



Биолог. журн. Армении, 1 (69), 2017

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНСТАНТЫ СВЯЗЫВАНИЯ ЛИГАНДОВ С НУКЛЕИНОВЫМИ КИСЛОТАМИ ПРИ СЛАБОМ СВЯЗЫВАНИИ

¹Տ.Ն. ԱԿՕՅԱՆ, ²Մ.Ա. ՇԱԳԻՆՅԱՆ, ³Յ.Տ. ԲԱԲԱՅԱՆ

¹Армянский госуниверситет инженерии, кафедра механической инженерии,

²Ереванский госуниверситет, кафедра биофизики,

³Национальный университет архитектуры и строительства Армении,
кафедра физики и электротехники,

babayanyura@gmail.com

Показано, что вычисление значений константы связывания из изотерм связывания по методу Скэтчарда является довольно трудной задачей, так как для ее определения необходимо знать физические характеристики полностью связанного состояния. Предложена формула, с помощью которой можно определить константу связывания, имея несколько измерений при малых концентрациях лигандов.

*Полинуклеотид – бромистый этидий – митоксантрон – изотерма связывания –
константа связывания*

Ցույց է տրվել, որ կապման հաստատունի արժեքների հաշվարկը Սկետչարդի մեթոդով կապման կորերից բավականին բարդ խնդիր է, քանի որ դրա որոշման համար անհրաժեշտ է իմանալ ամբողջությամբ կապված վիճակի ֆիզիկական բնութագրիչները: Առաջարկված է բանաձև, որի օգնությամբ կարելի է որոշել կապման հաստատունը՝ ունենալով մի քանի չափումներ լիգանդների փոքր կոնցենտրացիաների դեպքում:

*Պոլինուկլեոտիդ – էթիդիումի բրոմիդ – միտոքսանտրոն – կապման կոր –
կապման հաստատուն*

It was shown that calculation of values of the binding constant from the binding isotherms by Scatchard's method is quite a hard task, since physical characteristics of the totally bound state should be known for its determination. A formula was suggested which will make it possible to determine the binding constant, having several measurements at small concentrations of ligands.

Polynucleotide – ethidium bromide – mitoxantrone – binding isotherm – binding constant

При функционировании клетки молекулы нуклеиновых кислот (НК) взаимодействуют с различными низкомолекулярными соединениями. Многие из них представляют из себя лекарственные препараты, канцерогенные и мутагенные вещества и т.д. Поскольку НК играют ключевую роль в процессах, происходящих в клетке, их модификация при связывании с этими соединениями оказывает сильное влияние на клеточный метаболизм, замедляя или ускоряя биохимические процессы в клетках, а в некоторых случаях и прекращая их рост [6, 16].

Биохимические исследования показали, что большинство противоопухолевых лекарственных соединений, проникая в клетку, взаимодействуют с НК [9, 10]. Связывание с клеточной ДНК является главной причиной их фармакологической активности [7, 9, 17]. Связывание нековалентно взаимодействующих с ДНК лигандов обычно обратимо и может быть описано в рамках классической термодинамики. В подавляющем большинстве случаев адсорбированная молекула не диффундирует по поверхности ДНК. Важными параметрами связывания являются константа связывания (K) и число нуклеотидов НК (n), с которыми связывается одна молекула лиганда при насыщении взаимодействия. Параметры связывания обычно определяют из анализа изотерм адсорбции [1, 11]. Для построения изотерм связывания из кривых титрования по формулам (1) определяют концентрации свободного (C_f) и связанного (C_b) лигандов

$$C_f = \frac{A - A_b}{A_f - A_b} C_0 \quad \text{и} \quad C_b = C_0 - C_f \quad (1)$$

В формуле (1) A_f и A_b - физические характеристики свободного и связанного лиганда, A - при промежуточных концентрациях лиганда.

Однако очень часто из-за слабого связывания лигандов с НК невозможно точно определить A_b , и поэтому на основе формул (1) построенная изотерма адсорбции получается приближенной, и из общепринятого представления изотерм адсорбции [1] можно определить лишь приближенные значения K и n .

Поэтому в данной работе на примере исследований связывания бромистого этидия и митоксантрона с двуспиральными нуклеиновыми кислотами предлагается новый метод обработки спектроскопических кривых титрования и определения константы связывания.

