

Кудря В. Ю.

СПЕКТРАЛЬНІ ПРОЯВИ ВЗАЄМОДІЇ ОЛІГОАДЕНІЛАТУ З ВИСОКОМОЛЕКУЛЯРНИМИ БІЛКАМИ

У статті представлено результати досліджень спектрів оптичного поглинання, флюоресценції та фосфоресценції похідних нуклеотидів, що містять аденінові π -електронні системи – олігоаденілатів, низки високомолекулярних π -електрон-містких білків та їхніх спільних систем. Перевірено положення перших збуджених електронних рівнів ланок цих сполук. Підтверджено, що за спектральні властивості олігоаденілатів відповідальними є аденінові групи. Показано, що триптофанові групи є основними пастками триплетних збуджень у досліджених протейнах. Зафіксовано спектральні ознаки зв'язування олігоаденілату з білками. Під час цього зв'язування утворюється комплекс між π -електронними системами, подібний до АТ-комплексу, що виникає в макромолекулі ДНК. Обговорено природу цього комплексу. Також зафіксовано зміни у спектрах флюоресценції та фосфоресценції спільних систем при варіюванні відносних концентрацій у розчинах молекул олігоаденілату та макромолекул білків.

Ключові слова: ДНК, РНК, олігонуклеотид, фосфоресценція, взаємодія олігонуклеотидів з білками.

Вступ

Макромолекули нуклеїнових кислот (ДНК і РНК) та високомолекулярних білків, що містять π -електронні системи у своєму складі, є основним конструктивним матеріалом для будь-якого живого організму та відіграють важливу роль у зберіганні, передачі та реалізації спадкової інформації. Фактично ці сполуки є функціонально діючими макромолекулами, які вже використовуються в живому організмі. Останнім часом ліки на основі синтетичних похідних нуклеотидів (коротких фрагментів ДНК/РНК), що можуть направлено зв'язуватись з іншими макромолекулами, вже клінічно тестуються як імуномодулятори, антивірусні та антиракові препарати [9]. Таким чином, дослідження динаміки біохімічних та біофізичних процесів, що відбуваються в цих макромолекулах (зокрема взаємодії між нуклеїновими кислотами або їхніми фрагментами та білками) є важливим сучасним інструментом для пізнання секретів життя. Але на даний момент механізми взаємодії між цими біомолекулами досліджено недостатньо для того, щоб мати можливість контролювати ці процеси та, як результат, створювати високоефективні ліки нового покоління з направленою дією. Нами показано [1; 5–6; 10–14], що наявність π -електронних систем у досліджуваних біомолекулах, які спектрально проявляються

в оптичному (ближній «біологічний» ультрафіолетовий, видимий та ближній інфрачервоний) діапазоні довжин хвиль випромінювання, дає можливість застосовувати методи оптичної спектроскопії для таких досліджень. Перші серйозні спектроскопічні дослідження збуджених електронних станів нуклеїнових кислот проводилися ще у 60-х роках минулого сторіччя [2; 4; 7–8]. Метою цих досліджень було ототожнення центрів локалізації електронних збуджень у ДНК і РНК, зокрема було розглянуто кілька версій стосовно центрів локалізації триплетних збуджень у макромолекулі ДНК. Основна дискусія розгорталася навколо питання, чи є триплетний стан нейтрального дТМФ, іонізованого Т⁻, дАМФ або АТ-последовності відповідальним за випромінювання ДНК. У наших попередніх роботах [1; 5–6; 10–14] показано, що найнижчий триплетний рівень у макромолекулах ДНК і РНК належить аденіновій (А) ланці; пастками триплетних збуджень у РНК є А-ланки, а в ДНК – АТ-последовності. Пастками синглетних збуджень у ДНК і РНК є цитидинові (Ц) та гуанінові (Г) ланки. У цій статті наведено результати спектральних досліджень спільних систем (бінарних розчинів) ДНК, РНК та малої похідної нуклеотиду (тримера – олігоаденілату 2'5'A₃, що містить 3 А-групи) з високомолекулярними π -електрон-місткими білками (людський альбумін (ЛІА) та інтерферон (Інф)).

Методика експериментальних досліджень

Досліджували в даній роботі зразки макромолекул високомолекулярних π -електрон-містких білків, ДНК і РНК різного походження, а також тримера 2'5'A₃ люб'язно надані З. Ю. Ткачуком та І. Я. Дубеєм (Інститут молекулярної біології та генетики НАН України). Нуклеотиди, що містяться в тримері 2'5'A₃, з'єднані між собою фосфатними групами PO₄H «неприродним чином» у положеннях 2' та 5' (на відміну від ДНК і РНК, де вони з'єднані у положеннях 3' та 5'). Хімічну формулу 2'5'A₃ подано на рис. 1.

