

ВИВЧЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ 2'-5'-ОЛІГОАДЕНІЛАТІВ ТА ЇХНІХ АНАЛОГІВ ІЗ ПРОТЕЇНАМИ ЗА ДОПОМОГОЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЇ СПЕКТРОСКОПІЇ

З. Ю. ТКАЧУК¹, Л. В. ДУБЕЙ¹, В. В. ТКАЧУК¹, Л. В. ТКАЧУК¹,
М. Ю. ЛОСИЦЬКИЙ², В. М. ЯЩУК², І. Я. ДУБЕЙ¹

¹Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ;

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Україна;

e-mail: ztkachuk@bigmir.net

В роботі досліджено взаємодію серії «корових» 2'-5'-олігоаденілатів (2-5A) та їхніх аналогів із протеїнами – альбуміном, інтерфероном та імуноглобуліном G – методами флуоресцентної спектроскопії. За взаємодії олігоаденілатів у концентрації 5×10^{-5} М з альбуміном спостерігається різке гасіння флуоресценції протеїну (до 67%). Меншою мірою вивчені сполуки гасили емісію інтерферону, а за їхньої взаємодії з імуноглобуліном у тих самих умовах не відбувається значних змін флуоресценції. Величина гасіння залежить від структури препаратів 2-5A та знижується зі зменшенням їхньої концентрації. Ці дані свідчать про те, що 2-5A активно зв'язуються з альбуміном, менш ефективно – з інтерфероном і практично не взаємодіють з імуноглобуліном. Виходячи з різної ефективності гасіння препаратами емісії, збудженої при 280 та 296 нм, зроблено припущення про можливу роль тирозину та триптофану у процесах зв'язування конкретних препаратів. Розглянуто можливі механізми взаємодії олігоаденілатів із протеїнами.

Ключові слова: 2-5-олігоаденілати, гасіння флуоресценції, альбумін, інтерферон, імуноглобулін.

Низькомолекулярні медіатори під назвою 2'-5'-олігоаденілати (2-5A) із загальною формулою $\text{ppp}(2'-5')_n\text{A}_n$, де n від 2 до 10, синтезуються у клітині за допомогою інтерфероніндукованого ензиму 2'-5'-олігоаденілатсинтетази. 2-5A відіграють ключову роль у механізмі противірусної дії інтерферону, вони беруть участь у процесах клітинного росту і диференціації, апоптозу, патогенезі діабету й атеросклерозу і можуть бути перспективними препаратами в онкології та гематології [1, 2]. Біологічна активність таких олігонуклеотидів пов'язана з активуванням ензиму РНК-ази L. Активація можлива тільки фосфорильованими 2-5A, фосфатні групи яких забезпечують зв'язування з ензимом. Дефосфорильовані, так звані «корові» 2'-5'A, не зв'язуються з РНК-азою L та не активують її [1–3].

Багатолітні дослідження цього класу сполук спираються на так звану «інтерферонову гіпотезу» біологічної дії [1–4], яка передбачає противірусну дію сполук цього типу через утворення фосфорильованих 2'-5'-олігоаденілатів і подальшу активацію ними РНК-ази L, яка специфічно розщеплює вірусні мРНК і, таким чином, забезпечує противірусну дію. Проте

«корові» олігоаденілати виявляють різні типи активності, що зовсім не стосуються системи інтерферон–РНК-ази L. Так, «корові» 2-5A та їхні аналоги є інгібіторами відторгнення тканин після трансплантації [5], мають кардіопротекторні властивості [6], стимулюють проліферацію стовбурових клітин кісткового мозку та впливають на їхній апоптоз [7], демонструють гальмуючий вплив на скорочення гладеньких м'язів аорти та стегнової артерії шура [8] тощо.

Механізм дії «корових» 2-5A вивчено недостатньо. Невідомі всі протеїни-мішені цих сполук. Раніше нами було показано, що однією з мішеней біологічної дії цих олігонуклеотидів та їхніх аналогів є фосфодієстерази циклічних нуклеозидів. Запропоновано гіпотезу широкої участі 2-5A у регуляції цих ключових ензимів, які контролюють велику кількість клітинних процесів [9]. Інші автори вважають, що й антипроліферативна дія 2-5A та їхніх аналогів може бути пов'язана з активацією системи цАМФ [10].

Ми припускаємо, що у клітині знаходяться й інші протеїни-мішені «корових» 2-5A. Пошук цих протеїнів та вивчення їх взаємодії з 2'-5'A дозволили би встановити

деякі фундаментальні механізми регуляції клітинних процесів, а також знайти нові терапевтичні препарати.