Материал и методика. Использовали ДНК тимуса теленка, poly(G), poly(C), митоксантрон (MX) и бромистый этидий (БЭ). Все препараты из фирмы "Sigma" использовались без дополнительной очистки. Измерения проводили в водном растворе, содержащем 0.01 М буфер Трис и 0.1 М NaCl, pH 7.4.

Концентрация препаратов была определена с использованием следующих коэффициентов экстинкции ($M^{-1}cm^{-1}$): ДНК тимуса теленка ($\epsilon_{260}(p) = 6550$), poly(C) ($\epsilon_{260}(p) = 5100$), poly(G) ($\epsilon_{260}(p) = 9900$), poly(G)poly(C) ($\epsilon_{260}(p) = 7900$), MX ($\epsilon_{659} = 21500$) [15], и БЭ ($\epsilon_{480} = 5850$) [1]. Двуспиральный полирибонуклеотид poly(G)poly(C) был приготовлен нагреванием раствора смеси poly(G) и poly(C) в эквимольных количествах [1].

Спектрофотометрическое титрование проводили на спектрофотометрах PYE Unicam-SP8-100 (Англия) и "Cary-219" (США), термостатирование - с использованием термостата "Haake-F3" (Италия). Измерения проводили с использованием 10 мм кварцевых кювет с плотно закрывающимися крышками. Для спектрофотометрического титрования концентрации БЭ брали приблизительно $C_0 \approx 10^{-4}$ М, а концентрации MX - $C_0 \approx 3 \cdot 10^{-6}$ М. В работах было показано, что в указанных концентрациях БЭ [15] и MX [8] самопроизвольными ассоциациями молекул БЭ и MX можно пренебречь.

Результаты и обсуждение. Взаимодействие БЭ и MX с двуспиральными ДНК и полирибонуклеотидом исследовалось по характеру изменения спектров поглощения лигандов в видимой области спектра, вследствие связывания с НК. Следует отметить, что в видимой области спектра НК не поглощает, и следовательно, изменение спектров поглощения их обусловлено только комплексообразованием с НК. Как следует из рис. 1, при постоянной концентрации MX с увеличением содержания ДНК в растворе наблюдается гипохромизм и смещение максимума поглощения при 665 нм в сторону длинных волн. При этом на спектрах имеется четко выраженная изобестическая точка при 676 нм. Следовательно, в исследуемых условиях (при

ионной силе 0.11 М NaCl и температуре 300 К) МХ взаимодействует с ДНК одним, вполне возможно, полуинтеркаляционным способом [4, 5, 12].

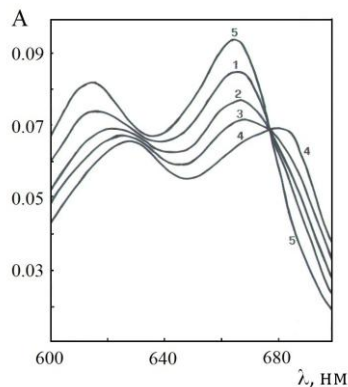


Рис.1. Изменение спектров поглощения МХ при связывании с ДНК тимуса теленка в буфере при 300 К температуре. В процессе титрования концентрация МХ остается постоянной ($c_0=3 \cdot 10^{-6}$ М). Концентрация ДНК в расчете на пару оснований равна: $c_p=1.35 \cdot 10^{-5}$ М (1); $2.85 \cdot 10^{-5}$ М (2); $4.5 \cdot 10^{-5}$ М (3) и $1.1 \cdot 10^{-5}$ (4); 5 – спектр поглощения чистого МХ.

При некоторых значениях C_p/C_0 (где C_p – концентрация нуклеотидов и C_0 – концентрация лиганда (в данном случае МХ в растворе) с увеличением C_p прекращается дальнейшее изменение спектров поглощения (рис.1). Следовательно, при таких относительных концентрациях МХ все молекулы лигандов в растворе находятся в связанном состоянии, и поглощение при 665 нм представляет значение A_b . Обычно это происходит, когда концентрация НК приблизительно на порядок больше концентрации лигандов.

