

УДК 577.113

Д.Н. Чернышев,

А.С. Бучельников,

Ю.В. Мухина, канд. физ.-мат. наук,

С.Ф. Барановский, профессор, д-р физ.-мат. наук,

Севастопольский национальный технический университет

ул. Университетская 33, г. Севастополь, Украина, 99053

E-mail: tolybas@rambler.ru

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СВЯЗЫВАНИЯ АРОМАТИЧЕСКИХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ С ДНК

Методом спектрофотометрии исследованы самоассоциация и комплексообразование с ДНК органических гетероциклических соединений акридинового и фенотиазинового ряда: профлавина, тионина и метиленового голубого. Определены равновесные константы димеризации красителей и параметры комплексообразования с ДНК с использованием моделей Скэтчарда и МакГи – фон Хиппеля. Сделано предположение, что преобладающим типом связывания с ДНК в случае профлавина и тионина является интеркаляция, а в случае метиленового голубого – «внешнее» связывание с поверхностью ДНК.

Ключевые слова: спектрофотометрия, комплексообразование с ДНК, краситель.

Введение

Гетероциклические ароматические соединения в настоящее время находят широкое применение в различных медицинских приложениях в качестве препаратов, обладающих положительными терапевтическими свойствами [1]. Принято считать, что большинство соединений этого класса проявляют свое медико-биологическое действие путем непосредственного связывания с клеточной ДНК и последующего блокирования жизненно важных клеточных процессов [1, 2]. В связи с этим детальная информация о характере связывания ароматических соединений с нуклеиновыми кислотами играет большую роль при интерпретации механизма биологического действия ароматических лекарственных препаратов, а также в реализации стратегии направленного синтеза более эффективных по своим терапевтическим свойствам соединений [2].

Исследования, проведенные к настоящему времени, показали, что большинство гетероциклических лигандов, содержащих в своей основе плоский ароматический хромофор и не слишком разветвленные боковые группы, связываются с ДНК посредством интеркаляции. При этом типе связывания ароматический хромофор располагается эквидистантно между смежными парами оснований [2]. Интеркаляционное связывание, как правило, идентифицируется в спектрофотометрии по гипохромному/батохромному сдвигу максимума поглощения лиганда [3], в ЯМР – по смещению химического сдвига протонов лиганда в область сильного поля [3], и в круговом дихроизме — по характеристическому изменению полосы поглощения [3]. В то же время ряд типичных интеркаляторов (таких, например, как акридиновые красители) при вариации ионных условий среды и фактора P/L (отношение концентрации пар оснований ДНК к концентрации лиганда) демонстрируют также неинтеркаляционное связывание. Подобное взаимодействие соответствует внешнему электростатическому связыванию лиганда с сахарофосфатным остовом ДНК, либо связыванию в малой или большой бороздках ДНК [4]. Экспериментальное разделение этих типов связывания, как правило, затруднительно, поскольку спектроскопический «отпечаток» интеркаляционного и неинтеркаляционного связывания не всегда может быть однозначно идентифицирован по имеющимся экспериментальным спектрам. Альтернативу предоставляет численный анализ спектроскопических данных с использованием подхода Скэтчарда или МакГи – фон Хиппеля [3, 5].

Целью настоящей работы является исследование типа связывания с ДНК различных гетероциклических соединений с применением подхода Скэтчарда, а также кооперативной и некооперативной моделей МакГи – фон Хиппеля [5] по данным спектрофотометрического титрования. В качестве соединений рассматривались красители фенотиазинового ряда – метиленовый голубой (МГ) и тионин (ТИ) — используемые в фотодинамической терапии злокачественных опухолей [3] (рисунок 1).



Рисунок 1 — Структурные формулы красителей метиленового голубого, тионина и профлавина

Выбор указанных соединений обусловлен тем, что в настоящее время не существует единого мнения по поводу доминирующего типа их связывания с ДНК, однако многие авторы сходятся во мнении, что и интеркаляция и внешнее связывание могут иметь место одновременно [3]. В качестве эталонного лиганда был выбран акридиновый краситель профлавин (ПФ), характеризующийся доминирующим интеркаляционным типом связывания с ДНК, однако, способный связываться с внешней поверхностью ДНК [3]. Все три красителя являются заряженными молекулами при физиологических условиях, в связи с чем наибольший вклад внешнесвязанных комплексов следует ожидать при низких ионных силах раствора.

Методика эксперимента

Электронные спектры поглощения красителей регистрировались на спектрофотометре СФ-46 в диапазоне длин волн 360-750 нм. В экспериментах использовались красители фирмы «Sigma» (США). Все исследования проводились в водно-солевом буферном растворе: 0,01 М NaCl; 0,01 М Na₂EDTA; 0,01 М Tris (рН 7,4). Этилендиаминтетраацетат натрия (Na₂EDTA) и 2-амино-2-(гидроксиметил)-1,3-пропандиол (Tris) фирмы «Sigma» (США). Хлористый натрий соответствовал квалификации «о.ч.». Используемые препараты и красители исследовались без дополнительной очистки. Для предотвращения фотоокисления, взвешивание препаратов и приготовление их растворов проводились в затемненном помещении. Исходные растворы красителей готовили растворением точных навесок в буферном растворе на основе бидистиллированной воды непосредственно перед измерениями.

При изучении самоассоциации гетероциклических соединений растворы красителей готовились с концентрациями $5 \cdot 10^{-4}$ – $1,9 \cdot 10^{-6}$ М методом последовательного разбавления исходного раствора. Температура (298 К) внутри кюветного отделения спектрофотометра при регистрации спектров поддерживалась постоянной термостатическим устройством с точностью $\pm 0,25$ К.

