

ТЕРМОДИНАМИКА ПЕРЕХОДА ПОРЯДОК–БЕСПОРЯДОК В ДВУСПИРАЛЬНОЙ СТРУКТУРЕ ДНК В ПРИСУТСТВИИ CoTAlIPyP4

Г.В. АНАНЯН*, П.О. ВАРДЕВАНЯН, Н.Г. КАРАПЕТЯН

Ереванский государственный университет, Ереван, Армения

*e-mail: angay@ysu.am

(Поступила в редакцию 3 декабря 2025 г.)

Определение термодинамических параметров перехода молекулы ДНК из высокоупорядоченной двуспиральной конформации в неупорядоченное клубкообразное состояние в присутствии лигандов имеет ключевую роль в понимании структурных особенностей комплексообразования. Для определения энтальпии ΔH и энтропии ΔS перехода спираль–клубок обычно применяется метод калориметрии. В данной работе эти параметры были определены с использованием альтернативного метода — УФ спектрофотометрического плавления. Были получены значения температуры и интервала плавления (T_m и ΔT) комплексов ДНК с водорастворимым катионным Co(II)-мезо-тетра(4-N-аллилпиридил)порфирином (CoTAlIPyP4). Показано, что энтальпия перехода спираль–клубок ДНК при комплексообразовании с CoTAlIPyP4 является эндотермической, что обусловлено как разрывом водородных связей между нуклеотидными парами, так и высвобождением молекул порфирина с поверхности двойной спирали ДНК. Энтропийный вклад положителен, поскольку система становится более неупорядоченной.

1. Введение

Исследование взаимодействия различных лигандов с ДНК занимает ключевую роль в процессе разработки лекарственных препаратов. Определение особенностей взаимодействия новых лекарственных препаратов с ДНК представляют как практический, так и фундаментальный интерес. Основную информацию о молекулярных силах, управляющих образованием комплексов, можно получить только посредством изучения термодинамики комплексообразования. Термодинамические параметры ΔG , ΔH , ΔS комплексов ДНК с лигандами можно получить с помощью высокочувствительной микрокалориметрии.

Среди многочисленных методов исследования комплексов ДНК–лиганд особое место занимает плавление. Переход от строго упорядоченной двойной спирали к неупорядоченному клубкообразному состоянию молекулы ДНК, или так называемое плавление, может происходить при изменении различных параметров окружающей среды, таких как температура, ионная сила, pH и др. Молекула ДНК, состоящая из двух комплементарных полимерных цепей, соединенных водородными связями, в процессе плавления претерпевает значительные изменения физических свойств. Поскольку при нагревании водородные

связи, стабилизирующие двуспиральную молекулу ДНК, постепенно разрушаются, спираль разделяется на две полинуклеотидные цепи, которые сворачиваются в статистические клубки. При этом уменьшается оптическая активность и вязкость раствора ДНК, а также увеличивается интенсивность поглощения в УФ области при 260 нм [1]. Термодинамическая теория перехода спираль–клубок в молекуле ДНК основана на определении разности свободных энергий спирального и клубкообразного состояний [2].

Обычно для определения теплоты перехода спираль–клубок в молекуле ДНК применяется общеизвестный метод калориметрии [3, 4]. Однако Франк-Каменецкий и Карапетян предложили альтернативный метод определения ΔH на основе спектрофотометрических кривых плавления [5, 6]. Этот метод применяется при таких разбавлениях растворов, когда можно пренебречь межмолекулярными взаимодействиями. Было показано, что энтальпию можно определить из кривых плавления ДНК–лиганд при помощи весьма универсальной формулы [6]:

$$\Delta H = \lim_{c \rightarrow 0} f(c) = R \times \lim_{c \rightarrow 0} \{(\delta\Delta T / \delta T_m^2) / [\delta(1/T_m)]^2\} c, \quad (1)$$

