

ПАРАМЕТРЫ СВЯЗЫВАНИЯ CuTAlIPyP4 И CoTAlIPyP4 ПОРФИРИНОВ С ДНК ПО ИЗОТЕРМАМ АДСОРБЦИИ

Г.В. АНАНЯН, Н.Г. КАРАПЕТЯН*, Е.Б. ДАЛЯН,
Р.С. КАЗАРЯН, С.Г. АРУТЮНЯН

Ереванский государственный университет, Ереван, Армения

*e-mail: nelkh@ysu.am

(Поступила в редакцию 24 июля 2024 г.)

Проведено сравнительное исследование параметров связывания катионных порфиринов CuTAlIPyP4 и CoTAlIPyP4 с ДНК по спектроскопическим изотермам адсорбции в зависимости от ионной силы раствора. Полученные результаты показывают, что константа связывания порфирина CoTAlIPyP4 с ДНК на порядок меньше, чем константа связывания CuTAlIPyP4 независимо от ионной силы. Наличие жестких аллильных боковых радикалов с ростом ионной силы увеличивает склонность порфиринов к агрегации и образованию сэндвич-подобных ансамблей на макромолекуле ДНК (*H*-агрегаты), что приводит к гипсохромному смещению электронных спектров поглощения порфиринов CuTAlIPyP4 и CoTAlIPyP4 независимо от типа центрального металла и пространственной структуры.

1. Введение

Процесс регуляции генов происходит за счет согласованного воздействия различных низкомолекулярных соединений на двухцепочечную молекулу ДНК. Катионные порфирины образуют с ДНК прочные комплексы либо за счет интеркаляции, либо за счет внешне-цепочечного связывания [1, 2]. Исследование структуры, специфичности связывания, динамики комплексообразования лиганда-порфирина с ДНК проводится с целью выяснения свойств как самого лиганда, так и взаимодействующей с ним ДНК. Первостепенное значение имеет определение типа связывания порфиринов с ДНК, т.е. структуры образовавшегося комплекса. Механизм связывания зависит от температуры, pH , ионной силы μ и от структурных особенностей порфирина. Следовательно, данные о структуре комплексов необходимо дополнить детальными термодинамическими и кинетическими данными, что позволит достоверно интерпретировать специфичность связывания, спектроскопические и гидродинамические характеристики комплексов.

Целью настоящей работы является определение параметров связывания водорастворимых катионных порфиринов CuTAlIPyP4 и CoTAlIPyP4 с молекулой ДНК, установление влияния особенностей структуры порфиринов и ионной силы раствора на способ связывания.

2. Материалы и методы исследования

Сверхчистая нативная ДНК тимуса теленка была приобретена у Sigma-Aldrich Ltd. Водорастворимые порфирины были синтезированы в ЕГМУ [3] (рис.1). Все исследования проводились в буферном растворе 1BPSE = 6 ммоль Na_2HPO_4 + 2 ммоль NaH_2PO_4 + 185 ммоль NaCl + 0.1 ммоль EDTA, pH 7.0, ионная сила μ = 0.02; 0.2. Маточные концентрации порфирина (1 ммоль) готовились за час до эксперимента. Все порфиринсодержащие растворы хранились в темноте во избежание фотохимических модификаций и деструкций порфирина. Для спектроскопических исследований использовались кварцевые кюветы (Perkin Elmer) толщиной 1 см и объемом 1.2 мл с плотно закрывающимися тефлоновыми крышками. Спектры поглощения регистрировались на спектрофотометре Lambda 800 (Perkin Elmer) с температурным блоком системы Пельтье (PTP-6 Peltie Systems) при 20°C.

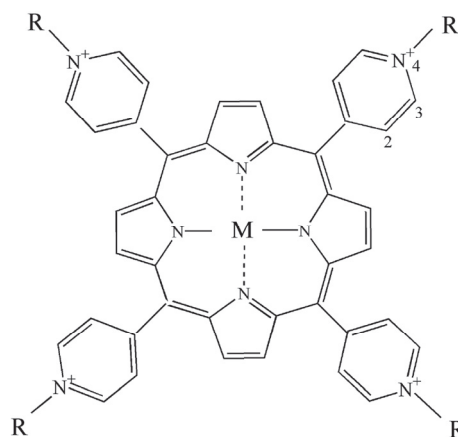


Рис.1. Схематическое изображение *мезо*-тетра(4-*N*-аллилпиридил) порфирина: R = (–CH₂–CH=CH₂), M = Cu, Co.

