

УДК 577.323

**СПЕКТРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СВЯЗЫВАНИЯ МЕТИЛОВОГО ЭФИРА ФЕОФОРБИДА-а С СИНТЕТИЧЕСКИМИ ПОЛИНУКЛЕОТИДАМИ И ДНК****О.А. Рязанова<sup>1</sup>, И.М. Волошин<sup>1</sup>, Л.В. Дубей<sup>2</sup>, В.Н. Зозуля<sup>1</sup>,**<sup>1</sup>*Физико-технический институт низких температур им. Б.И. Веркина НАН Украины, пр. Ленина 47, 61103, Харьков, ryazanova@ilt.kharkov.ua*<sup>2</sup>*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, ул. Заболотного 150, 03143, Киев*

Поступила в редакцию 5 мая 2009 г.

Принята 28 мая 2009 г

Изучено связывание метилового эфира феофорбида-а (Мерпхео-а) с синтетическими двухнитевыми полинуклеотидами poly(A)·poly(U), poly(G)·poly(C), четырехнитевым poly(G), и нативной ДНК. Измерения проведены в водных буферных растворах pH6,9 при низкой ионной силе (2 мМ Na<sup>+</sup>) в широком диапазоне соотношений молярных концентраций фосфатов и красителя (P/D) методами абсорбционной и поляризованной флуоресцентной спектроскопии. Определены абсорбционные и флуоресцентные характеристики комплексов биополимеров с красителем. Установлено, что для комплексов нейтрального Мерпхео-а с четырехнитевым poly(G) наблюдаются значительные спектральные изменения: а именно, гипохромизм поглощения, батохромный сдвиг полосы Соре в спектре поглощения (~ 26 нм), батохромный сдвиг максимума флуоресценции (~ 9 нм) и 48-кратное увеличение интенсивности флуоресценции. В отличие от этого, связывание Мерпхео-а с двухнитевыми полинуклеотидами poly(A)·poly(U), poly(G)·poly(C) и тимусной ДНК сопровождается более слабым спектральным сдвигом полос поглощения и флуоресценции, а также возрастанием интенсивности флуоресценции не более чем в 4 раза. Наблюдаемые спектральные изменения и высокое значение степени поляризации флуоресценции (0,26) свидетельствуют об интеркаляции хромофора красителя в четырехнитевую полинуклеотидную структуру. Небольшое увеличение степени поляризации флуоресценции красителя (0,12) и более слабые спектральные сдвиги свидетельствуют о другом типе комплексообразования, а именно о встраивании Мерпхео-а в бороздку двойной спирали, предположительно в виде димеров. Значительное изменение флуоресцентных характеристик Мерпхео-а при связывании с четырехнитевым полинуклеотидом poly(G) делает это производное перспективным для использования в качестве флуоресцентного зонда G-квадруплексной структуры.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** феофорбид-а, полинуклеотиды, ДНК, интеркаляция, флуоресценция, поглощение.

**SPECTROSCOPIC STUDY OF PHEOPHORBIDE-a METHYL ETHER BINDING TO SYNTHETIC POLYNUCLEOTIDES AND DNA****О.А. Ryazanova<sup>1</sup>, I.M. Voloshin<sup>1</sup>, L.V. Dubey<sup>2</sup>, V.N. Zozulya<sup>1</sup>,**<sup>1</sup>*B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of NAS of Ukraine, 47 Lenin ave., 61103, Kharkiv, ryazanova@ilt.kharkov.ua*<sup>2</sup>*Institute of Molecular Biology and Genetics of NAS of Ukraine, 150 Zabolotnogo str., 03143, Kiev*

Binding of pheophorbide-a methyl ether (Mepheo-a) to synthetic double-stranded poly(A)·poly(U), poly(G)·poly(C) polynucleotides, four-stranded poly(G), and native DNA was studied by methods of absorption and polarized fluorescent spectroscopy. Measurements were carried out in aqueous buffered solutions pH6.9 of low ionic strength (2 мМ Na<sup>+</sup>) in a wide range of phosphate-to-dye molar ratios (P/D). Absorption and fluorescent characteristics of complexes formed by the dye with the biopolymers were determined. It is established that binding of neutral Mepheo-a to four-stranded poly(G) is accompanied by significant spectral transformations, namely, by dye absorption hypochromism, bathochromic shift of Soret absorption band (~26 nm), bathochromic shift of fluorescence band maximum (~9 nm) and 50-fold increase of dye fluorescence intensity. Unlike that, Mepheo-a binding to double-stranded poly(A)·poly(U), poly(G)·poly(C) polynucleotides and to calf thymus DNA is accompanied by insignificant spectral shifts of absorption and fluorescence bands, as well as by no more than 4-fold rise of fluorescence intensity. Observed substantial spectral changes and high value of fluorescence polarization degree (0.26) evidence the intercalation of dye chromophore to four-stranded polynucleotide structure. Insignificant increase of dye fluorescence polarization degree (0.12) and weaker spectral transformations point to another binding mode, namely, incorporation of Mepheo-a to a groove of double helix, presumably, in the dimeric form. Since binding of Mepheo-a to four-stranded poly(G) polynucleotide induces substantial changes in fluorescent characteristics of the dye, this derivative is promising as a fluorescent probe for monitoring the G-quadruplex structure.

