

МЕХАНИЗМ СВЯЗЫВАНИЯ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО С ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫМИ СИНТЕТИЧЕСКИМИ ПОЛИНУКЛЕОТИДАМИ poly(rA) и poly(rU)

З. О. Мовсесян, А. П. Антонян, П. О. Вардеванян*

УДК 543.422;66.071.7

Ереванский государственный университет, Ереван, Армения;
e-mail: p.vardevanyan@ysu.am

(Поступила 11 января 2023)

Изучено связывание тиазинового красителя метиленового синего (МС) с одноцепочечными (оц-) синтетическими полирибонуклеотидами полирибоадениловой (poly(rA)) и полиуридиловой (poly(rU)) кислот методами абсорбционной спектроскопии и УФ-плавления. Обнаружено, что механизмы связывания МС с poly(rA) и с poly(rU) существенно различаются. Полученные данные указывают на то, что основной способ взаимодействия МС с оц-poly(rA) соответствует полунтеркаляции, с оц-poly(rU) — электростатическому связыванию. Выявлено, что МС способствует образованию гибридного дуплекса poly(rA)-poly(rU).

Ключевые слова: метиленовый синий, полунтеркаляция, полирибоадениловая и полиуридиловая кислоты, электростатическое связывание, абсорбция, УФ-плавление.

The study of the binding of thiazine dye methylene blue (MB) with single-stranded (ss-) synthetic polyribonucleotides poly(rA) and poly(rU) has been carried out with the methods of absorption spectroscopy and UV-melting. It has been revealed that the binding mechanisms of MB to poly(rA) significantly differs from that one of MB binding to poly(rU). The obtained data indicate that the main binding mode of MB to ss-poly(rA) corresponds to semi-intercalation, while at the binding to poly(rU) — electrostatic binding. MB has been also found out to contribute to the formation of hybrid duplex poly(rA)-poly(rU).

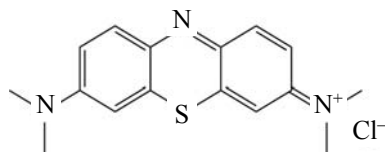
Keywords: methylene blue, semi-intercalation, poly(rA), poly(rU), electrostatic binding, absorption, UV-melting.

Введение. Изучение воздействия низкомолекулярных веществ на клеточные процессы посредством их связывания с нуклеиновыми кислотами (НК) — важная задача молекулярной биофизики [1, 2], решение которой позволяет не только выяснить характеристику взаимодействия малых молекул с НК, но и разработать новые подходы для создания эффективных терапевтических средств [3—6]. Поскольку структурный полиморфизм НК *in vivo* предоставляет многочисленные возможности для разработки новых терапевтических агентов, дизайн малых молекул, связывающихся с их неканоническими структурами, представляет собой активную область рационального дизайна лекарственных средств [1—6]. Роль РНК в прогрессировании многих заболеваний, особенно вирусных инфекций, таких как ВИЧ, СПИД и гепатит В, обусловила возрастающий интерес к РНК как к потенциальной мишени для терапевтического вмешательства [6—8]. С этой точки зрения среди одноцепочечных (оц) нуклеиновых кислот полирибоадениловая кислота (poly(rA)) имеет особое биологическое значение из-за ее роли в функционировании мРНК и экспрессии генов. Одноцепочечная poly(rA) играет важную роль в клеточной биологии, так как практически все мРНК в эукариотических клетках имеют “хвост” из poly(A) на конце, который является важной детерминантой созревания и стабильности мРНК, инициации трансляции, а также продукции альтернативных форм белков [9—12]. Поэтому важно понять, как лиганды, специфичные к двухцепочечным (дц) НК, влияют на такие структуры.