Спектри оптичного поглинання в діапазоні 200÷360 нм (~50000÷28000 см⁻¹) реєструвалися за допомогою спектрофотометра Specord UV VIS. Спектри флюоресценції та фосфоресценції в діапазоні 290÷620 нм (~34500÷16000 см⁻¹) реєструвалися при температурі 77 К на автоматизованому спектральному комплексі на базі спектрометра МДР-2.

Похибки у визначенні положення смуг поглинання та люмінесценції не перевищували 50 см⁻¹, що для досліджуваних широких смуг (≥ 1000 см⁻¹) цілком допустимо. Похибка у вимірюванні інтенсивності свічення одного і того ж самого зразка не перевищувала 2 %.

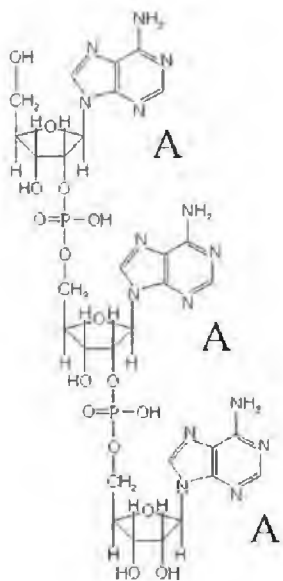


Рис. 1. Хімічна формула тримера 2'5'A₃

Результати та їх обговорення

Нами попередньо встановлено [1; 5–6; 10–14], що спектри поглинання ДНК і РНК близькі до суми (в еквімолярних концентраціях) спектрів поглинання відповідних мономерів – нуклеотидів. Схожа ситуація спостерігається і для досліджених високомолекулярних π -електрон-містких білків:

спектр поглинання білка близький до лінійної комбінації (з урахуванням відносного вмісту у макромолекулі) спектрів поглинання відповідних мономерів – π -електрон-містких амінокислот фенілаланіну (Фа), тирозину (Тир) та триптофану (Трп) (наприклад, для ЛА, рис. 2, а). Ці факти добре узгоджуються з типовою для π -електрон-містких макромолекул ситуацією, що ланки в макромолекулі є незалежними поглинаючими центрами. Спектр флюоресценції ЛА близький до лінійної комбінації спектрів Тир і Трп, а спектр фосфоресценції ЛА близький до відповідного спектра Трп. Останнє означає, що триплетні збудження у макромолекулі ЛА локалізуються та дезактивуються з триптофанових ланок [11]. Спектральні властивості та енергетична структура властивості олігоаденілату 2'5'A₃ пов'язані з А-ланкою.

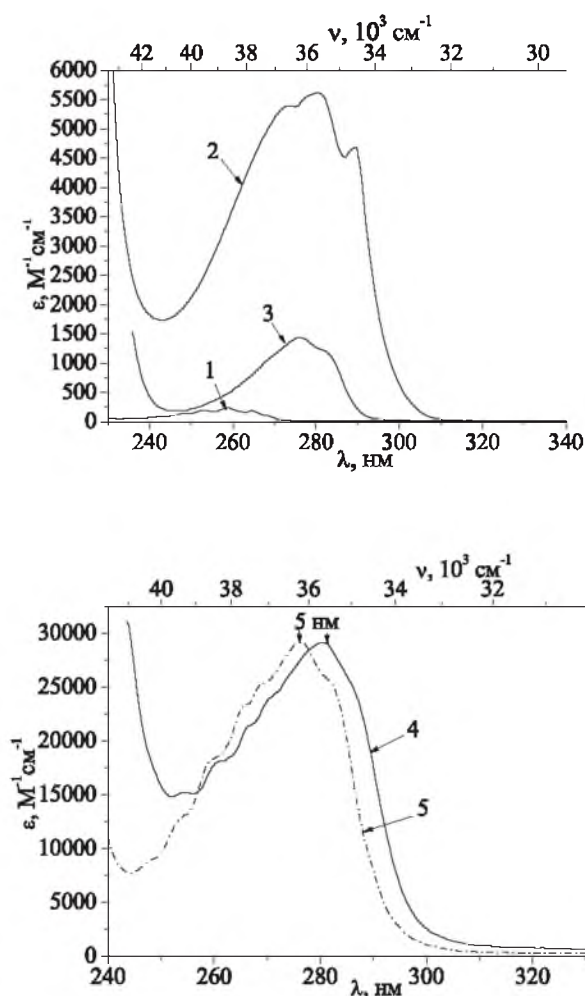
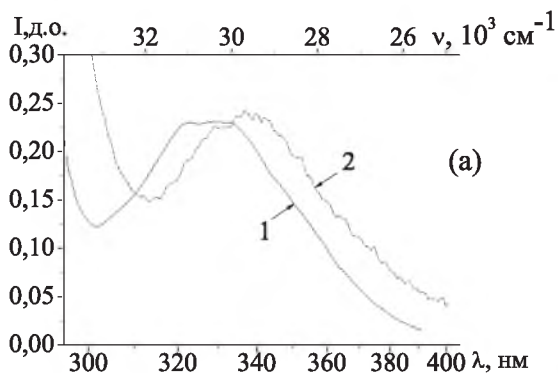


