УДК 577.113.57.01.5:578.245.2

Карпов О.В., докт. біол. наук, Жолобак Н.М., інж.,
Манджос О.П., асп., Пенчук Ю.М., асп.,
Співак М.Я., докт. біол. наук

ВИВЧЕННЯ ЗВ'ЯЗКУ СТРУКТУРА-АКТИВНІСТЬ В РЯДУ ЛІГАНДІВ ІНТЕРФЕРОНІНДУКУЮЧИХ МОЛЕКУЛЯРНИХ КОМПЛЕКСІВ З ОДНОЛАНЦЮГОВОЮ РНК

З метою встановлення структурних закономірностей утворення інтерфероніндукуючих молекулярних комплексів одноланцюгова РНК-ліганд вивчали гіпохромний ефект, що спостерігається в УФ-спектрах при комплексоутворені РНК з рядом лігандів. На основі аналізу отриманих величин гіпохромізму зроблено висновок, що головним чинником, який забезпечує відповідний тип комплексоутворення, є здатність ліганду до інтеркаляції. Іншими чинниками можуть виступати розподіл зарядів, а також наявність бічних угрупувань, приєднаних до гетероциклічного ядра лігандів. Вважається, що знайдені закономірності дають можливість проводити цілеспрямоване конструювання низки молекулярних комплексів з інтерфероногенними властивостями.

© Карпов О.В., Жолобак Н.М., Манджос О.П.,
Пенчук Ю.М., Співак М.Я., 2001

To understand structural backgrounds of interferon inducing single-stranded RNA — ligand complex formation, we studied hypochromic effect observed in the UV-spectra in the process of complex formation of several RNA-ligand complex formation. Taking into consideration hypochromism values obtained, the main factor assuring an adequate type of complex formation is ligand's intercalating ability. Other possible factors are charge distribution as well as the presence of side groups bound to heterocyclic ligand nuclei. This data are thought to permit the directed construction of a molecular complex series with the interferonogeneic properties.

Вступ. Конформаційні перетворення та пов'язані з ними фізико-хімічні і біологічні ефекти, що супроводжують взаємодію нуклеїнових кислот з різноманітними лігандами, і у першу чергу з речовинами — інтеркаляторами, як правило вивчаються у комплексах з ДНК. Існуюча інформація щодо поведінки РНК у таких комплексах досить обмежена, що обумовлено відсутністю відомих суттєвих біологічних наслідків взаємодії РНК з лігандами в умовах in vivo.

Недавно нами було встановлено, що взаємодія одноланцюгової РНК з інтеркалюючою сполукою — 2,7–біс[2-(діетиламіно-етоксі)-флуорен]-9-он дигідрохлоридом (тилороном), супроводжується характерним комплексоутворенням з відповідною зміною конформації нуклеїнового компонента у бік утворення стабільних дволанцюгових фрагментів [4]. Був виявлений також і біологічний ефект, пов'язаний з таким комплексоутворенням: отримані комплекси, на відміну від вихідних компонентів, набували здатності індукувати интерферони I типу (a/b-ІФН) в умовах in vivo та in vitro [5]. Мету даної роботи склало більш детальне вивчення знайденого феномену з застосуванням спектрофотометрії.

Матеріали і методи. Як нуклеїновий компонент комплексів використовували препарати одноланцюгової РНК бактеріофагу MS2 ("Serva", ФРН). У якості лігандів використовували етідій бромід, акридиновий оранжовий ("Serva"), актиноміцин Д, адріаміцин та тилорон гідрохлорид ("Sigma", США), а також барвники метиленовий синій, метиленовий зелений, толуїдіновий блакитний і трипафлавін ("Реанал", Угорщина). Препарати феназинхлориду та 2-амінофеназинхлориду були були власноруч синтезовані і люб'язно надані к.х.н. А.Г. Терентьєвим (Інститут молекулярної біології НАНУ). Препарати гідрохлориду мітоксантрону та 2,5-діамінофлуоренон дихлориду були люб'язно надані к.х.н. Д.М. Федоряком (Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАНУ).