MECHANISM OF BINDING OF METHYLENE BLUE WITH SINGLE-STRANDED SYNTHETIC POLYNUCLEOTIDES poly(rA) and poly(rU)

Z. O. Movsesyan, A. P. Antonyan, P. O. Vardevanyan* (Yerevan State University, Yerevan, Armenia;
e-mail: p.vardevanyan@ysu.am)

Среди различных лигандов, специфически связывающихся с дц-НК, важное значение имеет метиленовый синий (3,7-бис(диметиламино)-фенотиазин-5-ий хлорид) (МС)



который представляет собой фенотиазиновый катионный ароматический краситель, способный окрашивать нуклеиновые кислоты и обладающий противомаларийным действием. МС широко используется в качестве фотосенсибилизирующего агента для фотодинамической инактивации РНК-вирусов, включая ВИЧ, вирусы гепатита В и С в плазме. Однако наиболее важно, что МС проявляет терапевтическое действие к семейству коронавирусов [13]. Взаимодействию МС с дц-ДНК посвящено большое количество работ, в то время как взаимодействие этого лиганда с дц-РНК изучено недостаточно, а исследования по взаимодействию МС с оц-полирибонуклеотидами единичны.

Цель данной работы — изучение связывания МС с синтетическими полинуклеотидами полирибоадениловой (poly(rA)) и полиуридиловой (poly(rU)) кислот. Глубокое понимание взаимодействия этих молекул с природными полинуклеотидами может стать основой для конструирования и синтеза новых, более эффективных модуляторов клеточных процессов. Работа является дополнением к исследованиям, направленным на выяснение основ взаимодействия малых молекул с различными РНК, с целью разработки терапевтических агентов, нацеленных на эту биомакромолекулу.

Эксперимент. Использованы сверхчистые синтетические полинуклеотиды poly(rA) (P9403), poly(rU) (P9528), МС (Sigma, США), бидистиллированная вода, NaCl, Na-цитрат, Na₂EDTA (содержание в рабочих растворах 10⁻⁵ М). Концентрации красителя и полирибонуклеотидов определяли спектрофотометрически, коэффициенты экстинкции: $\epsilon_{665} = 76000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ для МС [14], $\epsilon_{257} = 10500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ для poly(rA) и $\epsilon_{260} = 9500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ для poly(rU) [15]. Эксперименты проводились в 0.5×SSC (1×SSC содержит 0.15 М NaCl, 0.015 М Na₃-цитрат), ионная сила $\mu \sim 0.1 \text{ M}$, pH~7.0.

Спектры поглощения образцов, спектрофотометрические титрования раствора МС с растворами poly(rA), poly(rU) и с их эквимольной смесью получены с помощью UV-Vis-спектрофотометра Perkin Elmer Lambda 365 (США). УФ-плавление гибридных дуплексов poly(rA)-poly(rU) и их комплексов с МС проводилось на UV-Vis-спектрофотометре Unicam SP-8-100 с термостатируемыми ячейками для кювет. Растворы образцов помещались в герметически закрывающиеся 1-см кварцевые кюветы. Нагрев растворов осуществлялся с помощью программного устройства SP 876 Series 2. Экспериментальные данные по спектрофотометрическому титрованию, а также спектры поглощения и кривые плавления обработаны программой Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение. МС представляет собой краситель, производное фенотиазина, который при растворении придает воде синий цвет. Он используется в качестве красителя НК, поскольку обладает способностью непосредственно связываться с ДНК и РНК. МС в растворе находится в катионной форме и образует электростатические связи с отрицательно заряженными группами НК, используется в качестве окислительно-восстановительного зонда и интеркалятора при создании сенсоров на основе ДНК и аптамеров. При этом обратимое окрашивание сводит к минимуму помехи при переносе НК на гибридизационные мембраны для блоттинга [14—16]. Однако некоторые особенности спектральных характеристик МС нельзя объяснить с точки зрения полной интеркаляции в дц-НК [17—19]. Объяснение можно получить на основании исследований по взаимодействию МС с оц-НК.

Методом абсорбционной спектроскопии получены спектры поглощения МС и его комплексов с оц-poly(rA) и оц-poly(rU). На рис. 1, а приведены спектры поглощения комплексов МС, МС-оц-poly(rA) и МС+оц-poly(rA)+оц-poly(rU). Как видно, поглощение МС резко уменьшается при добавлении в раствор лиганда оц-poly(rA) ($\lambda_{\text{макс}} = 665 \text{ nm}$) и претерпевает bathochromic сдвиг на ~2 nm (соотношение лиганд/фосфат 1:20). Разбавление незначительное, полагаем, что МС проявляет высокое сродство к оц-poly(rA).