Рис. 2. Спектри оптичного поглинання: 1-Фа, 2-Трп, 3-Тир, 4-ЛА, 5-лінійна комбінація спектрів амінокислот у відносному співвідношенні Трп:Тир:Фа=1:18:31

Для білка Інф спостерігається ситуація, подібна до ЛА (рис. 2): невеликий (~7 нм) зсув спектрів флюоресценції та фосфоресценції у корот-

кохвильовий бік, а також збільшення структурованості електронно-коливальної структури спектра флюоресценції Три, що входить до складу макромолекули Інф, порівняно з мономером Трп. На наш погляд, це пов'язано з жорсткою фіксацією Трп-ланок у макромолекулі Інф та «вимержанням» деяких ступенів вільності.



но низку $2'5'A_3$ +Інф-систем із: (1) сталою концентрацією ($C_{2'5'A_3}$) олігоаденілату $2'5'A_3$ та різними значеннями концентрації ($C_{\text{Інф}}$) Інф, (2) різними значеннями $C_{2'5'A_3}$ та сталою $C_{\text{Інф}}$. Зафіксовано зміни у спектрах флюоресценції систем $2'5'A_3$ +Інф при варіюванні вказаних концентрацій. Спектри флюоресценції цих систем

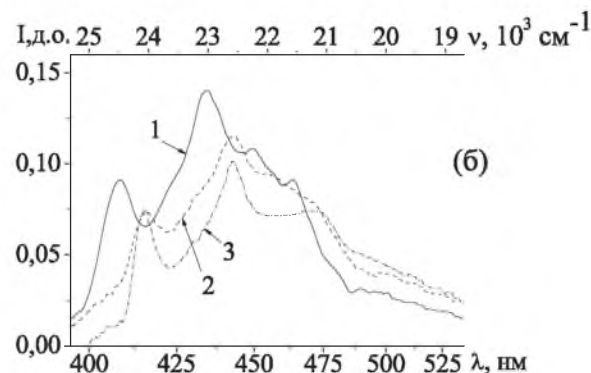


Рис. 3. Спектри флюоресценції (а) та фосфоресценції (б) при $T=77\text{K}$: Інф (1), Трп (2) та Трп при $T=4,2\text{K}$ (3). Збудження $\lambda=280$ нм. Розчини у воді, $C=5 \times 10^{-5}\text{M}$

Спектральні властивості спільних систем ДНК, РНК та $2'5'A_3$ з білками досліджувалися при низьких температурах в широкому діапазоні довжин хвиль збудження. Напі попередні дані [11] свідчать, що якщо ДНК і РНК зв'язуються з білками, то це зв'язування лише поверхневе, без проникнення усередину білка; $2'5'A_3$ глибоко проникає усередину макромолекули ЛА як у полімерну матрицю. Про це свідчить невеликий (~ 5 нм) зсув у короткохвильовий бік та збільшення електронно-коливальної структури спектрів флюоресценції $2'5'A_3$ інкорпорованого у макромолекулу ЛА, порівняно з «відокремленим» станом.

Спектри флюоресценції спільних систем $2'5'A_3$ з Інф майже схожі з лінійними комбінаціями спектрів флюоресценції А- та Трп-ланок. Як і очікувалось, основні спектральні зміни, пов'язані із взаємодією олігоаденілату $2'5'A_3$ з білками, проявляються у фосфоресценції (рис. 4), оскільки саме триплетний стан є більш чутливим до будь-яких хімічних, конформаційних або інших змін у макромолекулярній структурі [3]. Було дослідже-

