

## Вивчення кількісних характеристик комплексоутворення тилорону з полінуклеотидами різного походження

О. В. Карпов, С. М. Храпунов<sup>1</sup>, А. В. Сиволоб<sup>1</sup>

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

<sup>1</sup>Національний 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.

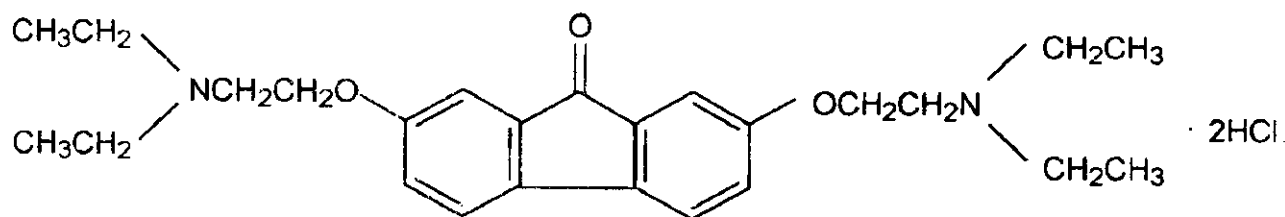
Гідрохлорид тилорону є першою синтетичною сполукою, для якої було доведено, що вона здатна індукувати інтерферон *in vivo* [1]. З часу його відкриття накопичено багато даних щодо його біологічних властивостей [2] та структурно-функціональних особливостей [3—6]. Зокрема встановлено, що ця сполука зв'язується 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 ( $\epsilon_p$ ), розрахований нами, складає  $74500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . У присутності ДНК та РНК екстинкція в зоні короткохвильової смуги значно зменшується. Коефіцієнти екстинкції ( $\epsilon_p$ ) 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  $\theta$  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 двоспиральною 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

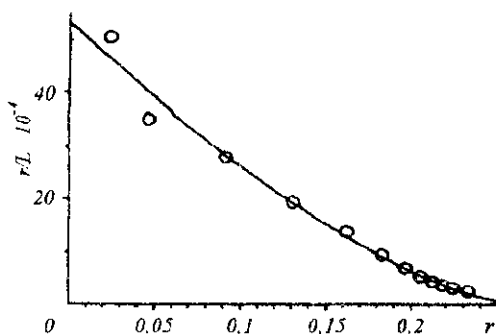


Рис. 1. Ізотерма зв'язування тилорону з тимусною ДНК

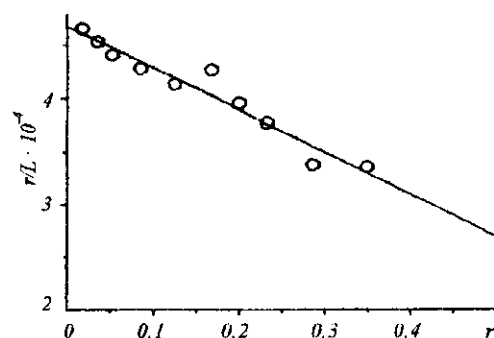


Рис. 2. Ізотерма зв'язування тилорону з синтетичним полінуклеотидом poly(U)

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-

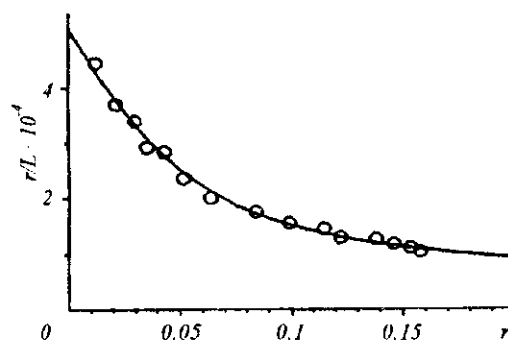


Рис. 3. Ізотерма зв'язування тилорону з дріжджовою РНК

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<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> and  $4,7 \cdot 10^4$  M<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> and  $1,1 \cdot 10^4$  M<sup>-1</sup> 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., Смородицев 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