

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО С ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫМИ ПОЛИНУКЛЕОТИДАМИ POLY(rA) И POLY(rU) И С ДВУХЦЕПОЧЕЧНЫМ ПОЛИНУКЛЕОТИДОМ POLY(rA)-POLY(rU)

Антонян А.П., Мовсесян З.О., Парсаданян М.А., Вардевнян П.О.

Ереванский государственный университет

ул. А. Манукяна, 1, г. Ереван, 0025, Армения; e-mail: p.vardevanyan@ysu.am

Поступила в редакцию 13.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0510

Аннотация. Исследовано взаимодействие красителя-интеркалятора метиленового синего (МС) с одноцепочечными (оц-) poly(rA), poly(rU) и двухцепочечным poly(rA)-poly(rU) полинуклеотидами методами абсорбционной спектроскопии, при различных концентрационных соотношениях лиганд/фосфат (концентрация оц-полинуклеотидов по фосфатному остатку). Обнаружено, что в полосе поглощения метиленового синего, в интервале изменения длины волны $500 \leq \lambda \leq 750$ нм спектры поглощения комплексов МС-оц-poly(rA) резко уменьшаются, по сравнению со спектром МС, по мере возрастания концентрации полинуклеотида в растворе. Также обнаружено, что спектры поглощения комплексов МС-оц-poly(rU) уменьшаются умеренно, при увеличении концентрации этого полинуклеотида в растворе. На спектрах комплексов МС-оц-poly(rU) образуется псевдоизобестическая точка, в то время как на спектрах комплексов МС-оц-poly(rA) такая точка не образуется. Псевдоизобестическая точка образуется и на спектрах комплексов МС-poly(rA)-poly(rU). Также обнаружено, что спектры поглощения комплексов МС с оц-poly(rA) и poly(rA)-poly(rU) сдвигаются в сторону длинных волн на ~5-7 нм, в то время как сдвиг спектров поглощения комплексов МС-оц-poly(rU) составляет всего ~2 нм. Изменения спектров поглощения комплексов МС с указанными полинуклеотидами, указывают на то, что МС проявляет высокую специфичность к poly(rA), по сравнению с poly(rU) и poly(rA)-poly(rU). Полученные данные также указывают на то, что МС с poly(rA) и poly(rA)-poly(rU) связывается интеркаляционным и электростатическим, а с оц-poly(rU) – в основном электростатическим механизмами.

Ключевые слова: Метиленовый синий, полуинтеркаляционный механизм, poly(rA), poly(rU), poly(rA)-poly(rU) электростатическое связывание, спектры поглощения.

Сложные структурные формы РНК играют ключевую роль в осуществлении некоторых клеточных процессов: синтез белков, сплайсинг и-РНК, регуляция транскрипции, выживание клетки. РНК имеет структурную гибкость и является важным объектом в области медицинских и химико-биологических исследований [1-3]. Учитывая, что в клетке РНК находится в различных структурных, в том числе, двухцепочечном (дц-) состояниях, весьма важным могут стать исследования по взаимодействию различных лигандов с дц-РНК, в качестве модели которой служит poly(rA)-poly(rU). Тем не менее, poly(rA)-poly(rU), хотя и является хорошей моделью дц-РНК, может перейти в трехцепочечную структуру [1-3]. С другой стороны, особое биологическое значение имеет одноцепочечная (оц-) poly(rA) в функционировании информационной (и-РНК), а также в процессах экспрессии генов [4-7]. С этой точки зрения важными являются и исследования по взаимодействию специфических к нуклеиновым кислотам (НК) лигандов с различными оц-полинуклеотидами. Эти исследования приобретают особую важность и в том аспекте, что практически все и-РНК в эукариотических клетках содержат poly(A) хвосты в 3' концах, которые играют важную роль для созревания и стабилизации и-РНК, а также для инициации трансляции и синтеза альтернативных форм белковых молекул [7,8]. Очевидно, что различные лиганды, проявляющие определенное сродство к этим хвостам, могут ингибировать функционирование и-РНК и нарушать синтез белка в клетке.