$$\delta T_m = T_m - T_0, \quad \delta\Delta T = \Delta T - \Delta_0 T,$$

где T_m и ΔT – соответственно температура и интервал плавления комплексов ДНК–лиганд, T_0 и $\Delta_0 T$ те же параметры плавления ДНК без лигандов, c – концентрация лиганда, R – универсальная газовая постоянная. Было показано, что при низких концентрациях лиганда ($c \ll 1$) δT_m и $\delta\Delta T$ можно рассчитать по следующим формулам:

$$\delta T_m = 2(RT_0^2 / \Delta H) c b \quad (2)$$

$$\delta\Delta T = 4(RT_0^2 / \Delta H) c. \quad (3)$$

Поскольку константы связывания лигандов со спиральными и клубкообразными состояниями ДНК различаются по значениям, формулы (2) и (3) показывают, что если константа связывания лиганда с одной из конформаций намного превосходит константу связывания с другой конформацией, то приращение ширины интервала плавления $\delta\Delta T$ в два раза больше, чем приращение температуры плавления δT_m . В этом случае ΔH можно определить по изменению каждого параметра при помощи формулы (4) или (5):

$$\Delta H = \frac{\delta(\Delta T)}{[\delta(T_m)]^2} T_0^2 c, \quad (4)$$

$$\Delta S = \Delta H / T_m. \quad (5)$$

Точность определения ΔH в этом случае зависит от точности экспериментально вычисленных значений температуры и интервала плавления при разных значениях концентрации лигандов.

Основная цель данной работы — охарактеризовать термодинамические особенности комплексообразования порфиринов с ДНК с использованием альтернативного метода Франк-Каменецкого и Карапетяна, который может пролить свет на процесс связывания молекул порфирина с ДНК.

2. Материалы и методы исследований

Сверхчистая нативная ДНК тимуса телят была приобретена у Sigma-Aldrich Ltd. Водорастворимый порфирин CoTAlIPyP4 синтезирован в ЕМУ [7]. Исследования проводились в фосфатном буферном растворе (0.1BPSE = 0.6

ммоль Na_2HPO_4 + 0.2 ммоль NaH_2PO_4 + 18.5 ммоль NaCl + 0.1 ммоль EDTA), pH 7.0. Концентрация ДНК составляла 7.57×10^{-5} М пар оснований. Раствор порфирина с концентрацией 10^{-5} – 10^{-4} М готовился за час до эксперимента и хранился 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 тefлоновыми крышками.

Спектры поглощения и кривые плавления регистрировались на спектрофотометре Lambda 800 (Perkin Elmer) с температурным блоком PTP-6 Peltier System. Для построения, сглаживания и обработки полученных результатов использовалась программа Origin (OriginLab Corporation).

3. Результаты и их обсуждение

На рис.1 приведены кривые плавления ДНК в присутствии различных концентраций порфирина CoTAlIPyP4 . Используя формулы (4) и (5), были определены ΔH и ΔS перехода спираль–клубок ДНК при комплексообразовании с CoTAlIPyP4 (табл.1).

Комплексообразование молекулы ДНК с водорастворимыми катионными порфиринами обычно сопровождается стабилизацией молекулы ДНК [8, 9]. Анализ кривых плавления показывает, что даже при очень низких относительных концентрациях порфирина наблюдается стабилизация двуспиральной молекулы ДНК. Увеличение концентрации CoTAlIPyP4 приводит к смещению кривых плавления ДНК в сторону более высоких температур, при этом температура и интервал плавления увеличиваются (табл.1).

