

Вивчення кількісних характеристик комплексоутворення тилорону з полінуклеотидами різного походження

О. В. Карпов, С. М. Храпунов¹, А. В. Сиволоб¹

Інститут мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України
252143, Київ, вул. Академіка Заболотного, 154

¹Національний університет імені Тараса Шевченка
252033, Київ, ул. Володимирська, 64

За допомогою спектрофотометрії вивчали термодинамічні параметри зв'язування дигідро-хлористої солі 2,7-біс[2-(діетил-аміно)етокси]-флуорен-9-ону (гідрохлорид тилорону) з нуклеїновими кислотами. Визначено, що константи зв'язування для ДНК та poly(U) дорівнюють $5,3 \cdot 10^5$ та $4,7 \cdot 10^4$ M^{-1} відповідно, у той час як розмір сайтів зв'язування для цих полінуклеотидів становить відповідно приблизно 2 пари основ і 1 нуклеотид. Аналіз ізотерм зв'язування для нативної дріжджової РНК показав, що константи зв'язування для одноланцюгових і двоспіральних ділянок дорівнюють $1,3 \cdot 10^5$ та $1,1 \cdot 10^4$ M^{-1} відповідно. Частка двоспіральних ділянок у структурі РНК досягла 32 %, що значно вище згаданої кількості, раніше визначеної для тих же зразків РНК у відсутності тилорону. Зроблено висновок про високу здатність тилорону стабілізувати двоспіральні ділянки в складі РНК. Обговорюються біологічні аспекти цієї властивості тилорону, зокрема, її значення для індукції інтерферону.

Вступ. Дигідрохлориста сіль 2,7-біс[2-(діетил-аміно)етокси]-флуорен-9-ону, відома як гідрохлорид тилорону, має структурну формулу, наведену на схемі.

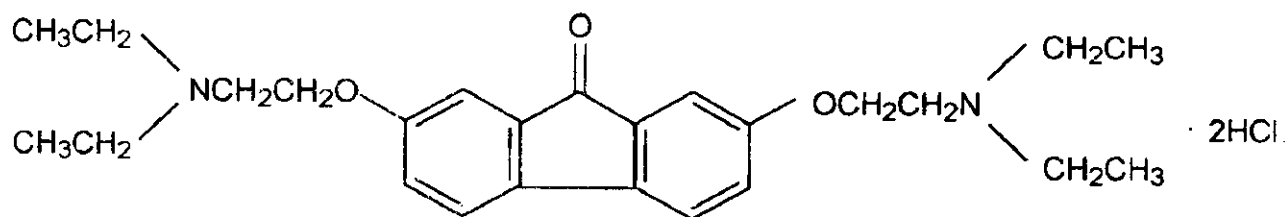
Гідрохлорид тилорону є першою синтетичною сполукою, для якої було доведено, що вона здатна індукувати інтерферон *in vivo* [1]. З часу його відкриття накопичено багато даних щодо його біологічних властивостей [2] та структурно-функціональних особливостей [3—6]. Зокрема встановлено, що ця сполука зв'язується з ДНК шляхом інтеркаляції свого гетероциклічного ядра між парами азотистих основ [3, 4, 6].

Інтерес до цієї сполуки виник знову з огляду на те, що недавно було встановлено її здатність утворювати специфічні комплекси з одноланцюговою РНК. Виявилося, що такі комплекси індують інтерферон як *in vivo*, так і *in vitro* в умовах, за яких компоненти цих комплексів самі по собі вказаної здатності позбавлені [7, 8]. У

зв'язку з цим метою даної роботи склала кількісна оцінка параметрів комплексоутворення тилорону з природними нуклеїновими кислотами та синтетичними полінуклеотидами.