При исследовании комплексообразования красителей с биополимером использовалась натриевая соль ДНК молок лосося («Sigma», D-1626, США), содержащая 41,2 % GC-пар оснований с молекулярной массой $\sim 1,3 \cdot 10^6$ Da (приблизительно 2000 пар оснований) [3]. Исходный раствор ДНК готовили путем растворения точной навески лиофилизированного препарата в течение 24 часов в буферном растворе. Концентрацию ДНК (в моль пар оснований на литр) определяли спектрофотометрически по интенсивности поглощения на длине волны 260 нм с использованием молярного коэффициента поглощения $\epsilon_{260} = 6600 \text{ М}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [3].

Спектрофотометрическое титрование проводилось при постоянных концентрациях красителей ([ПФ] = $5 \cdot 10^{-5}$ М, [МГ] = $5 \cdot 10^{-6}$ М, [ТИ] = $6,3 \cdot 10^{-6}$ М) и различных концентрациях ДНК ($3 \cdot 10^{-3}$ – $4,6 \cdot 10^{-6}$ М) в буферном растворе. Титрование выполнялось в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см при температуре $298 \pm 0,25$ К. Перед проведением измерений смешанные растворы системы лиганд – ДНК, выдерживались в течение 5 минут для установления равновесия.

Результаты и обсуждение

При концентрациях красителей, выбранных в настоящей работе, должны проявляться эффекты агрегации молекул, в связи с чем в качестве предварительного этапа анализа взаимодействия лиганд – ДНК было проведено исследование самоассоциации профлавина и тионина. Самоассоциация метиленового голубого была исследована ранее в работе [6].

Самоассоциация молекул красителей. На рисунке 2 представлены экспериментальные спектры водных растворов профлавина и тионина, измеренные при различных концентрациях красителей.

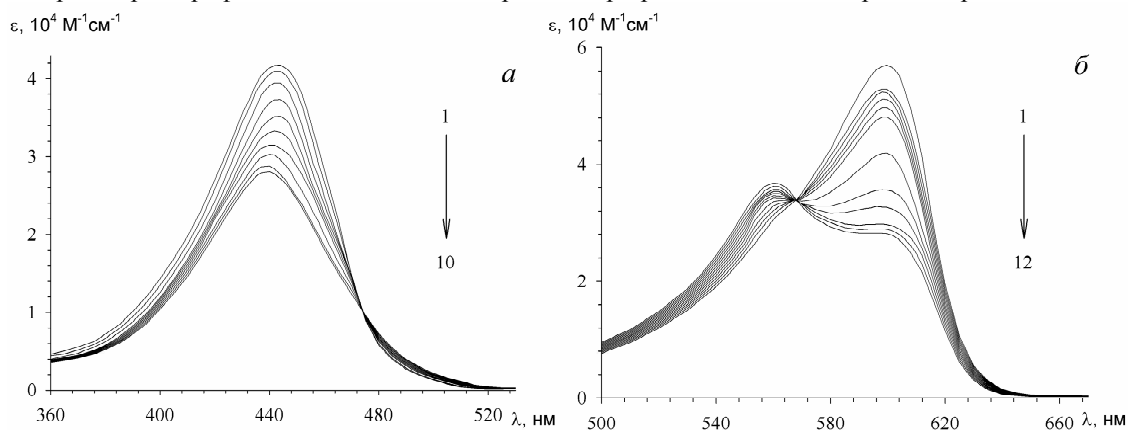


Рисунок 2 – Электронные спектры поглощения растворов молекул профлавина (а) и тионина (б): [ПФ] = $1,9 \cdot 10^{-6}$ (1), $5,5 \cdot 10^{-7}$ (2), $4,2 \cdot 10^{-6}$ (3), $7,9 \cdot 10^{-6}$ (4), $3,2 \cdot 10^{-5}$ (5), $1,9 \cdot 10^{-4}$ (6), $3,5 \cdot 10^{-4}$ (7), $7,1 \cdot 10^{-4}$ (8), $2 \cdot 10^{-3}$ (9), $2,8 \cdot 10^{-3}$ (10) М; [ТИ] = $4 \cdot 10^{-6}$ (1), $5 \cdot 10^{-6}$ (2), $2 \cdot 10^{-5}$ (3), $5 \cdot 10^{-5}$ (4), $8 \cdot 10^{-5}$ (5), $1 \cdot 10^{-4}$ (6), $1,5 \cdot 10^{-4}$ (7), $2 \cdot 10^{-4}$ (8), $4 \cdot 10^{-4}$ (9), $6 \cdot 10^{-4}$ (10), $8 \cdot 10^{-4}$ (11), $1 \cdot 10^{-3}$ М (12)

Для профлавіна и тионина характерны полосы поглощения с максимумами на длинах волн 444 и 598 нм соответственно. Положение мономерных максимумов поглощения при концентрационных изменениях остается практически неизменным. С увеличением концентрации ТИ наблюдается уменьшение интенсивности полос поглощения (ПП) с одновременным появлением новых ПП в коротковолновой области. Для ПФ увеличение концентрации приводит к уменьшению интенсивности ПП и небольшому сдвигу спектров в коротковолновую область. Описанные спектральные особенности являются индикатором стопочной агрегации молекул посредством вертикального стэкинга ароматических хромофоров [6, 7]. Наличие изобестических точек в спектрах ПФ и ТИ ($\lambda \approx 475$ и 568 нм соответственно) свидетельствует об отсутствии в выбранном диапазоне концентраций красителей ($2,5 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4}$ М) ассоциатов более высокого порядка, чем димеры.