Для отримання вихідних розчинів речовини розчиняли в 0,01×SSC-буфері (1×SSC містить 0,15 M NaCl та 0,015 M цитрат Na). Концентрацію РНК в розчинах визначали спектрофотометрично, використовуючи коефіцієнт молярної екстинкції ε_{260} = 7500 л × моль$^{-1}$ × см$^{-1}$ [7]. Концентрацію лігандів задавали, виходячи з ваги. Молекулярні комплекси РНК — ліганди готували прямим змішуванням вихідних розчинів при співвідношенні компонентів 1/1,2 M/M ліганд / РНК (фосфат).

Спектральні характеристики комплексів в УФ-диапазоні визначали за допомогою спектрофотометру "Specord UV-VIS" в диференційному режимі. Гіпохромний ефект визначали, як різницю показників поглинання між зразками нативної РНК та комплексу з відповідним лігандом при λ = 260 nm.

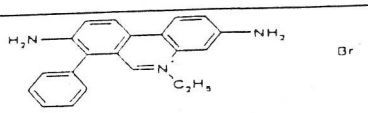
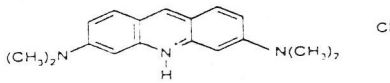
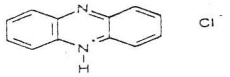
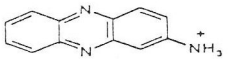
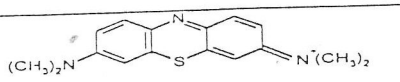
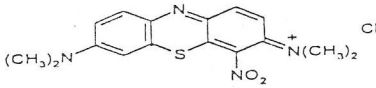
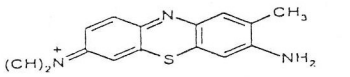
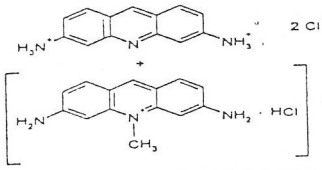
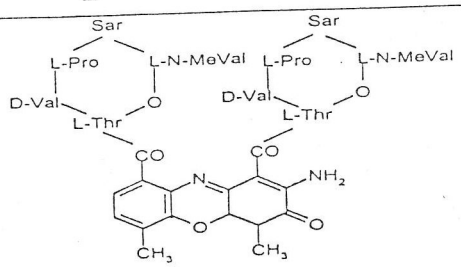
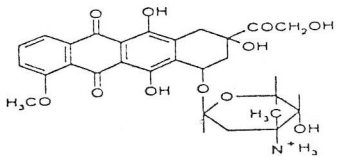
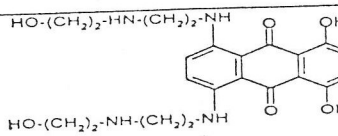
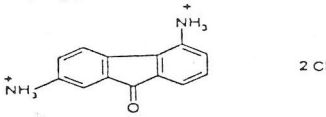
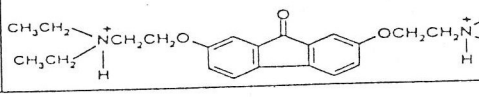
Результати та їх обговорення. При комплексоутворенні нуклеїнових кислот з малими молекулами — лігандами завичай спостерігаються зміни в спектрах поглинання обох компонентів комплексу. Раніш нами було показано, що додання тилорону до одноланцюгової РНК приводить до значних змін абсорбційного спектру останньої. При цьому спостерігалися виражені гіпохромний та батохромний зсуви, до того ж з'являвся новий максимум поглинання в області 280 nm, що свідчило про утворенні в розчині молекулярного комплексу РНК — тилорон з відповідною зміною конформації нуклеїнового компоненту. Виявлений при цьому гіпохромний ефект пояснювався утворенням в структурі однонитьової РНК упорядкованих двоспіральних фрагментів [4].

З метою більш детального вивчення цього феномену проведено спектрофотометричне вивчення комплексів, що утворює така РНК з рядом низькомолекулярних сполук. Вибір досліджуваних сполук обумовлювався можливістю їх зв'язування з нуклеїновими кислотами а також деякими їх структурними особливостями. При цьому, оскільки в УФ-області спектри РНК та деяких з лгандів, що вивчалися, включаючи і тилорон, помітно перекриваються, визначення спектру РНК необхідно було проводити в диференційному режимі, додаючи в кювету порівняння таку ж кількість ліганду, як і та, що знаходилася в складі комплексу. В ході досліджень відслідковували наявність гіпохромного ефекту в сумішах компонентів, відносно вихідної РНК, при довжині хвилі 260 nm, як найбільш суттєвого показника зміни структури нуклеїнового компоненту [2].