Изменения энтальпии и энтропии могут предоставить важную информацию о связывании порфиринов с ДНК. Энтальпия перехода ДНК спираль–клубок — это количество тепла, необходимое для преобразования ДНК из высокоупорядоченной канонической двухцепочечной формы в неупорядоченную форму. Этот переход является эндотермическим, то есть требует затрат энергии для разрыва водородных связей между парами оснований и расщепления двойной спирали на

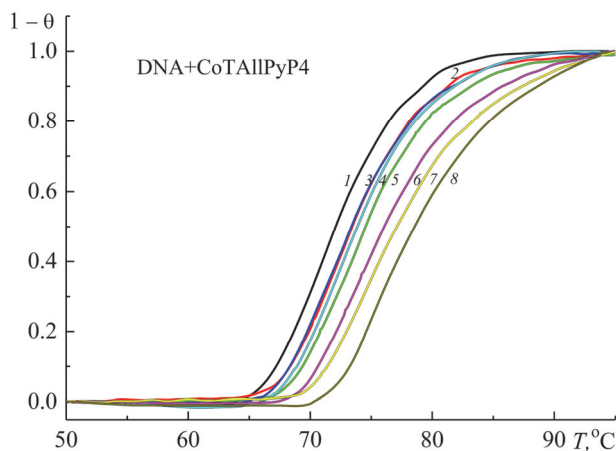


Рис.1. Кривые плавления ДНК при взаимодействии с CoTAlIPyP4 . Относительная концентрация порфирина ($r = C_P/C_{\text{DNA}}$) имеет значения: 1 – 0; 2 – 0.001; 3 – 0.003; 4 – 0.005; 5 – 0.01; 6 – 0.03; 7 – 0.05; 8 – 0.08.

Табл.1. Термодинамические параметры плавления комплекса ДНК–CoТАИРyP4

r	$T_m, ^\circ\text{C}$	ΔT	$\delta(T_m)$	$\delta(\Delta T)$	ΔH ккал/моль	ΔS э.е.
0	72.05	8.76	–	–	8.8±0.06	0.12±0.01
0.001	73.48	9.34	1.43	0.58	10.27±0.02	0.02±0.004
0.005	73.84	9.51	1.79	0.75	14.88±0.09	0.082±0.007
0.01	74.47	9.80	2.42	1.04	18.01±0.12	0.123±0.011
0.03	76.05	10.89	4.0	2.13	28.28±0.21	0.273±0.016
0.05	77.11	11.31	5.06	2.55	29.53±0.23	0.334 ±0.012
0.08	78.90	11.75	6.85	2.99	35.26±0.24	0.335±0.012

отдельные цепи, при этом энтропия системы увеличивается (табл.1).

Присутствие положительно заряженных молекул порфирина может только увеличить энергетические затраты, поскольку сначала энергия потребуется на вытеснение этих молекул с поверхности двойной спирали ДНК, а затем на разделение полинуклеотидных цепей путем разрыва водородных связей.

Важную роль в этом процессе играет гидратно–натриевая оболочка ДНК, состоящая из высокоупорядоченных молекул воды вокруг полярных групп и ионов натрия, нейтрализующих отрицательный заряд молекулы ДНК [10–12]. Разрушение этой упорядоченной системы молекулами порфирина CoТАИРyP4 при комплексообразовании является энтропийно выгодным (табл.1). Известно, что кулоновское взаимодействие между катионами и анионами сопровождается положительными изменениями энтропии [13, 14]. Следовательно, положительное изменение энтропии при связывании катионного металлопорфирина с ДНК, вероятно, обусловлено электростатическим взаимодействием между положительно заряженными *мезо*-заместителями порфирина и отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК.

Двухвалентный атом кобальта внутри полости плоского порфирина образует пять координационных связей, имеет один аксиальный лиганд, который вытесняет атом кобальта из полости порфирина, и имеет толщину примерно 5–7 Å [15, 16]. При таких размерах положительно заряженные молекулы CoТАИРyP4 не могут интеркалировать между нуклеотидными парами оснований ДНК, они располагаются лишь на отрицательно заряженной поверхности двойной спирали ДНК. Было показано [16–18], что Со-порфирины, как и Zn-, Mn-, Fe-содержащие порфирины с аксиальными лигандами, при взаимодействии с ДНК предпочитают внешний тип связывания, что реализуется посредством электростатических взаимодействий. Считается, что молекулы воды, непосредственно взаимодействующие с ДНК, играют ключевую роль в стабилизации комплексов порфиринов с нуклеиновыми кислотами, в частности, за счет образования водных мостиков между молекулами порфиринов и ДНК [19–22]. Как видно из табл.1, с увеличением концентрации CoТАИРyP4 энтропия растет. Взаимодействие молекул CoТАИРyP4 с ДНК приводит к значительному искажению структуры ДНК [23,