Матеріали і методи. В роботі використано високополімерну тимусну ДНК («Sigma», США), препарат поліуридилової кислоти poly(U) («Reanal», Угорщина) та комерційний препарат дріжджової РНК (рибосомна фракція РНК дріжджів *Saccharomyces*, «Біохімреактив», Латвія). Останню додатково очищали потрібною фенольною депротейнізацією з подальшим осадженням етанолом згідно зі стандартною методикою [7]. Як мономолекулярний компонент комплексів використовували гідрохлорид тилорону виробництва «Serva» (Німеччина).

Молекулярні комплекси готували простим змішуванням вихідних розчинів. Спектрофотометричні дослідження здійснювали при довжині хвилі 271 нм за допомогою спектрофотометру СФ-46 («Ломо», Росія) в $0,5 \times 1$ см кварцевих кюветах. Всі виміри проводили при 25 °С в ТЕ-буфері (10 мМ



Схема

трис-НСІ, 1 мМ ЕДТА, рН 7,5). Концентрацію нуклеїнових кислот та тилорону визначали спектрофотометрично.

Ізотерми зв'язування тилорону з полінуклеотидами будували в координатах Скетчарда [9]. Для визначення термодинамічних параметрів (констант асоціації та розміру сайтів зв'язування) застосовували стандартний метод найменших квадратів.

Результати та обговорення. У випадку прямої взаємодії між нуклеїновою кислотою та біологічно активною сполукою спостерігається зміна спектрів компонентів. У спектрі поглинання тилорону існують дві смуги поглинання з максимумами 271 та 470 нм, причому довгохвильова смуга має низьку ефективність. Коефіцієнт молярної екстинкції тилорону при 271 нм (ϵ_p), розрахований нами, складає $74500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. У присутності ДНК та РНК екстинкція в зоні короткохвильової смуги значно зменшується. Коефіцієнти екстинкції (ϵ_p) для тилорону, який повністю зв'язаний з нуклеїновою кислотою, вимірювали в присутності надлишку нуклеїнової кислоти за допомогою екстраполяції залежності абсорбції при різних концентраціях до нескінченної концентрації комплексу. Цей коефіцієнт для ДНК виявився рівним $17650 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, а у випадках роу(U) та РНК він мав однакове значення — $34000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Далі будували ізотерми зв'язування тилорону з полінуклеотидами, використовуючи такі розрахунки. Якщо загальна концентрація тилорону в розчині є C , тоді частина зв'язаного барвника θ визначається із співвідношення

$$\theta = \frac{\epsilon_f - A/C}{\epsilon_f - \epsilon_b}, \quad (1)$$

де A — виміряна абсорбція. Концентрація L вільного барвника в розчині дорівнює, таким чином, L

$= (1 - \theta)C$, а густина зв'язування тилорону (кількість молекул барвника на один нуклеотид) складає $r = \theta C / C_p$, де C_p є загальною концентрацією нуклеїнової кислоти (в молях нуклеотидів).

Згідно з моделлю виключених місць зв'язування [10] рівняння для ізотерми зв'язування інтеркалюючого барвника з двоспіральною нуклеїновою кислотою у координатах Скетчарда має вигляд

$$r/L = \frac{K(1 - 2nr)^n}{[1 - 2r(n - 1)]^{n-1}}, \quad (2)$$

де K — константа зв'язування; n — кількість пар основ, виключених для іншого ліганда кожним зв'язаним лігандом.

Для випадку одноланцюгової нуклеїнової кислоти ізотерма зв'язування у загальному вигляді описується рівнянням

$$r/L = \frac{K(1 - nr)^n}{[1 - r(n - 1)]^{n-1}}, \quad (3)$$

де n є величиною сайту зв'язування в нуклеотидах. Експериментальні дані, встановлені для ДНК і роу(U), були отримані згідно з рівняннями (2) та (3) відповідно. За допомогою стандартної процедури найменших квадратів визначали значення K і n як таких, що мінімізують суму квадратів відхилень експериментальних показників.