3. Результаты и их обсуждение

Связывание нековалентно взаимодействующих с ДНК лигандов обычно обратимо и может быть описано в рамках классической термодинамики. Важным параметром обратимого связывания является константа связывания K_b , определяемая как константа реакции ДНК + лиганд $\xrightarrow{K_b}$ комплекс, где K_b определяется следующим отношением:

$$K_b = \frac{[\text{комплекс}]}{[\text{свободный лиганд}][\text{свободные места}]} \quad (1)$$

Лиганды могут связываться стереоспецифически с определенными участками макромолекулы, однако такие взаимодействия редки и, в основном, большинство лигандов связывается с разными участками матрицы: в этом случае один лиганд может занять определенный участок на матрице, который станет недоступным для другого лиганда. В работе [4] была предложена модель «исключенных» мест связывания, для интерпретации и анализа изотерм связывания

лигандов с протяженными макромолекулами, согласно которой любая мономерная единица полимера является потенциальным местом связывания, т.е. реакционным центром.

Так как при определенных условиях порфирины могут взаимодействовать с ДНК одновременно более чем одним способом связывания (интеркаляция, внешнее упорядоченное и внешнее неупорядоченное связывание), то становится очевидным, что изотермы связывания ДНК – порфирин комплексов в области низких заполнений целесообразнее анализировать в рамках модели Макги и фон Хиппеля [5, 6]. Простейшая модель, предложенная ими, рассматривает ДНК как бесконечную линейную структуру, состоящую из идентичных и не взаимодействующих центров связывания. Изотерма связывания для этой некооперативной модели, которая учитывает исключение соседних участков, описывается следующим уравнением:

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

где $r = C_b/C_N$ – отношение концентрации связанного лиганда (C_b) к концентрации пар оснований ДНК (C_N), C_f – концентрация свободного лиганда, K_b – константа связывания лиганда, n – число нуклеотидов, приходящих на одно место связывания, или параметр исключения, выраженный в парах нуклеотидных оснований. В работе [7] было предложено использовать уравнение (2) в несколько модифицированном виде. Простой перестановкой можно получить зависимость C_f от остальных параметров:

$$C_f = r \left(\frac{1 - nr}{1 - nr + r} \right)^{-n} [K_b (1 - nr + r)]^{-1}. \quad (3)$$

Расчет констант связывания сводится к нахождению концентраций свободного и связанного лиганда при известной концентрации пар оснований. Наиболее удобным способом определения изменений является спектрофотометрическое титрование. На раствор лиганда с известной концентрацией последовательно добавляют кратные количества раствора ДНК и измеряются оптические параметры комплекса на каждом этапе. Добавление ДНК означает увеличение свободных мест связывания. Титрование продолжается до тех пор, пока очередное добавление ДНК не приводит к изменениям спектров поглощения, что свидетельствует о насыщении связывания. По оптическим характеристикам можно определить концентрации свободного (C_f) и связанного (C_b) лигандов на всех этапах титрования. Для этого обычно определяется доля связанного лиганда на каждом шагу титрования α_i :

$$\alpha_i = \frac{A_i - A_f}{A_b - A_f}, \quad (4)$$

где A_i – оптическое поглощение раствора на i -том шагу титрования, A_f – поглощение раствора порфирина до начала титрования, когда все молекулы порфирина находятся в свободном состоянии, и A_b – поглощение раствора в конце титрования, когда все молекулы порфирина связаны. Концентрация связанного лиганда C_b^i на i -том шагу титрования будет равна $C_b^i = \alpha_i C_t$, где C_t – полная

концентрация лиганда в растворе. Концентрация свободного лиганда на i -том шагу титрования C_f^i определяется как $C_f^i = C_t - C_b^i$ а относительная концентрация связанного лиганда как $r_i = C_b^i / C_{\text{DNA}}^i$, где C_{DNA}^i – концентрация добавленной ДНК на i -том шагу титрования.