**KEY WORDS:** pheophorbide-a, polynucleotides, DNA, intercalation, fluorescence, absorption.

## СПЕКТРОСКОПІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЗВ'ЯЗУВАННЯ МЕТИЛОВОГО ЕФІРУ ФЕОФОРБІДУ-а З СИНТЕТИЧНИМИ ПОЛІНУКЛЕОТИДАМИ І ДНК

О.А. Рязанова<sup>1</sup>, И.М. Волошин<sup>1</sup>, Л.В. Дубей<sup>2</sup>, В.М. Зозуля<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б.І. Веркіна НАН України,  
пр. Леніна 47, 61103, Харків, e-mail: ryazanova@ilt.kharkov.ua

<sup>2</sup>Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, вул. Заболотного 150, 03143, Київ

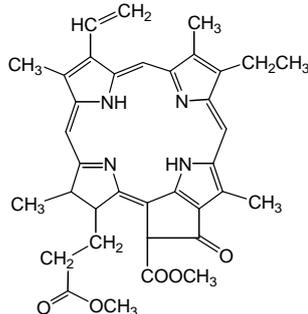
Вивчено зв'язування метилового ефіру феофорбиду-а (Merphео-a) з синтетичними двонитковими полінуклеотидами poly(A)·poly(U), poly(G)·poly(C), чотирихнитковими poly(G), і нативною ДНК. Виміри проведено у водних буферних розчинах рН6,9 за умов низької іонної сили (2 мМ Na<sup>+</sup>) у широкому діапазоні співвідношень молярних концентрацій фосфатів і барвника (P/D) методами абсорбційної та поляризованої флуоресцентної спектроскопії. Визначено абсорбційні і флуоресцентні характеристики комплексів біополімерів з барвником. Встановлено, що для комплексів нейтрального Merphео-a з чотирихнитковим poly(G) спостерігаються значні спектральні зміни: а саме, гіпохромізм поглинання, батохромний зсув смуги Core у спектрі поглинання (~ 26 нм), батохромний зсув максимуму флуоресценції (~ 9 нм) і 50-кратне підвищення інтенсивності флуоресценції. На відміну від цього, зв'язування Merphео-a з двонитковими полінуклеотидами poly(A)·poly(U), poly(G)·poly(C) і тимусною ДНК супроводжується більш слабким спектральним зсувом смуг поглинання і флуоресценції, а також зростанням інтенсивності флуоресценції не більш ніж у 4 рази. Такі спектральні зміни і високе значення ступеня поляризації флуоресценції (0,26) свідчать про інтеркаляцію хромофора барвника у чотирихниткову полінуклеотидну структуру. Незначне збільшення ступеня поляризації флуоресценції барвника (0,12) і більш слабкі спектральні зсуви свідчать про інший тип комплексоутворення, а саме про вбудовування Merphео-a в борозенку подвійної спіралі, припустимо у вигляді димерів. Значна зміна флуоресцентних характеристик Merphео-a при зв'язуванні з чотирихнитковим полінуклеотидом poly(G) робить це похідне перспективним для використання в якості флуоресцентного зонда G-квадруплексної структури.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** феофорбід-а, полінуклеотида, ДНК, інтеркаляція, флуоресценція, поглинання.

Наблюдаемый в последние годы рост числа научных работ по исследованию взаимодействия порфириновых производных с различными биологическими мишенями обусловлен возможностью широкого практического применения данного класса красителей в молекулярной биологии и медицине, в частности, в качестве фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии злокачественных образований [1-3]. Феофорбид-а (Pheo-a) по своему химическому строению близок к феофитину и хлорофиллу-а и может быть легко получен из хлорофилла [4]. Благодаря высокой фотосенсибилизирующей активности *in vitro* и *in vivo* [5-8], Pheo-a широко используется при фотодинамической терапии различных опухолей [2,9]. Фотофизические свойства феофорбида-а были изучены ранее [10, 11]. Установлено, что Pheo-a избирательно накапливается в раковых клетках [12] и имеет высокий коэффициент экстинкции в красной области спектра, где проницаемость живых тканей для света существенно возрастает. Фотодинамическая активность Pheo-a обеспечивается, главным образом, мономерными молекулами красителя и существенно уменьшается при димеризации [13] или агрегации красителя. Механизм фотодинамического эффекта Pheo-a обусловлен фотоиндуцированными окислительными процессами, основным инициатором которых является синглетный молекулярный кислород, <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, активно генерируемый красителем при облучении его красным светом [10,12], а также процессами, обусловленными переносом электрона между основаниями ДНК и первым возбужденным синглетным состоянием Pheo-a. Установлено, что феофорбид-а вызывает фотофрагментацию ДНК как в присутствии, так и в отсутствие кислорода [14]. К недостаткам Pheo-a можно отнести его анионный характер, препятствующий взаимодействию красителя с отрицательно заряженными

нуклеиновыми кислотами, а также низкая растворимость, осложняющая его доставку к мишени.

