



УДК 547.963.32+547.979.733

КОНЪЮГАТ ПОРФИРИНА С ПСОРАЛЕНОМ – НОВЫЙ ДНК-ЛИГАНД

© 1999 г. К. Ванг, О. С. Фёдорова*#, В. Р. Грамбл, Л. Чухайовски#

Университет Айдахо, Москоу, США;

*Новосибирский институт биоорганической химии СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8

Поступила в редакцию 19.05.98 г. Принята к печати 28.10.98 г.

4'-Остаток 4,5',8-триметилпсоралена присоединен через 4-(4-метиленаминобутиламино)тетрафторфенильный линкер к мезо-положению порфирина, содержащего в остальных трех мезо-положениях остатки *N*-метил-4-пиридиний-йодида. При титровании этим конъюгатом двуспиральной ДНК из тимуса телят наблюдался заметный батохромный сдвиг и существенное уменьшение экстинкции полосы Соре в электронном спектре порфиринового хромофора, что свидетельствовало об интеркаляционном типе связывания конъюгата с ДНК. При обработке количественных данных, полученных при титровании конъюгата, по уравнениям, соответствующим модели связывания лигандов МакГи и фон Хиппеля, определена константа ассоциации конъюгата с ДНК [$K(9.3 \pm 0.9) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$] и число нуклеотидов, занимаемых лигандом на спирали ДНК ($n = 5$). Сделан вывод о том, что конъюгат порфирина с псораленом является хорошим ДНК-лигандом и может оказаться полезным при исследовании пространственной структуры нуклеиновых кислот.

Ключевые слова: порфирин; псорален; ДНК-лиганд.

ВВЕДЕНИЕ

Общее свойство порфиринов и псораленов – их способность выступать в качестве лигандов нуклеиновых кислот [1, 2]. Катионные порфирины образуют с ДНК прочные комплексы либо за счет интеркаляции, либо за счет внешнецепочечного связывания. Известно, что порфирины являются хорошими сенсбилизаторами процесса генерации синглетного молекулярного кислорода $^1\text{O}_2$, который, по-видимому, и ответственен за фототоксичность этих соединений *in vivo* [3]. Псоралены также могут интеркалировать в двойные спирали нуклеиновых кислот. При фотовозбуждении они образуют с остатками тимина в ДНК и урацила в РНК фурансвязанные или пирансвязанные моноаддукты, а также диаддукты между двумя цепями спирали [4]. Благодаря своим фотохимическим свойствам порфирины и псоралены с давних времен находили применение для лечения различных заболеваний, в том числе онкологических [4, 6]. Индивидуальные порфирины и псоралены используются для изучения вторичной и третичной структуры нуклеиновых кислот [7–9]. Имеются данные о синтезе и применении конъюгатов порфиринов с различными молекулами: красителями, антибиотиками (эллиптицином и хлорамбуцилом) и олигонуклеотидами. Однако нет сведений о синтезе и

свойствах конъюгатов порфиринов с псораленами. Целью настоящего исследования явилась разработка метода присоединения мезо-замещенного порфирина к псоралену и изучение способности полученного конъюгата взаимодействовать с ДНК.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве порфириновой части конъюгата мы использовали трисметойодид 5,10,15-трис(4-пиридил)порфирина. Ранее он был применен в наших работах для синтеза конъюгатов с нуклеозидами [10, 11] и нуклеотидами [12]. Синтез конъюгата порфирина с псораленом представлен на схеме. Сначала мы получили 5,10,15-трис(4-пиридил)-20-пентафторфенилпорфирин (I) реакцией 4-формилпиридина и пентафторбензальдегида с пирролом в растворе пропионовой кислоты как описано в работе [13]. Из образовавшейся смеси изомеров, содержащих 4-пиридильные и пентафторфенильные остатки в мезо-положениях в различных соотношениях, необходимое соединение (I) мы выделили хроматографически. Хлорметильный остаток был введен в положение 4' 4,5',8-триметилпсоралена по методике [14]. Обработка полученного 4'-хлорметил-4,5',8-триметилпсоралена бутилендиамином в присутствии ацетанилида привела к 4'-[*N*-(4-аминобутил)аминометил]-4,5',8-триметилпсоралену (II) [15]. Соединение (III) образовалось при нуклеофильном замещении атома фтора в

Авторы для переписки (e-mail: fedorova@niboch.nsc.ru и leszek@uidaho.edu).

