



Биол. журн. Армении, 3 (64), 2012

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ АДСОРБЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ НА КИНЕТИКУ ДВУХСТАДИЙНОГО СВЯЗЫВАНИЯ ЛИГАНДОВ С ДНК ПРИ МАЛЫХ ЗАПОЛНЕНИЯХ

Г.Г. ОГАНЕСЯН

Ереванский госуниверситет, кафедра биофизики
biophys_dep@mail.ru

Изучена кинетика связывания протяженных лигандов с ДНК дуплексами в ДНК-биосенсорах. Рассматривается случай малых заполнений. Получена система нелинейных дифференциальных уравнений типа “реакция-диффузия”, описывающая процесс заполнения ДНК дуплексов лигандами. Показано, что концентрация адсорбционных центров сказывается на кинетике заполнения ДНК дуплексов лигандами только в том случае, когда характерное время диффузионной стадии намного больше характерного времени кинетической стадии.

ДНК дуплексы – адсорбционный центр – лиганд – малые заполнения – двухстадийная кинетика связывания

Զետագոտվել է ՂՆԹ-ի դուպլեքսների հետ երկարաձգված լիգանդների կապման կինետիկան ՂՆԹ-կենսասենսորներում: Դիտարկվել է փոքր հագեցումների դեպքը: Ստացվել է «ռեակցիա-դիֆուզիա» տիպի ոչ գծային դիֆերենցիալ հավասարումների համակարգ, որը նկարագրում է լիգանդներով ՂՆԹ-ի դուպլեքսների հագեցման պրոցեսը: Ցույց է տրվել, որ ադսորբցիոն կենտրոնների կոնցենտրացիան ազդում է լիգանդներով ՂՆԹ դուպլեքսների հագեցման կինետիկայի վրա միայն այն դեպքում, երբ դիֆուզիոն փուլի բնութագրական ժամանակը ավելի մեծ է կինետիկ փուլի բնութագրական ժամանակից:

ՂՆԹ-ի դուպլեքսներ – ադսորբցիոն կենտրոն – լիգանդ – փոքր հագեցումներ – կապման երկփուլ կինետիկա

The binding kinetics of extended ligands with DNA duplexes in DNA-biosensors has been investigated in this paper. The case of small fillings was observed. The system of non linear differential equations of “reaction-diffusion” type describing the filling process of DNA duplexes by ligands was obtained. It was shown that the concentration of adsorption centers affects on filling kinetics of DNA duplexes by ligands in case when the characteristic time of diffusion phase is much longer than the characteristic time of kinetic phase.

DNA duplexes – adsorption center – ligand – small fillings – two-phase binding kinetics

Проблеме термодинамики связывания лигандов с ДНК посвящено большое число работ [2-5,7-9,16,19]. Работы же, посвященные исследованию кинетики связывания лигандов с ДНК, относительно малочисленны [1, 6,10, 17,18, 20]. Между

тем для случая ДНК-биосенсоров может оказаться существенным именно кинетика связывания лигандов с ДНК. Известно, что в ДНК-биосенсорах связывание лиганда с ДНК происходит вблизи подложки, на которой иммобилизованы одноцепочные молекулы ДНК-мишени. Если в растворе есть одноцепочные ДНК, комплементарные ДНК-мишеням, то образуются дуплексы ДНК [11-13]. Образование дуплекса активизирует сигнал, который, преобразовываясь, передается регистрирующему устройству. Важной характеристикой ДНК-биосенсоров является величина сигнала и время отклика [21, 22]. На величину сигнала и время отклика существенное влияние оказывают лиганды, которые адсорбируются на ДНК дуплексах. Следует отметить, что вблизи подложки имеется пограничный слой жидкости, в которой перемещение лигандов идет в результате его диффузии, а не конвекции [14,15]. Так что процесс адсорбции лигандов на ДНК дуплексах происходит в две стадии – диффузия лиганда из глубинных слоев раствора к адсорбционному центру (диффузионная стадия) и непосредственное связывание лиганда с адсорбционным центром на ДНК (кинетическая стадия).

В данной работе исследовано влияние концентрации адсорбционных центров на ДНК и концентрации лигандов в растворе на кинетику двухстадийного связывания лигандов с ДНК.

