

БИОФИЗИКА

УДК 577.113.6

Ս.Օ. Վարդևանյան¹, Ա.Ս. Անտոնյան¹, Մ.Ա. Շագինյան¹, Ա.Տ. Կարապետյան²

Взаимодействие нековалентно связывающихся лигандов с ДНК

(Представлено чл.-кор. НАН РА А.А. Трчуняном 15/II 2011)

Ключевые слова: ДНК, БЭ, Hoechst 33258, интеркаляция, полуинтеркаляция, внешнее связывание

Исследование особенностей взаимодействия низкомолекулярных биологически активных веществ — лигандов с ДНК имеет решающее значение для понимания таких важных процессов, как репликация, рекомбинация, репарация и экспрессия генов. В настоящее время интенсивно проводятся исследования с целью разработки новых подходов для выявления способов связывания и специфичности лигандов к определенным последовательностям ДНК, а также для понимания молекулярных механизмов действия биологически активных соединений на функционирование ДНК [1-5]. Для понимания механизмов действия таких лигандов и развития принципов конструирования новых высокоактивных и специфических молекул необходимы структурные, термодинамические и кинетические исследования.

Низкомолекулярные вещества могут связываться с ДНК ковалентно (необратимо) и нековалентно (обратимо). Нековалентно связывающиеся лиганды в свою очередь подразделяются на интеркаляторы и неинтеркаляторы. Плоские, ароматические, гетероциклические группы лигандов-интеркаляторов при взаимодействии образуют стэкинг контакты с основаниями ДНК и индуцируют значительные конформационные изменения в ней [6,7].

В последнее время большое внимание уделяется также исследованиям взаимодействия лигандов-неинтеркаляторов, избирательно связывающихся с определенными последовательностями в одном из желобков ДНК. Среди

таких соединений определенным интерес представляют олигопептиды, являющиеся производными лекситропсинов (нетропсин, дистамицин), и бис-амиды, которые используются в качестве зондов, узнающих определенные последовательности ДНК [8]. Бис-амидные вещества с антивирусными и антибактериальными свойствами представляют собой класс лигандов, связывающихся в малом желобке ДНК, проявляя предпочтение к АТ богатым участкам [9,10]. Комплексы стабилизируются за счет ван-дар-ваальсовых контактов молекул лиганда со стенками малого желобка, а также за счет образования водородных связей между амидными группами лиганда и основаниями ДНК [11,12]. В стабилизации комплексов важную роль играет также электростатическое взаимодействие между положительно заряженными молекулами лиганда и отрицательно заряженным сахаро-фосфатным остовом.

Анализ многочисленных экспериментальных данных, а также некоторые общие соображения о переходе спираль – клубок обусловили возможность представления основной модели ДНК, используемой для теоретического рассмотрения ее плавления в присутствии лиганда. Сравнение теории с экспериментом дало возможность судить об особенностях связывания лигандов с ДНК, а также определить термодинамические параметры взаимодействия: отношение констант связывания с полимером, находящимся в различных состояниях (в частности двухцепочечном (дц) и одноцепочечном (оц)), и число пар оснований, соответствующих одному месту связывания лиганда (n) [13].

Настоящая статья обобщает результаты теоретического анализа экспериментальных данных, полученных в лаборатории молекулярной биофизики ЕГУ, которые позволили определить ряд термодинамических параметров связывания интеркалирующих, а также "внешне связывающихся" лигандов с дц- и оц-ДНК и выявить некоторые особенности взаимодействия этих лигандов с ДНК.

Установлено, что, в зависимости от величины соотношения констант связывания лиганда с дц- и оц-структурами низкомолекулярное вещество стабилизирует или дестабилизирует дц-структуру ДНК. На опыте это действие проявляется в сдвиге точки перехода комплекса T_m в ту или иную сторону по отношению к T_0 "чистого" полимера, а ширина интервала перехода и в том, и в другом случае увеличивается (при низких концентрациях лиганда). Такое изменение параметров перехода связано с перераспределением в ходе плавления молекул лиганда между спиральными и клубкообразными участками в соответствии с их сродством к этим участкам, а кривая зависимости от концентрации лигандов имеет колоколообразную форму, так

как из-за ограниченности числа мест связывания для скрепки на дц-участках ДНК увеличение концентрации лигандов приводит к затруднению процесса перераспределения и величина $\delta(\Delta T/T_m^2) = \Delta T/T_m^2 - \Delta T_0/T_0^2$ (ΔT и ΔT_0 – ширины интервала, T_m и T_0 – температуры плавления комплексов ДНК-лиганд и чистой ДНК соответственно), проходя через максимум, уменьшается. В предельном случае, когда все места связывания на дц-ДНК заняты лигандами, приращение ширины интервала плавления стремится к нулю (рис. 1, кривые 1-3).