Опыты показывают, что для некоторых комплексов, например, при связывании БЭ с синтетической полирибонуклеотидой poly(G)poly(C) при концентрациях полирибонуклеотида на порядок больше концентрации БЭ только часть молекул БЭ находятся в связанном состоянии. С увеличением концентрации БЭ при неизменной изобестической точке при 514 и 398 нм наблюдается монотонное уменьшение поглощения (красный сдвиг) с максимумом 480 нм (рис.2) и связывание практически завершается, когда концентрация poly(G)poly(C) на два и более порядка больше концентрации БЭ, т.е. при большом избытке poly(G)poly(C) в растворе [1]. В таких случаях для количественного описания связывания БЭ с poly(G)poly(C) можно при помощи линейной экстраполяции определить поглощение БЭ при 480 нм, и это значение брать как поглощение БЭ в полностью связанном состоянии (A_b) и при помощи формулы (1) вычислить C_b и C_f .

Связывание лигандов с НК характеризуется нелинейной изотермой адсорбции, которая хорошо описывается теоретической зависимостью (2) для некооперативного связывания лигандов на гомополимере [13]

$$\frac{r}{c_f} = k(1 - nr) \left[\frac{1 - nr}{1 - (n - 1)r} \right]^{n-1}, \quad (2)$$

где $r = \frac{C_b}{C_p}$.

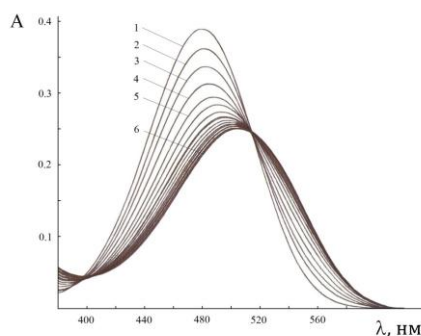


Рис.2. Изменение спектров поглощения БЭ при связывании с poly(G)poly(C) в буфере при температуре 300 К. Концентрация poly(G)poly(C) в растворе составляла: $c_p=2 \cdot 10^{-5}$ М (2); $4 \cdot 10^{-5}$ М (3); $6 \cdot 10^{-5}$ М (4); $7.9 \cdot 10^{-5}$ М (5) и $3.2 \cdot 10^{-3}$ М (6). В процессе титрования концентрация БЭ остается постоянной ($c_0=6.5 \cdot 10^{-5}$ М). 1 – спектр поглощения БЭ в отсутствие poly(G)poly(C).

Обычно изотерму связывания представляют в координатах Скэтчарда (зависимость $\frac{r}{c_f}$ от r). Расчёты показывают, что при таком слабом связывании,

как связывание БЭ с poly(G)poly(C), пользоваться общепринятым представлением изотерм адсорбции недостаточно, так как невозможно получить точное значение физических характеристик полностью связанного состояния лигандов и, следовательно, вычислить точное значение константы связывания.

Следовательно, при слабом связывании, когда экспериментально невозможно вычислить физические характеристики полностью связанного состояния комплексов лиганд.НК из общепринятых представлений изотерм связывания К определяется большой ошибкой.

Для более точного определения К предлагается следующий способ. При малых заполнениях (при малых значениях r) $nr \ll 1$ и упрощая уравнение (2) получаем:

$$\frac{r}{c_f} \approx k \text{ или } \frac{c_b}{c_f c_p} \approx k \quad (3)$$

Так как $C_0 = C_f + C_b$, то уравнение (3) примет следующий вид

$$\frac{c_b}{c_0} \approx \frac{k c_p}{1 + k c_p} \quad (4)$$

Предположим, что связывание лигандов исследуем спектрофотометрически. Тогда относительную интенсивность поглощения лигандов при образовании комплексов с НК – A_0/A (где A – поглощение раствора при наличии НК, а A_0 – поглощение чистого раствора лиганда) можно представить следующим образом:

$$\frac{A_0}{A} = \frac{c_f}{c_0} + \alpha \frac{c_b}{c_0} = 1 + (\alpha - 1) \frac{c_b}{c_0}, \quad (5)$$

где α – отношение оптической плотности молекул БЭ в свободном и связанном состояниях. Из уравнений (4) и (5) после преобразования получаем

$$\frac{A}{A_0 - A} \approx \frac{1}{\alpha - 1} + \frac{1}{k(\alpha - 1)} \frac{1}{c_p} \quad (6)$$