Теоретическая часть. В работе рассматривается случай, когда размеры молекулы дуплекса примерно совпадают с толщиной перемешиваемого слоя. В объемном растворе, который граничит с перемешиваемым слоем, концентрация лигандов постоянная и равна C_{L_0} . Будем рассматривать адсорбцию в среде с единичным объемом, так что в этой работе концентрация и число частиц в системе равнозначны, однако при переходе к произвольным объемам следует соответствующим образом переопределить концентрацию. Лиганд диффундирует из объемного раствора в сторону подложки. Начало координат поместим на поверхность подложки и ось x направим вглубь раствора. Все концентрации будут зависеть только от x . Расстояние от поверхности подложки до границы с объемным раствором равно l . Обозначим концентрацию лигандов в перемешиваемом слое – $C_L(x, t)$. Адсорбционные центры A_0 находятся на дуплексах ДНК. Начальная концентрация адсорбционных центров равна C_{A_0} . Молекулы лиганда будут перемещаться за счет диффузии от объемного раствора вглубь перемешиваемого слоя, и одновременно они будут адсорбироваться на адсорбционных центрах. Концентрация лигандов $C_L(x, t)$ будет изменяться как в результате диффузии, так и в результате адсорбции на адсорбционных центрах ДНК. Число адсорбированных лигандов на ДНК $C_{LA}(x, t)$ будет увеличиваться со временем.

Запишем систему уравнений для $C_L(x, t)$ и $C_{LA}(x, t)$, которая описывает согласованный процесс диффузии лигандов в перемешиваемом слое и его адсорбцию на ДНК дуплексы. Для случая протяженных лигандов и малых заполнений легко показать, что система уравнений имеет вид

$$\frac{\partial C_L(x, t)}{\partial t} = D_L \frac{\partial^2 C_L(x, t)}{\partial x^2} - k_1 C_L (N - (2n-1)C_{LA}) + k_{-1} C_{LA} \quad (1)$$

$$\frac{dC_{LA}}{dt} = k_1 C_L (N - (2n-1)C_{LA}) - k_{-1} C_{LA}, \quad (2)$$

где D_L - коэффициент диффузии лигандов; k_1 и k_{-1} – константы скорости образования и распада комплекса лиганда с ДНК соответственно; N – число адсорбционных центров на ДНК; n – число расположенных подряд адсорбционных центров, которые занимает одна адсорбированная молекула лиганда. Система нелинейных дифференциальных уравнений (1)-(2) относится к уравнениям типа “реакция-диффузия”. Структура уравнений (1) и (2) имеет простой смысл. В (1) изменение концентрации лигандов в перемешиваемом слое происходит в результате диффузии лигандов (первое слагаемое в правой части уравнения) и в результате адсорбции и десорбции лиганда на ДНК (второе и третье слагаемые). В (2) изменение концентрации связанных с ДНК лигандов происходит в результате адсорбции и десорбции лиганда на ДНК. К уравнениям (1) и (2) следует добавить начальное и граничные

условия. Поскольку в начальный момент времени все адсорбционные места на ДНК свободны, т.е. нет адсорбированных лигандов на ДНК, то начальное условие для уравнения (2) следующее:

$$c_{LA}(x, 0) = 0. \quad (3)$$

Поскольку в начальный момент времени в области, где находятся молекулы ДНК нет лигандов, то начальное условие для уравнения (1) следующее:

$$c_L(x, 0) = 0. \quad (4)$$

На границе с объемным раствором концентрация лиганда постоянна и равна C_{Lo} , а подложка непроницаема для лигандов. Учитывая это, имеем следующие граничные условия

$$\left(\frac{\partial c_L(x, t)}{\partial x} \right)_{x=0} = 0. \quad (5)$$

$$c_L(l, t) = c_{Lo} \quad (6)$$

После решения системы уравнений (1) и (2) можно определить изотерму адсорбции по формуле

$$c_{LA}(t) = \int_0^l c_{LA}(x, t) dx \quad (7)$$

Система уравнений (1) – (2) нелинейна и не имеет аналитического решения. Для анализа кинетики двухстадийной адсорбции протяженных лигандов на ДНК систему уравнений (1)–(2) следует решить численно. Для этого перепишем систему (1)–(2), начальные (3), (4) и граничные условия (5), (6) в безразмерном виде:

$$\frac{\partial c_1(\xi, \tau)}{\partial \tau} = \frac{\partial^2 c_1(\xi, \tau)}{\partial \xi^2} - \alpha \beta_1 c_1 (1 - (2n - 1)c_2) + \beta \beta_1 c_2 \quad (1a)$$

$$\frac{\partial c_2}{\partial \tau} = \alpha c_1 (1 - (2n - 1)c_2) - \beta c_2 \quad (2a)$$

$$c_1(\xi, 0) = 0 \quad (4a)$$

$$c_2(\xi, 0) = 0 \quad (3a)$$

$$\left(\frac{\partial c_1(\xi, \tau)}{\partial \xi} \right)_{\xi=0} = 0 \quad (5a)$$

$$c_1(1, \tau) = 1 \quad (6a)$$

$$c_1 = c_L / c_{Lo}, \quad c_2 = c_{LA} / N, \quad \xi = x / l, \quad \tau = t \cdot D_L / l^2 \quad (8)$$

$$c_1 = c_L / c_{Lo}, \quad c_2 = c_{LA} / N, \quad \xi = x / l, \quad \tau = t \cdot D_L / l^2 \quad (8)$$

$$\alpha = \frac{l^2 k_1 c_{Lo}}{D_L}, \quad \beta = \frac{l^2 k_{-1}}{D_L}, \quad \beta_1 = \frac{N}{c_{Lo}}. \quad (9)$$