Среди таких лигандов широкое прикладное значение приобретает метиленовый синий (МС) – фенотиазиновый катионный ароматический краситель-интеркалятор, который обладает множеством действий на клетку и организм. МС широко используется в качестве фотосенсибилизирующего агента для фотодинамической инактивации РНК-вирусов (ВИЧ, вирус гепатита В и вирус гепатита С) в плазме [9-12]. Однако, наиболее важным можно считать то, что МС проявляет терапевтические свойства к вирусам семейства коронавирусов. Недавние исследования выявили, что МС может также применяться для лечения нейродегенеративных расстройств, таких как болезнь Альцгеймера (AD), из-за его предполагаемого ингибирующего действия на агрегацию тау-белка [13-18].

Исходя из вышеприведенного, целью данной работы явилось выяснение особенностей связывания МС с оц-poly(rA), оц-poly(rU) и с poly(rA)-poly(rU) на основании спектров поглощения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы сверхчистые синтетические полинуклеоты poly(rA), poly(rU), poly(rA)-poly(rU), МС (Sigma (США)), бидистиллированная вода, NaCl, Na-цитрат, Na₂EDTA (содержание в рабочих растворах составляла 10⁻⁵ М). Концентрации использованных препаратов определялись спектрофотометрически,

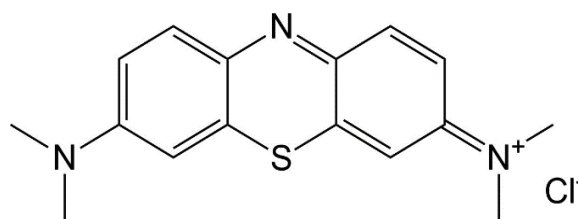


Рисунок 1. Химическая структура метиленового синего

на основании следующих коэффициентов экстинкции: $\epsilon_{665}=76000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для МС [19], $\epsilon_{257}=10500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для poly(rA), $\epsilon_{260}=9500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для poly(rU) [20], $\epsilon_{260}=7140 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для poly(rA)-poly(rU). Все эксперименты проводились в 0,5 ssc (1ssc содержит 0,15 М NaCl, 0,015 М Na₃-цитрат), ионная сила – ~0,1 М, pH≈7,0.

Спектры поглощения образцов, спектрофотометрические титрование раствора МС с растворами poly(rA), poly(rU) и poly(rA)-poly(rU) были получены с помощью спектрофотометра UV-VIS spectrophotometer Perkin Elmer Lambda 365 (США). Все экспериментальные данные по спектрофотометрическому титрованию, а также спектры поглощения обработаны программой Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 (а-в) приведены спектры поглощения МС и его комплексов с оц- poly(rU)+оц-poly(rA) (а), оц-poly(rA)+оц-poly(rU) (б), poly(rA)-poly(rU) (в). Из рисунка 1 а видно, что спектры поглощения МС при добавлении в раствор оц-poly(rU) начинают уменьшаться, с небольшим батохромным сдвигом (~2 нм). При этом, на спектрах поглощения образуется изобестическая точка (ИТ), которая, однако не является истиной (псевдоизобестическая точка), как в случае БЭ (см. [21]). Отметим, что при спектрофотометрическом титровании растворов МС растворами полинуклеотидов, разбавление составляло не более, чем 5 %, что намного меньше, чем уменьшение интенсивности поглощения. Следовательно, гипохромный и батохромный эффекты являются результатом взаимодействия МС с оц-poly(rU), вследствие чего молекулы МС переходят в связанное состояние с меньшей степенью свободы. Тем не менее, небольшие изменения спектров поглощения комплексов МС-оц-poly(rU), по сравнению со спектром лиганда, указывают на то, что оптические свойства связанных и свободных молекул МС достаточно близки друг другу. Исходя из того, что эти свойства обусловлены хромофорной группой лиганда (рис. 2), мы полагаем, что МС с оц-poly(rU) связывается в основном электростатическим механизмом, в результате чего и центральная, хромофорная часть молекулы, состоящая из группы ароматических колец, находится в несвязанном состоянии.