В настоящей работе исследовано взаимодействие с ДНК положительно заряженных порфиринов CuTAlPyP4 и CoTAlPyP4 (рис.1). В 4-м положении этих порфиринов боковым радикалом является аллильная группа с двойной связью, что придает ему жесткость. Такой выбор порфиринов обусловлен присутствием (CoTAlPyP4) или отсутствием (CuTAlPyP4) аксиального лиганда при центральном металле, который может препятствовать или способствовать связыванию с молекулой ДНК [8, 9]. Cu-содержащие порфирины в полости кольца образуют четыре координационные связи и имеют планарную структуру. Координационное число Co-содержащих порфиринов равно пяти. Пятый аксиальный лиганд кобальта вытягивает атом металла из плоскости макрокольца, поэтому порфирин приобретает пирамидальную форму размером примерно 5–7 Å, что предотвращает интеркаляцию. Взаимодействие лигандов, связывающихся одним способом, легче поддается интерпретации и обработке численными методами. Нуклеиновые кислоты являются линейными полиэлектролитами, поскольку в широкой области pH их фосфатные группы имеют отрицательный заряд. В связи с этим следует учитывать такую характеристику среды, как ионная сила μ , которая определяется концентрацией противоионов и влияет на размеры и форму макромолекулы ДНК.

Присутствие полиэлектролитной макромолекулы ДНК в растворе положительно заряженных молекул порфирина изменяет форму и интенсивность спектров поглощения всех порфиринов в области полосы Soret. Различные спектральные изменения указывают на разные способы связывания порфиринов с ДНК. Более того, различное поведение интенсивности поглощения комплексов в зависимости от концентрации ДНК указывает на то, что в растворе существует более чем один механизм связывания порфирина с дуплексом ДНК.

Спектры поглощения порфиринов регистрировали в области их наиболее интенсивного поглощения – полосы Soret (380–480 нм). На рис.2 показано изменение спектров поглощения исследуемых порфиринов при их титровании раствором ДНК, ионная сила раствора обеспечивается концентрацией ионов $[Na^+]$ ($\mu = 0.2$). Концентрация порфиринов в экспериментах была постоянной, а концентрация ДНК постепенно увеличивалась. В электронных спектрах поглощения порфиринов наблюдается уширение и сдвиг полосы Soret, а также значительное падение интенсивности поглощения (рис.2 и табл.1). Наблюдаемое гипохромное изменение, скорее всего, можно объяснить появлением в растворе комплексов ДНК–порфирин, где хромофоры находятся в более упорядоченной форме по сравнению со своим свободным состоянием.

Анализ кривых титрования позволяет весь процесс разделить на две стадии в зависимости от добавляемого количества ДНК, т.е. относительной концентрации порфирина $r = C_{\text{porph}}/C_{\text{DNA}}$. Взаимодействие CuTAlPyP4 и CoTAlPyP4 порфиринов с ДНК при низкой ионной силе ($\mu = 0.02$) было исследовано в предыдущей работе [9]. В настоящей работе исследованы особенности комплексообразования порфиринов с ДНК при большей ионной силе $\mu = 0.2$. Определяющую роль в связывании порфиринов с ДНК играет ионная сила среды,