(рис. 4) близькі до спектрів $2'5'A_3$ при збудженні $\lambda=260$ нм та до спектрів Трп-ланок Інф при збудженні $\lambda=280$ нм аж до $C_{2'5'A_3}=5 \cdot 10^{-5}$ М при сталому значенні $C_{\text{Інф}}=10^{-5}$ М. Починаючи зі значення $C_{2'5'A_3}=8 \cdot 10^{-5}$ М, смуга спектра фосфоресценції системи $2'5'A_3$ +Інф не схожа ані лише на смугу спектра $2'5'A_3$, ані лише на смугу спектра Трп. Крім смуги $2'5'A_3$ при збудженні $\lambda=260$ нм або смуги Трп при збудженні $\lambda=280$ нм, у спектрі фосфоресценції цієї системи з'являється безструктурна широка смуга з максимумом на $\lambda=450$ нм, яка не залежить від довжини хвилі збудження. При подальшому збільшенні значення $C_{2'5'A_3}$ інтенсивність смуги, пов'язаної з окремою $2'5'A_3$ - або Трп-ланкою, зменшується. За спектральним положенням та формою кривої спектра (у деякому наближенні) безструктурна широка смуга з максимумом на $\lambda=450$ нм близька до смуги спектра фосфоресценції ДНК. Таким чином, у досліджених спільних системах $2'5'A_3$ +білок формується комплекс, схожий на АТ-комплекс у макромолекулі ДНК.

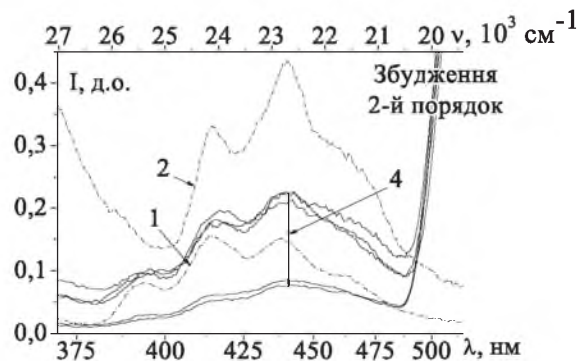
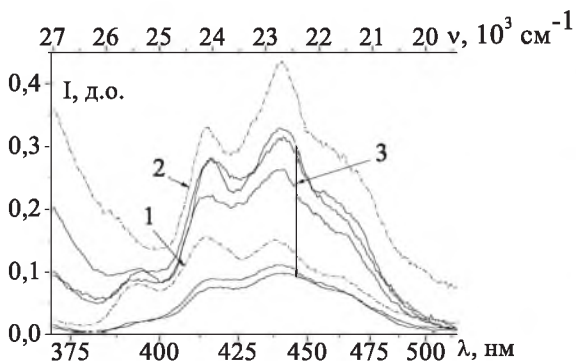


Рис. 4. Спектри фосфоресценції водних розчинів при $T=77\text{K}$: $2'5'A_3$ (1), Інф (2), $2'5'A_3$ +Інф при збудженні $\lambda=280$ нм (3) та $\lambda=260$ нм (4) ($C_{2'5'A_3}=10^{-5}$ до 10^{-4}M , $C_{\text{Інф}}=10^{-5}\text{M}$)

Висновки

Амінокислоти є незалежними поглинаючими центрами в макромолекулах π -електрон-містких білків людського альбуміну та інтерферону так само, як нуклеотиди в макромолекулах ДНК та РНК. На наш погляд, останні зв'язуються з білками поверхнево, без проникнення усередину білка. Олігоаденілат 2'5'A₃ зв'язується з альбу-

міном та інтерфероном, глибоко проникаючи усередину макромолекул білків як у полімерну матрицю; для інтерферону це зв'язування результується в утворенні комплексу, подібного до АТ-комплексу в макромолекулі ДНК¹.

¹ Автор висловлює щиро подяку проф. В. М. Яшуку за підтримку та цінні ідеї при проведенні досліджень цієї статті, З. Ю. Ткачуку та І. Я. Дубею – за надані зразки біологічних речовин.