Відомо, що зв'язування протеїнів з певними лігандами можна визначити за змінами у спектрах флуоресценції цих протеїнів чи їхніх лігандів (інтенсивність, максимум емісії тощо). Якщо в районі сайту зв'язування ліганду присутній залишок флуоресцентної амінокислоти, стає можливою взаємодія хромофорів, що веде до зміни параметрів флуоресценції за рахунок таких явищ, як перенос енергії чи гасіння флуоресценції амінокислоти або ліганду. До спектральних змін можуть привести також конформаційні зміни мікрооточення флуоресцентної амінокислоти у протеїні, що відбуваються внаслідок зв'язування протеїну з лігандом [11–13].

Олігоаденілатам не притаманна власна флуоресценція при кімнатній температурі, тому зв'язування зручно вивчати за змінами у спектрах короткохвильової флуоресценції протеїнів, обумовленої ароматичними амінокислотами, в першу чергу триптофаном та тирозином. Поглинання протеїнів при 280 нм пов'язано з тирозином та триптофаном, і збудження при цій довжині хвилі індукує флуоресценцію обох амінокислот. Поглинання ж протеїнів при 295 нм асоціюється майже виключно із триптофаном, і його флуоресценцію можна селективно збудити при 295–305 нм [11, с. 237–260].

Для нас особливо важливим є те, що флуоресцентні методи дозволяють досить швидко знайти протеїни, що найефективніше взаємодіють з конкретним лігандом, і навпаки. Це початковий етап досліджень механізму біологічної активності 2-5А поза рамками традиційної «інтерференової гіпотези».

Метою нашої роботи було дослідити можливості взаємодії та зв'язування «корових» 2'-5'-А з деякими протеїнами методами флуоресцентної спектроскопії.

Матеріали і методи

В роботі використано аденозин (Sigma, США), альбумін сироватки людини (Біофарма, Україна), інтерферон- α людини (Інтерфармбіотек, Україна) та імуноглобулін G людини (Octapharma, Швейцарія). Досліджували взаємодію цих протеїнів із серією 2'-5'-А, яка включала природний тример 2-5A₃ та його аналоги, що містять у 3'-положенні залишки 8-аміноаденозину (2-5A₃-NH₂), інозиту (2-5A₃-ino), кордицепіну (2-5A₃-cord) та епокси-аденозину (2-5A₃-epo),

а також тіофосфатний аналог тримера (2-5A₃-thio). Крім того, вивчали епоксимодифікований динуклеотид 2-5A₂-epo, аденозин Ade та епокси-аденозин Ade-epo. Препарати 2-5А одержали раніше розробленими нами методами на основі фосфотрифірної синтезу в розчині [14, 15]. Для синтезу тіофосфатного аналога 2-5A₃-thio ми вперше адаптували модифікований Н-фосфонатний метод [16] з використанням ацилфосфонатних інтермедіатів, початково запропонований для синтезу тіоаналогів коротких дезоксиолігонуклеотидів. Епокси-аденозин (2',3'-ангідроаденозин) одержали методом, наведеним у роботі [17].

Флуоресцентні дослідження. Суміш 2-5А з відповідним протеїном у буфері трис-НCl (20 мМ, рН 7,7), який містив 100 мМ NaCl та 5 мМ MgCl₂, інкубували при 37 °С протягом 10 хв, після чого записували спектри флуоресценції на спектрофлуориметрі Cary Eclipse (Varian, Австралія) при довжині хвилі збудження 280 та 296 нм. Вимірювання проводили у кварцовій кюветі товщиною 1 см. Спектри реєстрували в діапазоні 300–500 нм. Концентрація протеїнів у всіх випадках була однаковою (3,5×10⁻⁶ М) крім імуноглобуліну G (3,5×10⁻⁷ М), концентрація препаратів 2-5А в суміші становила 5×10⁻⁵, 5×10⁻⁶ або 5×10⁻⁷ М. У присутності цих препаратів спостерігали гасіння флуоресценції протеїнів. Величину гасіння флуоресценції Q визначали як відносне зниження інтенсивності емісії протеїну в її максимумі порівняно з контролем – протеїном за відсутності доданого аденілату:

$$Q = [(F_0 - F)/F_0] \times 100\%,$$

де F – інтенсивність флуоресценції протеїну у присутності препарату 2-5А, F₀ – інтенсивність флуоресценції самого протеїну в тих самих умовах.

Всі дані, наведені в таблиці, одержано внаслідок проведення трьох незалежних вимірювань, стандартна похибка не перевищувала 5%.

Результати та обговорення

У роботі вивчали вплив 2'-5'-А різної структури, а також похідних аденозину на власну флуоресценцію низки протеїнів – альбуміну, імуноглобуліну IgG та інтерферону. Здебільшого спостерігали гасіння флуоресценції протеїнів препаратами. На рисунку наведено спектри флуоресценції протеїнів у присутності 2-5А. Ці дані однозначно свідчать про взаємодію препаратів із протеїнами.

