

УДК 577.32:5396.199

## МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ СВЯЗЫВАНИЯ АКТИНОЦИНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ С ДНК ПРИ РАЗНЫХ ИОННЫХ СИЛАХ И ТЕМПЕРАТУРАХ

Е.Б. Круглова, Н.А. Гладковская, В.Я. Малеев

ИРЭ НАН Украины, ул. Ак. Проскуры, 12, г. Харьков, 61085

e-mail: glad@ire.kharkov.ua

Поступило в редакцию 17 июня 2003г.

Методом спектрофотометрического титрования исследованы комплексы актиноцинового антибиотика ActII с ДНК. Были рассмотрены две модели с одним и двумя местами связывания лигандов, описываемые уравнениями МакГи и фон Хиппела с разными значениями параметров. Для выбора оптимальной модели комплексообразования была использована программа оптимизации спектрофотометрических концентрационных зависимостей DALSMOD. С помощью этой программы установлено, что в системе ActII - ДНК присутствуют, по крайней мере, три по-разному поглощающих комплекса. Логарифмы констант комплексообразования на каждом из мест связывания лигандов с матрицей ДНК линейно зависят от логарифма концентрации NaCl. Анализ спектров поглощения рассмотренных смесей ActII - ДНК при разных температурах позволил оценить величины  $\Delta H$  и  $\Delta S$  для каждого типа комплексов. Полученные значения энтропии  $\Delta S$  положительны в растворах  $2 \times 10^{-2}$  М NaCl и отрицательны при 0.15 М NaCl.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** спектрофотометрия, ДНК, актиноциновый антибиотик, влияние ионных сил, кривые плавления, энтропия и энтальпия комплексообразования.

Как показано в целом ряде работ, способы связывания лекарственных препаратов с ДНК и полинуклеотидными матрицами различны для лигандов разного типа (интеркаляция, размещение в малой и большой бороздках и др.) [1-3]. Мульти-modalность связывания в таких системах приводит к трудностям при определении спектральных характеристик разных типов комплексов и к неоднозначности при вычислении изотерм связывания и термодинамических параметров комплексообразования (констант и величин мест связывания) [4]. Комплексы с различными молярными коэффициентами экстинкции в системах ДНК-лекарство появляются уже при внешнем (кооперативном) типе связывания, при этом образуются мономерно связанный и агрегированный лиганды [5,6]. Различия в спектрах поглощения агрегированных и мономерно связанных лигандов объясняется стэкингом хромофорных колец лигандов, расположенных на соседних местах связывания. Параллельно с внешним (в бороздках ДНК) типом связывания в таких системах возможна интеркаляция лигандов в двойную спираль ДНК, что приводит к сосуществованию в системе ДНК-лекарство, по крайней мере, трех по-разному поглощающих компонент [4,7]. Кроме того, спектры поглощения не связанных с ДНК лигандов в мономерной и димерной формах также различаются [8].

В связи с изложенным выше, представляет интерес разработка новых методик, которые позволили бы вычислять термодинамические параметры связывания лигандов с ДНК из анализа спектрофотометрических концентрационных зависимостей с учетом различий в спектрах поглощения всех образующихся комплексов. Различные типы комплексов, как правило, АТ-, GC- специфичны и образуются на разных местах связывания. Константы связывания для каждого из комплексов могут по-разному зависеть от ионной силы. В полиэлектролитной теории Меннинга такая зависимость представлена в виде линейной функции  $\lg K$  от  $\lg$  концентрации NaCl [9]. Представляет интерес рассмотреть применимость теории Меннинга для описания зависимостей констант связывания от ионной силы для разных типов комплексов. Важно также понять, как с ростом температуры меняется каждая из констант связывания в таких системах и какова роль каждой из них в процессе стабилизации (дестабилизации) двойной спирали ДНК.

В данной работе для решения всех перечисленных задач была использована новая методика анализа спектрофотометрических концентрационных зависимостей в системе ДНК - лиганд с помощью программы оптимизации DALSMOD. Такой подход позволил выбрать оптимальную модель связывания, получить детальную информацию о типах комплексов и их стехиометрии, вычислить спектральные и термодинамические параметры комплексообразования при разных ионных силах и температурах.



## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовалась ДНК из тимуса телянка фирмы "Serva". Антибиотик актиноинового ряда (ActII) с двумя метиленовыми группами в боковых цепочках был синтезирован Глибиным и др. [10] и использовался без дополнительной очистки. Структурная формула актиноинового антибиотика приведена на рис. 1.