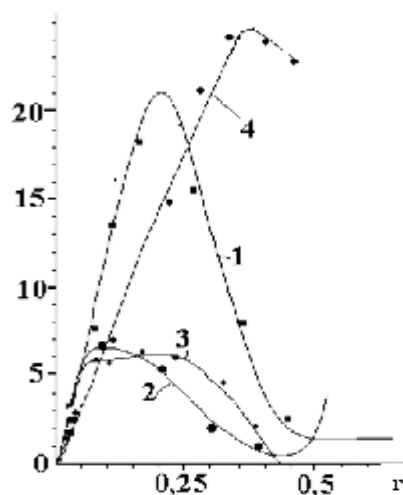


Рис.1. Кривые зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2) \cdot 10^{-5}$ град $^{-1}$ (кривые 1-3) и $\delta(1/T_m) \cdot 10^{-5}$ град $^{-1}$ (кривая 4) от r . Кривая 1 получена для комплексов БЭ с ДНК при $\mu = 2.0 \cdot 10^{-3}$ М Na $^{+}$, кривые 2 и 3 – для комплексов АМД (2) и БЭ (3) с ДНК при $\mu = 2.0 \cdot 10^{-2}$ М Na $^{+}$. Кривая 4 соответствует изменению $\delta(1/T_m)$ от r_b при $\mu = 2.0 \cdot 10^{-2}$ М Na $^{+}$. Аналогичные зависимости, полученные при других исследованных ионных силах, не приведены. Кривые получены из теоретических расчетов, точки на кривых – экспериментальные [13].

Дальнейшее увеличение концентрации лиганда вновь приводит к увеличению значения $\delta(\Delta T/T_m^2)$, а параметр приращения температуры плавления $\delta(1/T_m) = 1/T_0 - 1/T_m$ уменьшается (рис. 1, кривая 4): стабилизатор превращается в дестабилизатор дц-структуры. Теоретический анализ экспериментальных данных выявил существование более одного типа связывания в случае классического интеркалятора бромистого этидия (БЭ) с дц- и оц-ДНК, один из которых "сильный", другой (другие) -"слабый", и позволил оценить величины термодинамических параметров комплексообразования – константу и число мест связывания n [13].

Полученные результаты позволяют условно разделить кривые зависимости $\delta(\Delta T/T_m^2)$ и $\delta(1/T_m)$ от концентрации лиганда в случае комплексов БЭ с ДНК на три области:

1. низкие концентрации лиганда ($0 < r \leq 0.125$, где $r = C_{\text{лиг}}/C_{\text{ДНК}}$): молекулы БЭ преимущественно интеркалируют в плоскость пар оснований. При этом температура T_m и ширина интервала плавления ΔT комплексов увеличиваются;

2. интервал $0.125 \leq r \leq 0.5$; молекулы БЭ частично интеркалируют между соседними основаниями в одной из нитей ДНК (полуинтеркаляция). В этой области изменения концентрации лиганда T_m комплексов увеличивается, а ΔT уменьшается и при $r \sim 0.5$ становится равной ΔT_0 чистой ДНК (рис. 1). Этот эффект зависит от ионной силы раствора, увеличение которого приводит к уменьшению значения r , при котором $\Delta T = \Delta T_0$ (рис. 1, ср. кривые 1, 2, 3);

3. $r > 0.5$; все возможные места связывания на дц-участках ДНК насыщены и молекулы БЭ перераспределяются на свободные оц-участки ДНК, тем самым уменьшая T_m и резко увеличивая ΔT : стабилизатор дц-структуры ДНК превращается в дестабилизатор.

Исследования показали, что Hoechst 33258 (H33258) так же, как и БЭ, связывается с ДНК "сильным" и "слабым" способами. Примечательно, что при относительно высоких ионных силах раствора ($\mu > 0.004 \text{ M Na}^+$) и высоких концентрациях лиганда последние диссоциируют вследствие электростатической природы слабого способа связывания [14,15].

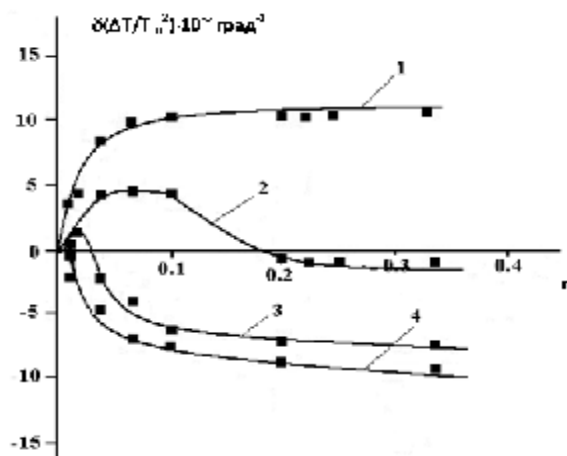


Рис.2. Кривые зависимости изменения $\delta(\Delta T/T_m^2) \cdot 10^5 \text{ град}^{-1}$ от r при ионных силах 0.002 (1); 0.004 (2); 0.01 (3) и 0.02 M Na^+ (4), полученные на основании кривых плавления ДНК и ее комплексов с H33258.