Анализ самоассоциации красителей в водном растворе проведен, как и ранее в [6,7], на основе экспериментальных концентрационных зависимостей молярного коэффициента поглощения молекул на длинах волн, соответствующих максимумам поглощения лигандов в мономерной форме (рисунок 3).

Динамическое равновесие в растворе моделировалось схемой:



где K_D – равновесная константа димеризации молекул, а L_1 и L_D – мономерная и димерная формы молекул красителей.

Общая концентрация молекул в растворе равна:

$$[L_0] = [L_1] + 2[L_D], \quad (2)$$

где $[L_0]$ – исходная концентрация красителя; $[L_1]$ – концентрация мономеров; $[L_D] = K_D [L_1]^2$ – концентрация димеров.

Согласно модели, суммарный молярный коэффициент поглощения ε может быть представлен в виде:

$$\varepsilon = \varepsilon_m f_m + \varepsilon_d f_d, \quad (3)$$

где ε_m , ε_d – коэффициенты молярного поглощения мономеров и молекул красителя в составе димерных комплексов соответственно; $f_m = [L_1]/[L_0]$ – равновесная доля молекул в мономерной форме; $f_d = 2K_D [L_1]^2 / [L_0]$ – равновесная доля молекул в составе димеров.

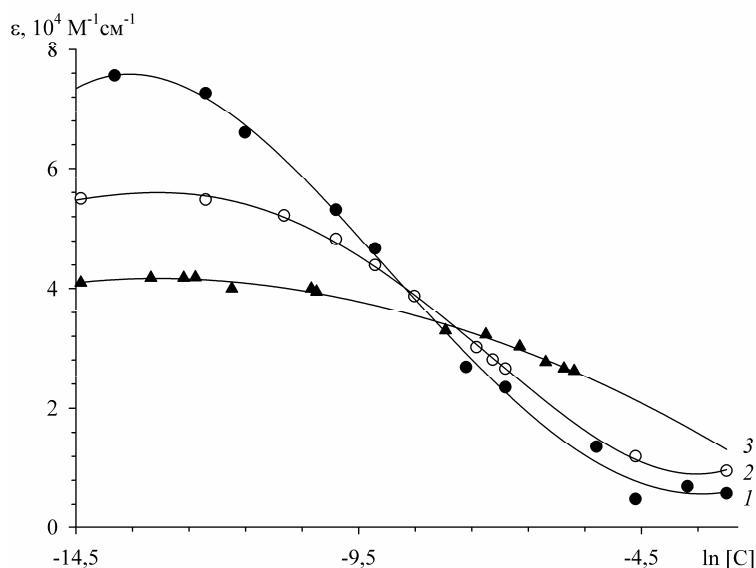


Рисунок 3 – Концентрационные зависимости молярных коэффициентов поглощения растворов красителей: метиленового голубого (1) [6], тионина (2) и профлавіна (3) на длине волны максимума поглощения $\lambda = 664, 598$ и 444 нм соответственно

Концентрация L_1 определяется из закона сохранения массы (2). Три неизвестных параметра ε_m , ε_d и K_D модели (3) рассчитывались исходя из экспериментальных значений молярных показателей поглощения (рисунок 3) с помощью метода наименьших квадратов. Расчетные значения параметров

самоасоціації представлені в таблиці 1 і знаходяться в хорошому відповідності з константами самоасоціації, отриманими для вказаних красителів методом ЯМР-спектроскопії [8].

Таблиця 1 – Параметри димеризації гетероциклічних сполучень

Краситель	Профлавин	Тионин	Метиленовый голубой [6]
K_D, M^{-1}	420 ± 110	3200 ± 500	3900 ± 800
$\epsilon_m, M^{-1} \cdot cm^{-1}$	48600 ± 700	76400 ± 700	73500 ± 800
$\epsilon_d, M^{-1} \cdot cm^{-1}$	36600 ± 1200	26200 ± 2500	8320 ± 2080

Анализ полученных параметров самоассоциации свидетельствует о том, что агрегация фенотиазиновых красителей более выгодна, чем агрегация акридинового красителя профлавина.

Основными факторами, определяющими эффективность самоассоциации ароматических соединений в водной среде, являются дисперсионные взаимодействия ароматических хромофоров в составе агрегатов, гидрофобные взаимодействия, связанные с высвобождением воды при образовании комплексов молекул, и межмолекулярные водородные связи [8]. Центральное кольцо фенотиазиновых красителей (см. рисунок 1) неплоское (изогнутое по линии атомов S—N [3]), в связи с чем интенсивность дисперсионных взаимодействий в димерах МГ и ТИ должна быть существенно ниже, чем у ПФ, поэтому этот фактор не может быть ответственным за наблюдаемое различие в константах. Дополнительная стабилизация комплексов фенотиазинов за счет образования межмолекулярной водородной связи в принципе возможна в димерах ТИ (между 3,7-NH₂ группами и азотом или серой центрального кольца), однако маловероятна в димерах МГ. Учитывая, что константа самоассоциации МГ выше, чем ТИ, фактор водородной связи также не является определяющим. Таким образом, на наш взгляд, различие констант самоассоциации ПФ, МГ и ТИ, по-видимому, обусловлено различным гидрофобным вкладом при образовании димеров молекул.

Комплексообразование лигандов с ДНК. Факт образования комплексов лиганд – ДНК регистрируется по изменениям спектров поглощения лиганда, вызванным добавлением к раствору лиганда биополимера [3]. Характер происходящих при этом изменений виден на рисунке 4: увеличение концентрации биополимера приводит к смещению максимумов поглощения красителей относительно полос мономерных молекул в длинноволновую область спектра, с одновременным изменением интенсивности поглощения и появлению изобестических точек. Такие изменения спектров поглощения лигандов свидетельствуют об образовании ими комплексов с ДНК.

