

УДК 573.3:547.963.3

Л. Р. АЛОЯН, Г. В. АНАНЯН, В. И. ВАРДАНЯН, Е. Б. ДАЛЯН

## ВЛИЯНИЕ БОКОВЫХ ГРУПП ПОРФИРИНОВ НА ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ДНК

Методами спектрофотометрии и кругового дихроизма исследовано взаимодействие мезо-тетра-(3N-пиридил)порфиринов, отличающихся боковыми радикалами, с ДНК. Показано, что при низких концентрациях порфиринов все они предпочтительнее взаимодействуют с ДНК по интеркаляционному механизму. Для этого типа взаимодействия были рассчитаны константа связывания ( $K_b$ ) и число мест посадки ( $n$ ) порфиринов на ДНК по методу, предложенному Корреа с соавторами.

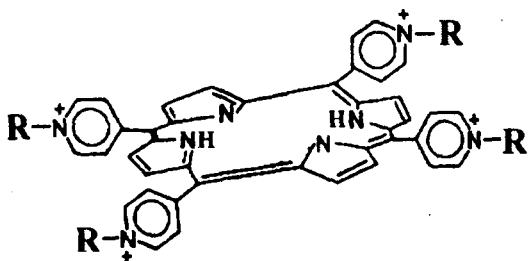
**Введение.** Изучению взаимодействия порфиринов с ДНК посвящено очень много работ (см., напр., [1–4]). Интерес вызван возможностью использования порфиринов – биологически активных веществ – в качестве противогрибковых, противовирусных и антибактериальных средств [5, 6]. Установлены механизмы их связывания с ДНК, однако все результаты и выводы, касающиеся этого взаимодействия, были получены для водорастворимого мезо-тетра-метилпиридилпорфирина (TMPyP). В литературе очень мало работ, посвященных изучению роли боковых радикалов в механизме связывания порфиринов с ДНК. Возможно, это обусловлено тем, что имеются определенные трудности в синтезе водорастворимых порфиринов, используемых для такого рода исследований. Эта задача весьма актуальна, поскольку не исключено, что медико-биологическая активность многих порфиринов может быть обусловлена именно типом боковых радикалов на пиридиловом кольце.

В данной работе методами спектрофотометрии и кругового дихроизма (КД) исследовано взаимодействие ДНК с новыми водорастворимыми мезо-тетра-(3N-метилпиридил)порфиринами, содержащими разные боковые радикалы (оксизтил (OE), бутил (But), аллил (Al), метиллил (MetAl)).

**Материалы и методы.** В работе был использован сверхчистый препарат высокомолекулярной ДНК тимуса теленка, выделенный в лаборатории Д.Ю. Ландо в ИБОХ АН Республики Беларусь. На схеме приведены мезо-тетра-(3N-оксизтилпиридил)порфирин (TOEPyP(3)), мезо-тетра-(3N-бутилпиридил)порфирин (TButPyP(3)), мезо-тетра-(3N-аллилпиридил)порфирин (TAlPyP(3)), мезо-тетра-(металлилпиридил)порфирин (TMetAlPyP(3)), которые были синтезированы на кафедре фармакологической химии ЕГМУ со

гласно методике, описанной в работе [3]. Область исследованных концентраций порфиринов –  $10^{-6}$ – $10^{-4}$  M, что в пересчете на пару нуклеотидов ДНК составляет  $0,001 < \nu < 1$ , где  $\nu = C_{\text{порф}}/C_{\text{пар основ}}$ . Исследования проводились в буферном растворе 0,1 BPSE (1 BPSE = 6 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 2 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  + 185 mM  $\text{NaCl}$  + 1 mM EDTA), pH = 7,2, ионная сила  $[\text{Na}^+] = 0,02$ .

Спектры титрования снимались на спектрофотометре Lambda 800 UV-VIS, а спектры КД – на дихрографе Roussel Jouan-II.



- R =  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$  (OE);
- R =  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$  (But);
- R =  $\text{CH}_2\text{-CH=CH}_2$  (Al);
- R =  $\text{CH}_2\text{-C}(\text{-CH}_3)=\text{CH}_2$  (MetAl).