Необходимо отметить, то спектры поглощения комплексов МС-оц-poly(rU) схожи с аналогичными спектрами комплексов МС-poly(rA)-poly(rU), на которых также образуется псевдоизобестическая точка [21]. Тем не менее, поскольку основной способ связывания МС с poly(rA)-poly(rU) является полуинтеркаляция, а электростатический механизм – минорным, то мы полагаем, что и с оц-poly(rU) МС может образовать полуинтеркаляционные комплексы, однако они не вносят значительный вклад в изменении спектров поглощения. Этот вывод подтверждается тем, что добавление раствора оц-poly(rA) приводит к резкому уменьшению поглощения образовавшихся комплексов, (рис. 1а, кривые 10-17). При этом, уменьшение поглощения комплексов по мере увеличения концентрации оц-poly(rA) в растворе указывает на предпочтительное связывание МС с этим полинуклеотидом. Этот эффект может быть результатом того, что poly(A) в растворе имеет достаточно упорядоченную структуру с высокой степенью стекинга между соседними азотистыми основаниями (см. [7]), что, в свою очередь, обуславливает встраивание ароматических групп лиганда в пространство между этими основаниями. Этот тип связывания соответствует полуинтеркаляции, которая характеризуется высокой гипохромностью и большим батохромным сдвигом.

На рисунке 2 (б) приведены спектры поглощения МС (кривая 1), его комплексов с оц-poly(rA) (кривые 2-13) и МС+оц-poly(rA)+оц-poly(rU) (кривые 14-18). Из приведенного рисунка видно, что спектры поглощения комплексов резко уменьшены относительно спектра поглощения МС и также сдвинуты в сторону длинных волн. Этот эффект подтверждает вывод о полуинтеркаляционном связывании МС с оц-poly(rA). При этом, на спектрах поглощения изобестическая или псевдоизобестическая точки не образуются, что указывает на то, что молекулы лиганда находятся только в одном спектроскопически описываемом состоянии, а именно связанном. При этом, в этом состоянии молекулы МС имеют иные оптические характеристики, чем в свободном, следовательно, мы полагаем, что именно хромофорная часть молекул лиганда находится во взаимодействии с мономерными звеньями полинуклеотида. Наиболее выгодным является гидрофобное перемещение этих групп из полярной водной среды в намного менее полярную среду, а именно, в пространство между соседними адениловыми остатками оц-poly(rA). При этом, однако, нельзя исключить электростатическое взаимодействие положительно заряженных молекул МС с отрицательными фосфатными группами полинуклеотида. Однако, вклад этого способа связывания в поглощении образовавшихся комплексов незначительный. На основании полученных данных мы заключаем, что преобладающим способом связывания МС с оц-poly(rA) является полуинтеркаляция,