Ізотерма адсорбції тилорону на ДНК у координатах Скетчарда, наведена на рис. 1, має досить типовий вигляд для випадку, коли ліганд займає на ДНК ділянку, більшу ніж одна пара основ. При цьому константа зв'язування тилорону з ДНК склала $(5,3 \pm 0,05) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, а розмір сайту ДНК, зайнятого однією молекулою тилорону — $1,90 \pm 0,05$, тобто близько 2 пар основ. Ці значення практично збігаються з даними, отриманими в

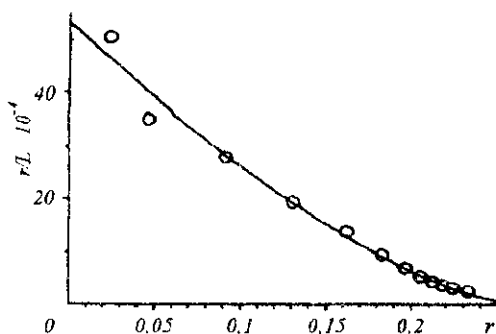


Рис. 1. Ізотерма зв'язування тилорону з тимусною ДНК

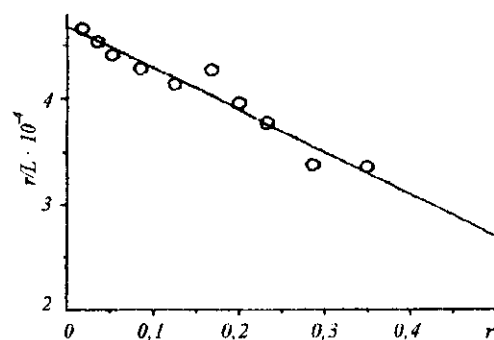


Рис. 2. Ізотерма зв'язування тилорону з синтетичним полінуклеотидом poly(U)

аналогічних умовах для гетеродезоксирибонуклеотидів різного складу [5].

Ізотерма адсорбції тилорону на синтетичному одноланцюговому полірибонуклеотиді poly(U) (рис. 2) свідчить, що тилорон у цьому випадку має менш тісні контакти з основами. Константа зв'язування тилорону з poly(U) склала $(4,7 \pm 0,1) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, а сайт зв'язування — $0,92 \pm 0,08$, тобто приблизно 1 нуклеотид.

Далі вивчали взаємодію тилорону з дріжджовою РНК, що містить у своєму складі як одноланцюгові, так і двоспіральні ділянки. У цьому випадку ізотерми зв'язування будували, виходячи з наступних розрахунків. Якщо фракція нуклеотидів f знаходиться у складі двоспіральних ділянок РНК, тоді, беручи за основу рівняння (2) і (3), а також те, що n дорівнює 2 парам основ та 1 нуклеотидові для двоспіральних та одноланцюгових нуклеїнових кислот відповідно, отримуємо для одноланцюгових ділянок

$$r_1/L = K_1(1 - f - r_1) \quad (4)$$

і для двоспіральних —

$$r_2/L = \frac{K_2(f - 4r_2)^2}{f - 2r_2}, \quad (5)$$

де r_1 , r_2 та K_1 , K_2 є густинами зв'язування і константами зв'язування для одноланцюгових і двоспіральних ділянок відповідно. Виходячи з припущення, що фракція f істотно не змінюється при збільшенні загальної густини зв'язування тилорону з РНК r , рівняння (4) і (5) разом з очевидною умовою $r = r_1 + r_2$ описують ізотерму зв'язування тилорону з РНК. Величини K_1 , K_2 та f було отримано за допомогою методу найменших квадратів згідно з наведеною вище системою рівнянь.