Ранее было показано [17, 18], что МС, несмотря на то что является интеркалятором, при относительно больших ионных силах раствора ($\mu = 0.02 \text{ M}$) с дц-ДНК связывается полуинтеркаляционным способом, не полностью вклиниваясь в пространство между соседними парами оснований НК. С этой точки зрения полагаем, что при ионной силе раствора $\mu = 0.1 \text{ M}$ МС с оц-poly(rA) также связывается по полуинтеркаляционному механизму, в результате чего поглощение связанных молекул лиганда

существенно уменьшается. Величина гипохромного эффекта свидетельствует о том, что центры адсорбции на *оц*-poly(rA) существенно больше, чем в случае дц-ДНК [17]. При добавлении *оц*-poly(rU) с концентрацией, эквимольной к *оц*-poly(rA), интенсивность в максимуме спектра поглощения увеличивается и сдвигается в длинноволновую сторону на ~8 нм. В то же время уменьшение интенсивности спектра поглощения, полученного для комплексов МС-*оц*-poly(rU), значительно меньше, чем в случае *оц*-poly(rA) (рис. 1, *а* и *б*, кривые 2). Тем не менее и при взаимодействии МС с *оц*-poly(rU) имеет место сдвиг в красноволновую область на ~2 нм, а при эквимольной концентрации указанных *оц*-poly(rA) батохромный сдвиг ~6—7 нм, как при связывании МС с дц-ДНК или poly(rA)-poly(rU) [20]. При этом кривые 3 на рис. 1, *а* и *б* фактически схожи. Очевидно, что к *оц*-poly(rU) МС проявляет меньшее сродство, чем к *оц*-poly(rA), поскольку при добавлении последней на раствор комплексов МС-*оц*-poly(rU) имеет место резкое уменьшение интенсивности поглощения. Полагаем, что в растворе с ионной силой $\mu = 0.1$ М *оц*-poly(rA) обладает большей упорядоченностью, чем *оц*-poly(rU), вследствие чего связывание МС с *оц*-poly(rA) сильнее по сравнению с *оц*-poly(rU) [21]. При добавлении в раствор комплексов МС-*оц*-poly(rA) *оц*-poly(rU) в эквимольном количестве образуется дц-структура (дц-poly(rA)-poly(rU)), количество центров адсорбции для МС более ограничено и определенная часть связанных молекул лиганда диссоциирует, что приводит к увеличению интенсивности поглощения.

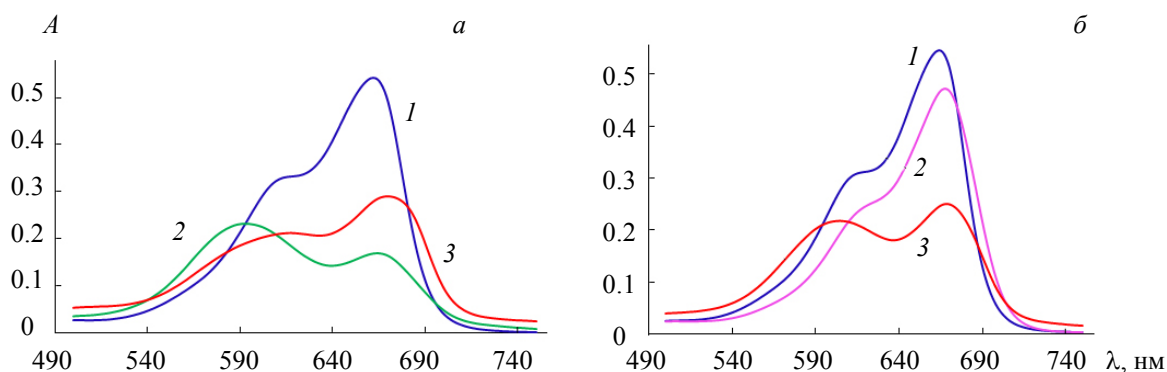


Рис. 1. Спектры поглощения МС (1) и его комплексов МС-*оц*-poly(rA) (*а*), МС-*оц*-poly(rU) (*б*) (2) и МС-poly(rA)-poly(rU) (3); соотношение лиганд/фосфат 1:20