Численно решив уравнения (1a) и (2a), можно определить кинетику заполнения лигандами адсорбционных центров на ДНК дуплексе по формуле:

$$\theta(\tau) = \int_0^1 c_2(\xi, \tau) d\xi. \quad (7a)$$

Результаты и обсуждение. Варьирование параметров в системе уравнений (1a) - (2a) позволяет моделировать широкий спектр экспериментальных ситуаций. Здесь рассмотрим случай зависимости двухстадийной кинетик заполнения ДНК дуплексов лигандами от соотношения концентраций адсорбционных центров на ДНК N и концентрации лигандов в растворе C_{Lo} , т.е. от параметра β_1 (9). Поскольку концентрация лигандов в объемном растворе постоянная, то фактически будет варьироваться число адсорбционных центров N от некоторых ее малых значений до его максимального значения, когда $N = C_{Lo}$. При этом параметр β_1 будет меняться от некоторого малого значения (например от 0.01) до 1. Параметры α и β

положительны и могут быть как больше, так и меньше единицы. На основании результатов работ [1,6] и анализа безразмерных выражений (8) и (9) можно оценить характерное время диффузионной и кинетической стадий при адсорбции лигандов на ДНК. Можно показать, что при $\alpha \leq 0,01$ $\beta \leq 0,01$ характерное время диффузионной стадии много меньше характерного времени кинетической стадии.

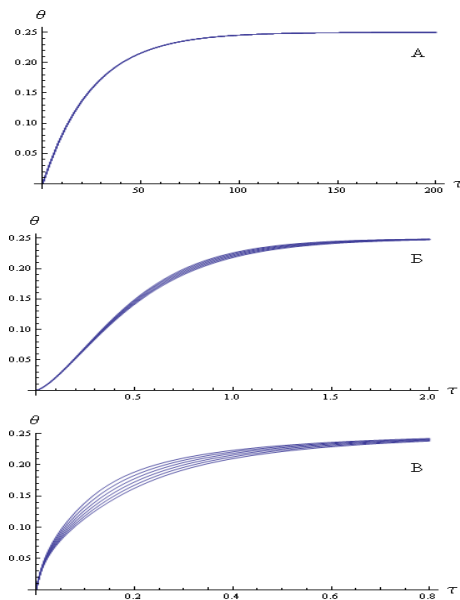


Рис.1. Двухстадийная кинетика адсорбции лигандов на ДНК при малых заполнениях.

На всех кривых $n=2$. Семейство кривых на А, Б и В построены для различных значений β_i (с верхней кривой к нижней β_i принимает значения 0.01, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1).

А) - $\alpha = 0,01$ $\beta = 0,01$, все шесть кривых слились в одну кривую.

Б) - $\alpha = 1$ $\beta = 1$, все шесть кривых практически не отличаются друг от друга.

В) - $\alpha = 100$ $\beta = 100$.

В этом случае лимитирующей стадией в кинетике адсорбции лигандов на ДНК является кинетическая стадия. При этом кинетика заполнения ДНК лигандами является эффективно одностадийным процессом. При $\alpha \geq 100$ $\beta \geq 100$ характерное время диффузионной стадии много больше характерного времени кинетической стадии. В этом случае лимитирующей стадией в кинетике адсорбции лигандов на ДНК является диффузионная стадия и кинетика заполнения ДНК лигандами является эффективно одностадийным. В случае же $\alpha \sim 1$, $\beta \sim 1$ характерное время диффузионной стадии того же порядка, что и характерное время кинетической стадии. В этом случае процесс заполнения ДНК дуплексов является двухстадийным.