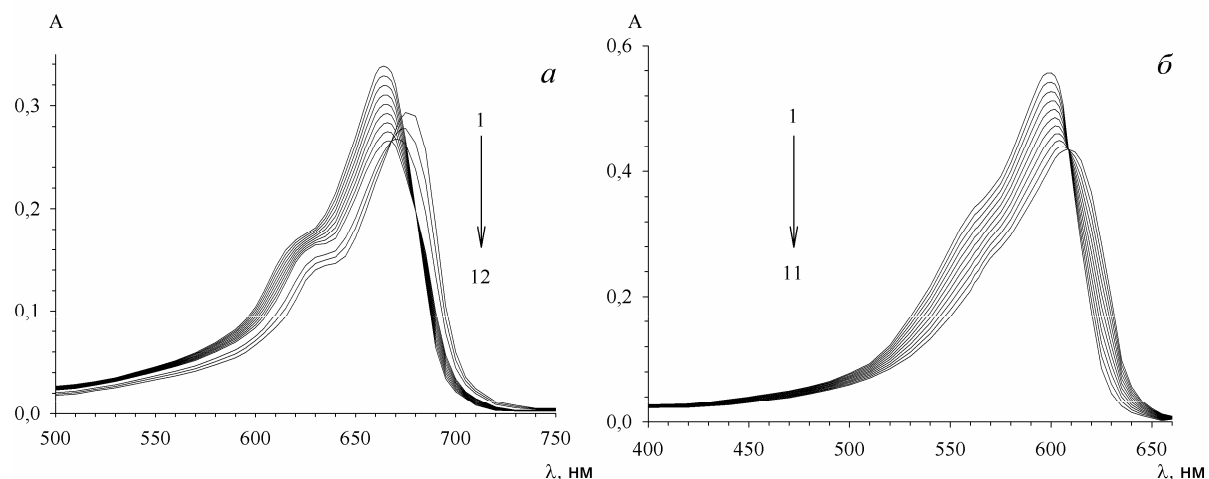


Рисунок 4 – Спектры поглощения водных растворов красителей: метиленового голубого (а) ($[МГ] = 5 \cdot 10^{-6} M = \text{const}$) и тионина (б) ($[ТИ] = 6,3 \cdot 10^{-6} M = \text{const}$) при различных концентрациях ДНК: 0 (1), $4,6 \cdot 10^{-6}$ (2), $6 \cdot 10^{-6}$ (3), $8 \cdot 10^{-6}$ (4), $2,3 \cdot 10^{-5}$ (5), $4 \cdot 10^{-5}$ (6), $6 \cdot 10^{-5}$ (7), $7,7 \cdot 10^{-5}$ (8), $2,3 \cdot 10^{-4}$ (9), $5 \cdot 10^{-4}$ (10), $8 \cdot 10^{-4}$ (11), $2 \cdot 10^{-3} M$ (12)

Количественный анализ комплексообразования проведен по экспериментальным концентрационным зависимостям оптической плотности красителей на длинах волн, соответствующих их максимумам поглощения в мономерной форме (рисунок 5, далее по тексту молекула красителя будет именоваться лигандом). В схеме комплексообразования предполагается, что молекулы лиганда, связанные с ДНК, находятся в равновесии со свободными лигандами и свободными участками (местами связывания) биополимера. Предполагается также, что все места связывания на полимере одинаковы. При связывании лиганд занимает n пар оснований, которые становятся недоступными для связывания с другими молекулами красителя.

Равновесие в растворе моделировалось схемой:



где K – равновесная константа связывания лиганда с парами оснований, P – свободные участки биополимера, содержащие n пар оснований, PL_1 – комплекс лиганда с участком биополимера.

Выражение для равновесной константы комплексообразования

$$K = \frac{[PL_1]}{[P][L_1]} \quad (5)$$

представим в виде:

$$K = \frac{[L_2]}{\left(\frac{[P_0]}{n} - [L_2]\right)[L_1]}. \quad (6)$$

Здесь $[L_2]$ – концентрация участков полимера, занятых лигандами ($[L_2] = [PL_1]$), $[P_0]$ – исходная концентрация пар оснований ДНК, $\frac{[P_0]}{n} - [L_2]$ – концентрация свободных участков.

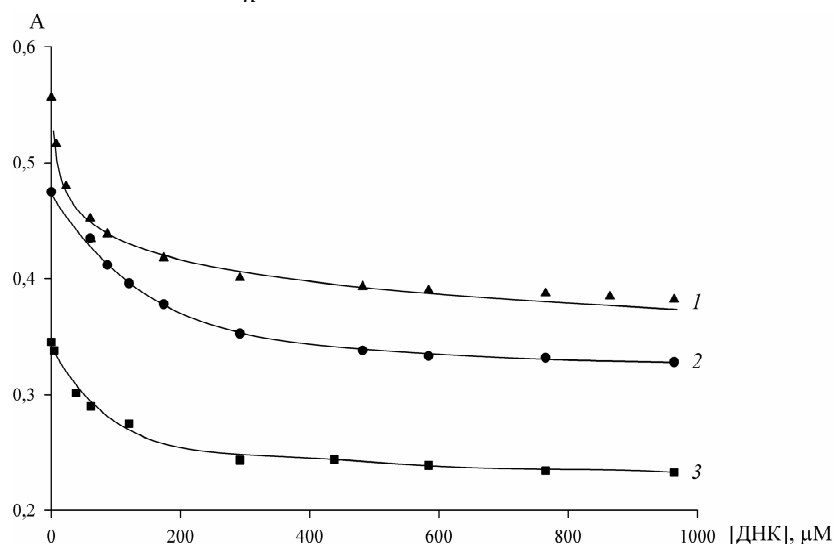


Рисунок 5 – Зависимость оптической плотности растворов красителей на длине волны максимального поглощения: [ТИ] = $6,3 \cdot 10^{-6}$ М, $\lambda = 598$ нм (1); [ПФ] = $5 \cdot 10^{-5}$ М, $\lambda = 444$ нм (2); [МГ] = $5 \cdot 10^{-6}$ М, $\lambda = 664$ нм (3) от концентрации ДНК