Базуючись на значеннях ізотерми адсорбції тилорону на РНК, що наведена на рис. 3, ми отримали величини констант зв'язування тилорону з двоспіральними ($K_1 = 1,3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$) та одноланцюговими ($K_2 = 1,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$) ділянками в структурі РНК. Величини цих параметрів вказують на термодинамічну вигідність зв'язування тилорону саме з двоспіральними ділянками. До того ж, як показує аналіз, середня частка нуклеотидів у складі двоспіральних ділянок у присутності тилорону становить 32%. Водночас показано, що препарат РНК, який використовувався в нашій роботі (рибосомна фракція РНК дріжджів *Saccharomyces*) у вихідному стані містить у своєму складі 16% дволанцюгових ділянок [11]. Таким чином, комплексоутворення тилорону з цією РНК призводить до подвоєння частки двоспіральних ділянок у складі останньої.

Аналіз експериментальних даних, наведених у цій роботі, ґрунтується на спрощуючому припущенні про незмінність частки двоспіральних ділянок у процесі титрування РНК за допомогою тило-

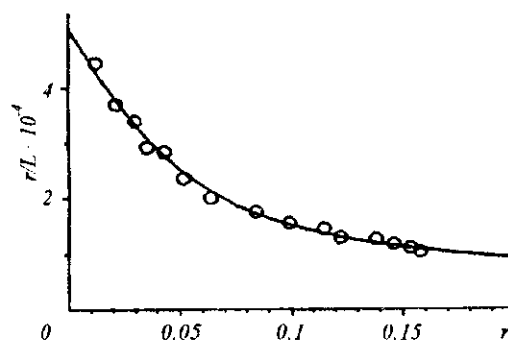


Рис. 3. Ізотерма зв'язування тилорону з дріжджовою РНК

рону. Факт, що використана для розрахунків модель задовільно описує експериментальні дані, вказує на суттєве збільшення вже при дуже низьких густинах зв'язування під дією тилорону вмісту двоспіральних структур в РНК, і далі цей вміст мало залежить від густини зв'язування тилорону.

Відомо, що структура одноланцюгових гетерополінуклеотидів, що знаходяться у розчині, зазнає впливу динамічних змін утворення і розпаду великої кількості ділянок з частковою комплементарністю [12]. За даних умов тилорон, інтеркалюючи між парами основ двоспіральних ділянок, що тільки-но утворилися, зсуває динамічну рівновагу системи саме в бік накопичення вказаних двоспіральних фрагментів, виступаючи в ролі своєрідного «закріплювача» такої структури. Цьому може сприяти і та обставина, що позитивний заряд тилорону не локалізований на ароматичному хромофорі [6], а приєднані до нього бокові ланцюги можуть потенційно проєктуватися у боріздки двоспірального полінуклеотиду, збільшуючи енергію зв'язування за рахунок гідрофобної взаємодії [5, 6].

Відомо, що інтерферогенна здатність індукторів нуклеотидної природи залежить передусім як від наявності в складі їх мономерних компонентів рибози, так і від вторинної структури полімерів — присутності достатньої кількості двоспіральних ділянок [12]. Саме такі стабільні двоспіральні ділянки комплексів дріжджова РНК — тилорон можуть зумовлювати інтерферогенну дію в умовах *in vivo* та *in vitro*, яка виявлена раніше [7, 8].

А. В. Карпов, С. Н. Хрпунув, А. В. Сиволоб

Изучение количественных характеристик комплексообразования тилорона с полинуклеотидами различного происхождения

Резюме

С помощью спектрофотометрии изучали термодинамические параметры связывания дигидрохлоридной соли 2,7-бис[2-(диэтил-амино)этокси]-флуорен-9-она (гидрохлорид тилорона) с нуклеиновыми кислотами. Определено, что константы связывания для ДНК и poly(U) равны $5,3 \cdot 10^5$ и $4,7 \cdot 10^4$ M^{-1} соответственно, в то время как размер сайтов связывания для этих полинуклеотидов составляет приблизительно 2 пары оснований и 1 нуклеотид соответственно. Анализ изотерм связывания для нативной дрожжевой РНК показал, что константы связывания для одноцепочечных и двоспиральных участков равны $1,3 \cdot 10^5$ и $1,1 \cdot 10^4$ M^{-1} соответственно. Доля двоспиральных участков в структуре РНК достигала 32 %, что значительно выше указанного количества, ранее определенного для тех же образцов РНК в отсутствие тилорона. Сделан вывод о высокой способности тилорона стабилизировать двоспиральные участки в составе РНК. Обсуждаются биологические аспекты этого свойства тилорона, в частности, его значение для индукции интерферона.