24]. В результате этого искажения изменяется локальная плотность заряда молекулы ДНК, что приводит к высвобождению противоионов натрия из тех участков поверхности спирали, которые взаимодействуют с молекулами порфиринов. Как искажение структуры ДНК, так и высвобождение противоионов, адсорбированных на поверхности двойной спирали и нейтрализующих отрицательный заряд молекулы ДНК [10, 11], приводит к значительным положительным изменениям энтропии [13, 25, 26]. В ходе этого процесса энтропия увеличивается как за счет перехода связанных молекул воды в свободную фазу, так и за счет увеличения подвижности нуклеотидных цепей при переходе спираль–клубок. Чем выше концентрация исследуемого порфирина в растворе, тем более разупорядочена система. Таким образом, при переходе спираль–клубок ДНК при наличии CoTAlIPyP4 в растворе увеличивается количество свободных молекул порфирина, ионов натрия и воды, связанных с двойной спиралью ДНК. Определение термодинамических параметров методом спектрофотометрического плавления применимо при очень маленьких концентрациях лиганда, а концентрация порфирина в растворе в данном случае составляет 10^{-5} – 10^{-4} М. В таких разбавленных растворах образование агрегатов не наблюдается [9, 16]. Следовательно, взаимодействие ДНК–порфирин имеет энтропийный характер. На основании полученных результатов можно предположить, что характер сил взаимодействия преимущественно гидрофобный.

4. Заключение

Термодинамические параметры перехода спираль–клубок ДНК (энтальпия ΔH и энтропия ΔS) при взаимодействии с водорастворимым катионным порфирином CoTAlIPyP4 были определены с использованием экспериментально полученных значений температуры и интервала плавления (T_m и ΔT). Показано, что энтальпия перехода спираль–клубок ДНК при комплексообразовании с CoTAlIPyP4 порфирином имеет эндотермический характер, что связано как с разрывом водородных связей, так и с высвобождением внешне связанных молекул порфирина с поверхности ДНК. Молекула CoTAlIPyP4 имеет один аксиальный лиганд и толщину 5–7 Å. Поэтому при взаимодействии эти молекулы располагаются только на внешней поверхности двойной спирали ДНК. Такое расположение приводит к значительному искажению структуры и изменению локальной плотности заряда молекулы ДНК, которое было доказано методами кругового дихроизма (КД) и вискозиметрии [8]. Эти конформационные изменения ДНК приводят к высвобождению противоионов натрия и переходу связанных молекул воды в свободную фазу из тех участков поверхности спирали, которые взаимодействуют с молекулами порфиринов. Эти изменения приводят к значительным положительным изменениям энтропии. Чем выше концентрация исследуемого порфирина в растворе, тем более разупорядочена система. Следовательно, взаимодействие ДНК–порфирин имеет энтропийный характер. На основании полученных результатов можно предположить, что характер сил взаимодействия преимущественно гидрофобный.

Работа выполнена при поддержке Комитета по науке РА в рамках научного проекта № 25RG-1F152.