Согласно схеме (4), наблюдаемую оптическую плотность лиганда в растворе можно описать выражением:

$$A = \epsilon_1 l [L_1] + \epsilon_2 l [L_2], \quad (7)$$

где l – длина оптического пути; ϵ_1 , ϵ_2 – коэффициенты молярного поглощения лиганда в свободном и связанном состояниях соответственно.

Исключив из формулы (7) концентрацию $[L_1]$, с помощью закона сохранения массы (8)

$$[L_0] = [L_1] + [L_2], \quad (8)$$

получим

$$A = A_0 - \Delta \epsilon l [L_2], \quad (9)$$

где $\Delta \epsilon = \epsilon_1 - \epsilon_2$; $A_0 = \epsilon_1 l [L_0]$ — оптическая плотность разбавленного раствора красителя в мономерной форме. В случае превышения концентрации лигандов в составе димеров 3% от $[L_0]$ (исходной концентрации), экспериментальное значение A_0 пересчитывалось с использованием параметров самоассоциации красителей (таблица 1). Концентрацию $[L_2]$ рассчитывали по формуле

$$[L_2] = \frac{1}{2} \left(\frac{1}{K} + [L_0] + \frac{[P_0]}{n} \right) - \sqrt{\frac{1}{4} \left(\frac{1}{K} + [L_0] + \frac{[P_0]}{n} \right)^2 - \frac{[P_0][L_0]}{n}}, \quad (10)$$

полученной из законов сохранения массы (6) и действующих масс (8).

Выражение (9), описывающее наблюдаемую оптическую плотность раствора, содержит три неизвестных параметра K , n и $\Delta\epsilon$, для расчета которых использовались экспериментальные зависимости поглощения красителей в системах лиганд — ДНК (рисунок 5). Параметры модели определялись путем минимизации функционала:

$$S = \sum_{i=1}^n v_i (A_i^e - A_i)^2, \quad (11)$$

где A_i^e — экспериментальные значения оптической плотности; A_i — значения оптической плотности, рассчитанные с помощью выражения (9); v_i — весовой множитель. Результаты расчетов по данной методике (модель Скэтчарда) приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Параметры комплексообразования в системах лиганд — ДНК, рассчитанные с использованием модели Скэтчарда (I) и кооперативной модели МакГи – фон Хиппеля (II)

Модель	Комплекс	K, M^{-1}	n	w	$\Delta\epsilon, M^{-1} \cdot cm^{-1}$
I	ПФ — ДНК	41000 ± 3000	$2,44 \pm 0,23$	—	10400 ± 3700
II		20900 ± 2700	$2,09 \pm 0,14$	$2,63 \pm 0,41$	10400 ± 2500
I	ТИ — ДНК	80400 ± 19000	$1,89 \pm 0,24$	—	25000 ± 700
II		33800 ± 4100	$2,66 \pm 0,15$	$4,72 \pm 0,53$	24800 ± 800
I	МГ — ДНК	194800 ± 21000	$4,98 \pm 0,92$	—	17400 ± 1600
II		53400 ± 11000	$5,89 \pm 1,10$	$6,50 \pm 1,21$	17500 ± 900

Метод Скэтчарда, хотя и является широко распространенным при определении параметров связывания, допускает значительный субъективизм в их оценке. Более объективный анализ констант связывания и параметра кооперативности, которые могут существенно различаться для интеркаляционного и неинтеркаляционного типов связывания, предоставляют модели МакГи – фон Хиппеля [5].

Согласно модели МакГи – фон Хиппеля, молекула ДНК представляет собой жесткий полимер (решетку), состоящий из N повторяющихся звеньев (пар оснований) (рисунок 6). Лиганд может занять любые n последовательных звеньев решетки. В одних случаях лиганды располагаются таким образом, что решетка не может связать ни одного дополнительного лиганда, хотя на ней имеются свободные центры, а в других – остаются места для присоединения лигандов. Все эти формы находятся в равновесии со свободными лигандами.

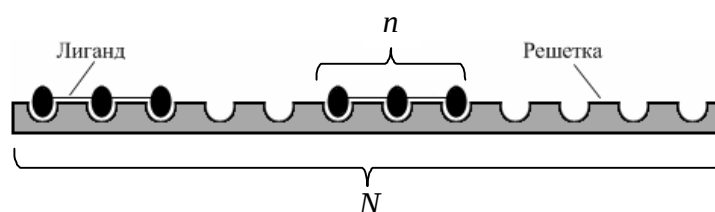


Рисунок 6 – Схематическое изображение связывания лиганда с ДНК

Положив, что среднее число свободных участков связывания, расположенных на одной линейной макромолекуле равно N_f , равновесную константу комплексообразования запишем в виде:

$$K = \frac{[PL_1]}{N_f [P_{ii}] [L_1]}, \quad (12)$$

где $[P_{ii}]$ — концентрация макромолекул.

При $N \gg n$, среднее число свободных участков на полимере можно записать так:

$$N_f = NP_n, \quad (13)$$

где P_n — вероятность обнаружения на решетке не занятого лигандом участка, N/n — количество потенциальных участков связывания на макромолекуле. Вероятность P_n , умноженная на общее число

пар оснований полимера N , дает среднее число свободных лигандсвязывающих участков N_f длиной n на одной решетке.