Как следует из уравнения (6), зависимость $\frac{A}{A_0 - A}$ от $\frac{1}{c_p}$ должна быть приблизительно линейной, и из этой зависимости можно определить k . Из спектров поглощения, в частности, приведенных на рис.1 и 2, определены относительные изменения поглощения $(\frac{A_0}{A})$ комплексов МХ·ДНК, БЭ·poly(G)poly(C) и МХ·poly(G)poly(C) и построена зависимость $\frac{A_0}{A}$ от c_p (рис3). На рис. 3 не приведена указанная зависимость для комплексов БЭ·ДНК, так как интеркаляционное связывание БЭ с ДНК довольно сильное и подробно исследовано многими авторами [14,18]. В этих работах показано, что сильное интеркаляционное связывание БЭ с ДНК характеризуется константой связывания порядка 10^6M^{-1} . Известно, что крутизна кривой зависимости $\frac{A_0}{A}$ от C_p зависит от k : с увеличением k увеличивается крутизна кривой. Из литературных данных следует, что для комплексообразования МХ·ДНК $k \approx 5.2 \cdot 10^5 \text{M}^{-1}$ [2], для МХ·poly(G)poly(C) $k \approx 5.7 \cdot 10^4 \text{M}^{-1}$ [3], а для БЭ·poly(G)poly(C) вычисленное приблизительное значение составляет $k \approx 10^3 \text{M}^{-1}$ [1]. Приведенные литературные значения k согласуются с нашими данными, приведенными на рис. 3.

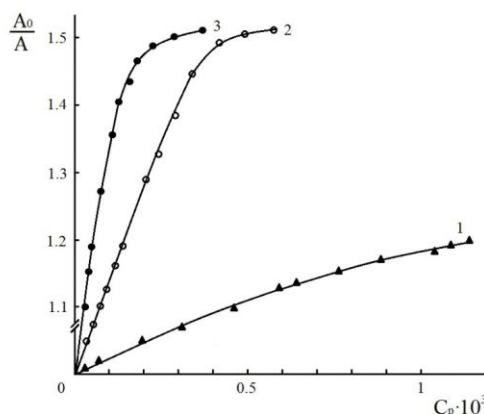


Рис.3. Зависимость относительного изменения поглощения (A_0/A) от концентрации НК в расчете на пару оснований (c_p) для комплексов poly(G)poly(C)-БЭ (1); poly(G)poly(C)-МХ (2) и ДНК-МХ (3) в буфере при температуре 300 К.

Из экспериментальных данных (в частности, из спектров поглощения, приведенных на рис. 1 и 2) была построена зависимость $\frac{A}{A_0 - A}$ от $\frac{1}{c_p}$ и вычислены значения k для комплексов МХ·ДНК, МХ·poly(G)poly(C) и БЭ·poly(G)poly(C) согласно формуле (6). Результаты расчетов приведены в табл.1. Как следует из таблицы, для комплексов МХ·ДНК и МХ·poly(G)poly(C), вычисленные по формуле (6) значения k почти совпадают с значениями k , полученными общепринятым представлением изотерм связывания [1-3].

Таблица 1. Значение константы связывания лигандов с двуспиральными нуклеиновыми кислотами, вычисленного по формуле (6) и общепринятым способом (литературные данные) по формуле (2).

Тип комплекса	k, M ⁻¹ по формуле (2)	k, M ⁻¹ по формуле (6)
МХ·ДНК	(5.2±0.4)·10 ⁵ [17]	(5.5±0.4)·10 ⁵
МХ·poly(G)poly(C)	5.7·10 ⁴ [18]	(6.2±0.5)·10 ⁴
БЭ·ДНК	10 ⁶ [15]	-----
БЭ·poly(G)poly(C)	(4±1)·10 ³ [8]	(1.0±0.2)·10 ³

Что касается комплекса БЭ·poly(G)poly(C), у которого наблюдается слабое связывание, то, как следует из табл.1, предложенным способом по формуле (6) можно вычислить более точное значение константы связывания. Следует отметить, что, зная значение К, можно определить термодинамические параметры связывания (изменение свободной энергии Гиббса, энтропии и энтальпии) [1,2], которые являются основными характеристиками, определяющими стабильность комплексов НК с низкомолекулярными соединениями.