Результати цих досліджень, разом з відомостями щодо комплексоутворення досліджених лігандів з ДНК, наведеними з літератури, зведені у Табл. Як видно, у випадку класичних інтеркаляторів — бромістого етідію та акридинового оранжевого, величина гіпохромного ефекту складає 7,14% та 6,52% відповідно. Це явище можно пояснити утворенням в структурі одноланцюгової РНК деякої кількості упорядкованих двоспіральних фрагментів, стабілізованих прошаруванням молекул вказаних лігандів, як і у випадку їх взаємодії з ДНК. Схожий ефект спостерігається і у випадку комплексів з лігандами, близькими за структурою до акридинового оранжового — феназинхлоридом та 2-амінофеназинхлоридом.

При взаємодії з одноланцюговою РНК барвників — метиленового синього та толуїдінового блакитного, які, як встановлено, взаємодіють з одно — та дволанцюговими полінуклеотидами шляхом зовнішнього зв'язування [1], гіпохромізм відсутній. Це вказує на відсутність впливу даних лігандів на вторинну структуру РНК. Гіпохромізм не виявлений також і у суміші РНК з актиноміцином Д, що можно пояснити встановленою раніш нездатністю цього ліганду взаємодіяти з полірибонуклеотидами [1]. Найбільш суттєві величини гіпохромізму виявилися притаманними таким лігандам, як трипафлавін і тилорон (26,39% та 43,33% відповідно). При цьому виявилося, що, на від-

Таблиця 1. Характеристика комплексів, які утворюються при взаємодії нуклеїнових кислот з лігандами

Сполука	Структурна формула	Механізм зв'язування з ДНК*	Гіпохромний ефект нуклеїнового компоненту при зв'язуванні з одноланцюговою РНК (Н, %)
Етидій бромід		інтеркаляція [13]	7,14
Акридиновий оранжевий		інтеркаляція [9]	6,52
Феназін хлорид		НВ	3,03
2-амінофеназін хлорид		НВ	5,88
Метиленовий синій		зовнішнє зв'язування [1,10]	0
Метиленовий зелений		НВ	0
Толуїдіновий блакитний		зовнішнє зв'язування [10]	0
Трипафлавін (флавакридин гідрохлорид)		інтеркаляція [11]	26,39
Актиноміцин Д		інтеркаляція [11]	0
Адріаміцин		інтеркаляція [3]	12,17
Мітоксантрон гідрохлорид		інтеркаляція [2]	23,75
2,5-діаміно-флуоренон дихлорид		інтеркаляція [8]	18,66
Тилорон гідрохлорид		інтеркаляція [8]	43,33

* НВ - механізм взаємодії не визначено

міну від абсорбційних спектрів РНК у присутності бромістого етідію та акридинового оранжевого, в яких, за винятком зменшення оптичної щільності в диапазоні дожин хвиль 250–270 nm ніяких інших відмінностей в порівнянні зі спектром нативної РНК не спостерігалося, у абсорбційних спектрах комплексів РНК — тилорон та РНК — трипафлавін відмічається не тільки гіперхромний, але і батохромний зсув, що свідчить про більш суттєві конформаційні зміни нуклеїнового компонента таких комплексів.