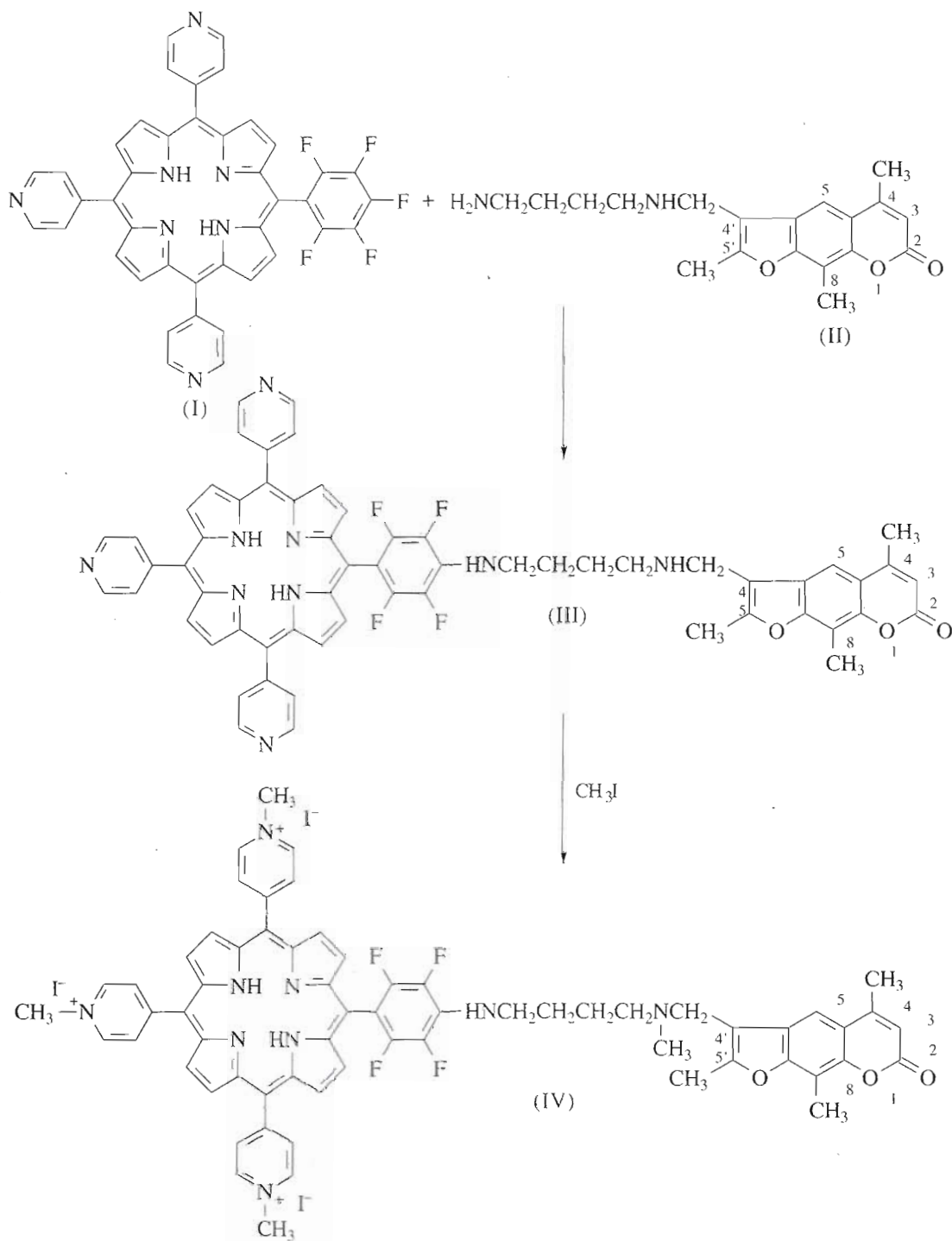
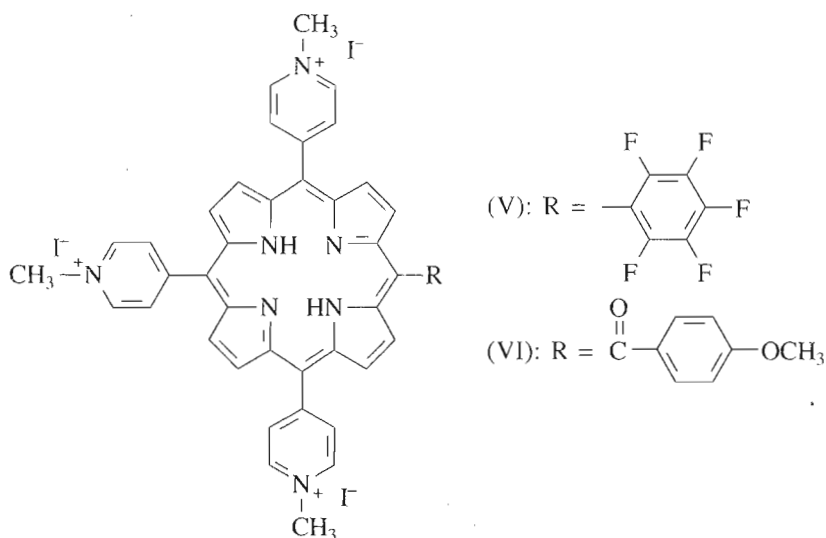