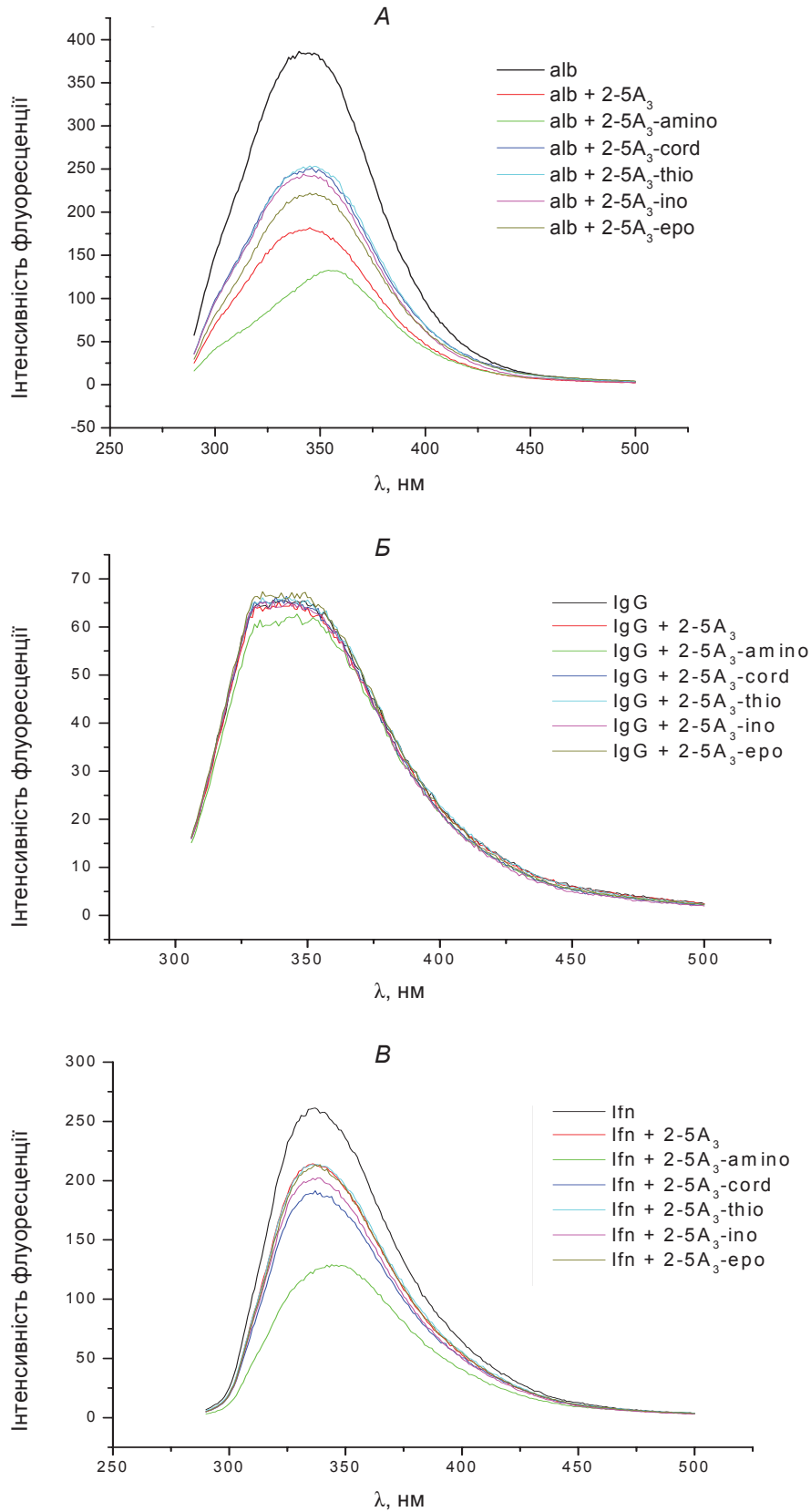
Вплив різних концентрацій 2-5А на флуоресценцію протеїнів, що збуджувалась при 280 та 296 нм

