромний ефект), що відповідає утворенню двоспиральних структур у складі молекули нуклеїнової кислоти. Величина гіпохромізму становить близько 47% від підвищення абсорбції світла комплексу РНК — тилорон при плавленні. Це пояснюється одночасним перебігом двох процесів: розплітання двоспиральних ділянок та десорбції тилорону. Окрім того форма денатураційної кривої змінюється на одностадійну з відповідним звуженням інтервалу плавлення.

Параметри теплової денатурації одноланцюгової РНК бактеріофага MS2 та її комплексу з тилороном наведено в таблиці. Як і очікувалось, значення гіперхромного ефекту та $T_{пл}$ одноланцюгової РНК, яку використовували у низьких концентраціях (10 мкг/мл), щоб уникнути ефекту самоасоціації, при застосуванні низькоіонного розчинника виявилися по-

Параметри теплової денатурації одноланцюгової РНК бактеріофага MS2 та її комплексу з тилороном ($M \pm m$)

Сполука	Гіперхромний ефект, %	Температура плавлення, °С	Інтервал плавлення, °С
РНК	$2,10 \pm 0,05$	$44,8 \pm 0,2$	$15,3 \pm 0,1$
Комплекс РНК — тилорон	$4,05 \pm 0,05$	$45,8 \pm 0,2$	$9,7 \pm 0,1$

рівняно невеликими. Це вказує на невелику кількість двоспиральних ділянок у структурі молекул РНК. Водночас комплексоутворення її з тилороном приводить до подвійного збільшення величини гіперхромізму та незначного підвищення $T_{пл}$ (приблизно на 1 °C). До того ж при утворенні комплексу РНК — тилорон спостерігається значне звуження інтервалу плавлення (на 5,6 °C), що свідчить про кооперативну природу структурного переходу спіраль — клубок, притаманну саме двоспиральним структурам.



Температурна денатурація РНК бактеріофага MS2 та її молекулярного комплексу з тилороном. 1 — MS2; 2 — молекулярний комплекс РНК — тилорон.

Отже наведені дані підтверджують зроблені нами в попередній роботі [3] висновки про те, що взаємодія тилорону з одноланцюговою РНК приводить до стабілізації двоспиральних фрагментів, які спонтанно утворюються в структурі молекул внаслідок часткової комплементарності.

Питання щодо взаємозв'язку інтерферогенної активності полірибонуклеотидів та їхньої $T_{пл}$ остаточно не вирішено. Сучасний погляд на цю проблему зводиться до визнання важливості лише деякого мінімального рівня термостабільності, необхідного для підтримання дволанцюгової структури у фізіологічних температурних умовах (37 °C), вище яких термостабільність майже не має значення [8]. Це саме стосується комплексу одноланцюгової РНК з тилороном.

При інтерпретації отриманих нами даних термодинамічних показників молекулярного комплексу одноланцюгової РНК з тилороном необхідно брати до уваги одну суттєву особливість молекули нуклеїнової кислоти. На відміну від ДНК, де взаємне просторове розміщення комплементарних нуклеотидів є строго фіксованим унаслідок генетично заданої послідовності, у двох частково комплементарних фрагментів одноланцюгової РНК така фіксація відсутня. Зв'язок між нуклеотидами в молекулі може змінюватися внаслідок значно менших термодинамічних обмежень. Такі двоспиральні фрагменти у розчині практично завжди відрізняються за довжиною і до того ж можуть взаємодіяти один з одним одразу в кількох місцях, утворюючи своєрідну «третинну структуру», яка містить дволанцюгові ділянки різної довжини, що перериваються розгалуженнями, петлями і одноланцюговими ділянками. Аналогічна картина спостерігається і у випадку утворення у розчині двоспиральних фрагментів, здатних до індукції синтезу інтерферону шляхом об'єднання одноланцюгових гомополінуклеотидів [1, 9]. Саме наявності сітчастої «третинної структури», поряд з певною довжиною двоспиральних ділянок, відводиться головна роль в індукції інтерферону зазначеними полінуклеотидами у разі їх контакту з клітинами, які індукують інтерферон [10].

У випадку комплексоутворення одноланцюгової РНК з тилороном можуть реалізуватися два типи взаємодії. По-перше, відбувається інтеркаляція тилорону між парами сусідніх основ двоспиральних фраг-

ментів РНК, як і у випадку з ДНК [11, 12]. По-друге, оскільки комплементарні пари основ та гетероциклічне ядро тилорону практично ізоморфні, аміноетильні залишки тилорону можуть утворювати стабілізуючі контакти з фосфатними групами сусідніх ділянок молекул рибонуклеїнової кислоти. При цьому утворюється сітчаста просторова структура, яка є необхідною для ефективної індукції інтерферону [10]. Саме цим, на наш погляд, можна пояснити порівняно велику ефективність молекулярних комплексів одноланцюгової РНК з тилороном як індукторів інтерферону.

A. V. Karpov

THERMAL DENATURATION OF MOLECULAR COMPLEXES FORMED BY SINGLE-STRANDED RNA WITH TILORONE

S u m m a r y

The study of thermal denaturation for molecular complexes formed during interaction between phage MS2 single-stranded RNA and tilorone has been carried out. Both certain increase of T_m (by on 1.1) and the narrowing of complexes melting interval, ΔT , (by 5,6 °C), have been detected. The value of hyperchromic effect, H , increases twice. The conclusion is made concerning the formation of double-stranded regions in single-stranded RNA molecules in the process of RNA—tilorone interactions. These results are discussed as an additional proof of our previous presumption concerning stabilization of spontaneously forming double-stranded RNA regions by tilorone binding.

D. K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

1. Torrence P. T., De Clercq E. Interferon and their applications / Ed. Came P.E. and Carter W. A.-Springer-Verlag. — 1984.— P. 371–383.
2. Mayer G. D., Krueger R. F. Interferon and interferon inducers./ Ed. Stringer D.A. — Dekker: New York. — 1980.— P.187–221.
3. Карпов О. В. // Укр. биохим. журн. — 1997.— 69, № 3. — С. 122–125.
4. Карпов А. В., Жолобак Н. М. // Вопр. вирусологии. — 1996. — № 1. — С.13–16.
5. Карпов А. В., Жолобак Н. М. // Антибиотики и химиотерапия. — 1995. — 40, № 5. — С.20–23.
6. Благой Ю. П., Сорокин В. А., Валеев В. А. и др. // Молекуляр. биология. — 1977.— 11, вып. 4. — С. 748–756.
7. Пермогоров В. И., Тяглов Б. В. // Там же. — 1978. — 12, вып. 5. — С.1050–1056
8. Lampson G. P., Field A. K., Tytell A. A. et al. // Proc. Soc. Exp.— Biol. Med. — 1970. — 135, N 3. — P. 911–916.
9. De Clercq E., Eckstein F., Merigan T. C. // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 1970. — 173, N 1. — P. 444–461.
10. Вильнер Л. М., Тимковский А. П., Тихомирова-Сидорова Н. С. // Итоги науки и техники. Вирусология, Т.6. ВИНТИ АН СССР: — М. — 1977. — С. 114–158.
11. Chandra P., Zunino F., Gaur V. P. et al. // FEBS Lett. — 1972. — 28, N1. — P. 5–9.
12. Chandra P., Zunino F., Zaccara A. et al. // Ibid. — 23, N 2. — P. 145–148.

Ін-т мікробіології та вірусології ім. Д.К.Заболотного
НАН України, Київ

Одержано 13.11.96.