Чтобы улучшить растворимость красителя и обеспечить возможность его взаимодействия с НК, было синтезировано растворимое катионное производное Pheo-*a* (CatPheo-*a*), обладающее боковой цепочкой с триметиламмониевой группой на конце [15]. Проведенное нами ранее исследование взаимодействия CatPheo-*a* с модельными синтетическими полинуклеотидами различной вторичной структуры (двухнитевыми poly(A)·poly(U), poly(G)·poly(C) и четырехнитевым poly(G)) в нейтральных водных буферных растворах, содержащих 2 мМ Na<sup>+</sup>, выявило наличие двух типов связывания. При низких соотношениях молярных концентраций полимер/краситель, P/D, наблюдалось сильное кооперативное связывание Pheo-*a* с сахарофосфатным остовом полинуклеотидов, обусловленное электростатическим взаимодействием, которое сопровождалось стекинг-ассоциацией молекул красителя [16]. Этот тип связывания характеризуется сильным тушением флуоресценции CatPheo-*a* и ростом ее степени поляризации [15]. При увеличении P/D наблюдалась дезинтеграция ассоциатов и появление антикооперативного интеркаляционного типа связывания. В случае двухнитевых полинуклеотидов его вклад незначителен, а для системы, содержащей четырехнитевый poly(G) – весьма велик. Для системы CatPheo-*a* + poly(G) при высоких значениях P/D наблюдалось 4,5 кратное возрастание интенсивности флуоресценции по сравнению с ее значением для свободного красителя, и возрастание степени поляризации флуоресценции до 0,26.



**Рис. 1.** Структурная формула метилового эфира Феофорбида-*a* (MePheo-*a*).

Исследование собственно внешнего электростатического связывания феофорбида с нуклеиновыми кислотами на модельной системе CatPheo-*a* – одонитевой неорганический полифосфат (PPS) [15] позволило установить стехиометрию, кооперативность и константу связывания, а также определить спектроскопические характеристики образующихся комплексов. Для того чтобы исследовать интеркаляционный тип взаимодействия феофорбида-*a* с нуклеиновыми кислотами в чистом виде, было синтезировано нейтральное производное данного красителя – метиловый эфир феофорбида-*a* (MePheo-*a*, Fig.1) [17]. Цель настоящей работы состояла в исследовании взаимодействия MePheo-*a* с синтетическими полинуклеотидами различной вторичной структуры (двухнитевыми poly(A)·poly(U), poly(G)·poly(C) и четырехнитевым poly(G)) и нативной ДНК в водных буферных растворах pH6,9, содержащих 2 мМ Na<sup>+</sup>, и определении абсорбционных и флуоресцентных характеристик сформировавшихся комплексов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Метиловый эфир Феофорбида-*a* (Рис. 1) был получен эстерификацией Феофорбида *a* в метаноле в условиях кислотного катализа и очищен хроматографией на силикагеле. В работе использовали Феофорбид *a* производства фирмы Frontier Scientific (Logan, Utah, США). Хромато-масс-спектры (LC-MS) получали на приборе Agilent 1100LC/MSD SL (США).

Полинуклеотиды poly(A)·poly(U), poly(G)·poly(C), poly(G) (Sigma Chemical Co.) использовали без дополнительной очистки. В качестве растворителя во всех экспериментах использовали 2 мМ Na-какодилатный буфер, pH6,9, приготовленный на

деионизованной дистиллированной воде, в который добавляли NaCl (Sigma Chemical Co.) до концентрации 0,1 М.

Концентрацию полинуклеотидов определяли спектрофотометрически в водных растворах, используя следующие коэффициенты молярной экстинкции:  $\varepsilon_{260} = 7140 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  для poly(A)·poly(U),  $\varepsilon_{260} = 7900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  для poly(G)·poly(C),  $\varepsilon_{252} = 9900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  для poly(G). Поскольку растворимость MePheo-а в воде является очень низкой, сначала готовили концентрированный базовый раствор, растворяя определенное весовое количество красителя в фиксированном объеме этилового спирта. Для того чтобы получить водный раствор красителя заданной концентрации, базовый раствор был разбавлен водным буферным раствором в 10 раз, таким образом, концентрация спирта в образцах не превышала 10 %.

Электронные спектры поглощения были получены в 0,5 и 1 см кварцевой кювете на спектрофотометре SPECORD UV-VIS (Carl Zeiss, Йена, Германия). Интенсивность и поляризацию флуоресценции измеряли в 0,5 см кварцевой кювете методом счета фотонов на лабораторном спектрофлуориметре на основе двойного монохроматора ДФС-12 (ЛОМО, Россия). Возбуждение флуоресценции осуществляли с помощью He-Ne лазера ( $\lambda_{\text{возб}} = 633 \text{ nm}$ ). Интенсивность лазерного излучения была ослаблена с помощью нейтрального светофильтра. Излучение регистрировали под углом  $90^\circ$  к возбуждающему лучу. Счет фотонов производился путем накопления импульсов за 10 с для каждой экспериментальной точки. Установка и методика измерений были описаны ранее [18]. Степень поляризации флуоресценции ( $p$ ) определяли из уравнения [19]:

$$p = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad (1)$$

где  $I_{\parallel}$  и  $I_{\perp}$  - параллельная и перпендикулярная электрическому вектору возбуждающего света составляющие поляризованной флуоресценции.