### Результаты и обсуждение.

**Спектры титрования.** Электронный спектр поглощения порфиринов характеризуется широкой малоинтенсивной полосой в УФ-области и несколькими узкими интенсивными пиками в видимой области света. Исследовать взаимодействие данных порфиринов с ДНК удобно при наблюдении за изменением максимума высокоинтенсивной полосы около 420 нм (пик Core). На рис. 1 приведены спектры поглощения исследуемых комплексов при различных концентрациях ДНК, которые добавлялись к раствору порфирина неизменной концентрации малыми порциями (по 2 мкл) из маточного раствора.

Как видно из рис. 1, увеличение концентрации ДНК приводит к уменьшению интенсивности этой полосы с bathochromным сдвигом. Скорее всего, этот эффект может быть следствием упорядоченной стопкообразной упаковки порфиринов на ДНК как на матрице. К такой упаковке могут приводить как интеркаляция, так и внешнее упорядоченное желобковое связывание порфиринов с ДНК. В первом случае имеют место стекнинг-взаимодействия типа порфирин–основание–порфирин, во втором случае – типа порфирин–порфирин.

На спектрах титрования всех исследуемых комплексов порфирин–ДНК изобестическая точка наблюдается только при определенных значениях  $\nu$ . Отсутствие четкой изобестической точки свидетельствует о том, что реализуется не один тип взаимодействия. К аналогичным выводам мы приходим и при исследовании спектров КД комплексов ДНК с TButPyr(3) и TAIPyr(3).

**Спектры КД.** Известно, что для комплексов ДНК–порфирин спектры КД проявляются в виде двух полос. Первая из них в УФ-области спектра совпадает с полосой естественного КД ДНК (220–310 нм), а вторая – в видимой области (400–470 нм) – полоса индуцированного порфиринами КД (ИКД). Сами порфирины, являясь симметричными соединениями, не проявляют кругового дихроизма во всей области своих электронных переходов. Поскольку выше 310 нм ДНК прозрачна, а порфирины имеют сильную полосу поглоще-

ния в области 400–450 нм (полоса Soret), то предполагается, что полоса ИКД комплекса в видимой области обусловлена упаковкой порфиринов на ДНК.