Сполука	Конц., М	Гасіння флуоресценції Q, %					
		Альбумін		Інтерферон		Імуноглобулін	
		280 нм	296 нм	280 нм	296 нм	280 нм	296 нм
2-5A ₃	5×10 ⁻⁵	55,0	0,0	18,0	2,5	7,6	1,0
	5×10 ⁻⁶	11,0	0,0	0,0	1,7	0,0	0,0
	5×10 ⁻⁷	2,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2-5A ₃ -NH ₂	5×10 ⁻⁵	67,0	54,0	50,0	39,0	5,0	5,7
	5×10 ⁻⁶	13,0	6,3	2,7	6,6	0,0	3,4
	5×10 ⁻⁷	7,9	6,0	0,0	1,6	0,0	0,0
2-5A ₃ -epo	5×10 ⁻⁵	45,0	18,4	18,5	5,0	0,0	0,0
	5×10 ⁻⁶	3,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	5×10 ⁻⁷	2,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2-5A ₃ -ino	5×10 ⁻⁵	40,0	0,0	22,7	3,3	2,0	1,0
	5×10 ⁻⁶	6,6	0,0	0,0	2,0	0,0	0,0
	5×10 ⁻⁷	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0	0,0
2-5A ₃ -cord	5×10 ⁻⁵	38,0	6,0	27,3	7,4	2,5	0,0
	5×10 ⁻⁶	9,0	0,0	1,2	2,5	0,0	0,0
	5×10 ⁻⁷	2,4	0,0	0,0	2,0	0,0	3,0
2-5A ₃ -thio	5×10 ⁻⁵	37,0	11,4	17,7	5,7	0,0	0,0
	5×10 ⁻⁶	16,0	11,3	1,5	5,5	0,0	0,0
	5×10 ⁻⁷	3,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2-5A ₂ -epo	5×10 ⁻⁵	26,3	18,4	14,6	14,8	0,7	3,0
	5×10 ⁻⁶	3,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	5×10 ⁻⁷	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ade-epo	5×10 ⁻⁵	22,0	14,0	19,2	0,0	0,0	0,0
	5×10 ⁻⁶	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	5×10 ⁻⁷	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ade	5×10 ⁻⁵	26,0	0,0	15,0	0,0	0,0	1,5
	5×10 ⁻⁶	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	5×10 ⁻⁷	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Гасіння флуоресценції широко використовують для вивчення конформаційної динаміки біополімерів, фолдингу протеїнів, причому навіть на рівні одиночних молекул [11, 13, 18, 19]. Гасіння флуоресценції протеїнів можна використати для швидкого скринінгу інгібіторів ензимів, причому сполуки, що зв'язуються із протеїном неспецифічно, його флуоресценцію помітно не гасять [20]. Найбільше уваги приділяється гасінню флуоресценції триптофану. Молекулярні механізми цього процесу та фактори, що впливають на нього, всебічно вивчені [11, 21–23].

Альбумін є найрозповсюдженішим протеїном сироватки крові, відповідальним за транспортування як ендо-, так і екзогенних речовин, тому процеси його зв'язування з низькомолекулярними сполуками відіграють дуже важливу роль у фармакології та фармакокінетиці медичних препаратів. Механізм взаємодії альбумінів з малими молекулами дуже широко вивчався флуоресцентними методами, в т.ч. з використанням ефекту гасіння флуоресценції протеїну [24–29].

Гасіння флуоресценції імуноглобулінів теж широко використовувалося для вивчення



Вплив 2-5-А на спектри флуоресценції альбуміну (А), імуноглобуліну (Б) та інтерферону (В). Концентрація протеїнів $3,5 \times 10^{-6}$ М, 2-5А – 5×10^{-5} М. Довжина хвилі збудження флуоресценції становить 280 нм (А, В) та 296 нм (Б)

процесів зв'язування цих протеїнів із малими фармакологічно важливими молекулами [30–32], а також конформаційних змін протеїнових молекул, що відбуваються у разі взаємодії антиген–антитіло [33].

Дослідження взаємодії олігоаденілатів з альбуміном та імуноглобуліном у нашій роботі проводиться вперше.

Що стосується інтерферонів, то в цьому разі флуоресцентні методи досліджень застосовувалися рідше, причому переважно для вивчення їхньої взаємодії з біологічними макромолекулами (ензими, рецептори тощо) [34–36]. Із використанням гасіння флуоресценції вивчалися конформаційні зміни інтерферонів, що відбуваються за їхньої денатурації [37], взаємодія їх з флуоресцентними барвниками [38] та механізм взаємодії протеїнів із такими низькомолекулярними сполуками, як йодид калію та акриламід [39]. Досліджували взаємодію інтерферонів з 26-членним олігонуклеотидним аптамером [40]. Показано, що цей олігонуклеотид, що специфічно зв'язується з γ -інтерфероном, змінює вторинну та третинну структуру останнього.

Проте нам не вдалося знайти в літературі даних щодо вивчення взаємодії інтерферонів з 2-5A за допомогою флуоресцентних методів.

Внаслідок проведених експериментів встановлено, що особливо різке гасіння флуоресценції протеїну спостерігається за взаємодії олігоаденілатів з альбуміном, а за взаємодії імуноглобуліну з усіма вивченими сполуками в тих самих умовах не відбувається значних змін емісії. Проміжне положення займає інтерферон. Величина його гасіння залежить від структури та концентрації препаратів 2-5A. Одержані дані наведено в таблиці.