Схема.

n-положении фенильной группы порфирина (I) терминальной аминогруппой соединения (II). Метойодид (IV) получали обработкой трис(пиримидил)производного (III) йодистым метилом.

Для исследования способности порфирина псоралена (IV) связываться с ДНК мы регистриро-

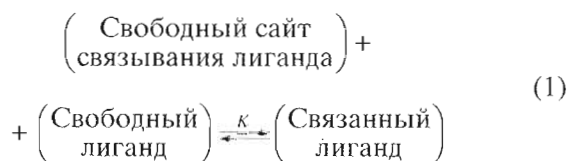
вали изменение его электронного спектра при титровании водным раствором ДНК. Аналогичное исследование проводили с трисметойдидами 5,10,15-трис(4-пиримидил)-20-пентафторфенилпорфирина (V) и 5,10,15-трис(4-пиримидил)-20-(4-метоксибензоил)порфирина (VI), не содержащими псораленовых остатков.



Из спектров электронного поглощения производного (IV) при титровании раствором ДНК видно, что полоса Соре смещается в длинноволновую область и ее интенсивность уменьшается (рис. 1, таблица). В спектре наблюдается появление двух изобестических точек. Аналогичное изменение спектров наблюдалось также и при титровании соединений (V) и (VI) (таблица).

Чтобы вычислить на основании этих данных величины истинных констант связывания порфиринов с ДНК, а также число пар оснований, занимаемых одной связанной молекулой порфирина, мы использовали модель МакГи и фон Хиппеля

[16]. В отличие от классической модели Скэтчарда для независимых сайтов связывания эта модель учитывает размеры участка связывания лиганда, влияние занятых участков на вероятность связывания с другими молекулами лиганда, а также наличие лиганд-лигандной кооперативности. При этом равновесный процесс



описывается выражением:

$$\frac{r}{m} = K(1 - nr) \left(\frac{1 - nr}{1 - (n-1)r} \right)^{n-1}, \quad (2)$$

где $r = [\text{комплекс}]/[\text{ДНК}]_0$ представляет собой так называемую плотность связывания, т.е. отношение числа молей связанных лигандов к общему числу молей пар оснований матрицы, m — молярная концентрация свободных лигандов, n — число пар оснований ДНК, занимаемых одной связанной молекулой лиганда и исключаемых из взаимодействия с другими молекулами лиганда, K — константа равновесия, получаемая, как правило, из зависимости r/m от r при экстраполяции r к нулю (координаты Скэтчарда).

Поглощение A при фиксированной длине волны, соответствующей, например, максимуму полосы Соре несвязанного порфирина, зависит от концентраций порфирина P и пар оснований ДНК согласно уравнению:

$$A = \epsilon_{\text{своб}}[P] + \epsilon_{\text{связ}}[\text{комплекс}] = \epsilon_{\text{своб}}[P]_0 + (\epsilon_{\text{связ}} - \epsilon_{\text{своб}})[\text{ДНК}]_0 r, \quad (3)$$