На рис.1 представлена кинетика заполнения ДНК дуплексов лигандами, полученная в результате численного решения системы уравнений (1а)-(2а) и (7а). Результаты, представленные на рис.1, указывают на то, что концентрация адсорбционных центров сказывается на кинетике заполнения ДНК дуплексов лигандами только в том случае, когда характерное время диффузионной стадии много больше характерного времени кинетической стадии, т.е. когда лимитирующей стадией в кинетике адсорбции лигандов на ДНК является диффузионная стадия. Результат физически понятен; если кинетика заполнения лимитируется диффузией, то чем

больше адсорбционных центров на дуплексе, тем медленнее будет его заполнение. Такое поведение кинетических кривых и наблюдается на рис.1В.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аракелян В.Б., Бабаян С.Ю., Таирян В.И., Аракелян А.В., Парсаданян М.А., Вардеванян Р.О. Кинетика связывания лигандов с нуклеиновыми кислотами при произвольном связывании. Биофизика, 51, 3, с. 370-375, 2006.
2. Вардеванян Р.О., Антонян А.П., Давтян А.Г., Аракелян А.В., Минасян С.Г., Тавадян Л.А. Применение метода дифференциальной импульсной вольтамперметрии в исследовании комплексов бромистого этидия с ДНК. Биофизика, 50, 2, с. 371-373, 2005.
3. Гурский Г.В., Заседателев А.С., Волькенштейн М.В. Теория одномерной адсорбции. II. Адсорбция малых молекул на гетерополимере. Мол. биология, 6, с. 479 – 489, 1972.
4. Заседателев А.С., Гурский Г.В., Волькенштейн М.В. Теория одномерной адсорбции. I. Адсорбция малых молекул на гомополимере. Мол. биология, 5, с. 245-490, 1971.
5. Нечипуренко Ю.Д., Заседателев А.С., Гурский Г.В. Кооперативные взаимодействия при связывании протяженных лигандов с ДНК. I Неконтактные кооперативные взаимодействия. Мол. биология, 18, с. 798-812, 1984.
6. Arakelyan V.B., Babayan S.Yu., Tairyan V.I., Arakelyan A.V., Parsadanyan M.A., Vardevanyan P.O. Kinetics of Ligand Binding to Nucleic Acids. J. Biomol. Struct. Dyn., 24, 2, p. 479-484, 2006.
7. Arakelyan V.B., Haroutiunyan S.G., Arakelyan H.V., Haroutiunyan T.S. Adsorption of ligands on macromolecules in the fluctuating medium. J. Biomol. Struct. Dyn., 20, p. 135-139, 2002.
8. Chaires J.B. Drug-DNA interactions. Curr. Opin. Struct. Biol., 8, p. 314-320, 1998.
9. Crothers D.M. Calculation of binding isotherms for heterogenous polymers. Biopolymers, 6, p. 575-584, 1968.
10. Goeddel D.V., Yansura D.G., Carnther M.N. Binding of synthetic lactose operator DNAs to lactose repressors. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 74, p. 3292-3296, 1977.
11. Gooding, J.J. Electrochemical DNA hybridization biosensors. Text. / J.J.Gooding /, Electroanalysis. 14, p. 1149-1156, 2002.
12. Hagan M.F., Chakraborty A.K. Hybridization dynamics of surface immobilized DNA. J.Chem. Phys., 120, p. 4958-4968, 2004.
13. Erickson D., Li D., Krull U.J. Modeling of DNA Hybridization Kinetic for Spatially Resolved biochips. Analytical Biochemistry, 317, p. 186-200, 2003.
14. Jennissen H.P., Zumbrink T. A novel nanolayer biosensor principle. Biosensors and Bioelectronics, 19, p. 987-997, 2004.
15. Jennissen H.P. Boundary-layer exchange by bubble: A novel method for generating transient nanofluidic layers. Physics of Fluids, 17, 100616, p. 1-9, 2005.
16. Krugh T.R. Drug-DNA interactions. Curr. Opin.Struct.Biol., 4, p. 351-364, 1994.
17. Lin S.Y., Riggs A.D. Lac repressor binding to non-operator DNA: detailed studies and a comparison of equilibrium and rate competition methods. J.Mol.Biol., 72, p. 671-690, 1972.
18. Livshitz M.A., Gursky G.V., Zasedatelev A.S., Volkenstein M.V. Equilibrium and kinetic aspects of protein-DNA recognition. Nucleic Acids Research, 6, 6, p. 2217-2236, 1979.
19. McGhee J.D., von Hippel P.H. Theoretical aspects of DNA-protein Interactions: Co-operative and non-co-operative Binding of Large Ligands to a One-Dimensional Heterogeneous Lattice. J. Mol. Biol., 86, p. 469-489, 1974.
20. Riggs A.D., Bourgeois S., Cohn M. The lac repressor-operator interaction. 3. Kinetic studies. J.Mol.Biol., 53, p. 401-417, 1970.
21. Turner A., Karube I., Wilson G. Biosensors, fundamentals and applications. Oxford University Press, Oxford 1987, 786p.
22. Thevenot D., Toth K., Durst R., Wilson G. Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification. Analytical Letters, 34, 5, p. 635-659, 2001.

Поступила 02.07.2012