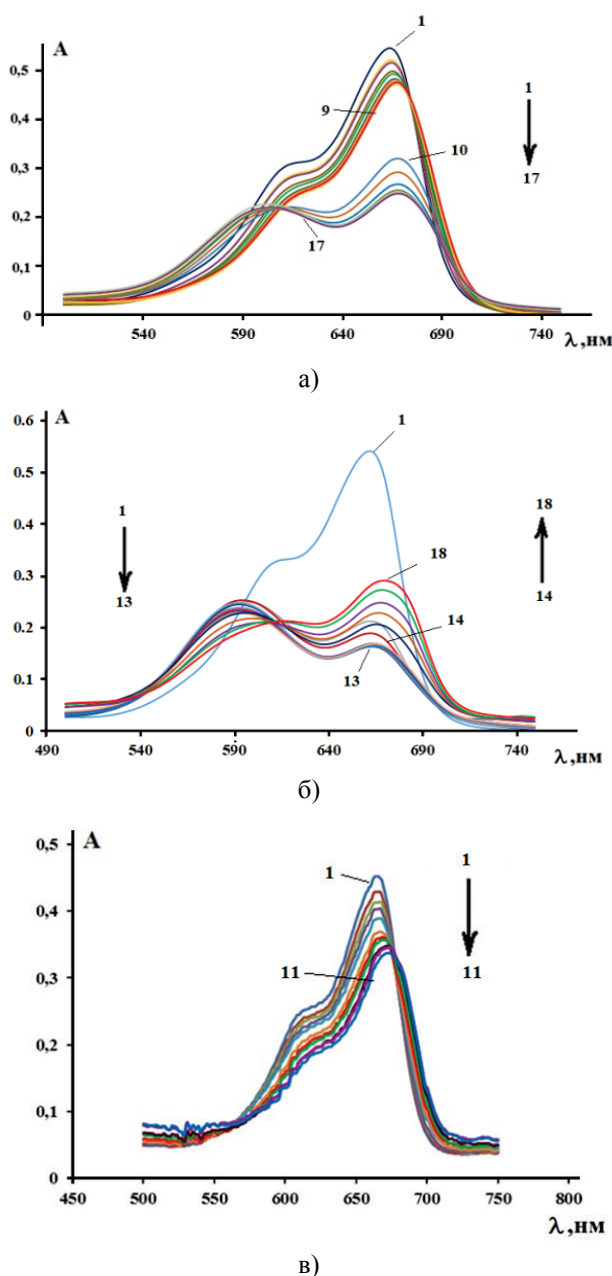


Рисунок 2. Спектры поглощения МС (кривые 1) и его комплексов с оц- poly(rU)+оц-poly(rA) (а), оц-poly(rA)+оц-poly(rU) (б), poly(rA)-poly(rU) (в) (спектры комплексов МС-poly(rA)-poly(rU) получены в [21]). Концентрационное соотношение – г-лиганд/фосфат =1/20)

с оц-poly(rU) – электростатический механизм. Другое важное заключение то, что МС проявляет ярко выраженное сродство к оц-poly(rA).

Из рисунка 2 в видно, что спектры поглощения комплексов МС с poly(rA)-poly(rU) монотонно уменьшаются, по мере увеличения концентрации дц-полинуклеотида и сдвигаются в сторону более длинных волн на 5-6 нм. При этом, как уже было отмечено, на этих спектрах образуется псевдоизобестическая точка. Этот факт указывает на то, что молекулы МС в растворе находятся в спектроскопически близких, но различающихся двух состояниях – свободном и связанном. МС является интеркалятором, однако при ионных силах раствора $\geq 0,02$ М с дц-НК связывается полуинтеркаляционным способом (см. [22]). Очевидно, что и с poly(rA)-poly(rU) этот лиганд образует полуинтеркаляционные комплексы, при этом, являясь катионным лигандом, связывается с дц-полинуклеотидом электростатически. Проявление обоих способов и обуславливает характер изменений спектров поглощения этих комплексов. Отметим, что спектры поглощения комплексов МС-poly(rA)-poly(rU) по форме различаются от аналогичных спектров комплексов МС-оц-poly(rA) и имеют некоторую схожесть со спектрами комплексов МС-оц-poly(rU). По всей вероятности, это обусловлено структурными особенностями указанных гомополинуклеотидов.

Таким образом, полученные данные выявляют, что МС, являясь интеркалятором, проявляет ярко выраженное сродство к оц-poly(rA) и достаточно низкое сродство к оц-poly(rU). При этом, с полиадениловой кислотой этот лиганд связывается полуинтеркаляционным способом, с полиуридиловой – электростатическим.

С этой точки зрения мы полагаем, что с poly(rA)-poly(rU) МС связывается как полуинтеркаляционным, так и электростатическим механизмами одновременно.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Комитета по науке РА в рамках научного проекта № 21Т-1F063.