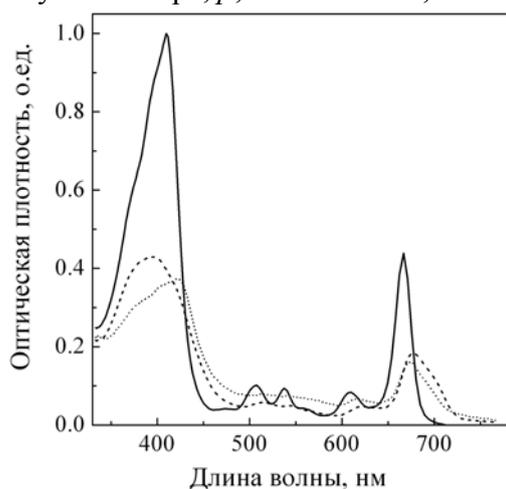
Связывание красителя с полинуклеотидами было изучено методом флуоресцентного титрования. При этом в раствор MePheo-а добавляли комплекс красителя с полинуклеотидом, содержащим такую же концентрацию красителя, но более высокую концентрацию полимера, Р, что позволяло получить необходимое соотношение молярных концентраций полинуклеотидных фосфатов и красителя, Р/Д. Концентрация MePheo-а во всех образцах составляла  $5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ . В ходе эксперимента регистрировали интенсивность и степень поляризации флуоресценции комплекса в максимуме излучения свободного MePheo-а. Измерения выполнены при комнатной температуре 22-24 °С.

**Процедура синтеза метилового эфира Феофорбида а:** 12 мг Феофорбида а (0,02 ммоль), высушенного в вакууме над  $\text{P}_2\text{O}_5$ , растворили в 2 мл безводного метанола, добавили 60 мкл конц. серной кислоты и выдержали реакционную смесь в течение ночи при комнатной температуре. К смеси добавили 5 мл хлороформа, промыли водой (3 мл), насыщенным раствором  $\text{NaHCO}_3$  (2x3 мл) и снова водой (3 мл). Органический слой высушили над безводным сульфатом натрия и нанесли смесь на небольшую колонку (1x5 см) с силикагелем Kieselgel 60 (Merck). Колонку промыли хлороформом, продукт элюировали 0,5% метанола в хлороформе. Соответствующую фракцию упарили в вакууме. Продукт осадил из хлороформа в гексан, отделили центрифугированием, промыли 0.5 мл гексана и высушили в вакууме. Получено 7 мг почти черного порошка (выход 58%). LC-MS:  $m/z$  607,5 (M+1)<sup>+</sup>.

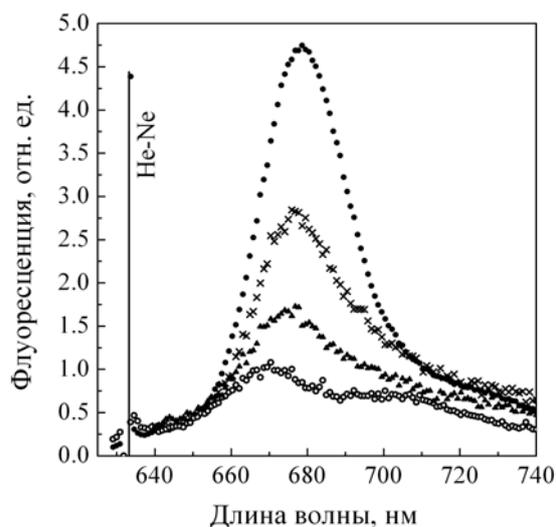
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что фотофизические свойства феофорбида-а и его производных определяются главным образом поведением делокализованной  $\pi$ -электронной системы макроциклического хромофора молекулы [20]. На Рис. 2 представлены электронные спектры поглощения MePheo-*a* в этаноле и водном растворе, содержащем 10 % этанола. Из рисунка видно, что спектр поглощения красителя в этиловом спирте состоит из интенсивной В-полосы при 410 нм (так называемой полосы Core), а также из четырех Q-полос, моменты переходов которых лежат в плоскости молекулы. Самой интенсивной из Q-полос является длинноволновая полоса при 666,5 нм. Для водного раствора красителя наблюдается 60 % гипохромизм спектра поглощения, уширение всех полос, а также коротковолновый сдвиг полосы Core до 396,5 нм, и красный сдвиг Q-полос, в частности, длинноволновой полосы до 676,5 нм. Вид спектра поглощения MePheo-*a* является характерным для порфириновых производных, принадлежащих к классу хлорина [21].

Спектр флуоресценции MePheo-*a* в водных растворах (Рис. 3) представляет собой суперпозицию полосы с максимумом при 669 нм и менее интенсивной широкой полосы с максимумом приблизительно при 707 нм. Степень поляризации флуоресценции в максимуме спектра,  $p$ , составляет 0,01.