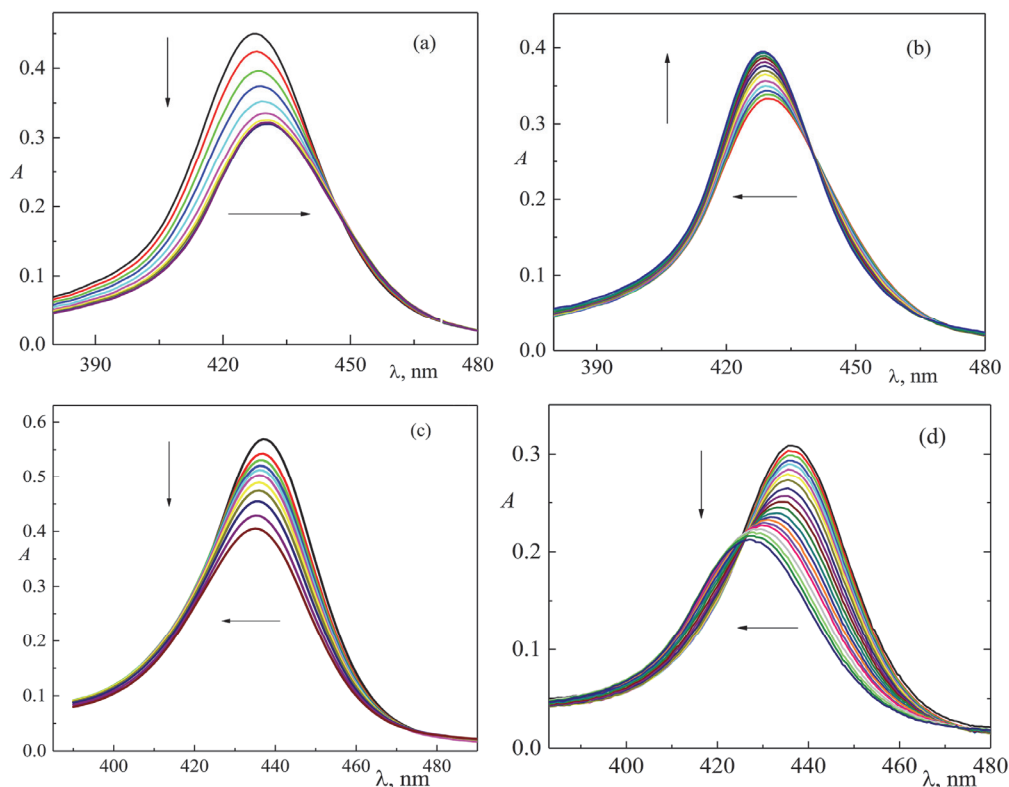


Рис.2. Спектры поглощения порфиринов (а, б) CuTAlIPyP4 и (с, d) CoTAlIPyP4 при различных концентрациях ДНК, $\mu = 0.2$, $pH\ 7.0$. Значения относительной концентрации порфиринов r следующие: (а) $0.8 < r < 10$, (б) $0.01 < r < 0.8$, (с) $0.7 < r < 2.7$, (d) $0.01 < r < 0.7$.

поскольку она влияет на конформацию ДНК, а также на способ взаимодействия и укладки порфиринов на ДНК. В отличие от интеркаляционного и бороздочного связывания, внешнее связывание носит преимущественно энтропийный характер. Это объясняется тем, что при образовании комплекса с положительно заряженным лигандом происходит высвобождение с поверхности ДНК ранее связанных с ней молекул противоионов [10]. Наличие протонированных групп в молекулах интеркалирующих или бороздочных соединений оказывает существенное влияние на характер связывания этих соединений с ДНК и приводит к его зависимости от ионной силы среды μ . При высокой ионной силе раствора роль катионной природы лиганда не столь существенна, так как при этих условиях наблюдается значительное экранирование фосфатных групп противоионами раствора. При низкой ионной силе преобладают электростатические взаимодействия, что может способствовать связыванию лигандов. Кроме того, на начальных стадиях титрования, когда молекулы порфирина в основном находятся в свободном состоянии, связывание обусловлено непосредственным взаимодействием положительно заряженных групп порфирина с фосфатными группами ДНК.

На первой стадии ($0.8 < r < 10$) титрования раствора CuTAlIPyP4 концентрированным раствором ДНК при $\mu = 0.2$ наблюдается гипохромизм полосы Core

($\Delta h = 27.8\%$, которое меньше, чем при $\mu = 0.02$) и батохромный сдвиг максимума спектра $\Delta\lambda = +3$ нм (рис.2а и табл.1). При дальнейшем добавлении ДНК (вторая стадия, $0.01 < r < 0.8$) наблюдается гиперхромизм полосы Соре $\Delta h = -17.5\%$ и гипсохромный сдвиг $\Delta\lambda = -3$ нм (рис.2б и табл.1). Такое радикальное изменение может произойти только в том случае, если добавление ДНК приводит к изменению способа связывания, то есть к «перетеку» порфиринов от способа связывания I к способу связывания II. Комплексообразование CuTAlIPyP4 с ДНК при $\mu=0.2$ сопровождается примерно 5-кратным уменьшением константы связывания K_b и 3-кратным уменьшением параметра исключения по сравнению с аналогичными параметрами при низкой ионной силе ($\mu = 0.02$). Поскольку молекулы порфирина CuTAlIPyP4 плоские, они могут интеркалировать между нуклеотидными парами оснований ДНК [8, 9]. Но при ионной силе $\mu = 0.2$ молекула ДНК находится в более вытянутой форме и интеркаляционный тип связывания становится почти эквивалентным внешнему упорядоченному связыванию. В этом случае возможна частичная интеркаляция или полуинтеркаляция за счет боковых радикалов с жесткими двойными связями. Маленькое значение параметра исключения ($n = 0.52$) при $\mu = 0.2$ говорит в пользу предположения, что имеет место внешнее связывание.