Список литературы / References:

1. Kankia B.I. Mn^{2+} -induced triplex formation of an equimolar mixture of poly(rA) and poly(rU). *Nucl. Acids Res.*, 2003, vol. 31, no. 17, doi: 10.1093/nar/gkg698.
2. Andrushchenko V., Blagoi Yu., van de Sande J.H., Wieser H. Poly(rA)•Poly(rU) with Ni^{2+} Ions at Different Temperatures: Infrared Absorption and Vibrational Circular Dichroism Spectroscopy. *J. of Biomol. Struct. & Dyn.*, 2002, vol. 19, no. 5, doi: 10.1080/07391102.2002.10506792.
3. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Shahinyan M.A. Study of the influence of the ionic strength on complex-formation of ethidium bromide with poly(rA)-poly(rU). *J. of Biomol. Struct. & Dyn.*, 2020, vol. 38, no. 8, doi: 10.1080/07391102.2019.1630006.
4. Dower K., Kuperwasser N., Merrikk H., Rosbash M. A synthetic A tail rescues yeast nuclear accumulation of a ribozyme-terminated transcript. *RNA*, 2004, vol. 10, doi: 10.1261/rna.7166704.
5. Svitkin Y.V., Sonenberg N. An efficient system for cap- and poly(A)- dependent translation in vitro. *Meth. Mol. Biol.*, 2004, vol. 257, doi: 10.1385/1-59259-750-5:155.
6. Alvarez E., Castello A., Menendez-Arias L., Carrasco L. HIV protease cleaves poly(A)-binding protein. *Biochem J.*, 2006, vol. 396, doi: 10.1042/BJ20060108.
7. Pradhan A.B., Haque L., Das S. Binding of Phenazinium Dye Safranin T to Polyriboadenylic Acid: Spectroscopic and Thermodynamic Study. *PLOS ONE*, 2014, vol. 9, no. 2, doi: 10.1371/journal.pone.0087992.
8. Tian B., Hu J., Zhang H., Lutz C.S. A large-scale analysis of mRNA polyadenylation of human and mouse genes. *Nucleic Acids Res.*, 2005, vol. 33, 201–212. DOI: 10.1093/nar/gki158
9. Bojadzic D., Alcazar O., Buchwald P. Methylene Blue Inhibits the SARS-CoV-2 Spike–ACE2 Protein-Protein Interaction—a Mechanism that can Contribute to its Antiviral Activity Against COVID-19. *Front. Pharmacol.*, 2021, doi: 10.3389/fphar.2020.600372.
10. Bistas E., Sanghavi D. *Methylene blue*. (Treasure Island, FL: StatPearls), 2020.
11. Dicko A., Roh M.E., Diawara H., Mahamar A., Soumare H.M., Lanke K. et al. Efficacy and safety of primaquine and methylene blue for prevention of Plasmodium falciparum transmission in Mali: a phase 2, single-blind, randomised controlled trial. *Lancet Infect. Dis.*, 2018, vol. 18, no. 6, doi: 10.1016/s1473-3099(18)30044-6.
12. Cagno V., Medaglia C., Cerny A., Cerny T., Tapparel C., Cerny E. Methylene blue has a potent antiviral activity against SARS-CoV-2 in the absence of UV-activation in vitro, 2020.
13. Gendrot M., Andreani J., Duflo I., Boxberger M., Bideau M.L., Mosnier J., Jardot P., Fonta I., Rolland C., Bogreau H., Hutter S., La Scola B., Pradines B. Methylene blue inhibits replication of SARS-CoV-2 in vitro. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, 2020, vol. 56, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.106202.
14. Vardhana S.A., Wolchok J.D. The many faces of the anti-COVID immune response. *J. Exp. Med.*, 2020, vol. 217, no. 6, doi: 10.1084/jem.20200678.
15. Di Cosimo S., Malfettone A., Perez-Garcia J.M., Llombart-Cussac A., Miceli R., Curigliano G., Cortes J. Immune checkpoint inhibitors: a physiologydriven approach to the treatment of coronavirus disease 2019. *Eur. J. Canc.*, 2020, vol. 135, doi: 10.1016/j.ejca.2020.05.026.
16. Liu P.P., Blet A., Smyth D., Li H. The science underlying COVID-19: implications for the cardiovascular system. *Circulation.*, 2020, vol. 142, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047549.
17. Ye Q., Wang B., Mao J. The pathogenesis and treatment of the ‘cytokine storm’ in COVID-19. *J. Infect.*, 2020, vol. 80, no. 6, doi: 10.1016/j.jinf. 2020.03.037.
18. Acharya V.V., Chaudhuri (Chattopadhyay) P. Modalities of Protein Denaturation and Nature of Denaturants. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.*, 2021, vol. 69, no. 2, doi: 10.47583/ijpsrr.2021.v69i02.002.
19. Nedu M.-E., Tertis M., Cristea C., Georgescu A.V. Comparative Study Regarding the Properties of Methylene Blue and Proflavine and Their Optimal Concentrations for In Vitro and In Vivo Applications. *Diagnostics*, 2020, vol. 10, doi: 10.3390/diagnostics10040223.
20. Sani N.D.Md., Ariffin E.Y., Sheryn W., Shamsuddin M.A., Heng L.Y., Latip J., Hasbullah S.A., Hassan N.I. An Electrochemical DNA Biosensor for Carcinogenicity of Anticancer Compounds Based on Competition between Methylene Blue and Oligonucleotides. *Sensors*, 2019, vol. 19, doi: 10.3390/s19235111.
21. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Shahinyan M.A., Sahakyan V.G. Peculiarities of interaction of synthetic polyribonucleotide poly(rA)-poly(rU) with some intercalators. *J. of Biomol. Struct. & Dyn.*, 2018, vol. 36, no. 14, doi: 10.1080/07391102.2017.1402708.
22. Vardevanyan P., Antonyan A., Parsadanyan M., Torosyan M., Karapetian A. Joint interaction of Ethidium Bromide and Methylene Blue with DNA. The effect of ionic strength on binding thermodynamic parameters. *J. of Biomol. Struct. And Dyn.*, 2016, vol. 34, no. 7, doi: 10.1080/07391102.2015.1079557.