В терминах условных вероятностей P_n можно представить в виде [5]:

$$P_n = P_f P_{ff}^{n-1}, \quad (14)$$

где P_{ff} – условная вероятность того, что за данным свободным элементом решетки следует другой незанятый элемент (условную вероятность события наступающего или повторяющегося $n-1$ раз), P_f – вероятность того, что произвольно выбранный элемент (пара оснований) решетки не занят лигандом.

Используя долю занятых элементов решетки P_b , или вероятность того, что данный центр решетки занят, выразим P_f :

$$P_f = 1 - P_b = 1 - \frac{n[L_2]}{N[P_{ii}]} = 1 - \frac{nv}{N}. \quad (15)$$

Предположив, что адсорбция лигандов не деформирует структуру полимера, связанные лиганды не взаимодействуют между собой, условная вероятность P_{ff} , представляющая собой долю свободных элементов решетки, находящимися перед незанятыми центрами, равна:

$$P_{ff} = \frac{P_f}{P_f + \frac{P_b}{n}} = \frac{1 - \frac{nv}{N}}{1 - \frac{(n-1)v}{N}}. \quad (16)$$

С учетом уравнений (13-16) среднее число свободных участков представим следующим образом:

$$N_f = NP_n = N \left(1 - \frac{nv}{N} \right) \left(\frac{1 - \frac{nv}{N}}{1 - \frac{(n-1)v}{N}} \right)^{n-1}. \quad (17)$$

Используя ранее введенные обозначения, получим:

$$\frac{[L_2]}{[P_0]([L_0] - [L_2])} = K \left(1 - \frac{n[L_2]}{[P_0]} \right) \left(\frac{[P_0] - n[L_2]}{[P_0] - (n-1)[L_2]} \right)^{n-1}. \quad (18)$$

В случае $n = 1$ уравнение (18) сводится к уравнению Скэтчарда (10), полученному для систем при отсутствии эффекта «перекрывания», обусловленного тем, что при насыщении решетки лигандами они так распределяются по ней, что часть свободных центров может оказаться недоступной для связывания молекул красителя. Вследствие этого полное насыщение решетки большими лигандами ($n > 1$) практически недостижимо. Этот эффект моделью Скэтчарда не учитывается. Некооперативная модель (18), в сравнении с моделью Скэтчарда, более адекватно описывает экспериментальные данные.

Согласно некооперативной модели, равновесная концентрация, входящая в выражение (9), рассчитывалась из уравнения (18). Концентрация $[L_2]$ определялась на каждом цикле минимизации функционала (11) при варьировании параметров (K , n , $\Delta\epsilon$). Полученные оценки параметров использовались как начальные приближения K , n и $\Delta\epsilon$ при их поиске с помощью данной модели.

Между ближайшими (соседними) лигандами, связанными с биополимером, возможны кооперативные взаимодействия. Они могут быть вызваны как различными нековалентными взаимодействиями между адсорбированными молекулами, так и в результате опосредованного взаимодействия, состоящего в том, что адсорбированный лиганд деформирует структуру полимера в месте присоединения соседнего лиганда [9].

В случае кооперативной модели, также примененной в настоящей работе для анализа экспериментальных концентрационных зависимостей оптической плотности исследуемых растворов, предполагается, что адсорбция лигандов не искажает структуру полимера. ДНК с адсорбированными лигандами рассматривается как последовательность из элементов двух классов: свободных звеньев полимера и групп лигандов, связанных с полимером. В группу может входить один, два или три лиганда. Взаимодействие одного лиганда со связующим местом на полимере, удаленном от других лигандов, образующих комплекс с ДНК, характеризуется константой K . Связывание последующих лигандов, вступающих во взаимодействие со своим соседом, происходит с измененной константой Kw , а связывание лиганда, образующего группу из трех лигандов, может происходить с константой Kw^2 .

Таким образом, параметр w отражает кооперативные взаимодействия между связанными молекулами красителя. Модель МакГи – фон Хиппеля (кооперативная модель) принимает следующий вид [5]:

$$\frac{[L_2]}{[P_0]([L_0] - [L_2])} = K(1 - nr) \left(\frac{(2w - 1)(1 - nr) + r - R}{2(w - 1)(1 - nr)} \right)^{n-1} \left(\frac{1 - (n + 1)r + R}{2(1 - nr)} \right)^2, \quad (19)$$

где $r = \frac{[L_2]}{[P_0]}$, $R = \sqrt{4wr(1 - nr) + (1 - (n + 1)r)^2}$; w – параметр кооперативности, характеризующий

взаимодействия между близлежащими лигандами связанными с ДНК. Значение $w > \frac{n+1}{2}$ соответствует

кооперативному связыванию, $w < \frac{n+1}{2}$ – антикооперативному. При $w = 1$ лиганды не взаимодействуют друг с другом.

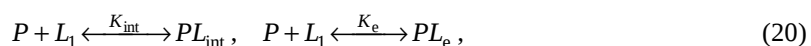
Параметры кооперативной модели: K , n , w и $\Delta\epsilon$ определены из условия наилучшего совпадения экспериментальных и расчетных данных путем минимизации функционала (11) и представлены в таблице 2. Кооперативная модель, в сравнении с другими рассмотренными моделями, более адекватно описывает экспериментальные данные (рисунок 5), т.е. обеспечивает наименьшее значение функционала (11).

Анализ полученных данных (таблица 2 и таблица 1) показывает, что с увеличением K_D параметр кооперативности также возрастает. По-видимому, между адсорбированными молекулами красителей на ДНК проявляются те же взаимодействия, что и при самоассоциации лигандов.