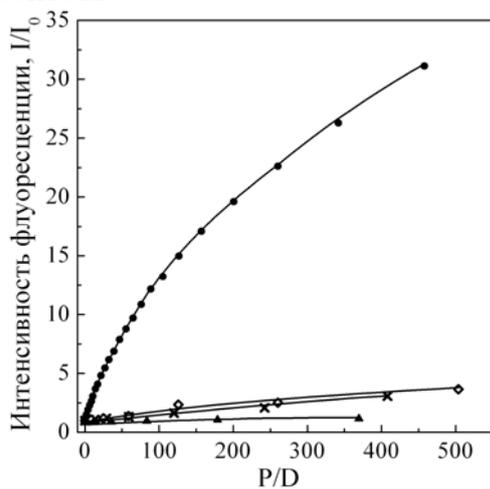
**Рис. 2.** Спектры поглощения MePheo-*a* в этаноле (—) и водном растворе (-----), а также комплекса MePheo-*a* с poly(G) при P/D = 458 (.....). Измерения выполнены при 20 °С, концентрация красителя 10 мкМ. Спектры нормированы на величину поглощения спиртового раствора красителя в максимуме полосы Core.



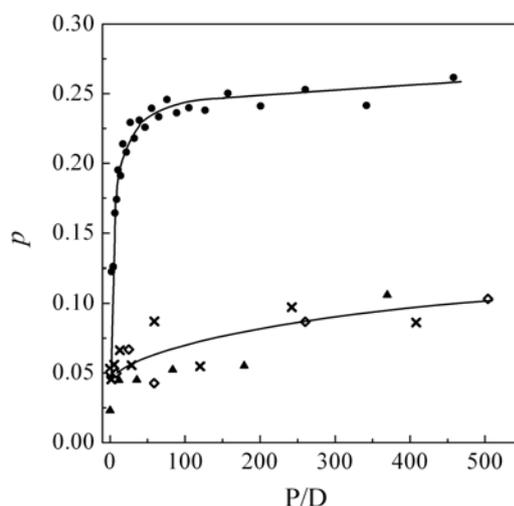
**Рис. 3.** Нормированные спектры флуоресценции MePheo-*a* (○) и его комплексов с полинуклеотидами poly(A)·poly(U) при P/D = 3040 (▲), poly(G)·poly(C) при P/D = 408 (×), и poly(G) (уменьшено в 10 раз) при P/D = 458 (●),  $\lambda_{\text{возб}} = 633$  нм. Измерения выполнены в какодилатном буферном растворе содержащем 10 % этанола, при 2 мМ Na<sup>+</sup>, C<sub>MePheo</sub> = 5 мкМ.

Из приведенных выше данных следует, что полоса флуоресценции MePheo-*a* в водном растворе (669 нм) расположена в более коротковолновой области по сравнению с длинноволновой полосой поглощения (676,5 нм). Такое же взаимное расположение данных полос поглощения и флуоресценции наблюдалось ранее для Pheo-*a* [22], CatPheo-*a* [15] и пиррофеофорбида [23]. Этот парадоксальный, на первый взгляд, факт вызван тем, что, при исследуемой концентрации, 5 мкМ, в нейтральных водных растворах данные красители существуют преимущественно в ассоциированной форме. Причем, как следует из температурной зависимости интенсивности поглощения и

флуоресценции образцов CatPheo-*a*, диссоциация и переход красителя в мономерную форму происходит при температурах свыше 70 °С [16]. Таким образом, можно сделать заключение о том, что длинноволновая полоса поглощения MePheo-*a* в водных растворах соответствует главным образом поглощению ассоциированной формы красителя, тогда как его флуоресценция обусловлена мономерной формой красителя. Спектр поглощения MePheo-*a* в этаноле также соответствует мономерной форме красителя.



**Рис. 4.** Зависимость нормированной интенсивности флуоресценции MePheo-*a* при 669 нм от соотношения молярных концентраций полимер/краситель при титровании полинуклеотидами poly(A)·poly(U) (▲), poly(G)·poly(C) (×), poly(G) (●) и тимусной ДНК (◇),  $\lambda_{\text{возб}} = 633$  нм. Измерения выполнены в какодилатном буферном растворе содержащем 10 % этанола, при 2 мМ Na<sup>+</sup>,  $C_{\text{MePheo}} = 5$  мкМ.



**Рис. 5.** Зависимость степени поляризации флуоресценции MePheo-*a* при 669 нм от соотношения молярных концентраций полимер/краситель при титровании полинуклеотидами poly(A)·poly(U) (▲), poly(G)·poly(C) (×), poly(G) (●) и тимусной ДНК (◇),  $\lambda_{\text{возб}} = 633$  нм. Измерения выполнены в какодилатном буферном растворе содержащем 10 % этанола, при 2 мМ Na<sup>+</sup>,  $C_{\text{MePheo}} = 5$  мкМ.