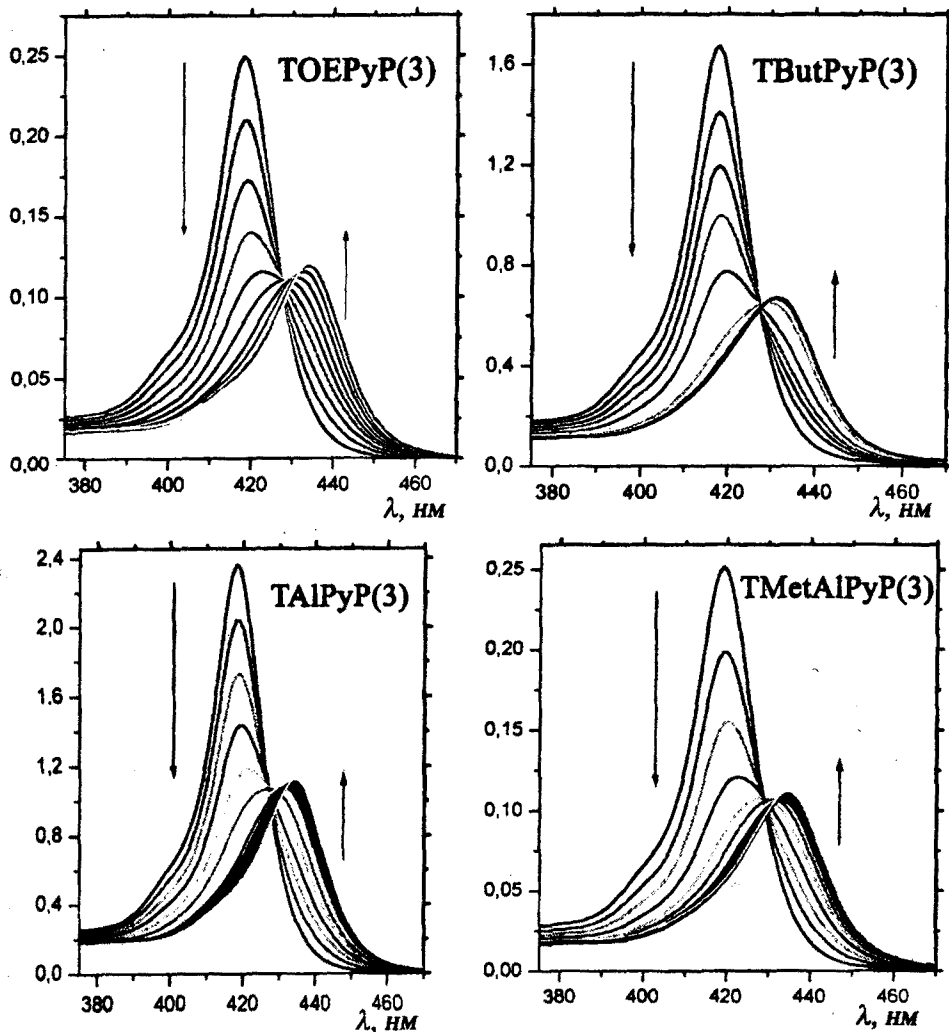


Рис. 1. Спектры поглощения комплексов порфиринов с ДНК.

На основании многочисленных экспериментов, проведенных с комплексами TMPyP–ДНК, установлено, что знак КД-сигнала в видимой области может служить тестом для определения типа связывания порфиринов с ДНК: отрицательное значение ИКД – признак интеркаляционного связывания, а положительное – внешнего упорядоченного связывания [3, 7].

Обычно для интерпретации конформационных перестроек ДНК под воздействием того или иного лиганда исследуется изменение полосы естественного КД ДНК в УФ-области. Однако при взаимодействии с порфиринами невозможно однозначно судить о характере конформационных перестроек ДНК, поскольку исследуемые порфирины имеют собственную полосу поглощения в районе 260 нм в УФ-области и могут стать оптически активными при связывании с ДНК. Поэтому не исключено, что изменения в УФ-области

КД-спектров комплексов могут быть вызваны наличием новой индуцированной порфиринами полосы КД, а не конформационными перестройками в молекуле ДНК.

На рис. 2 приведены КД-спектры комплексов ТОЕРуР(3)-ДНК и ТАІРуР(3)-ДНК (КД-спектры были получены для всех исследуемых комплексов). Для комплекса с ТОЕРуР(3) (а также с ТMetAlPyP(3)) наблюдаются отрицательные ИКД-спектры, а для комплекса с ТАІРуР(3) (ТВutPyP(3)) отрицательное значение ИКД наблюдается только при малых относительных концентрациях порфиринов ( $\nu$ ). Дальнейшее увеличение  $\nu$  приводит к тому, что на спектрах ИКД появляется также положительная часть.

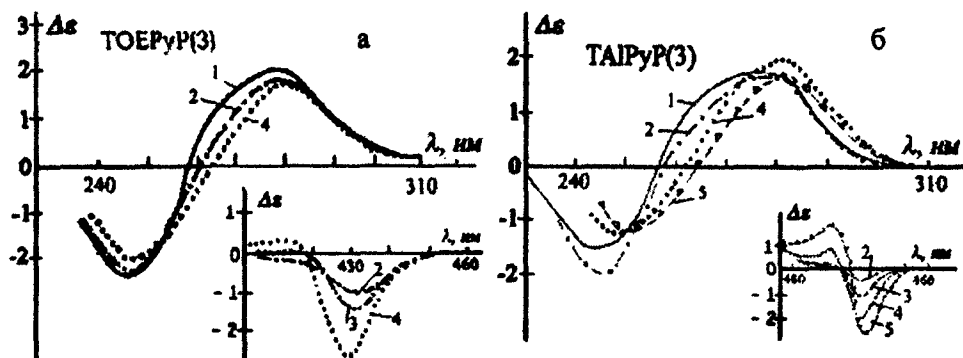


Рис. 2. Спектры КД комплексов ДНК с ТОЕРуР(3) и ТАІРуР(3) при различных относительных концентрациях порфиринов  $\nu = C_{\text{порф}}/C_{\text{пар.основ.}}$ : а) 1 -  $\nu=0$ ; 2 - 0,08; 3 - 0,15; 4 - 0,77; б) 1 -  $\nu=0$ ; 2 - 0,07; 3 - 0,20; 4 - 0,70; 5 - 2,00.