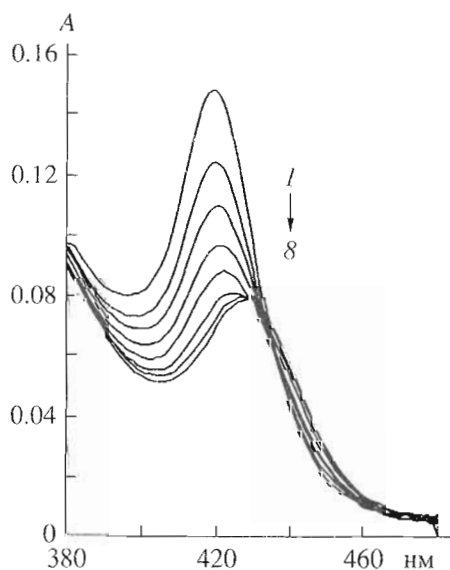


Рис. 1. Электронные спектры порфиринилпсоралена (IV) в присутствии ДНК в концентрации (мкМ) 0 (1), 0.45 (2), 0.9 (3), 1.35 (4), 1.8 (5), 2.7 (6), 3.6 (7), 4.5 (8); 25°C; буфер: 10 мМ Трис-НСl, 1 мМ EDTA, 0.1 М NaCl, рН 7.5.

Значения длин волн максимумов поглощения полосы Sore для производных порфиринов (IV), (V) и (VI), λ_{\max} , коэффициенты молярного поглощения, ϵ , гипохромный эффект, h , константы ассоциации порфиринов с ДНК, K , и числа нуклеотидов, занимаемых одним лигандом на ДНК, n

Соединение	Полоса Sore				Константа ассоциации $K \times 10^{-6}, M^{-1}$	n
	без ДНК		с ДНК			
	λ_{\max}, nm	$\epsilon, M^{-1} cm^{-1}$	λ_{\max}, nm	$h, \%$		
(IV)	420	2.9×10^4	428	47	9.3 ± 0.9	5
(V)	418	4.1×10^4	428	36	7.5 ± 1.5	2
(VI)	422	1.1×10^5	434	44	5.1 ± 1.1	2

где $\epsilon_{\text{своб}}$ и $\epsilon_{\text{связ}}$ – молярные коэффициенты поглощения свободного и связанного порфиринов, $[P]_0$ и $[ДНК]_0$ – исходные концентрации порфирина и нуклеиновой кислоты (в парах оснований), соответственно. Величина $\epsilon_{\text{связ}}$ может быть рассчитана путем экстраполяции значений A к высоким концентрациям ДНК.

Величины r и m легко рассчитываются из набора экспериментальных значений оптического поглощения раствора порфирина при фиксированной длине волны (A) от исходной концентрации ДНК ($[ДНК]_0$):

$$r = \frac{[P]_0}{[ДНК]_0} \frac{A_0 - A}{A_\infty - A}, \quad m = [P]_0 - r[ДНК]_0. \quad (4)$$

В данных выражениях A – это значение оптического поглощения при соответствующей суммарной концентрации ДНК, а A_0 и A_∞ – данные значения в начальной и конечной точках кривой титрования.

На рис. 2 представлена зависимость величины оптического поглощения A соединения (IV) при длине волны, соответствующей максимуму полосы Sore, от концентрации ДНК, $[ДНК]_0$, выраженной в парах оснований. Из этой зависимости с помощью уравнений (2) и (4) были рассчитаны значения K и n , которые представлены в таблице. Здесь же приведены аналогичные величины для соединений (V) и (VI).

Из таблицы видно, что порфирин (IV), содержащий остаток псоралена, и порфирины (V) и (VI), не содержащие такого остатка, при связывании с ДНК претерпевают батохромный сдвиг полосы Sore на 8–12 нм. Наблюдается также существенное уменьшение поглощения (гипохромный эффект), которое в соответствии с формулой:

$$h = \left(1 - \frac{A_{\max}^\infty}{A_{\max}^0} \right) \times 100\% \quad (5)$$

составляет 36–47%.

Из литературных данных следует, что значительный батохромный сдвиг максимума полосы Sore (~10 нм) и заметный гипохромизм этой поло-

сы поглощения ($\geq 35\%$) соответствует взаимодействию порфиринов с ДНК по интеркаляционному типу [17]. Такой тип взаимодействия свойствен катионному метойодиду 5,10,15,20-тетрапиридилпорфирина, константа связывания которого с ДНК, K , имеет величину 10^6 – $10^7 M^{-1}$ (ср. [17] и ссылки в этой работе). Представленные нами данные также свидетельствуют в пользу интеркаляционного взаимодействия порфириновых производных (IV), (V) и (VI) с ДНК.