Всі досліджені препарати впливають на флуоресценцію альбуміну і меншою мірою на емісію інтерферону, хоча відносні величини гасіння, одержаного зі збудженням при 280 та 296 нм, суттєво відрізняються. Природний тример 2-5A₃ в концентрації 5×10^{-5} М (~15 молярних еквівалентів відносно протеїнів) та за збудження 280 нм гасив емісію альбуміну на 55%, інтерферону на 18% та імуноглобуліну на 8%. Гасіння триптофанової емісії (збудження при 296 нм) у всіх випадках було значно меншим. Високий ступінь гасіння емісії альбуміну в цих умовах продемонстрували аналоги 2-5A₃. Найвищу активність виявляє аміноаналог 2-5A₃-NH₂, який гасить флуоресценцію альбуміну на 67% при збудженні 280 нм і на 54% при збудженні 296 нм. Він також суттєво

знижує емісію інтерферону (відповідно на 50 і 39%). В той же час на порядок менше гасіння спостерігається за його взаємодії з імуноглобуліном (5–6%). Аналоги 2-5A₃-cord і 2-5A₃-thio в концентрації 5×10^{-5} М діють на флуоресценцію альбуміну майже однаково (гасіння 37–38%), а гасіння флуоресценції інтерферону є меншим – 27 і 18% у разі збудження 280 нм та 7 і 6% при збудженні 296 нм.

Подібні загальні закономірності спостерігаються і для інших сполук. 2-5A₂-еро, епокси-аденозин і аденозин (всі 5×10^{-5} М) діють на флуоресценцію альбуміну, збуджену при 280 нм, майже однаково: гасіння становить 26, 22 і 26%. Вплив цих препаратів на флуоресценцію інтерферону в тих самих умовах теж дуже близький, хоча й помітно менший, ніж для альбуміну. За збудження 296 нм спостерігається суттєва різниця у впливі препаратів.

Цікаво, що 2-5A₃ та 2-5A₃-ino, а також аденозин сильно гасять емісію тирозину в альбуміні, проте зовсім не впливають (в межах похибки експерименту) на флуоресценцію триптофану. Інші препарати тією чи іншою мірою впливають на триптофанову емісію альбуміну. Характерно, що аденозин не гасить емісію триптофану в жодному із протеїнів, а епокси-аденозин гасить флуоресценцію цієї амінокислоти лише в альбуміні. Жоден з цих трьох препаратів не впливає на флуоресценцію IgG.

Здебільшого величина гасіння емісії, що збуджувалось при 280 нм, помітно вища, ніж флуоресценції триптофану. Лише для аденозину та 2-5A₂-еро в концентрації 5×10^{-5} М спостерігається переважання гасіння триптофанової емісії у разі взаємодії з імуноглобуліном (1–3% для збудження при 296 нм, 0% для 280 нм). У низьких концентраціях (5×10^{-7} М, 7 екв. протеїну відносно аденілату) для низки аналогів 2-5A₃ спостерігається перевищення гасіння триптофану порівняно з тирозином за взаємодії з інтерфероном, хоча абсолютні величини є низькими (до 2%, за повної відсутності гасіння за збудження 280 нм). Проте дані щодо активнішого гасіння емісії триптофану для описаних вище випадків фактично знаходяться в межах похибки експерименту.

Залежність величини гасіння від довжини хвилі збудження має важливе значення для встановлення механізму взаємодії протеїну із препаратом. Порівняння гасіння флуоресценції Q, одержаного за збудження при 280 та 295 нм, демонструє, чи бере участь у взаємодії лише триптофан, чи також і тирозин. Якщо величини гасіння за двох довжин

хвиль практично збігаються, це свідчить про те, що тирозин не бере участь у процесі взаємодії й весь ефект пов'язаний із триптофаном. Якщо ж більше спостерігається гасіння флуоресценції за довжини хвилі збудження 280 нм порівняно з 295 нм, це говорить про те, що залишки тирозину теж беруть участь у взаємодії протеїну із препаратом. Це зв'язано з тим, що збудження при 280 нм зумовлює флуоресценцію і тирозину, і триптофану, тоді як збудження при 295 нм веде лише до триптофанової флуоресценції [41, 42].

Виходячи з одержаних даних (таблиця) можна дійти висновку про те, що у зв'язуванні природного 2-5A₃ в концентрації 5×10⁻⁵ М з усіма протеїнами майже виключну роль відіграє взаємодія з тирозином. Подібно до нього діє аналог 2-5A₃-іно. Для препаратів 2-5A₃-еро, 2-5A₃-cord та 2-5A₃-thio спостерігається зростання ролі триптофану в гасінні флуоресценції. У разі з 2-5A₃-NH₂, а також динуклеотидом 2-5A₂-еро спостерігається вже переважання ролі триптофану.

Для нуклеозидів специфічність впливу на окремі амінокислоти теж досить виражена. Так, аденозин за взаємодії як з альбуміном, так і з інтерфероном спричинює лише гасіння емісії тирозину. В той самий час, його епоксид-аналог так само діє на інтерферон, проте у разі його дії на альбумін спостерігається переважна дія триптофану в загальному гасінні емісії протеїну. Характерно, що для нуклеозидів зниження концентрації веде до більш різкого падіння впливу на протеїни, ніж для олігонуклеотидів.