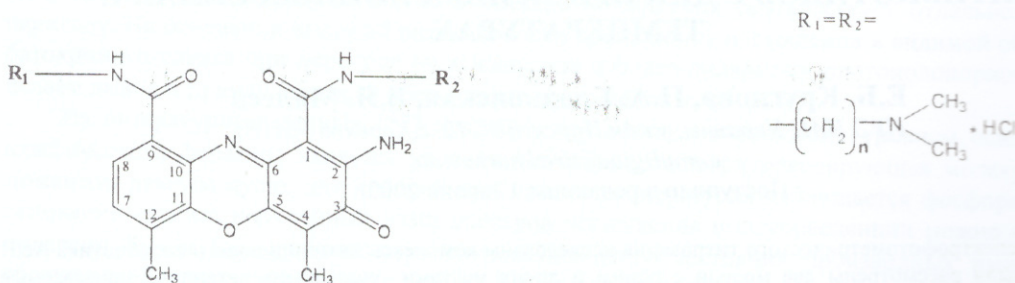


Рис. 1. Структурная формула актиноинового антибиотика ActII,  $n=2$ .

При определении концентрации исследуемого антибиотика использовали значение молярного коэффициента экстинкции в изобестической точке  $\epsilon_{400} = 1,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [11]. Полученные значения концентраций использовались в дальнейшем для определения молярных коэффициентов экстинкции в УФ-области спектра, которые были равны  $\epsilon_{235} = 4,52 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  в водном растворе и  $\epsilon_{235} = 4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  в 0,2 М NaCl. Спектрофотометрические измерения проводили в термостатированных кварцевых кюветках с длиной оптического пути 1, 2 и 10 мм на спектрофотометре Specord M40 (Германия). Константы димеризации и молярные коэффициенты экстинкции мономерной ( $\epsilon_m$ ) и димерной ( $\epsilon_d$ ) форм для этих антибиотиков рассчитывались по оригинальной программе оптимизации DALС и приведены в работе [12].

Для анализа комплексообразования в системе ДНК-лиганд была использована программа оптимизации DALС, модифицированная путем замены простых уравнений ЗДМ (закона действующих масс) системой уравнений, описывающих процессы связывания лигандов с несколькими различными местами связывания на полиэлектролитных матрицах (DALСMOD). В этой программе для расчета равновесного состава каждой смеси при заданных  $C_{Na}^0$ ,  $C_D^0$ ,  $C_P^0$ ,  $C_N^0$ , где  $C_{Na}^0$ ,  $C_D^0$ ,  $C_P^0$ ,  $C_N^0$  – полные концентрации ионов  $Na^+$ , лиганда, фосфатов ДНК и пар оснований, соответственно, использовались уравнения (1)-(6). Уравнения (1)-(3) описывают конкурентное связывание лигандов с матрицей ДНК [13,14]. В нашем случае это антибиотик ActII и ион  $Na^+$ . Уравнение МакГи и фон Хитцеля (4) описывает некооперативное связывания лиганда на месте связывания  $n_3$  [15]. Уравнения (5) и (6) отражают закон сохранения общих концентраций.

$$\frac{R_1}{m_1} = K_1 \times (1 - R_1 - R_2 \times n_2) \quad (1)$$

$$\frac{R_2}{m_2} = K_2 \left[ \frac{1 - R_1 - R_2 \times n_2}{1 - R_2 \times n_2 + R_2 - \gamma \times \frac{\omega - 1}{\omega}} \right]^{n_2} \frac{\omega \times R_2^2}{\gamma} \quad (2)$$

$$\left( R_2 - \gamma \times \frac{\omega - 1}{\omega} \right)^2 = \frac{\gamma}{\omega} \left( 1 - R_2 \times n_2 + R_2 - \gamma \times \frac{\omega - 1}{\omega} \right) \quad (3)$$

$$\frac{R_3}{m_2} = K_3 \left[ \frac{1 - R_3 \times n_3}{1 - R_3 \times n_3 + R_3} \right]^{n_3} (1 - R_3 \times n_3 + R_3) \quad (4)$$

$$C_{Na}^0 = m_1 + R_1 \times C_P^0 \quad (5)$$

$$C_D^0 = m_2 + 2 \times K_D \times m_2^2 + R_2 \times C_P^0 + R_3 \times C_N^0 \quad (6)$$

В уравнениях (1)-(6):  $K_1$  – константа связывания ионов  $Na^+$  с фосфатами ДНК;  $K_2$  – константа мономерно связанного лиганда (комплекс 1) на месте связывания  $n_2$ ;  $\omega$  – фактор кооперативности,



характеризующий образование агрегатов на тех же местах связывания;  $K_3$  - константа связывания лиганда на месте связывания  $p_3$  (комплекс 2);  $R_1$  и  $R_2$  - доли связанных ионов  $\text{Na}^+$  и комплекса 1, равные частному от деления соответствующих равновесных концентраций на  $C_p^0$ ;  $R_3$  - доля комплекса 2, равная частному от деления соответствующей равновесной концентрации  $C_N^0$ ;  $m_1$  и  $m_2$  - концентрации несвязанных ионов  $\text{Na}^+$  и мономера лиганда;  $K_D$  - константа димеризации лиганда,  $\gamma$  - характеризует вероятность расположения лигандов на соседних местах связывания [9]. Величины мест связывания  $p_2$  и  $p_3$  равны количеству оснований (фосфатов) ДНК, занятых каждым из комплексов на матрице ДНК.