В работе [17] было показано, что для мезо-замещенных порфиринов с тремя и двумя остатками *N*-метилпиридиния константы ассоциации с ДНК и величины гипохромного эффекта падают незначительно, и было сделано заключение, что только половина порфиринового кольца необходима для интеркаляции. Такой вывод согласуется и с результатами настоящей работы, поскольку при переходе от производного (IV) к производным (V) и (VI), у которых заместитель в мезо-положении не обладает собственным средством к ДНК, константа ассоциации падает лишь незначительно.

С другой стороны, если в случае соединения (IV) пять пар нуклеотидов ДНК исключаются из

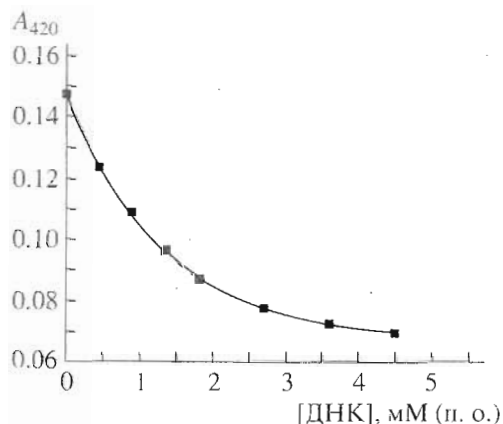


Рис. 2. Зависимость оптического поглощения в полосе Sore (A_{420}) от концентрации оснований ДНК (в парах оснований).

взаимодействия с другими молекулами порфирина после образования комплекса, то в случае соединений (V) и (VI) исключаются только две пары нуклеотидов.

ВЫВОДЫ

Полученные результаты показывают, что производное порфирина с псораленом, состоящее из двух фрагментов, имеющих сродство к ДНК, также сохраняет сродство к ДНК. Можно предположить, что этот новый тип порфирина-псораленовых соединений способен образовывать фотошшивки с разнесенными участками нуклеиновых кислот и поэтому будет полезным для исследования пространственной структуры нуклеиновых кислот.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Общие методы. ДНК из тимуса теленка была получена от Sigma Chemical Co. (Сен-Луис, США). Все исходные соединения для синтеза и растворители были получены от Aldrich Chemical Co. (Милуоки, США). Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре Bruker IBM AT 300 МГц с Фурье-преобразователем и электронные спектры – на спектрофотометре Hewlett Packard 8452A. Количественную обработку данных с помощью нелинейной регрессии проводили по программе SigmaPlot 2.0 for Windows.

5,10,15-Трис(4-пиридил)-20-пентафторфенилпорфирин (I) синтезировали по методу [18]. 2.5 г (12.8 ммоль) пентафторбензальдегида и 4.48 мл (51 ммоль) 4-формилпиридина кипятили в 75 мл пропионовой кислоты, прибавляя по каплям раствор 2.7 мл пиррола в 3 мл пропионовой кислоты. Реакционную смесь кипятили в течение 1 ч, затем большую часть растворителя отгоняли в вакууме, и остаток нейтрализовали насыщенным раствором Na_2CO_3 . Образовавшийся черный осадок отфильтровывали, сушили на воздухе и разделяли с помощью колоночной хроматографии на силикагеле (60–230 меш) при элюции раствором хлороформ–метанол (40 : 1). Выход (I) составил 8%; ^1H -ЯМР (CDCl_3 , δ , м. д.): 9.08 (4 Н, м, пиррол), 8.90 (8 Н, м, 4 Н пиррольного и 4 Н пиридинового колец), 8.19 (4 Н, д, пиридин), 7.71 (4 Н, м, пиридин), –2.96 (2 Н, с, NH порфирина); ^{19}F -ЯМР (CDCl_3 , δ , м. д.): –143.35 (2 F, м, 2,6-F₂), –155.30 (1 F, т, 4-F), –161.34 (2 F, м, 3,5-F₂).