Резюмируя вышеизложенное, можем прийти к следующему выводу: ТОЕРуР(3) и ТMetAlPyP(3) связываются с ДНК способом интеркаляции, а для ТВutPyP(3) и ТАІРуР(3) реализуется как интеркаляция ( $\nu \leq 0,2$ ), так и внешнее связывание при относительно высоких концентрациях порфиринов ( $\nu \geq 0,2$ ).

*Расчет параметров связывания.* Данные, полученные по титрованию порфиринов с ДНК, были использованы нами для расчетов параметров связывания при интеркаляционном способе связывания:  $K_b$  - константа связывания,  $n$  - число пар оснований, которые становятся недоступными при связывании одного порфирина. Для этого брали интервал концентраций  $\nu$ , при котором на спектрах титрования наблюдается изобестическая точка. Например, для комплекса ТОЕРуР(3)-ДНК изобестическая точка наблюдается при концентрациях  $\nu < 0,2$ , а для комплекса ТВutPyP(3)-ДНК - при  $\nu < 0,21$ .

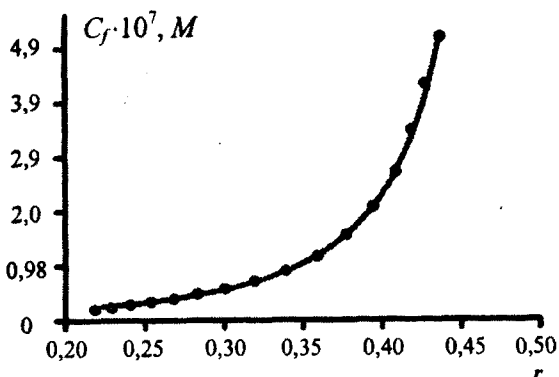
Для нахождения  $K_b$  и  $n$  используется формула, предложенная Корреа с соавторами [8]:

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

где  $r$  - отношение концентрации связанных лигандов  $C_b$  к концентрации центров связывания на ДНК ( $r = C_b/C_{\text{пар.основ.}}$ ), а  $C_f$  - концентрация свободных лигандов в растворе.

На рис. 3 приведена теоретически рассчитанная изотерма связывания ТОЕРуР(3) с ДНК, совпадающая с экспериментально полученными точками.

$K_b$  и  $n$  определялись подгонкой теоретической кривой к экспериментальным данным по методу наименьших квадратов с использованием



компьютерной программы Graphpad Prism. Результаты, полученные для всех четырех типов комплексов, приведены в таблице.

Рис. 3. Зависимость  $C_f$  от  $r$ , полученная по результатам титрования ТОЕРуР(3) с ДНК при 25<sup>0</sup>С (точки) и теоретически рассчитанная по формуле (1) (сплошная кривая).  $K_b=2,25 \cdot 10^7$  и  $n=1,96$ .

Как видно из полученных данных, удлинение цепочки углеводородного радикала на одну  $\text{CH}_2$ -группу (ТВутРуР(3)), наличие ОН-группы (ТОЕРуР(3)), а также разветвление бокового радикала с кратной связью (ТМетАлРуР(3)) существенно не влияют на константы связывания этих порфиринов с ДНК.

А для порфирина ТАлРуР(3) (кратная связь в боковом радикале) наблюдается уменьшение константы связывания.