На основании спектров поглощения построены зависимости A/A_0 от концентраций для комплексов МС-*оц*-poly(rA) (рис. 2). Как видно, кривая зависимости A/A_0 от C_p (C_p — концентрация фосфатных групп в растворе) резко снижается при добавлении в раствор *оц*-poly(rA) и достигает своего минимума. При добавлении в раствор *оц*-poly(rU) кривая возрастает. Иная картина наблюдается при добавлении в раствор МС указанных полинуклеотидов в обратной последовательности: кривая A/A_0 от C_p претерпевает небольшое снижение при взаимодействии МС с poly(rU), затем в присутствии *оц*-poly(rA) имеет место резкое падение с достижением плато при дальнейшем увеличении концентрации *оц*-poly(rA). Существенное различие в поведении кривых подтверждает, что *оц*-poly(rA) является более предпочтительной мишенью для МС, чем *оц*-poly(rU). Сравнение зависимостей A/A_0 при низких C_p показывает, что спектральные характеристики связанных молекул МС с *оц*-poly(rA) и *оц*-poly(rU) сильно различаются: в комплексе с poly(rA) поглощение молекул лиганда намного больше, чем в комплексе с *оц*-poly(rU), а хромофорные группы связанных с указанными poly(rA) молекул МС находятся в различных окружениях. На основании этих данных можно утверждать, что молекулы лиганда с poly(rA) взаимодействуют посредством стекинг-контактов (интеркаляционный тип), в то время как в случае *оц*-poly(rU) основным является электростатическое взаимодействие. Этот тип взаимодействия имеет место и при связывании МС с *оц*-poly(rA). Следовательно, резкое падение кривой зависимости A/A_0 от C_p при взаимодействии тиазинового красителя с *оц*-poly(rA) является результатом связывания полуинтеркаляционным и электростатическим способами, с *оц*-poly(rU) — в основном электростатическим. Однако нельзя исключить и полуинтеркаляционный тип связывания МС с *оц*-poly(rU). Кривые на рис. 2 отражают эффект гибридизации одиночных нитей poly(rA) и poly(rU), в результате чего образуется дц-структура в реальном времени при взаимодействии с лигандом. Последнее указывает на то, что МС существенно облегчает процесс гибридизации. Это под-

тверждается результатами УФ-плавления растворов эквимольной смеси poly(rA) и poly(rU) в отсутствие и в присутствии МС.

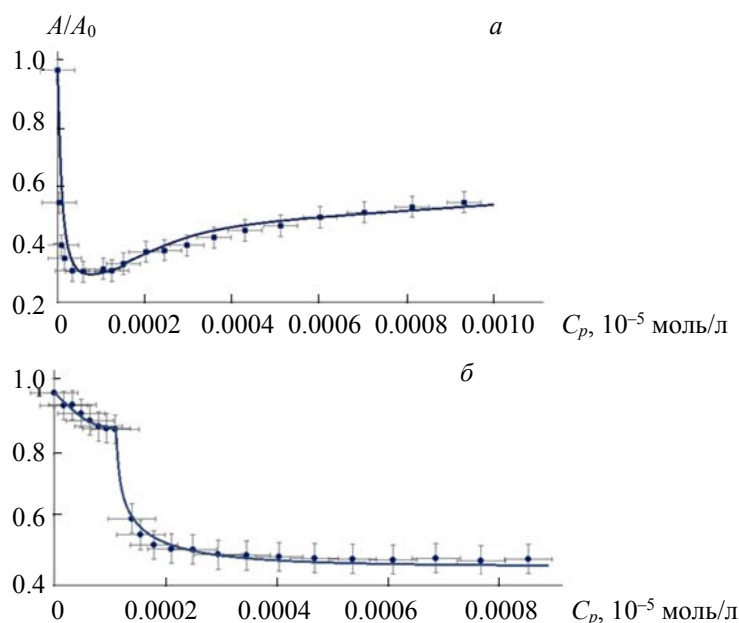


Рис. 2. Зависимости A/A_0 от концентрации фосфатных групп полинуклеотидов (C_p), полученные при взаимодействии МС с оц-poly(rA) и оц-poly(rU) (а), оц-poly(rU) и оц-poly(rA) (б)