Число пар оснований на полинуклеотиде, приходящихся в среднем на одно место связывания для молекул ПФ и ТИ имеет значение, близкое к двум (таблица 2), что соответствует преимущественному связыванию по типу интеркаляции [3], и согласуется с данными ЯМР спектроскопии и кругового дихроизма для этих соединений. Для МГ параметр $n = 5,89 \pm 1,1$, что может быть объяснено преобладанием «внешнего» типа связывания [10]. Последнее, однако, не означает отсутствие интеркаляционного типа связывания МГ с биополимером.

Сделав допущение, что молекулы МГ при связывании с полимером образуют два различных типа комплексов, нами был проведен дополнительный анализ системы МГ — ДНК с использованием модели Скэтчарда.

Равновесное комплексообразование лиганда с полимером моделировалось схемой:



где K_{int} и PL_{int} – константа равновесия и комплекс МГ – ДНК, соответствующие интеркаляционному связыванию; K_e и PL_e – равновесная константа и комплекс МГ с участком полимера, соответствующие связыванию лиганда с внешней частью макромолекулы.

Экспериментальные данные (рисунок 5) описывались выражением:

$$A = A_0 - \Delta\epsilon_1 l [L_{2\text{int}}] - \Delta\epsilon_2 l [L_{2e}], \quad (21)$$

где $\Delta\epsilon_1$ – разность коэффициентов молярного поглощения МГ в свободном и интеркалированном состояниях; $\Delta\epsilon_2$ – разность коэффициентов молярного поглощения лиганда в свободном состоянии и в состоянии «внешнего» связывания с биополимером. Расчет концентраций МГ $[L_{2\text{int}}]$ и $[L_{2e}]$ в составе комплексов PL_{int} и PL_e проводился с использованием уравнения Скэтчарда, учитывающим два типа связывания [9]:

$$\frac{[L_0] - [L_1]}{[P_0]} = \frac{K_1 [L_1]}{n_1 (1 + K_1 [L_1])} + \frac{K_2 [L_1]}{n_2 (1 + K_2 [L_1])}, \quad (22)$$

где n_1 и n_2 — числа пар оснований, приходящиеся на одно место связывания лиганда при образовании комплексов PL_{int} и PL_e .

Оценка параметров комплексообразования K_1 , K_2 , n_2 , $\Delta\epsilon_1$ и $\Delta\epsilon_2$ (при фиксированном значении $n_1 = 2$) показала, что $K_2 = (96 \pm 17) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ превосходит константу интеркаляционного связывания $K_2 = (26,4 \pm 4,6) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$. Число пар оснований n_2 составляет $5,9 \pm 0,3$. Интенсивность поглощения лиганда в составе интеркаляционного комплекса несколько выше, чем при внешнем связывании с биополимером: $\Delta\epsilon_1 = 16300 \pm 800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ и $\Delta\epsilon_2 = 17800 \pm 1100 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. С использованием полученных

значений K_1 , n_1 , K_2 и n_2 был произведен расчет относительного содержания молекулярных комплексов в растворе (рисунок 7).

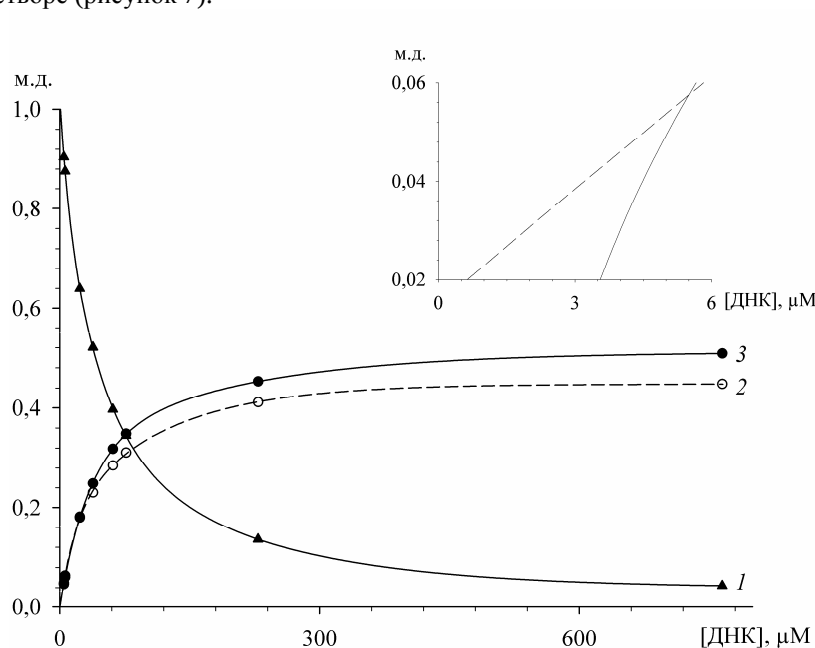


Рисунок 7 – Расчетные зависимости относительного содержания (мольных долей (м.д.)) МГ и его комплексов с нуклеиновой кислотой от концентрации ДНК: мономер МГ (1), интеркаляционный комплекс МГ – ДНК (2), внешнесвязанный комплекс МГ – ДНК (3). На вставке – зависимость относительного содержания (интеркаляционного —) и (внешнесвязанного - - -) комплексов МГ при малых концентрациях ДНК

Следует отметить, что вклад в общее равновесие различных молекулярных форм определяется не только значениями K_1 , n_1 , K_2 и n_2 , но и концентрациями $[P_0]$. Так, относительное содержание МГ в составе комплексов растет, а в мономерной форме – падает с повышением концентрации ДНК в растворе. Наблюдаемые изменения значений $[L_{2int}]/[L_0]$, и $[L_{2e}]/[L_0]$ при очень низких концентрациях ДНК (см. вставку на рисунке 7), указывают на вытеснение комплексов, образованных лигандом с внешней частью биополимера, интеркаляционными комплексами, что обусловлено тем, что для интеркаляционного связывания требуется меньший участок посадки лиганда на ДНК ($n_1 = 2$).