ЛИТЕРАТУРА

1. **R.M. Wartell, A.S. Benight.** Physics Reports, **126**, 67 (1985).
2. **A.A. Vedenov, A.M. Dykhne, M.D. Frank-Kamenetskii.** Sov. Phys. Usp., **14**, 715 (1972).
3. **N.C. Garbett.** The Use of Calorimetry to Study Ligand–DNA Interactions. Chapter 12 in: Ed. J. Aldrich-Wright, Metallointercalators. Springer, Vienna, pp. 299–324, 2011.
4. **A. Vologodskii, M.D. Frank-Kamenetskii.** Phys. Life Rev., **25**, 1 (2018).
5. **A.T. Karapetian, P.O. Vardevanian, G.A. Terzikian, M.D. Frank-Kamenetskii.** J. Biomol. Struct. Dyn., **8**, 123 (1990).
6. **A.T. Karapetian, P.O. Vardevanian, M.D. Frank-Kamenetskii.** J. Biomol. Struct. Dyn., **8**, 131 (1990).
7. **A.G. Tovmasyan, N.S. Babayan, L.A. Sahakyan, A.G. Shahkhatuni, G.H. Gasparyan, R.M. Aroutiounian, R.K. Ghazaryan.** J. Porphyrins Phthalocyanines, **12**, 1100 (2008).
8. **V.G. Barkhudaryan, G.V. Ananyan.** J. Porphyr. Phthalocyanines. **22**, 1022 (2018).
9. **G.V. Ananyan, Y.B. Dalyan, N.H. Karapetyan, V.G. Barkhudaryan, A.A. Avetisyan.** J. Biomol. Struct. Dyn., **41**, 7290 (2023).
10. **X. Shi, R.B.J. Macgregor.** Biophys. Chem., **125**, 471 (2007).
11. **T.V. Chalikian, G.E. Plum, A.P. Sarvazyan, K.J. Breslauer.** Biochemistry, **33**, 8629 (1994).
12. **H. Ogoshi, T. Mizutani, T. Hayashi, Y. Kuroda, K.M. Kadish, K.M. Smith, R. Guilard.** The Porphyrin Handbook. Academic Press, Burlington, **6**, 279 (1999).
13. **B. Jana, S. Pal, P.K. Maiti, S.T. Lin, J.T. Hynes, B. Bagchi.** J. Phys. Chem. B., **110**, 19611 (2006).
14. **G.A. Jeffrey, W. Saenger.** Hydration of Nucleic Acids. Chapter In: Hydrogen Bonding in Biological Structures. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 484–504, 1994.
15. **U. Sehlstedt, S.K. Kim, P. Carter, J. Goodisman, J. F. Vollano, B. Norden, J.C. Dabrowiak.** Biochemistry, **33**, 417 (1994).
16. **G.V. Ananyan, N.H. Karapetyan, Y.B. Dalyan, R.S. Ghazaryan, S.G. Haroutiunian.** J. Contemp. Phys., **59**, 398 (2024).
17. **L. Gong, I. Bae, S.K. Kim.** J. Phys. Chem. B, **116**, 12510 (2012).
18. **G.V. Ananyan, N.H. Karapetyan, Y.B. Dalyan.** J. Biomol. Struct. Dyn., **40**, 10313 (2021).
19. **R.F. Pasternack, E.J. Gibbs.** Met. Ions In Biol. Syst., **33**, 367 (1996).
20. **R. Satange, M.-H. Hou.** RSC Chem. Biol., **6**, 699 (2025).
21. **B.P. Fingerhut.** Chem. Commun., **57**, 12880 (2021).
22. **B. Nguyen, S. Neidle, W.D. Wilson.** Acc. Chem. Res., **42**, 11 (2009).
23. **M. Bennett, A. Krah, F. Wien, E. Garman, R. McKenna, M. Sanderson, S. Niedle.** Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **97**, 9476 (2000).
24. **L.A. Lipscomb, F.X. Zhou, S.R. Presnell, R.J. Woo, M.E. Peek, R.R. Plaskon, L.D. Williams.** Biochemistry, **35**, 2818 (1996).
25. **J.B. Chaires.** Biopolymers, **44**, 201 (1997).
26. **A. Mardt, R.F. Gorriz, F. Ferraro, P. Ulrich, M. Zahran, P. Imhof.** Biophys. Chem., **283**, 106779 (2022).