Дані, одержані в експерименті з імуноглобуліном, фактично знаходяться в межах похибки експерименту. Лише для 2-5A₃ та його аміно-аналога спостерігається помітний вплив (гасіння в межах 5–7%), причому в першому разі має місце переважна дія тирозину, а у другому — лише триптофану. В цілому, результати проведених експериментів з високою ймовірністю свідчать про відсутність помітного зв'язування IgG з олігоаденілатами.

Зменшення концентрації 2-5A в 10–100 разів (відповідно 1,5 та 0,15 екв. препарату відносно протеїну) здебільшого цілком закономірно веде до значного зниження ефекту гасіння флуоресценції.

Таким чином, загальною закономірністю є те, що всі досліджені препарати в концентрації 5×10⁻⁵ М ефективно гасять флуоресценцію альбуміну, меншою мірою — інтерферону і майже не впливають на емісію імуноглобуліну G. Результати спектрально-

флуоресцентних досліджень свідчать на користь взаємодії та зв'язування олігоаденілатів із деякими протеїнами. Із одержаних даних можна дійти висновку, що досліджені препарати в максимальній концентрації специфічно зв'язуються з альбуміном, менш ефективно з інтерфероном і практично не взаємодіють з імуноглобуліном, тобто спостерігається значна селективність щодо конкретних протеїнів. Виходячи з різної ефективності препаратів на гасіння емісії тирозину та триптофану, можна припустити, що їхня взаємодія з першими двома протеїнами здебільшого відбувається за участю або в безпосередній близькості до залишків тирозину, а роль триптофану, як правило, відносно менша. У разі з імуноглобуліном зв'язування препаратів відсутнє або слабке, проте у взаємодії цього протеїну з низкою сполук (наприклад, 2-5A₃-NH₂) головну роль може відігравати триптофан. Аміно-аналог 2-5A₃-NH₂ виявляється найефективнішим лігандом для усіх протеїнів, причому в його взаємодії з ними ключову роль відіграє триптофан. У разі зниження молярного співвідношення препарат–протеїн ефект гасіння флуоресценції стає менш помітним.

Наші розрахунки та розгляд ієрархії енергетичних станів системи 2-5A₃-протеїн приводять до висновку, що похідні 2-5A можуть гасити власну флуоресценцію протеїну за рахунок таких можливих механізмів. По-перше, це перепоглинання молекулами аденілатів фотонів збудження флуоресценції протеїну. Точніше, поглинання частини фотонів збуджуючого світлового потоку молекулами 2-5A має призводити до падіння інтенсивності флуоресценції альбуміну. При цьому зменшення інтенсивності флуоресценції лінійно залежить від концентрації молекул 2-5A (у разі невеликих концентрацій). Цей механізм має істотно впливати на гасіння, оскільки для довжини хвилі збудження λ = 280 нм ε(Trp) = 5000, ε(Tyr) = 1300, ε(2'-5'-A3) = 6000. До того ж у молекулі альбуміну знаходиться 1 триптофанова група, 18 тирозинових груп та 31 феніл-аланінова група. По-друге, можливе перехоплення енергії електронного збудження тирозинових груп молекулами олігоаденілатів. Цей механізм має працювати, оскільки за нашими розрахунками перший синглетний збуджений рівень 2-5-A3 розташований нижче, ніж відповідний рівень тирозину, але вище, ніж відповідний рівень триптофану. По-третє, це утворення комплексів між похідними 2-5A та оптичними центрами протеїну. І, нарешті, можливий четвертий варіант, коли

відбувається зміна конформації макромолекули протеїну під час контакту з 2-5А.

Дією лише першого механізму не можна вичерпно пояснити встановлену залежності. Механізми 2, 3 й 4 можуть бути реалізовані лише у разі контакту молекули протеїну з олігоаденілатом, оскільки дія кожного з цих механізмів вимагає малої відстані між оптичними центрами протеїну та π -електронними системами 2-5А. Наведені міркування свідчать на користь зв'язування аденілатів із протеїнами, які вивчалися. Для глибшого розуміння механізмів взаємодії протеїнів із молекулами олігоаденілатів будуть проведені додаткові дослідження.

Представлену вище методику буде використано і для дослідження взаємодії 2-5А з іншими протеїнами, оскільки вона дозволяє швидко знайти пари протеїн–ліганд, що ефективно взаємодіють. Подальші експерименти (наприклад, з використанням флуоресцентного титрування) дозволять визначити кількість сайтів зв'язування лігандів із протеїнами та відповідні константи зв'язування. Розпочато дослідження взаємодії 2-5А із протеїнами з використанням нових реагентів (синтезованих нами флуоресцентно мічених 2'-5'-триаденілатів), що надасть додаткову інформацію щодо механізму зв'язування 2-5А з різними клітинними протеїнами, його специфічності, кінетики процесу тощо.