Можливо, що такі суттєві відмінності спектральних параметрів комплексів класичних інтеркаляторів з одноланцюговою РНК з одного боку, та комплексів РНК — тилорон та РНК — трипафлавін з іншого, обумовлені слідуючою обставиною. Встановлено, що позитивний заряд тилорону, на відміну від більшості трициклічних сполук такого типу, включаючи і вищезгадані інтеркалятори, не є локалізованим в середині ароматичного хромофору молекули [12, 14]. З іншого боку, відомо, що трипафлавін являє собою суміш гідрохлориду 3,6-діаміно-10-метилакридиній хлориду та дігідрохлориду 3,6-діаміноакридину [6]. При цьому останній компонент суміші характеризується близькою до тилорону локалізацією позитивного заряду. Вважається ймовірним, що саме ця обставина може обумовлювати специфічний тип взаємодії вказаних сполук з одноланцюговою РНК, відображенням чого є отримані спектральні характеристики комплексів. Щодо досить суттєвих значень гіпохромного ефекту, отриманих у випадках комплексів РНК з адріаміцином та гідрохлоридом мітоксантрону, то вони, напевне, пояснюються наявністю у молекулах цих сполук значних бічних угрупувань (цукрового залишку у адріаміцина, та подовжених аліфатичних залишків — у гідрохлорида мітоксантрону), поєднаних з їх гетероциклічними ядрами. При взаємодії вказаних сполук з нуклеїновими кислотами такі угрупування здатні забезпечити додаткову стабілізацію комплексів шляхом утворення водневих зв'язків з цукрофосфатним каркасом. Це ж справедливо і для спорідненої з тилороном сполуки — 2,5-діамінофлуоренон дихлориду, де позитивно заряджені NH_3-групи можуть здійснювати електростатичні контакти з негативно зарядженими фосфатами нуклеїнової кислоти.

Підсумовуючи можна зазначити, що утворення стабілізованих лігандами двоспіральних ділянок у складі одноланцюгової РНК, віддзеркаленням чого є гіпохромний ефект, обумовлюється багатьма структурними особливостями конкретного ліганду, головною з яких є здатність до інтеркаляції. Оскільки наявність дволанцюгової структури є головною умовою прояву молекулами РНК інтерфероногенної дії, подальший пошук лігандів з відповідними структурними характеристиками може забезпечити створення цілого спектру молекулярних комплексів — перспективних індукторів інтерферонів.

1 *Гейл Э., Кандлифф Э., Рейнолдс П.* Молекулярные основы действия антибиотиков. — М.: Мир. — 1975 — С. 199–307. 2. *Зенгер В.* Принципы структурной организации нуклеиновых кислот — М.: Мир. — 1987 — С. 67–68. 3. *Кантор Ч., Шиммел П.* Биофизическая химия. — М., "Мир" — 1984 — Т.2 — С. 32–34. 4. *Карпов О.В.* Спектрофотометричне вивчення взаємодії одноланцюгової РНК з тилороном. // Укр. биохим. журн. — 1997 — Т.69, №3 — С. 122–125. 5. *Карпов О.В., Жолобак Н.М.* Інтерфероногенні властивості комплексів дріжджова РНК-тилорон // Доп. НАН України — 1996 — №3 — С. 128–131. 6. *Краткая* химическая энциклопедия — М.: "Советская энциклопедия" — 1967 — Т.5 — С. 266. 7. *Методы* исследования нуклеиновых кислот / Под ред. А.Н. Белозерского — М.: Мир. — 1970 — С. 277–280. 8. *Chandra P., Zunino F., Gaur V.P.* et al. Mode of tilorone hydrochloride interaction to DNA and polydeoxyribonucleotides // FEBS Lett. — 1972 — Vol.28 — P .5 — 9. 9. *Lerman L.S.* Structural considerations in the interaction of DNA and acridines // J. Mol. Biol. — 1961 — Vol.3 — P. 18–30. 10. *Neidle S.* The molecular basis for the action of some DNA-binding drugs // Progr. Med. Chem. — 1979 — Vol.16 — P. 151–221. 11. *Sobell H.M.* The stereochemistry of actinomycin binding to DNA and its implications in molecular biology // Progr. Nucl. Asids Res. Mol. Biol. — 1973 — Vol.13 — P. 153–190. 12. *Wakelin L.P., Waring M.J.* The unwinding of circular deoxyribonucleic acid by phenanthridinium drugs: structure-activity relations for the intercalation reaction // Mol. Pharmacol. — 1974 — Vol. 10 — P. 554–561. 13. *Wilson W.D., Krishnamoorthy C.R., Wang Y.-H., Smith J.C.* Mechanism of intercalation: Ion effects on the equilibrium and kinetic constants for the interaction of propidium and ethidium with DNA // Biopolymers — 1985 — Vol.24 — P. 1941–1961. 14. *Wright R.G.McR., Wakelin L.P.G., Fieldes A.* et al. Effects of ring substituents and linker chains on the bifunctional intercalation of diacridines into deoxyribonucleic acid // Biochemistry — 1980 — Vol.19 — P. 5825–5836.