Титрование CoTAlIPyP4 порфирина раствором ДНК при $\mu = 0.2$ сопровождается гипохромизмом полосы Соре ($\Delta h = 24.4\%$) и выраженным гипсохромным смещением спектров поглощения ($\Delta\lambda = -4$ и -10 нм, соответственно) (рис.2с, d). Подобное поведение спектров наблюдалось и при низкой ионной силе ($\Delta\lambda = -3$ нм) (табл.1). Поскольку кобальтсодержащие порфирины также, как и Zn(II)-, Mn(III)-, Fe(III)-содержащие порфирины, обладают одним или двумя аксиальными лигандами, они не плоские, имеют некую толщину (5–10 Å). Поэтому при взаимодействии с ДНК интеркаляционный тип связывания исключается, эти порфирины однозначно проявляют внешний тип связывания. Внешнему типу связывания присущи маленький гипохромизм и незначительный батохромный сдвиг, за исключением Mn(III)-содержащих порфиринов, когда смещение максимума спектра на полосе Соре практически не наблюдается [11–13]. Константа связывания CoTAlIPyP4 порфирина с ДНК при $\mu = 0.2$ на порядок меньше, чем при низкой ионной силе, а параметр исключения практически мало меняется,

Табл.1. Спектральные характеристики и параметры связывания порфиринов CuTAlIPyP4 и CoTAlIPyP4 с ДНК при ионной силе $\mu = 0.02$ и $\mu = 0.2$, pH 7.0

Порфирин	CuTAlIPyP4		CoTAlIPyP4	
	$\mu = 0.02$	$\mu = 0.2$	$\mu = 0.02$	$\mu = 0.2$
$\lambda_{\max}$, нм	426	428	437	435
$\Delta\lambda$, нм	3	+3 (–3)	–3	–4 (–10)
Δh , %	33	27.8 (–17.5)	31	24.4 (25)
$K_b \times 10^7$, M ^{–1}	4.08	0.8	0.14	0.03
n	1.81	0.52	0.54	0.44

поскольку расположение молекул порфирина на внешней поверхности макромолекулы ДНК только уплотняется.

Известно, что катионные порфирины проявляют сильную склонность к образованию агрегатов в водных растворах [14, 15]. В большинстве случаев агрегаты представляют собой смесь кластеров с различным расположением мономерных звеньев. Агрегация порфиринов обычно сопровождается расщеплением, гипсохромностью и уширением полосы *Soret*. Геометрия агрегатов определяется главным образом кулоновским отталкиванием и ван-дер-ваальсовыми контактами между порфириновыми кольцами [16]. Экситонное взаимодействие между мономерами проявляется в изменении спектров поглощения, флуоресценции, кругового дихроизма, что дает информацию о геометрии агрегатов [11]. Положение полосы *Soret* для агрегатов типа сэндвича (*H*-агрегаты) смещается в коротковолновую область спектра (гипсохромный сдвиг), тогда как для расположенных рядом друг с другом агрегатов (*J*-агрегаты) наблюдается смещение в длинноволновую область спектра (батохромный сдвиг).

Связывание с полиэлектролитной молекулой ДНК также стимулирует агрегацию катионных порфиринов [17, 18]. При увеличении концентрации ДНК число мест связывания становится выше концентрации порфирина, агрегаты распадаются и связываются с ДНК в виде мономеров. Изменение поведения спектров поглощения комплексов ДНК–порфирин при увеличении концентрации ДНК доказывает существование второго типа связывания, что можно объяснить только агрегацией порфиринов. Поэтому возможны три способа связывания порфиринов с ДНК: связывание мономеров порфирина на поверхности молекулы ДНК (внешнее связывание); интеркаляция порфиринов между парами оснований молекулы ДНК и связывание на поверхности молекулы ДНК вместе с агрегацией (самостэкинг).

4. Заключение

Проведено сравнительное исследование взаимодействия двух отличающихся друг от друга по пространственной структуре положительно заряженных порфиринов с двуспиральной молекулой ДНК. Плоская молекула порфирина CuTAPyP4 при низкой ионной силе связывается с ДНК предпочтительно интеркаляционным способом, однако результаты, полученные при ионной силе $\mu = 0.2$, свидетельствуют о внешнем типе связывания. Молекулы порфирина CoTAPyP4 с аксиальным лигандом и определенной толщиной не могут интеркалировать и связываются с ДНК внешним способом независимо от ионной силы. Десятикратное увеличение ионной силы увеличивает склонность к агрегации порфиринов и к образованию сэндвич-подобных ансамблей на макромолекуле ДНК (*H*-агрегаты), что приводит к гипсохромному смещению электронных спектров поглощения порфиринов CuTAPyP4 и CoTAPyP4 , независимо от типа центрального металла и пространственной структуры. Полученные данные могут иметь практическое значение для понимания молекулярных механизмов взаимодействия ДНК с металлопорфиринами с различными боковыми радикалами и центральным металлом. Этот факт в дальнейшем может служить основой для разработки новых лекарственных препаратов для фотодинамической терапии.