A. V. Karpov, S. N. Khrapunov, A. V. Sivolob

Study of the quantitative characteristics of tilorone complexation with polynucleotides of various origin

Summary

Thermodynamic parameters of tilorone hydrochloride (dihydrochloride salt of 2,7-bis[2-(diethyl-amino)ethoxy]-fluoren-9-one) binding to nucleic acids are measured spectrophotometrically. It is found that the binding constants for DNA and poly(U) are $5,3 \cdot 10^5$ M^{-1} and $4,7 \cdot 10^4$ M^{-1} respectively, while the binding site sizes for these polynucleotides are, respectively, about 2 bp and 1 nucleotide. The analysis of binding isotherm for native yeast RNA shows that the binding constants for double- and single-stranded regions are $1,3 \cdot 10^5$ M^{-1} and $1,1 \cdot 10^4$ M^{-1} respectively. The fraction of double-stranded regions in the RNA is found to be 32 %, the value which are considerably higher than the value previously reported for the same RNA sample in the absence of tilorone. A tilorone high ability of stabilizing double-stranded RNA regions is suggested and biological applications of this ability, especially for interferon induction, are discussed.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Mayer G. D., Krueger R. F. Tilorone hydrochloride: mode of action // Science.—1970.—169, N 3951.—P. 1214—1215.
2. Mayer G. D., Krueger R. F. Tilorone hydrochloride and related molecules // Interferon and interferon inducers / Ed. D. A. Stringfellow.—New York: Dekker, 1980.—P. 187—221.
3. Chandra P., Zunino F., Gaur V. P. et al. Mode of tilorone hydrochloride interaction to DNA and polydeoxyribonucleotides // FEBS Lett.—1972.—28.—P. 5—9.
4. Chandra P., Zunino F., Zaccara A. et al. Influence of tilorone hydrochloride on the secondary structure and template activity of DNA // Ibid.—1972.—23.—P. 145—148
5. Daune M., Sturm J., Zana R. Temperature-jump study of tilorone binding on poly dA poly dT // Stud. biophys.—1976.—57.—P. 139—144.
6. 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.—19, N 5.—P. 5825—5836.
7. Карпов А. В., Жолобак Н. М. Продукция интерферонов I типа в организме под действием молекулярных комплексов дрожжевая РНК — тилорон // Вопр. вирусологии.—1996.—1.—С. 13—16.
8. Карпов А. В., Жолобак Н. М. Изучение интерферогенных свойств комплексов дрожжевая РНК — тилорон в культуре клеток // Антибиотики и химиотерапия.—1995.—40, № 5.—С. 20—23.
9. Crothers D. M. Calculation of binding isotherms for heterogeneous polymers // Biopolymers.—1969.—6.—P. 575—584.
10. McGhee J. D., von Hippel P. H. Theoretical aspects of DNA-protein interactions: cooperative and non-cooperative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice // J. Mol. Biol.—1974.—86, N 2.—P. 469—489.
11. Аксенов О. А., Головин Б. П., Смородинцев А. А. Анти-вирусное действие производных дрожжевой РНК и влияние на него поликатионов // Вестн. АМН СССР.—1970.—№ 8.—С. 51—58.
12. Torrence P. T., De Clercq E. Interferon induction by nucleic acids: structure-activity relationships // Interferon and their applications / Ed. P. E. Came, W. A. Carter.—Berlin: Springer, 1984.—P. 371—383.

Надійшла до редакції 26.05.97