На Рис. 4 и 5 приведены кривые флуоресцентного титрования раствора MePheo-*a* комплексом красителя с двухнитевыми полинуклеотидами poly(A)·poly(U), poly(G)·poly(C), нативной ДНК и четырехнитевым poly(G). Кривые построены в виде зависимости относительной интенсивности флуоресценции MePheo-*a*,  $I/I_0$  (Рис. 4), и степени поляризации флуоресценции,  $p$  (Рис. 5), от P/D. Здесь  $I_0$  – интенсивность флуоресценции свободного красителя в максимуме полосы, при 669 нм,  $I$  – интенсивность флуоресценции комплекса при той же длине волны. Из этих зависимостей следует, что увеличение относительной концентрации двухнитевых полимеров приводит к постепенному возрастанию интенсивности и степени поляризации флуоресценции красителя. Так, например, при P/D = 400 интенсивность флуоресценции комплекса MePheo-*a* + poly(A)·poly(U) в 1,3 раза выше излучения свободного красителя, в случае, poly(G)·poly(C) – в 3 раза, а в случае нативной ДНК – в 3,5 раза выше, при этом степень поляризации флуоресценции возрастает до 0,1. Также наблюдается красный сдвиг максимума флуоресценции комплексов на 7-8 нм по отношению к максимуму свободного MePheo-*a* (Рис.3).

Связывание MePheo-*a* с полинуклеотидом poly(G) представляет особый интерес, поскольку в водных растворах данный полинуклеотид может образовывать четырехнитевые структуры. Это позволяет моделировать особые участки теломерной ДНК – так называемые G - квадруплексы. Предварительная проверка подтвердила

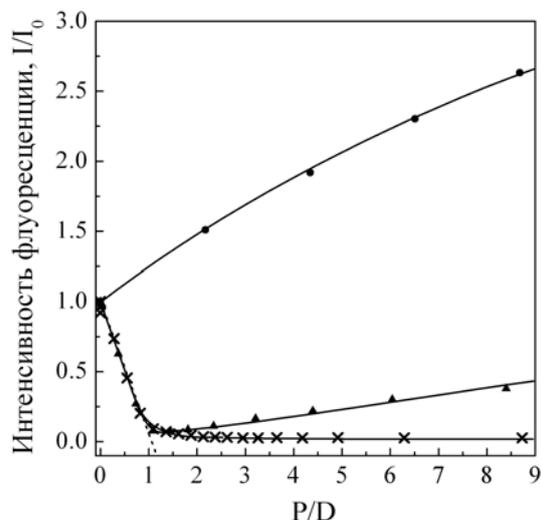
формирование четырехнитевой структуры в исследуемом растворе poly(G). Для этого были получены и проанализированы кривые плавления образца с регистрацией по поглощению при 295 нм, на которых четко проявился переход, характерный для разрушения четырехнитевой структуры [24].

Из кривых флуоресцентного титрования системы MePheo-*a* + poly(G) следует, что при увеличении относительного содержания полимера наблюдается резкое усиление флуоресценции MePheo-*a* (Рис. 4). При P/D = 400 интенсивность флуоресценции MePheo-*a*, измеренная при длине волны 669 нм, в 30 раз превышает величину, зарегистрированную для свободного красителя, а в максимумах соответствующих полос комплекса и свободного MePheo-*a* интенсивность высвечивания отличается в 48 раз. Данные изменения сопровождаются 9 нм батохромным сдвигом максимума полосы флуоресценции (до 678,5 нм) по сравнению со спектром свободного MePheo-*a*, а также 26 нм батохромным сдвигом полосы Core и 3 нм гипсохромным сдвигом длинноволновой Q-полосы в спектре поглощения (Рис. 2). Наблюдаемые спектроскопические изменения, очевидно, обусловлены уходом хромофора красителя из водного окружения вследствие его интеркаляции между гуаниновыми основаниями, что подтверждается высоким значением степени поляризации флуоресценции, которая при высоком содержании полимера выходит на постоянный уровень, равный 0,26 (Рис. 5). Следует отметить, что интенсивность флуоресценции комплекса MePheo-*a* + poly(G), измеренная в максимуме полосы (678,5 нм) оказывается в 50 раз выше излучения свободного красителя.

Сравнение кривых флуоресцентного титрования комплекса MePheo + poly(G) с данными для комплекса CatPheo-*a* + poly(G) [16] показало, что усиление флуоресценции при интеркаляционном связывании нейтрального красителя с полимером почти на порядок выше, чем для катионного. Соотношение  $I/I_0$  при P/D = 400, определенное при 669 нм - длине волны, соответствующей максимуму излучения свободного красителя, составляет 30 и 4,5 соответственно. Такое различие обусловлено существенным вкладом внешнего электростатического связывания CatPheo-*a* с отрицательно заряженным сахарофосфатным остовом биополимеров, которое сопровождается стекингом хромофоров красителя и приводит к тушению флуоресценции. Наиболее сильно электростатическое связывание проявляется при малых соотношениях P/D, однако даже при большой относительной концентрации полимера его вклад достаточно велик.