4'-[N-(4-Аминобутил)аминометил]-4,5',8-триметилпсорален (II). Синтез проводили по методике [15]. Выход составил 32%; ^1H -ЯМР (CDCl_3 , δ , м. д.): 7.57 (1 Н, с, 5-Н), 6.19 (1 Н, с, 3-Н), 3.82 (2 Н, с, 1-NH₂), 2.60 (4 Н, м, 2 CH₂), 2.52, 2.47 и 2.44 (9 Н, 3 с, 3 CH₃), 1.48 (4 Н, м, 2 CH₂), 1.39 (2 Н, м, CH₂), 1.31 (1Н, м, 6"-NH).

5,10,15-Трис(4-пиридил)-20-{4-[4-(4,5',8-триметил-4'-псораленилметиламино)бутиламино]-2,3,5,6-тетрафторфенил}порфирин (III). Соединение (I) (27 мг, 0.038 ммоль) и 27 мг (0.0758 ммоль) соединения (II) растворяли в 7 мл сухого DMF, прибавляли 0.1 мл триэтиламина для связывания образующегося в реакции HF, смесь перемешивали в течение 48 ч при 90–110°C и упаривали в вакууме. Продукт реакции (III) экстрагировали из остатка 4 × 20 мл воды, экстракт упаривали и остаток хроматографировали на колонке с силикагелем, которую элюировали градиентом метанола в хлороформе (от 1 : 40 до 1 : 2). Первая фракция была исходным порфирином (I), а вторая – продуктом (III); выход 88%; ^1H -ЯМР (CDCl_3 , δ , м. д.): 9.05 (4 Н, д, пиррол), 8.82 (8 Н, м, 4 пиррольных Н и 4 пиридиновых Н), 8.16 (4 Н, д, пиридин), 7.71 (4 Н, дд, пиридин), 7.65 (1 Н, с, Н5 псоралена), 6.18 (1 Н, с, Н3 псоралена), 4.49 (2 Н, с, CH₂), 3.70 (4 Н, м, 2 CH₂), 3.20 (4 Н, м, 2 CH₂), 2.51, 2.48 и 2.44 (9 Н, 3-CH₃ псоралена), 1.26 (2Н, д, NH^{1'} и NH^{6''}, сигнал исчезает при добавлении D₂O), –2.95 (с, 2Н, NH порфирина).

Трисметойодид 5,10,15-трис(4-пиридил)-20-{4-[4-(4,5',8-триметил-4'-псораленилметиламино)бутиламино]-2,3,5,6-тетрафторфенил}порфирина (IV). Соединение (III) (10 мг, 9.9 мкмоль), 2.5 мл йодистого метила и 2.5 мл CH₃NO₃ кипятили в атмосфере N₂ в течение 12 ч и затем смесь упаривали на роторном испарителе. Осадок растворяли в воде, фильтровали, и фильтрат упаривали. Выход продукта (IV) 6.6 мг (46%); ^1H -ЯМР (MeOH, δ , м. д.): 9.43 (4 Н, д, пиррол), 9.20 (8 Н, м, 4 пиррольных Н и 4 пиридиновых Н), 8.94 (4 Н, д, пиридин), 8.49 и 8.42 (4 Н, 2д, пиридин), 7.71 (1 Н, с, Н5 псоралена), 6.21 (1 Н, с, Н3 псоралена), 4.56 (6 Н, с, NCH₃), 4.52 (3Н, с, NCH₃), 4.38 (2 Н, с, CH₂), 3.34 (4 Н, м, 2 CH₂), 3.02 (4 Н, м, 2 CH₂), 2.55, 2.49 и 2.46 (9 Н, 3с, 3 CH₃ псоралена), 2.31 (3 Н, с, N^{6''}-CH₃); λ_{max} (нм, H₂O) (ϵ , M⁻¹ cm⁻¹): 356 (27000), 420 (полоса Core, 29000), 516 (2400).

Соединение (V) получали путем N-метилования соединения (I).

Соединение (VI) получали из 5,10,15-трис(4-пиридил)-20-(4-метоксибензоил)порфирина, который в свою очередь был синтезирован по методике, описанной в работе [12] для 5,10,15-трис(4-пиридил)-20-(4-ацетамидобензоил)порфирина. При этом вместо 4-ацетамидобензальдегида использовали 4-метоксибензальдегид.

Мы благодарим Т.М. Иванову за обсуждение работы и полезные советы.