Заключение.

Анализ экспериментальных данных с использованием модели МакГи – фон Хиппеля свидетельствует о преобладающем интеркаляционном связывании профлавина и тионина с ДНК. Молекулы метиленового голубого образуют комплексы с биополимером как путем интеркаляции, так и «внешнего» связывания. Наблюдаемая связь между параметрами кооперативности и константами димеризации лигандов, позволяет предположить, что между адсорбированными молекулами красителей на ДНК проявляются те же взаимодействия, что и при их самоассоциации. Из анализа равновесия в растворе молекул метиленового голубого и ДНК, проведенного в рамках модели Скэтчарда, учитывающей два типа связывания, следует, что равновесная константа образования комплекса лиганда с «внешней» частью биополимера выше, чем для интеркаляционного комплекса.

Бibliографический список использованной литературы

1. Dougherty G. Spectroscopic analysis of drug-nucleic acid interactions / G. Dougherty, W.J. Pigram // Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. — 1982. — Vol. 12. — № 2. — P. 103–132.
2. Graves D.E. Intercalative binding of small molecules to nucleic acids / D.E. Graves, L.M. Velea // Curr. Org. Chem. — 2000. — Vol. 4. — № 9. — P. 915–929.
3. Барановский С.Ф. Комплексообразование гетероциклических лигандов с ДНК в водном растворе / С.Ф. Барановский, П.А. Болотин, М.П. Евстигнеев, Д.Н. Чернышев // Журн. прикл. спектроскопии. — 2008. — Т. 75. — № 2. — С. 242–249.
4. Круглова Е.Б. Использование спектрофотометрического анализа для вычисления термодинамических параметров связывания в системах актиноциновые производные — ДНК / Е.Б. Круглова, Н.А. Гладковская, В.Я. Малеев // Биофизика. — Т. 50. — № 2. — 2005. — С. 253–264.

5. McGhee J.D. Theoretical aspects of DNA-protein interactions: co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice / J.D. McGhee, P.H. von Hippel // J. Mol. Biol. — 1974. — Vol. 86. — № 2. — P. 469–489.
6. Барановский С.Ф. Агрегация 1,3,7-триметилксантина с метиленовым голубым в водном растворе / С.Ф. Барановский, П.А. Болотин, М.П. Евстигнеев // Журн. прикл. спектроскопии. — 2006. — Т. 73. — № 2. — С. 158–163.
7. Барановский С.Ф. Ассоциация рибофлавина, кофеина и натриевого эфира салициловой кислоты в водном растворе / С.Ф. Барановский, П.А. Болотин // Журн. прикл. спектроскопии. — 2007. — Т. 74. — № 2. — С. 188–194.
8. Davies D.B. ^1H NMR investigation of self-association of aromatic-drug molecules in aqueous solution / D.B. Davies, L.N. Djimant, A.N. Veselkov // J. Chem. Soc. Faraday Trans. — 1996. — Vol. 92. — № 3. — P. 383–390.
9. Заседателев А.С. Теория одномерной адсорбции. 1. Адсорбция малых молекул на гомополимере / А.С. Заседателев, Г.В. Гурский, М.В. Волькенштейн // Молекулярная биология. — 1971. — Т. 5. — № 2. — С. 245–252.
10. Rohs R., Sklenar H. Methylene blue binding to DNA with alternating AT base sequence: minor groove binding is favored over intercalation / R. Rohs, H. Sklenar // J. Biomol. Str. Dyn. — 2004. — Vol. 21. — № 5. — P. 699–711.

Поступила в редакцию 09.10.2010 г.

Чернишев Д.Н., Бучельников А.С., Мухина Ю.В., Барановский С.Ф. Спектрофотометричний аналіз зв'язування ароматичних біологічно активних сполук з ДНК

Методом спектрофотометрії досліджені самоасоціація і комплексоутворення з ДНК органічних гетероциклічних сполук акридинового та фенотіазинового ряду: профлавіна, тіоніна та метиленового блакитного. Визначено рівноважні константи димеризації красителів та параметри комплексоутворення з ДНК з використанням моделей Скэтчарда і МакГи – фон Хіппеля. Зроблено припущення, що переважаючим типом зв'язування з ДНК у разі профлавіна та тіоніна є інтеркаляція, а у разі метиленового блакитного – «зовнішнє» зв'язування з поверхнею ДНК.

Ключові слова: спектрофотометрія, ДНК комплексоутворення, барвник.

Chernyshev D.N., Buchelnikov A.S., Mukhina Yu.V., Baranovsky S.F. Spectrophotometric analysis of binding of aromatic biologically active compounds to the DNA

The self-association and DNA complexation of organic heterocyclic compounds that belong to acridine and thiazine groups (proflavine (PF), thionine (TH) and methylene blue (MB)) are studied by spectrophotometry. Equilibrium dimerization constants of dyes and the DNA complexation parameters were determined using Scatchard and McGhee — von Hippel theoretical approaches. Based of analysis of the data obtained, it is concluded that a dominating type of binding with DNA in the case of proflavine and thionine is intercalation and in the case of methylene blue — “external” binding with DNA surface.

Keywords: spectrophotometry, DNA complexation, dye.