Работа выполнена при поддержке Комитета науки РА в рамках научно-исследовательского проекта № 21T-1F244.

ЛИТЕРАТУРА

1. **R.F. Pasternack, E.J. Gibbs.** Metal Ions in Biological Systems, **33**, 367 (1996).
2. **Y.B. Dalyan, S.G. Haroutiunian, G.V. Ananyan, V.I. Vardanyan, D.Y. Lando, V.N. Madakyan, R.K. Kazaryan, L. Messori, P. Orioli, A.S. Benight.** J. Biomolecular Structure & Dynamics, **18**, 677 (2001).
3. **В.Н. Мадакян, Р.К. Казарян, М.А. Хачатрян, А.С. Степанян, Т.С. Куртикян, М.Б. Ордян.** Химия гетероциклических соединений, **2**, 212 (1986).
4. **D.M. Crothers.** Biopolymers, **6**, 575 (1968).
5. **J.D. McGhee, P.H. Hippel.** J. Mol. Biol., **86**, 469 (1974).
6. **Ю.Д. Нечипуренко.** Биофизика, **59**, 12 (2014).
7. **J.J. Correia, J.B. Chaires.** Methods in Enzymology, **240**, 593 (1994).
8. **V.G. Barkhudaryan, G.V. Ananyan.** J. Porphyrins and Phthalocyanines, **21**, 110 (2017).
9. **V.G. Barkhudaryan, G.V. Ananyan.** J. Porphyrins and Phthalocyanines, **22**, 1022, (2018).
10. **I. Haq, J. Ladbury.** J. Molecular Recognition, **13**, 188 (2000).
11. **G.V. Ananyan, Y.B. Dalyan, N.H. Karapetyan, V.G. Barkhudaryan, A.A. Avetisyan.** J. Biomolecular Structure and Dynamics, **41**, 7290 (2023).
12. **S.C.M. Gandini, V.E. Yushmanov, J.R. Perussi, M. Tabak, I.E. Borissevitch.** J. Inorganic Biochemistry, **73**, 35 (1999).
13. **H. Dezhampanah, A.K. Bordbar, Sh. Tangestaninejad.** J. Porphyrins and Phthalocyanines, **13**, 964 (2009).
14. **R. Weigand, F. Rotermund, A. Penzkofer.** J. Phys. Chem., **101**, 7729 (1997).
15. **K. Kano, H. Minamizono, T. Kitae, S. Negi.** J. Phys. Chem., **101**, 6118 (1997).
16. **C.A. Hunter, J.K.M. Sanders, A.J. Stone.** Chem. Phys., **133**, 395 (1989).
17. **S.C.M. Gandini, I.E. Borissevitch, J.R. Perussi, H. Imasato, M. Tabak.** J. Luminescence, **78**, 53 (1998).
18. **R.F. Pasternack, C. Bustamante, P.J. Collings, A. Giannetto, E.J. Gibbs.** J. Am. Chem. Soc., **115**, 5393 (1993).

BINDING PARAMETERS OF CuTallPyP4 AND CoTallPyP4 PORPHYRINS TO DNA USING ADSORPTION ISOTHERMS

G.V. ANANYAN, Y.B. DALYAN, S.G. HAROUTIUNIAN,
R.S. GHAZARYAN, N.H. KARAPETYAN

A comparative study of the binding parameters of CuTallPyP4 and CoTallPyP4 cationic porphyrins to DNA was carried out using spectroscopic adsorption isotherms depending on the ionic strength of the solution. The results obtained show that the binding constant of CoTallPyP4 porphyrin to DNA is an order of magnitude smaller than the binding constant of CuTallPyP4, regardless of ionic strength. The presence of hard allylic side radicals with increasing ionic strength increases the tendency to aggregation of porphyrins and to the formation of sandwich-like assemblies on the DNA macromolecule (*H*-aggregates), which leads to a hypsochromic shift in the electronic absorption spectra of CuTallPyP4 and CoTallPyP4 porphyrins, regardless of the central metal and spatial structure.