Работа выполнена при поддержке гранта SEED Университета Айдахо (США) и гранта РФФИ № 96-04-48615.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gibbs E.J., Pasternack R.F.* // *Seminars in Hematology*. 1989. V. 26. P. 77–85.
2. *Shi Y.-B., Lipson S.E., Chi D.Y., Spielmann P., Monforte J.H., Hearst J.E.* // *Bioorganic Photochemistry* / Ed. H. Morrison. N.Y.: John Wiley & Sons, 1990. V. 1. P. 341–378.
3. *Hopf F.R., Whitten D.G.* // *Porphyrins and Metalloporphyrins* / Ed. K.M. Smith. Amsterdam: Elsevier, 1975. P. 667–695.
4. *Hearst J.E.* // *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 1981. V. 10. P. 69–86.
5. *Dougherty T.J.* // *Photochem Photobiol.* 1987. V. 43. P. 879–889.
6. *Psoralens in Cosmetics and Dermatology* / Ed. J. Chan. Paris: Pergamon, 1981.
7. *Celander D.W., Nussbaum J.M.* // *Biochemistry*. 1996. V. 35. P. 12061–12069.
8. *Dabrowiak J.C., Ward B., Goodisman J.* // *Biochemistry*. 1989. V. 28. P. 3314–3322.
9. *Cimino G.D., Gamper H.B., Isaacs S.T., Hearst J.E.* // *Ann. Rev. Biochem.* 1985. V. 54. P. 1151–1193.
10. *Czuchajowski L., Palka A., Morra M., Wandrekar V.* // *Tetrahedron Lett.* 1993. V. 34. P. 5409–5412.
11. *Czuchajowski L., Niedbala H., Shultz T., Seaman W.* // *Bioorg. and Med. Chem. Lett.* 1992. V. 12. P. 1645–1648.
12. *Li H., Fedorova O., Trumble W.R., Fletcher R., Czuchajowski L.* // *Bioconjugate Chem.* 1997. V. 8. P. 49–56.
13. *Li H., Czuchajowski L.* // *J. Heterocyclic Chem.* 1997. V. 34. P. 999–1003.
14. *Isaacs S.T., Shen C.J., Hearst J.E., Rappoport H.* // *Biochemistry*. 1977. V. 16. P. 1058–1064.
15. *Lee B.L., Murakami A., Blake K.R., Lin S., Miller P.* // *Biochemistry*. 1988. V. 27. P. 3197–3203.
16. *McGhee J.D., von Hippel P.H.* // *J. Mol. Biol.* 1974. V. 86. P. 469–489.
17. *Sari M.A., Battioni J.P., Dupre D., Mansuy D., Le Pecq J.B.* // *Biochemistry*. 1990. V. 29. P. 4205–4215.
18. *Adler A.D., Longo F.R., Finarell J.D., Goldmacher J., Assour J., Korsakoff L.* // *J. Org. Chem.* 1967. V. 32. P. 476.

Porphyrin–Psoralen Conjugate as a New DNA Ligand

Xiao Wang*, O. S. Fedorova*, W. R. Trumble*, and L. Czuchajowski****

**Department of Chemistry, University of Idaho, Moscow, ID 83844-2343, USA*

***Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, prosp. Akademika Lavrent'eva 8, Novosibirsk, 630090 Russia*

4'-Psoralenyl residue was attached to a *meso*-position of porphyrin via the 4-[4-methylene(methyl)aminobutylamino]-2,3,5,6-tetrafluorophenyl linker; the other three *meso*-substituents in the porphyrin core were the 4-residues of *N*-methylpyridinium iodide. Upon titration with calf thymus DNA, this conjugate showed a bathochromic shift and a remarkable hypochromicity of the Soret band, which suggested that it was able to interact with DNA through the intercalative mode of binding. Quantitative treatment of the titration data according to the equations of the McGhee and von Hippel model determined the value of the association constant of the conjugate with DNA, $K = (9.3 \pm 0.9) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, and the number of nucleotides interacting with one molecule of the conjugate, $n = 5$. It was proposed that our porphyrin–psoralen conjugate might be useful for studying the spatial structure of nucleic acids.

Key words: porphyrin, psoralen, DNA ligand

To whom correspondence should be addressed; e-mail: fedorova@nboch.nsc.ru. and e-mail: leszek@uidaho.edu.