На рис. 3 приведены кривые УФ-плавления, которые имеют сигмоидальную форму аналогично кривым плавления дц-НК. По мере возрастания температуры растворов наблюдается гиперхромный эффект на ~30—32 %, что обычно свойственно дц-НК при переходе спираль-клубок. Кривая комплексов МС-poly(rA)-poly(rU) сдвинута в сторону больших температур на ~2°. Этот результат находится в согласии с данными по плавлению комплексов МС с дц-poly(rA)-poly(rU) [20]. Отметим, что дц-структура между poly(rA) и poly(rU) в отсутствие МС образовалась после содержания раствора их смеси в эквимольных концентрациях в течение ≥ 24 ч, в то время как в присутствии МС дц-структура образуется в процессе спектральных измерений, что исследовано методом УФ-плавления.

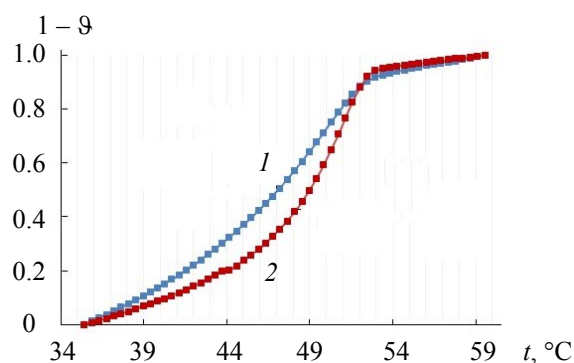


Рис. 3. Кривые плавления дц-poly(rA)-poly(rU) (1) и комплексов МС-poly(rA)-poly(rU) (2) при ионной силе раствора 0.1 М

На кривой 2 (рис. 3) имеется участок предплавления в области температуры 30—45°, в то время как на кривой 1 такой участок не обнаруживается. Это свидетельствует о том, что дц-poly(rA)-poly(rU) в присутствии МС имеет более гетерогенную структуру, чем в отсутствие этого лиганда, а по форме кривая близка к двухфазным кривым плавления. Сдвиг кривой плавления комплексов дц-poly(rA)-poly(rU) с МС в высокотемпературную сторону указывает на то, что тиазиновый краситель стабилизирует дц-структуру poly(rA)-poly(rU).

Таким образом, результаты свидетельствуют о существенном различии типов связывания МС с poly(rA) по сравнению с poly(rU) и гибридным дуплексом poly(rA)-poly(rU) при их смешивании в эквимольном количестве. Основной способ взаимодействия МС с оц-poly(rA) соответствует полуинтеркаляции, имеет место также электростатическое связывание, в то время как с оц-poly(rU) — электростатическое. Кроме того, МС облегчает образование гибридного дуплекса poly(rA)-poly(rU).

О сильном взаимодействии МС с оц-poly(rA) свидетельствуют батохромный и гипохромный сдвиги в спектрах поглощения, поскольку в процессе связывания снижается поглощение комплексов МС-оц-poly(rA). Данный эффект нельзя отнести к электростатическому типу взаимодействия, что указывает на большую роль гидрофобных сил при связывании этого лиганда с оц-poly(rA). Наиболее предпочтительными способами взаимодействия МС с оц-poly(rA) являются полуинтеркаляция и электростатическое связывание. Об этом свидетельствуют результаты, полученные при взаимодействии указанного лиганда с эквимольным количеством смеси оц-poly(rA) и оц-poly(rU), которые при гибридизации образуют двухцепочечную структуру. Это согласуется с данными [18, 20], где основным способом связывания МС с дц-poly(rA)-poly(rU) является полуинтеркаляция, неосновным — электростатическое взаимодействие. Показано, что при больших концентрациях poly(rA)-poly(rU) метиленовый синий связывается с ним одним способом, при относительно низких концентрациях двухцепочечной РНК реализуются два способа связывания. Эти способы связывания ранее были обнаружены и при взаимодействии метиленового синего с двухцепочечной ДНК [18, 20].