INTERACTION OF METHYLENE BLUE WITH SINGLE-STRANDED POLYNUCLEOTIDES POLY(rA) AND POLY(rU) AND WITH DOUBLE STRANDED POLYNUCLEOTIDE POLY(rA)-POLY(rU)**Antonyan A.P., Movsesyan Z.O., Parsadanyan M.A., Vardevanyan P.O.**

Yerevan State University

A. Manoogian str., 1, Yerevan, 0025, Armenia; e-mail: p.vardevanyan@ysu.am

Received 13.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0510

Abstract. Interaction of dye-intercalator methylene blue (MB) with single-stranded (ss-) polynucleotides poly(rA), poly(rU) and double-stranded poly(rA)-poly(rU) has been studied by the method of absorption spectroscopy at various concentration ratios ligand/phosphate (concentration of ss-polynucleotides by phosphate residue). It was revealed that in the absorption layer of methylene blue, in the wavelength change interval $500 \leq \lambda \leq 750$ nm, the absorption spectra of the complexes MB-ss-poly(rA) decrease more sharply, as compared to MB spectrum, along with polynucleotide concentration enhancement in the solution. It was also revealed that the absorption spectra of the complexes MB-ss-poly(rU) decrease moderately at the increase of this polynucleotide concentration in the solution. In the spectra of the complexes MB-ss-poly(rU) a pseudo-isosbestic point is formed, while in the spectra of the complexes MB-ss-poly(rA) there is no such point. The pseudo-isosbestic point is formed also in the spectra of the complexes MB-poly(rA)-poly(rU). It was also revealed that the absorption spectra of the complexes of MB with ss-poly(rA) and poly(rA)-poly(rU) are shifted to the longer wavelengths by $\sim 5-7$ nm, while the shift in the absorption spectra of the complexes MB-ss-poly(rU) composes almost ~ 2 nm. The absorption spectra changes of the complexes of MB with the mentioned polynucleotides indicate that MB shows higher specificity to poly(rA), as compared to poly(rU) and poly(rA)-poly(rU). The obtained data also indicate that MB binds to poly(rA) and poly(rA)-poly(rU) by intercalation and electrostatic modes, and with ss-poly(rU) – mainly by electrostatic mechanism.

Key words: *Methylene blue, semi-intercalation mechanism, poly(rA), poly(rU), poly(rA)-poly(rU), electrostatic binding, absorption spectra.*