На рис. 2 приведены зависимости изменения ширины интервала плавления комплексов ДНК-H33258 от концентрации лиганда. Как видно из рисунка, при ионных силах раствора $\mu = 0.002 \text{ M}$; $\mu = 0.01 \text{ M}$ и $\mu = 0.02 \text{ M Na}^+$ из-за ограниченности мест связывания на дц-ДНК кривые практически не меняются уже при значениях $r \geq 0.1$. Особый интерес представляют данные, полученные при $\mu = 0.004 \text{ M Na}^+$ (рис. 2, кривая 2): кривая зависимости

$\delta(\Delta T/T_m^2)$ от r увеличивается при низких концентрациях лиганда ($r \geq 0.05$), проходит через плато и, уменьшаясь, приравнивается к нулю при значениях $r \geq 0.2$ ($\delta(\Delta T/T_m^2) \approx 0$) (рис. 2, кривая 2).

На существование различных способов связывания Н33258 с ДНК указывает Скетчард-анализ кривых адсорбции (нелинейные кривые), с помощью которого были определены значения констант (K) и числа мест связывания (n) для двух способов (таблица) [14].

Экспериментальные значения K и n , полученные для комплексов Н33258 с ДНК при различных ионных силах раствора

| Ионная сила, М Na ⁺ | $K_s \cdot 10^{-6} \text{ М}^{-1}$ | $K_w \cdot 10^{-5} \text{ М}^{-1}$ | n_s | n_w |
|--------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------|-------|
| 0.002 | 7.9±0.30 | 0.80±0.03 | 14 | 3 |
| 0.004 | 0.62±0.05 | 0.14±0.05 | 8 | 3 |
| 0.01 | 6.25±0.20 | 0.67±0.02 | 11 | 3 |
| 0.02 | 450.00±20.00 | 10.30±2.00 | 17 | 4 |

Примечание: K_s и K_w — константы сильного и слабого способов связывания, соответственно, n_s и n_w — число пар оснований, соответствующих одному месту сильного и слабого способов связывания, соответственно.

Значение K_s , полученное при ионной силе раствора $\mu = 0.002 \text{ М Na}^+$, указывает на то, что Н33258 с ДНК связывается неспецифически, сильным способом. Однако, как видно из таблицы, значение K_s , соответствующее сильному способу, уменьшается при повышении ионной силы раствора от 2 до 4 мМ Na⁺. Данные таблицы позволяют предположить, что при ионной силе 4 мМ Na⁺ молекулы Н33258 с ДНК связываются двумя сильными способами одновременно, которые, по всей вероятности, ослабляют друг друга. Дальнейшее повышение ионной силы раствора приводит к значительному возрастанию величины K_s , что является следствием проявления только одного, ярко выраженного специфического взаимодействия молекул лиганда с АТ последовательностями ДНК (при 20 мМ Na⁺ значение константы связывания наибольшее).

Как видно из приведенных в таблице данных, значение n_s уменьшается при увеличении ионной силы раствора от 2 до 4 мМ Na⁺, а при дальнейшем повышении ионной силы раствора значение n_s увеличивается. При $\mu = 20 \text{ мМ Na}^+$ значение n_s наибольшее, так как в этих условиях число мест связывания Н33258 на ДНК сильным способом сильно ограничено по сравнению с n_s , полученными при более низких ионных силах. Значения n_w практически одинаковы в интервале изменения ионной силы раствора — $2 \leq \mu \leq 20 \text{ мМ}$

Na⁺. Это указывает на то, что при высоких концентрациях лиганда слабый способ связывания H33258 с ДНК происходит по одному и тому же механизму независимо от ионной силы раствора.

Таким образом, сравнительный анализ теоретически рассчитанных и экспериментальных результатов по взаимодействию лигандов с ДНК выявил, что и БЭ, и Hoechst 33258 могут связываться с ДНК более чем одним способом (мультиמודальные лиганды), что дает возможность в дальнейшем изучить их совместное связывание с ДНК.