Закключение. Показано, что метиленовый синий, специфический к дц-ДНК (В-семейству нуклеиновых кислот), может образовывать прочные комплексы с нуклеиновыми кислотами, принадлежащими А-семейству. Основным механизмом связывания метиленового синего с двух- и одноцепочечными полинуклеотидами является полуинтеркаляция. Исходя из спектров поглощения, данный способ в случае оц-poly(rU) не выявляется из-за неупорядоченной структуры полинуклеотида [21], однако полностью исключать его нельзя. Метиленовый синий связывается с оц-poly(rA) по полуинтеркаляционному механизму, в то время как с оц-poly(rU) — в основном электростатическим способом. Рассмотрение особенностей связывания метиленового синего с одноцепочечными полинуклеотидами открывает новые возможности для выявления и изучения терапевтических агентов на основе РНК.

Исследование выполнено при финансовой поддержке комитета по науке Республики Армения (проект № 21Т-1F063).

- [1] A. B. Pradhan, L. Haque, S. R. S. Das. PLoS One, **9**, N 2 (2014) e8799
- [2] S. Miljanic, A. Kendel, M. Novak, T. G. Deligeorgiev, I. Crnolatac, I. Piantanida, V. Chis. RSC Adv., **6** (2016) 41927—41936
- [3] M. Maiti, G. S. Kumar. Med. Res. Rev., **27** (2007) 649—695
- [4] H. Ihmels, D. Otto. Topics in Current Chemistry: Supramolecular Dye Chemistry, Berlin, Springer (2005)
- [5] R. Palchaudhuri, P. J. Hergenrother. Curr. Opin. Biotechnol., **18** (2007) 497—503
- [6] N. Foloppe, N. Matassova, F. Aboul-ela. Drug Disc. Today, **11** (2006) 1019—1027
- [7] Z. Liu, A. Sall, D. Yang. Int. J. Mol. Sci., **9** (2008) 978—999
- [8] S. Fulle, H. Gohlke. J. Mol. Recognit., **23** (2010) 220—231
- [9] P. Giri, G. S. Kumar. Biochim. Biophys. Acta, **1770** (2007) 1419—1426
- [10] O. P. Cetinkol, N. V. Hud. Nucl. Acids Res., **37** (2009) 611—621
- [11] P. Giri, G. S. Kumar. Arch. Biochem. Biophys., **474** (2008) 183—192
- [12] H. Xi, D. Gray, S. Kumar, D. P. Arya. FEBS Lett., **583** (2009) 2269—2275
- [13] А. П. Антонян, Н. Р. Петросян, П. О. Вардеванян. Журн. прикл. спектр., **88**, № 6 (2021) 942—947 [A. P. Antonyan, N. H. Petrosyan, P. O. Vardevanyan. J. Appl. Spectr., **88** (2021) 1210—1214]
- [14] M.-E. Nedu, M. Tertis, C. Cristea, A. V. Georgescu. Diagnostics, **10** (2020) 223

-
- [15] **N. D. M. Sani, E. Y. Ariffin, W. Sheryn, M. A. Shamsuddin, L. Y. Heng, J. Latip, S. A. Hasbullah, N. I. Hassan.** *Sensors*, **19** (2019) 5111
- [16] **S. Tchen, J. B. Sullivan.** *J. Crit. Care*, **57** (2020) 146—156
- [17] **P. Vardevanyan, A. Antonyan, M. Parsadanyan, M. Torosyan, A. Karapetian.** *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **34**, N 7 (2016) 1377—1382
- [18] **M. A. Parsadanyan, M. A. Shahinyan, A. P. Antonyan.** *Proc. YSU, Chem. Biol.*, **54**, N 2 (2020) 112—117
- [19] **R. Rohs, H. Sklenar.** *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **21**, N 5 (2004) 699—711
- [20] **P. O. Vardevanyan, A. P. Antonyan, M. A. Parsadanyan, M. A. Shahinyan, V. G. Sahakyan.** *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **36**, N 14 (2018) 3607—3613
- [21] **В. Зенгер.** Принципы структурной организации нуклеиновых кислот, Москва, Мир (1987)