Вычисление значений k из изотерм связывания по методу Скетчарда довольно трудоемкая и дорогостоящая работа, так как для ее определения необходимо знать физические характеристики (например, поглощение или квантовый выход) полностью связанного состояния, достичь которого иногда бывает невозможно или в случае достижения затрагивается большое количество биополимера. Для определения k предложенным способом по формуле (6) необходимо иметь лишь несколько измерений при малых концентрациях лигандов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бабаян Ю.С., Манзини Д.М., Квадрифолио Ф.* Взаимодействие бромистого этидия с синтетическими двуспиральными полирибонуклеотидами. Молекул. биология, 22, 4, с. 898-910, 1988.
2. *Бабаян Ю.С., Манзини Дж.* Взаимодействие противоопухолевого соединения митоксантрона с двуспиральными нуклеиновыми кислотами. Молекул. биология, 24, 4, с. 1084-1094, 1990.
3. *Бабаян Ю.С., Тумян В.А., Асланян В.М.* Взаимодействие противоопухолевого препарата митоксантрона с поли(Г).поли(Ц). Биофизика, 35, 4, с. 679-680, 1990.
4. *Awasti P., Dogra S., Bartwal R.* Muttispectroscopic methods reveal different modes of interaction of anticancer drug mitoxantrone with poly(dG-dC).poly(dG-dC) and poly(dA-dT).poly(dA-dT). J. Photochem. Photobiol. B: Biology, 127, p. 78-87, 2013.
5. *Bhattacharyya J., Basu A., Kumar G.S.* Intercalative interaction of anticancer drug mitoxantrone with double stranded DNA: A calorimetric characterization of the energetics. J. Chem. Thermodynamics, 75, 8, p. 45-51, 2014.
6. *Berman H.M., Young P.R.* The interaction of intercalating drugs with nucleic acids. Annu. Rev. Biophys. Bioeng., 10, p. 87-114, 1981.
7. *Carvalho C., Santos R. X., Cardoso S.* Doxorubicin the good, the bad and the by effect. Current Med. Chemistry, 16, 25, p. 3267-3285, 2009.
8. *Enache M., Volanschii E.* Spectral characterization of self-association of antitumor drug mitoxantrone. Rev. Roum. Chim., 55, 4, p. 255-262, 2010.
9. *Hagemeister F., Cabanillas F., Coleman M., Gregory S.A., Zinzani P.L.* The role of mitoxantrone in the treatment of indolent lymphomas. Oncologist, 10, p. 150-159, 2005.
10. *Hajihassan Z., Rabbani-Chadigani A.* Studies on the binding affinity of anticancer drug mitoxantrone to xromatine, DNA and histone proteinse. J. Biomedical Sci., 16, p. 31-37. 2009.

11. Karapetyan A.T., Babayan Y.S., Torosyan M.A., Shahinyan M.A. Mitoxantrone interaction with poly(G). Proceedings of the YSU. Phys. Math. Sci, 3, p. 49-54, 2015.
12. Karapetyan A.T., Torosyan M.A., Babayan Y.S. Antitumor drug mitoxantrone do not preclude salt-driven B-Z transition of poly(dG-dC). Inter. J. Biochem. Biophys. 3, 4, p. 49-53, 2015.
13. McGhee J.D., von Hippel P.H. Theoretical aspects of DNA- protein interactions: Co-operative and non-co- operative binding of large ligands to one dimension homogeneous lattices. J. Mol. Biol., 86, 3, p. 469-489, 1974.
14. Minasyan S.H., Tavadyan L.A., Antonyan A.P., Davtyan H.G., Parsadanyan M.A., Vardevanyan P.O. Differential pulse voltammetric studies of ethidium bromide binding to DNA. Bioelectrochemistry, 48, p. 48-55, 2006.
15. Vardevanyan P.O., Parsadanyan M.A., Minasyants M.V. Ethidium bromide interaction with poly(G). Biophys., Reviews and letters, 9, 3, p. 239-247, 2014.
16. Waring M.J. DNA modification and cancer. Annu.Rev. Biochem., v. 50, 1981, p.159-192.
17. Waradwaj P., Misra K., Sharma A., Kumar R. Mitoxantrone: an agent with promises for anticancer therapies. Electronic J. Biology, 6, 2, p. 36-42, 2010.
18. Winkle S.A., Rosenberg L.S., Krugh T.R. On the cooperative and non-cooperative binding of ethidium to DNA. Nucleic Acids Res., 10, 24, p. 8211-8223, 1982.

Поступила 26.08.2016