¹Ереванский государственный университет

²Ереванский государственный университет архитектуры и строительства

Ս. Օ. Վարդևանյան, Ա. Ս. Անտոնյան, Մ. Ա. Շահինյան, Ա. Թ. Կարապետյան

Взаимодействие нековалентно связывающихся лигандов с ДНК

Рассмотрены особенности связывания лигандов с ДНК. Определены термодинамические параметры связывания интеркалирующих, а также "внешне связывающихся" лигандов с двухцепочечный (дц) и одноцепочечный (оц) ДНК. Выявлены некоторые особенности взаимодействия этих лигандов с ДНК. Показано, что в зависимости от величины соотношения констант связывания лиганда с дц- и оц-структурами, низкомолекулярное вещество стабилизирует или дестабилизирует дц-структуру ДНК. Показано также, что бромистый этидий и Hoechst 33258 могут взаимодействовать с ДНК больше чем одним способом.

Պ. Ն. Վարդևանյան, Ա. Պ. Անտոնյան, Մ. Ա. Շահինյան, Ա. Թ. Կարապետյան

ԴՆԹ-ի հետ ոչ կովալենտ կապվող լիգանդների փոխազդեցությունը

Դիտարկվել են ԴՆԹ-ի հետ լիգանդների կապման առանձնահատկությունները: Որոշվել են երկշղթա (եշ) և մեկշղթա (մշ) ԴՆԹ-ի հետ ինտերկալյացիոն և արտաքին եղանակով փոխազդող լիգանդների կապման թերմոդինամիկ պարամետրերը: Բացահայտվել են ԴՆԹ-ի հետ այս լիգանդների կապման որոշ առանձնահատկություններ: Յուրյ է արվել, որ կախված եշ- և մշ-կառուցվածքների հետ լիգանդի կապման հաստատությունների միջև հարաբերությունից, ցածրամոլեկուլային միացությունը կայունացնում կամ ապակայունացնում է ԴՆԹ-ի եշ-կառուցվածքը: Յուրյ է արվել նաև, որ էթիդիումի բրոմիդը և Hoechst 33258-ը կարող են ԴՆԹ-ի հետ փոխազդել ավելի քան մեկ եղանակով:

The Interaction of Non-Covalent Binding Ligands with DNA

The binding peculiarities of ligands with DNA have been observed. The thermodynamic parameters of binding of intercalative and external-binding ligands with ds- and ss-DNA have been determined. Some interaction peculiarities of these ligands with DNA have been revealed. It has been shown, that depending on the value of relationship between ligand binding constants with ds- and ss-structures, low-molecular compound stabilizes or destabilizes ds-structure of DNA. It has also been shown, that EtBr and Hoechst 33258 can interact with DNA by more than one mode.

Литература

1. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Davtyan H.G., Karapetyan A.T. - *Exp. and Mol. Medicine*. 2003. V. 35. N6. P. 527-533.
2. Lane A.N., Jenkins T.C. Q. - *Rev. Biophys.* 2000. V. 33. N3. P. 255-306.
3. Chaires J.B. - *Biopolymers*. 1998. V. 44. P. 201-215.
4. Monaco R.R. - *J.Biomol. Struct. Dyn.* 2007. V. 25(2). P. 119-25.
5. Alonso A., Almendral M.J., Curto Y., Criado J.J., Rodriguez E, Manzano J.L. - *Anal. Biochem.* 2006. V. 355. P. 157-164.
6. Ibrahim M.S - *Analytica Chimica Acta*. 2001. V. 443. P. 63-72.
7. Willis B., Arya D.P. - *Biochemistry*. 2006. V. 45. P. 10217-10232.
8. Aleman C., Namba A.M., Casanovas J. - *J. Biomol. Struct. and Dyn.* 2005. V. 23. N 1. P. 29-36.
9. Bostock-Smith C.E., Laughton C.A., Searle M.S. - *Biochem. J.* 1999. V. 342. P. 125-132.
10. Breusegem S.Y., Clegg R.M., Lootiens F.G. - *J. Mol. Biol.* 2002. V. 315. P. 1049-1061.
11. Banerjee D., Pal S.K. - *J. Phys. Chem. B.* 2007. V. 111. P. 10833-10838.
12. Streltsov S.A., Gromyko A.V., Oleinikov V.A., Zhuze A.L. - *J. Biomol. Struct. and Dyn.* 2006. V. 24. N 3. P. 1-18.
13. Karapetian A.T., Mehrabian N.M., Terzikian G.A., Vardevanian P.O., Antonian A.P., Borisova O.F., Frank-Kamenetskii M.D. - *J.Biomol. Struct. Dyn.* 1996. V. 14. N2. P. 275-283.
14. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Pirumyan K.V., Muradyan A.M., Karapetian A.T. - *J.Biomol. Struct. Dyn.* 2008. V. 25. N 6. P. 641-646.
15. Kakkar R., Grover S.R. - *J. Biomol. Struct. & Dynam.* 2005. N 1. V. 23. P. 37-47.