Список літератури

1. Кудря В. Ю. Спектральні властивості та фотостабільність нуклеїнових кислот та полігонуклеотидів / В. Ю. Кудря // Наукові записки НаУКМА : Сер. фіз.-мат. науки. — 2011. — Т. 113. — С. 50–55.
2. Bersohn A. Phosphorescence in nucleotides and nucleic acids / Bersohn A., Isenberg I. // J. Chem. Phys. — 1964. — Vol. 40, № 11. — P. 3175–3180.
3. Faidysh A. N. Intramolecular energy transfer by singlet and triplet excitons in macromolecules / A. N. Faidysh, V. V. Slobodyanik, V. N. Yashchuk // J. Luminescence. — 1979. — Vol. 21. — P. 85–92.
4. Gueron M. Excited States of Nucleotides and Singlet Energy Transfer in Polynucleotides / M. Gueron, J. Eisinger, R. G. Shulman // J. Chem. Phys. — 1967. — Vol. 47, № 10. — P. 4077–4091.
5. Kudrya V. Yu. The Peculiarities of the RNA Luminescence / V. Yu. Kudrya, V. M. Yashchuk, S. M. Levchenko, V. I. Mel'nik, L. A. Zaika, D. M. Govorun // Mol. Cryst. Liq. Cryst. — 2008. — Vol. 497. — P. 93–100.
6. Kudrya V. Yu. The Spectral Properties and Photostability of the DNA, RNA and Oligonucleotides / V. Yu. Kudrya, V. M. Yashchuk // Укр. Фіз. Ж. — 2012. — Т. 57, № 2. — С. 187–192.
7. Lamola A. A. Triplet State of DNA / A. A. Lamola, M. Gueron, T. Yamane, J. Eisinger, R. G. Shulman // J. Chem. Phys. — 1967. — Vol. 47, № 3. — P. 2210–2217.
8. Rahn R. O. Phosphorescence and Electron Spin Resonance Studies of the uv-Excited Triplet State of DNA / R. O. Rahn, R.G. Shulman, J.W. Longworth // J. Chem. Phys. — 1966. — Vol. 45, № 8. — P. 2955–2965.
9. Tkachuk Z. Multiantivirus compound, composition and method of treatment of virus diseases / Tkachuk Z. // U.S. Patent Application. — 2011. — Bulletin № 13, 046–240. — P. 57.
10. Yashchuk V. M. Electronic Excitation Energy Transfer in DNA. Nature of Triplet Excitations Capturing Centers / V. M. Yashchuk, V. Yu. Kudrya, M. Yu. Losytsky, I. Ya. Dubey, H. Suga // Mol. Cryst. Liq. Cryst. — 2007. — Vol. 467. — P. 311–323.
11. Yashchuk V. M. Optical Response of the Polynucleotides-Proteins Interaction / V. M. Yashchuk, V. Yu. Kudrya, S. M. Levchenko, Z. Yu. Tkachuk, D. M. Hovorun, V. I. Mel'nik, V. P. Vorob'yov, G. V. Klishevich // Mol. Cryst. Liq. Cryst. — 2011. — Vol. 535. — P. 93–110.
12. Yashchuk V. M. Some Peculiarities of Electronic Excitation Energy Structure of the Biologic Polynucleotides and Processes of Triplet Excitation Trapping / V. M. Yashchuk, V. Yu. Kudrya, S. M. Levchenko, N. V. Yevtushenko // Наукові записки НаУКМА : Сер. фіз.-мат. науки. — 2007. — Т. 61. — С. 39–42.
13. Yashchuk V. M. The effect of triplet-triplet excitation energy transfer on the DNA self-protection mechanism / V. M. Yashchuk, V. Yu. Kudrya, M. Yu. Losytsky, I. Ya. Dubey, T. Y. Ohulchansky, H. Suga, S. M. Yarmoluk // Наукові записки НаУКМА : Сер. фіз.-мат. наук. — 2006. — Т. 51. — С. 48–56.
14. Yashchuk V. The nature of the electronic excitations capturing centres in the DNA / V. Yashchuk, V. Kudrya, M. Losytsky, H. Suga, T. Ohul'chansky // Journal of Molecular Liquids. — 2006. — Vol. 127, Iss. 1–3. — P. 79–83.

V. Kudrya

SPECTRAL MANIFESTATIONS OF THE INTERACTION BETWEEN OLIGOADENILATE AND HIGH-MOLECULAR PROTEINS

Optical absorption, fluorescence and phosphorescence spectra of the small nucleotide derivatives containing adenine π -electron system – oligoadenilates, the high-molecular π -electron-containing proteins and their common systems were investigated. The positions of the first excited electronic energy levels of these compounds cells were verified. It was examined all the optical spectral properties of the oligoadenilate were connected with adenine groups. It was shown tryptophan groups were the main triplet electronic excitations traps in the proteins. The spectral manifestations of the binding of the oligoadenilate to the proteins were fixed. Some complex in the common systems between π -electron systems was formed to be some similar to AT-complex in the DNA macromolecule. The nature of this complex was discussed. The changes in fluorescence and phosphorescence spectra of the common systems under the variation of the mutual concentrations of the oligoadenilate and protein macromolecules were observed.

Keywords: DNA, RNA, oligonucleotide, phosphorescence, interaction between oligonucleotides and proteins.

Матеріал надійшов 13.03.2013