На Рис. 6 приведены начальные участки кривых флуоресцентного титрования для систем MePheo-*a* + poly(G), CatPheo-*a* + poly(G) [16] и CatPheo-*a* + однонитевой неорганический полифосфат (PPS) [15]. Из рисунка видно, что стекинг-ассоциация красителя, которая сопутствует внешнему электростатическому связыванию CatPheo-*a* с полифосфатом, в диапазоне P/D от 0 до 1 приводит к 40-кратному резкому тушению его флуоресценции. Дальнейшее увеличение относительной концентрации полимера приводит лишь к незначительному повышению интенсивности флуоресценции, достигающего 10% от первоначального значения при P/D > 10000. Для системы CatPheo-*a* + poly(G) в интервале P/D от 0 до 1 кривая совпадает с данными для предыдущей системы, однако при увеличении P/D флуоресценция CatPheo-*a* усиливается за счет появления интеркаляционного связывания красителя с полимером. Для системы MePheo-*a* + poly(G), начиная с малых P/D, наблюдается рост квантового выхода флуоресценции красителя вследствие интеркаляционного связывания красителя с полимером. Следует заметить, что увеличение квантового выхода флуоресценции производных феофорбида-*a* при взаимодействии с poly(G) представляет особый интерес, поскольку обычно гуаниновые основания эффективно тушат флуоресценцию

большинства красителей [25, 26].



**Рис. 6.** Сравнение зависимости нормированной интенсивности флуоресценции в максимуме полосы свободного красителя от соотношения молярных концентраций полимер/краситель для комплексов MePheo-а · poly(G) (●), CatPheo-а · poly(G) (▲) и CatPheo-а · PPS (×),  $\lambda_{\text{возб}} = 633$  нм. Измерения выполнены в какодилатном буферном растворе при 2 мМ  $\text{Na}^+$ , содержащем в случае с MePheo-а 10 % этанола, концентрация красителей  $5 \cdot 10^{-6}$  М в случае полинуклеотидов и  $1,3 \cdot 10^{-5}$  М в случае полифосфата.

Сравнение данных флуоресцентного титрования для систем Merpheo-а + двухнитевые полинуклеотиды или ДНК с данными для Merpheo-а + четырехнитевой poly(G) (Рис. 4 и 5) свидетельствует о том, что связывание с двухнитевыми биополимерными системами является гораздо более слабым, чем в случае квадруплексной poly(G). Так для комплексов, содержащих poly(A)·poly(U), poly(G)·poly(C) и нативную ДНК при высоких соотношениях P/D степень поляризации флуоресценции составляет 0,1, тогда как для системы Merpheo-а + poly(G) она в 2,6 раза выше (Рис. 5). Относительная интенсивность флуоресценции красителя, измеренная в максимуме полосы свободного Merpheo-а, при его связывании с биополимерами возрастает в 1,7 раза в случае poly(A)·poly(U), в 3-3,7 раза в случае poly(G)·poly(C) и нативной ДНК, и в 30 раз – в случае poly(G). Что касается изменений в спектре поглощения, то связывание с двухнитевыми полинуклеотидами сопровождается 7 нм красным сдвигом полосы Core (для poly(G) этот сдвиг значительно сильнее и составляет 26 нм), положение Q-полос остается практически без изменений. Имеющиеся литературные данные по изучению связывания моно-, ди-, тетра- и гекса-катионных производных пиррофеофорбида-а [27], который по структуре очень сходен с феофорбидом-а, с двухнитевой ДНК, выполненные методом гель-электрофореза и абсорбционного титрования показали, что интеркаляция в двойную спираль наблюдалась только для тетра- и гексакатионных производных. Однако, чувствительность метода гель-электрофореза и абсорбционной спектроскопии существенно ниже, чем флуоресцентной спектроскопии. Поэтому слабое интеркаляционное связывание могло быть не зафиксировано. Поскольку константа связывания нейтрального производного MePheo-а с отрицательно заряженными биополимерами, очевидно, является существенно меньшей, чем для катионных производных феофорбида-а [15,16] и пиррофеофорбида-а [27], мы предполагаем, что для двухнитевых полинуклеотидов и ДНК может осуществляться встраивание красителя в бороздку двойной спирали, предположительно, в виде димеров, что приводит к наблюдаемому возрастанию интенсивности и степени поляризации флуоресценции MePheo-а.

Значительное увеличение интенсивности флуоресценции Merpheo-а при его интеркаляции в четырехнитевую poly(G) позволяет использовать краситель в качестве флуоресцентного зонда распознавания G-квадруплексных структур теломерной ДНК.

Спектроскопические свойства MePheo-а и его комплексов с синтетическими

полинуклеотидами приведены в Таблице 1.

Таблица 1. Спектроскопические свойства MePheo-*a* и его комплексов с синтетическими полинуклеотидами

Образец	Поглощение		Флуоресценция		
	В-полоса: $\lambda_{\text{макс}}$ , нм	Длинно-волновая Q-полоса: $\lambda_{\text{макс}}$ , нм	$\lambda_{\text{макс}}$ , нм	$\rho$	$I_{\text{макс}}/I_{\text{макс ВБР}}$ при 669 нм
MePheo- <i>a</i> в этаноле	410	666,5	673,5	0,01	150
MePheo- <i>a</i> в ВБР *	396,5	676,5	669	0,02 – 0,05	1
MePheo- <i>a</i> + poly(A)·poly(U) (P/D = 400) в ВБР *	403	678	677	0,1	1,3
MePheo- <i>a</i> + poly(G)·poly(C) (P/D = 400) в ВБР *	403,5	676	677	0,1	3
MePheo- <i>a</i> + poly(G) (P/D = 400) в ВБР *	422,7	673	678,5	0,26	30

\* ВБР – водный буферный раствор: 2 мМ Na-какодилатный буфер (pH6.9)

### ВЫВОДЫ

Исследование связывания нейтрального MePheo-*a* с синтетическими полинуклеотидами различного состава и вторичной структуры показало, что данный краситель взаимодействует с poly(G) путем интеркаляции хромофора между гуаниновыми основаниями четырехнитевой полимерной структуры. В то же время, связывание с двухнитевыми полинуклеотидами poly(A)·poly(U), poly(G)·poly(C) и нативной ДНК осуществляется путем встраивания красителя в бороздку двойной спирали, предположительно, в димерной форме.