Порфирины	$n$	$K_b \cdot 10^{-7}, M^{-1}$
ТАлРуР(3)	$2,2 \pm 0,008$	$0,565 \pm 0,2$
ТМетАлРуР(3)	$2,2 \pm 0,02$	$2,1 \pm 0,2$
ТОЕРуР(3)	$1,96 \pm 0,007$	$2,25 \pm 0,08$
ТВутРуР(3)	$2,6 \pm 0,01$	$2,25 \pm 0,14$

**Выводы.** Несмотря на наличие двух механизмов взаимодействия с ДНК, исследуемые порфирины предпочитают связываться интеркаляционно. Второй механизм – внешнее упорядоченное связывание – включается при более высоких относительных концентрациях порфиринов, после того как первый тип связывания достигает насыщения. Константа интеркаляционного связывания ДНК с порфирином практически не зависит от типа его бокового радикала. Исключение составляет ТАлРуР(3) с кратной связью в боковом радикале, для которого наблюдается уменьшение константы связывания.

*Работа выполнена при частичной поддержке гранта ISTC # А 301.2.*

Кафедра молекулярной физики

Поступила 02.03.2006

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Дальян Е.Б. – Биофизика, 2002, т. 47, вып. 2, с. 253–258.
2. Dalyan Y.B., Haroutiunian S.G., Ananyan G.V., Vardanyan V. I., Lando D.Y., Madakyan V.N., Kazaryan R.K., Messory L., Orioli P. and Benight A.S. – Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, 2001, № 5, v. 18, p. 677–687.

3. Fiel R.J., Howard J.C., Mark E.H., Datta-Gupta N. – Nucleic Acids Res., 1979, № 6, p. 3093–3118.
4. Pasternak R.F., Gibbs E.J. – Metal Ions in Biological Systems, 1996, № 33, p. 367–397.
5. Aasanka M., Kurimura T., Toya H., Ogaki K., Kato Y. – AIDS, 1990, № 3, p. 403–404.
6. Dixon D.W., Marzilli L.G., Schinazi R.F. – Ann. NY Acad. Sci., 1990, № 616, p. 511.
7. Carvlin M.J., Datta-Gupta N., Fiel R.J. – Biochem. Biophys. Res. Commun., 1982, № 108, p. 66–73.
8. Correia J.J., Chaires J.B. – Methods in Enzymology, 1994, v. 240, p. 593–614.

Լ. Ռ. ԱԼՈՅԱՆ, Գ. Վ. ԱՆԱՆՅԱՆ, Վ. Ի. ՎԱՐԴԱՆՅԱՆ, Ե. Բ. ԴԱԼՅԱՆ

ԴՆԹ-Ի ՀԵՏ ՊՈՐՖԻՐԻՆՆԵՐԻ ՓՈԽԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱՆՐԱՆՑ  
ԿՈՂՄՆԱՅԻՆ ԽՄԲԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ամփոփում

Սպեկտրոֆոտոմետրիայի և շրջանային դիֆրակցմի մեթոդներով ուսումնասիրվել է տարբեր կողմնային խմբերով մեզո-տետրա-(3N-պիրիդիլ)պորֆիրինների փոխազդեցությունը ԴՆԹ-ի հետ: Ցույց է տրված, որ պորֆիրինի փոքր կոնցենտրացիաների դեպքում նրանց համար նախընտրելի է փոխազդեցության ինտերկալյացիոն մեխանիզմը: Այս տիպի փոխազդեցության համար հաշվարկվել են կապման հաստատունները ( $K_b$ ) և մեկ պորֆիրինի կողմից զբաղեցրած հիմնային զույգերի թիվը ( $n$ )՝ Կորրեայի և համահեղինակների կողմից առաջարկված մեթոդով:

L. R. ALOYAN, G. V. ANANYAN, V. I. VARDANYAN, Ye. B. DALYAN

THE INFLUENCE OF PERIPHERAL SUBSTITUENTS ON INTERACTION  
OF PORPHYRINS WITH DNA

Summary

The interaction of meso-tetra-(3N-pyridyl)porphyrins with different peripheral substituents was studied by methods of spectrophotometry and circular dichroism. It was shown that for less concentration these porphyrins bind to DNA preferably via intercalation. The binding constants ( $K_b$ ) and the number of binding sites per base pairs ( $n$ ) were calculated by Correia and co-authors' method.