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ 2'-5'-ОЛИГОАДЕНИЛАТОВ И ИХ АНАЛОГОВ С ПРОТЕИНАМИ ПРИ ПОМОЩИ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

З. Ю. Ткачук¹, Л. В. Дубей¹, В. В. Ткачук¹,
Л. В. Ткачук¹, М. Ю. Лосицкий²,
В. Н. Ящук², І. Я. Дубей¹

¹Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев;

²Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Украина;
e-mail: ztkachuk@bigmir.net

В работе исследовали взаимодействие серии «коровых» 2'-5'-олигоаденилатов (2-5А) и их аналогов с протеинами альбумином, интерфероном и иммуноглобулином G методами флуоресцентной спектроскопии. При взаимодействии олигоаденилатов в концентрации 5×10^{-5} М с альбумином наблюдается резкое гашение флуоресценции протеина (до 67%). Изученные соединения в меньшей степени

гасят эмиссию интерферона, а при взаимодействии их с иммуноглобулином в тех же условиях значительных изменений флуоресценции не отмечается. Степень гашения зависит от структуры препаратов 2-5А и снижается с уменьшением их концентрации. Эти данные свидетельствуют, что 2-5А активно связываются с альбумином, менее эффективно — с интерфероном и практически не взаимодействуют с иммуноглобулином. Исходя из разной эффективности гашения препаратами эмиссии, возбужденной при 280 и 296 нм, сделано предположение о возможной роли тирозина и триптофана в процессах связывания конкретных препаратов. Рассмотрены возможные механизмы взаимодействия олигоаденилатов с протеинами.

Ключевые слова: 2-5-олигоаденилаты, тушение флуоресценции, альбумин, интерферон, иммуноглобулин.

STUDYING THE INTERACTION OF 2'-5'-OLIGOADENYLATE AND THEIR ANALOGUES WITH PROTEINS BY FLUORESCENCE SPECTROSCOPY

Z. Yu. Tkachuk¹, L. V. Dubey¹,
V. V. Tkachuk¹, L. V. Tkachuk¹,
M. Yu. Losytskyy², V. M. Yashchuk²,
I. Ya. Dubey¹

¹Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

²Taras Shevchenko Kyiv National University, Ukraine;
e-mail: ztkachuk@bigmir.net

Summary

The interaction of “core” 2'-5'-oligoadenylates (2-5A) and their analogues with proteins albumin, interferon and immunoglobulin G was studied by fluorescence spectroscopy methods. Strong quenching of protein fluorescence (up to 67%) was observed upon interaction of oligoadenylates in concentration of 5×10^{-5} M with albumin. Investigated compounds quenched the emission of interferon to a lesser extent, whereas no significant fluorescence changes occurred upon interaction with immunoglobulin under the same conditions. The level of quenching depended on the structure of 2-5A compounds and decreased with the decrease of their concentration. These data suggest that 2-5A actively bind to albumin and less efficiently to interferon, and practically do not interact with immunoglobulin. Taking into consideration different efficiency of quenching of the fluorescence excited at 280 and 296 nm, the

assumption has been made about a possible role of tyrosine and tryptophan in the binding of a given compound to proteins. Possible mechanisms of interaction of oligoadenylates with proteins are discussed.

Key words: 2-5-oligoadenylates, fluorescence quenching, albumin, interferon, immunoglobulin.