ԴՆԹ-Ի ԿՐԿՆԱԿԻ ՊԱՐՈՒՅՐԱԶԵՎ ԿԱՌՈՒՑՎԱԾՔՈՒՄ
ԿԱՐԳ-ԱՆԿԱՐԳԱՎՈՐՈՒԹՅՈՒՆ ԱՆՑՄԱՆ ԹԵՐՄՈԴԻՆԱՄԻԿԱՆ
CoTAlIPyP4-Ի ԱՌԿԱՅՈՒԹՅԱՄԲ

Գ.Վ. ԱՆԱՆՅԱՆ, Պ.Հ. ՎԱՐԴԵՎԱՆՅԱՆ, Ն.Հ. ԿԱՐԱՊԵՏՅԱՆ

Լիզանդների առկայությամբ ԴՆԹ-ի բարձր կարգավորված կրկնակի պարուրաձև կոնֆորմացիայից անկարգավորված կծիկանման վիճակի անցման թերմոդինամիկական պարամետրերի որոշումը կարևոր է կոմպլեքսագոյացման կառուցվածքային առանձնահատկությունները հասկանալու համար: Այս պարամետրերը որոշելու համար սովորաբար օգտագործվում է կալորիամետրիկ մեթոդը: Աշխատանքում ուսումնասիրվել են ջրալույծ կատիոնային Co(II)-*meso*-տետրա(4-N-ալիլպիրիդիլ)պորֆիրինի (CoTAlIPyP4) հետ ԴՆԹ-ի փոխազդեցության թերմոդինամիկական առանձնահատկությունները թերմոդինամիկական պարամետրերի որոշման ակտերնատիվ՝ ՈւՄ-հալման սպեկտրոֆոտոմետրիկ մեթոդը: ԴՆԹ-CoTAlIPyP4 կոմպլեքսների պարույր-կծիկ անցման էնթալպիան ΔH և էնտրոպիան ΔS որոշվել են փորձնականորեն ստացված հալման ջերմաստիճանի և հալման միջակայքի արժեքների (T_m և ΔT) միջոցով: Ցույց է տրվել, որ կոմպլեքսագոյացումը էնդոթերմիկ է՝ պայմանավորված ինչպես ջրածնային կապերի խզմամբ, այնպես էլ ԴՆԹ-ի կրկնակի պարույրի մակերևույթից CoTAlIPyP4 պորֆիրինային մոլեկուլների արտագատմամբ: Էնտրոպիկ ներդրումը դրական է, քանի որ համակարգը դառնում է ավելի անկարգավորված:

THERMODYNAMICS OF THE ORDER-DISORDER TRANSITION IN THE
DOUBLE-HELICAL STRUCTURE OF DNA IN THE PRESENCE OF CoTAlIPyP4

G.V. ANANYAN, P.H. VARDEVANYAN, N.H. KARAPETYAN

Determining the thermodynamic parameters of the DNA transition from a highly ordered double-helical conformation to a disordered coiled state in the presence of ligands is key to understanding the structural features of complex formation. Calorimetry is commonly used to determine the enthalpy ΔH and entropy ΔS of the helix-coil transition. In this study, these parameters were determined using an alternative method: UV spectrophotometric melting. The melting temperature and melting range (T_m and ΔT) of DNA complexes with water-soluble cationic Co(II)-*meso*-tetra(4-N-allylpyridyl)porphyrin (CoTAlIPyP4) were obtained. The enthalpy of the helix-coil transition during complex formation with CoTAlIPyP4 was shown to be endothermic, which is caused by both the rupture of hydrogen bonds between nucleotide pairs and the release of porphyrin molecules from the surface of the DNA double helix. The entropic contribution is positive because the system becomes more disordered.