Поскольку связывание с квадруплексной poly(G) сопровождается многократным увеличением интенсивности флуоресценции красителя, MePheo-*a* может служить эффективным флуоресцентным зондом распознавания G-квадруплексных структур теломерной ДНК, что может быть использовано при разработке препаратов для противоопухолевой терапии.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке по программе УНТЦ, грант № 3172.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Owens J.W., Smith R., Robinson R. and Robins M. // Inorg. Chim. Acta.– 1998.– v. 279.– p. 226–231.
- Dougherty T.Jr., Gomer C.J., Henderson B.W., et al. // J. Natl. Cancer Inst.– 1998.– v. 90.– p. 889–905.
- Ricchelli F. // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. – 1995.– v. 29.– p. 109–111.
- Willstatter R. and Stoll A. Untersuchungen über Chlorophyll. Methoden und Ergebnisse. – Berlin: Springer, 1913.
- Röder B. // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. – 1990. – v.5. – p. 519-521.
- Röder B. // Lasers Med. Sci.– 1990.– v.5.– p.99-106.
- Roeder B. Pheophorbides. – Photodynamic Tumor Therapy: 2nd and 3rd Generation Photosensitizers. (J.G. Moser, Ed.) .– Amsterdam: Harwood Academic Publishers. – 1998.– p. 35-42.
- Hajri A., Wack S. et al. // Photochem. Photobiol.– 2002.– v.75.– p.140-148.
- MacDonald I.J. and Dougherty T.Jr. // J. Porphyrins Phthalocyanines.– 2001.– v. 5.– p.105-129.
- Krasnovsky A. Jr. et al. // J. Photochem Photobiol. B: Biol.– 1990.– v.5.– p. 245-254.
- Roeder B. Photobiophysical parameters. – Photodynamic Tumor Therapy: 2nd and 3rd Generation

- Photosensitizers. (J.G. Moser, Ed.). – Amsterdam: Harwood Academic Publishers. – 1998. – p. 9-19.
12. Tanielian C., Kobayashi M., Wolf C. // *J. Biomed. Opt.* – 2001. – v. 6. – p. 252-256.
  13. Eichwurz I., Stiel H., Roeder B. // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* – 2000. – v.54. – p.194-200.
  14. Kobayashi M., Koyama S., Nakazato M., Miyoshi N., Wolf C., Daikuzono N., Tanielian C., Sasaki M., Komiyama M. // *J. Clin. Laser. Med. Surg.* – 1994. – v.12. – p. 133-138.
  15. Ryazanova O.A., Voloshin I.M., Dubey I.Ya., Dubey L.V., Zozulya V.N. // *Annals of the New York Academy of Sciences.* – 2008. – v.1130. – p. 293-299.
  16. Ryazanova O.A., Voloshin I.M., Dubey I.Ya., Dubey L.V. and Zozulya V.N. // *IFMBE Proceedings.* – 2008. – v.20. – p. 397-400.
  17. Wongsinkongman P., Brossi A., Wang H.-K., Bastow K.F., Lee K.-H. // *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* – 2002. – v.10. – p.583-591.
  18. Zozulya V., Blagoi Yu., Lober G., Voloshin I. et al. // *Biophys. Chem.* – 1997. – v.65, p. 55-63.
  19. Lakowicz, J.R. 1999. *Principles of Fluorescent Spectroscopy* 2<sup>nd</sup> ed. Kluwer Academic/Plenum Press. New York.
  20. Spikes, J.D. & Bommer, J.C. 1991. Chlorophyll and related pigments as photosensitizers in biology and medicine. *In Chlorophylls*. H. Scheer, Ed.: 1181-1204. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
  21. Rabinowitch E. // *Rewiew of modern physics.* – 1944. – v. 16(3-4). – p. 226-235.
  22. Röder, B. // *J. Photochem. Photobiol, B: Biol.* – 1987. – v.1. – p.103-113.
  23. Mansouri S., Fery-Forgues S., Meunier B., Paillous N. // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* . – 1996. – v.8. – p. 1649-1654.
  24. Mergny J., Phan A., Lacroix L. // *FEBS Letters.* – 1998. – v.435. – p.74-78.
  25. Löber G., Kittler L. // *Studia biophysica.* – 1978. – v.73(1). – p.25-30.
  26. Seidel C., Schulz A., and Sauer M. // *J. Phys. Chem.* – 1996. – v.100. – p.5541-5555.
  27. Taima H., Yoshioka N., Inoue H. // *Org. Biomol. Chem.* – 2009. – v. 7. – p. 1176-1183.