1. *Player M. R., Torrence P. F.* // *Pharmacol. Ther.* – 1998. – **78**, N 2. – P. 55–113.
2. *Silverman R. H.* // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2007. – **18**, N 5–6. – P. 381–388.
3. *Liang S. L., Quirk D., Zhou A.* // *IUBMB Life.* – 2006. – **58**, N 9. – P. 508–514.
4. *Malmgaard L.* // *J. Interferon Cytokine Res.* – 2004. – **24**, N 8. – P. 439–454.
5. *Tkachuk Z., Kvasnyuk E., Matsuka G., Mikhailopulo I.* // *United States Patent 5571799*, 1996.
6. *Сидорик Л. Л., Дубей І. Я., Бобык В. І. та ін.* // *Доп. НАН України.* – 2001. – № 9. – С. 161–165.
7. *Ткачук З. Ю., Дубей І. Я., Яковенко Т. Г. та ін.* // *Biopolymers and Cell.* – 2007. – **23**, N 1. – С. 14–20.
8. *Філіппов І. Б., Ткачук З. Ю., Дубей І. Я.* // *Доп. НАН України.* – 2010. – № 6. – С. 152–157.
9. *Ткачук З. Ю., Ткачук В. В., Ткачук Л. В. та ін.* // *Biopolymers and Cell.* – 2001. – **17**, N 5. – С. 411–416.
10. *Itkes A. V.* // *Progr. Mol. Subcell. Biol.* – 1994. – **14**. – P. 209–221.
11. *Albani J. R.* *Structure and dynamics of macromolecules: absorption and fluorescence studies* / Elsevier: Amsterdam, 2004. – 426 p.
12. *Lakowicz J. R.* *Principles of fluorescence spectroscopy* / 3rd edition, Springer Science: New York, 2006. – 954 p.
13. *Demchenko A. P.* *Introduction to fluorescence sensing* / Springer Science: New York, 2009. – 586 p.
14. *Ткачук З. Ю., Дубей І. Я., Яковенко Т. Г. та ін.* // *Biopolymers and Cell.* – 2007. – **23**, N 1. – С. 14–20.
15. *Дубей І. Я., Дубей Л. В.* // *Там само.* – N 6. – С. 538–544.
16. *Fuji M., Ozaki K., Sekine M., Hata T.* // *Tetrahedron.* – 1987. – **43**, N 15. – P. 3395–3407.
17. *Robins M. J., Fourn Y., Mengel R.* // *J. Org. Chem.* – 1974. – **39**, N 11. – P. 1564–1570.
18. *Eggeling C., Fries J. R., Brand L. et al.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – **95**, N 4. – P. 1556–1561.
19. *Zhuang X., Ha T., Kim H. D. et al.* // *Ibid.* – 2000. – **97**, N 26. – P. 14241–14244.
20. *Bodenreider C., Beer D., Keller T. H. et al.* // *Anal. Biochem.* – 2009. – **395**, N 2. – P. 195–204.
21. *Marme N., Knemeyer J.-P., Sauer M., Wolfrum J.* // *Bioconjugate Chem.* – 2003. – **14**, N 6. – P. 1133–1139.
22. *Doose S., Neuweiler H., Sauer M.* // *Chem. Phys. Chem.* – 2005. – **6**, N 11. – P. 2277–2285.
23. *Alston R. W., Lasagna M., Grimsley G. R. et al.* // *Biophys. J.* – 2008. – **94**, N 6. – P. 2280–2287.
24. *Sulkowska A.* // *J. Mol. Struct.* – 2002. – **614**, N 1–3. – P. 227–232.
25. *Silva D., Cortez C. M., Louro S. R. W.* // *Spectrochim. Acta Part A.* – 2004. – **60**, N 5. – P. 1215–1223.
26. *Ercelen S., Klymchenko A. S., Mély Y., Demchenko A. P.* // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2005. – **35**, N 5. – P. 231–242.
27. *Hu Y.-J., Liu Y., Zhang L.-X. et al.* // *J. Mol. Struct.* – 2005. – **750**, N 1–3. – P. 174–178.
28. *Kandagal P. B., Shaikh S. M. T., Manjunatha D. H. et al.* // *J. Photochem. Photobiol. A.* – 2007. – **189**, N 1. – P. 121–127.
29. *Trynda-Lemiesz L., Wiglusz K.* // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2010. – **52**, N 2. – P. 300–304.
30. *Liu Y., He W., Gao W. et al.* // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2005. – **37**, N 1–2. – P. 1–11.
31. *He W., Yao X., Liu P. et al.* // *Science in China, Ser. B.* – 2006. – **49**, N 6. – P. 550–559.
32. *Liu Y., Yang Z., Du J. et al.* // *Immunobiol.* – 2008. – **213**, N 8. – P. 651–661.
33. *Hill R. J.* // *Eur. J. Immunol.* – 1973. – **3**, N 6. – P. 330–334.
34. *Falach A., Nathan I., Baram S. et al.* // *Bioconjugate Chem.* – 1997. – **8**, N 4. – P. 459–465.
35. *Gavutis M., Lata S., Lamken P. et al.* // *Biophys. J.* – 2005. – **88**, N 6. – P. 4289–4302.
36. *Kalie E., Jaitin D. A., Podoplelova Y. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 2008. – **283**, N 47. – P. 32925–32936.
37. *Christova P., Todorova K., Timtcheva I. et al.* // *Z. Naturforsch.* – 2003. – **58c**, N 3–4. – P. 288–294.
38. *Jeon H., Choi S.* // *Genomics & Informatics.* – 2007. – **5**, N 3. – P. 113–117.

39. *Borukhov S. I., Strongin A. Ya.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1990. – **169**, N 1. – P. 282–288.
40. *Balasubramanian V., Nguyen L. T., Balasubramanian S. V., Ramanathan M.* // *Mol. Pharm.* – 1998. – **53**, N 5. – P. 926–932.
41. *Sulkowska A., Bojko B., Rownicka J., Sulkowski W. W.* // *J. Mol. Struct.* – 2006. – **792–793**. – P. 249–256.
42. *Seedher N., Kanojia M.* // *Centr. Eur. J. Chem.* – 2009. – **7**, N 1. – P. 96–104.

Отримано 20.09.2010