Ниже на рис.2,а,б приведены две рассматриваемые нами модели связывания, схематически описывающие наблюдаемые процессы комплексообразования в системе ДНК - биологически активный лиганд.

*Модель I.* Связывание лиганда с ДНК происходит с образованием только мономерно связанных (комплекс 1) и агрегированных ( $1'$ ) лигандов на местах связывания  $p_2$ . Модель I описывается уравнениями (1) - (3), (5), (6) (Рис.2,а).

*Модель II.* Связывание лиганда с ДНК происходит с образованием двух типов комплексов (комплекса 1 и комплекса 2) на разных местах связывания  $p_2$  и  $p_3$  с учетом образования агрегатов на местах связывания  $p_2$ . Модель II описывается уравнениями (1) - (6) (Рис.2,б).

В обеих моделях также учитываются мономер - димерное равновесие ( $2m \leftrightarrow d$ ) с константой  $K_D$  по уравнению (6) и связывание ионов  $\text{Na}^+$  с фосфатами ДНК ( $P^-$ ) по уравнению (1).

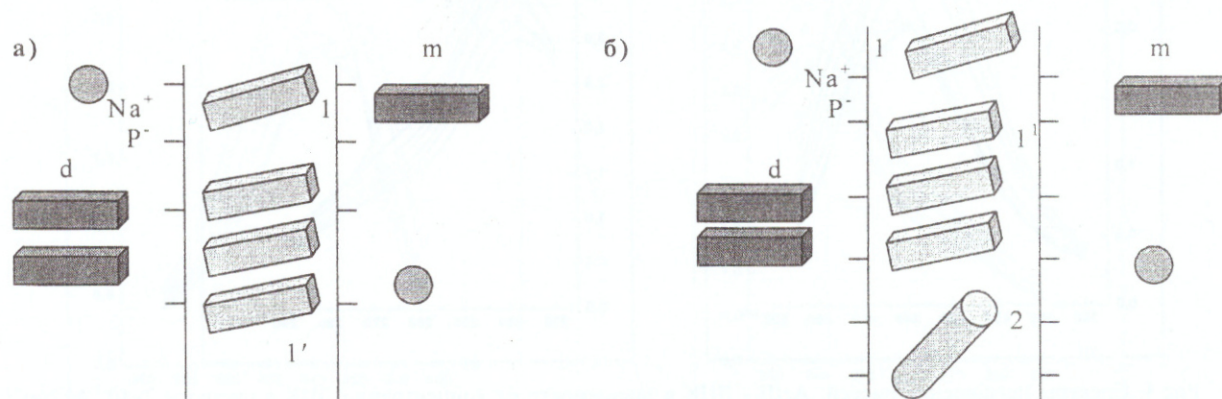


Рис.2. Модель внешнего кооперативного связывания лиганда с полианионной матрицей с учетом конкурентного связывания иона  $\text{Na}^+$  (Модель I) (а) и модель образования двух типов комплексов (кооперативный (комплексы 1 и  $1'$ ) и некооперативный (комплекс 2) типы связывания) на двух разных местах связывания (Модель II) (б).

Для каждой описанной выше модели равновесный состав смесей  $[c_{ik}]$ , где  $[c_{ik}]$  - равновесные концентрации лиганда в  $k$ -ом состоянии в  $i$ -ом растворе рассчитывался в программе оптимизации DALSMOD по уравнениям (1)-(6) на каждом шаге итераций, как было описано в [8]. Оптимальные значения молярных коэффициентов экстинкции комплексов 1 и 2 и соответствующие константы связывания вычислялись далее путем минимизации суммы квадратов отклонений наблюдаемых оптических плотностей  $A_{ij}$  (в  $i$ -ом растворе при  $j$ -ой длине волны) от расчетных, вычисляемых по закону Ламберта-Бера как  $A_{ij} = \sum [c_{ik}] \times \epsilon_{kj}$ . Соответствие каждой выбранной модели экспериментальным данным определялось путем сравнения факторов Гамильтона  $R_I$  и  $R_{II}$  (для разных моделей) с предельным значением фактора Гамильтона  $R_{lim}$ , которое рассчитывалось при каждом выходе из программы оптимизации. Модель считается приемлемой, если  $R < R_{lim}$ . Чем меньше величина  $R$ , тем лучше модель удовлетворяет экспериментальным данным [16]. Оптимальные значения величин мест связывания  $p_2$ ,  $p_3$  и  $\omega$  определялись нами как величины, при которых фактор Гамильтона  $R$  был минимальным, как будет описано ниже.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Спектрофотометрические концентрационные зависимости в системах ДНК-лиганд при разных ионных силах и температурах изучались на примере связывания актиноциновых антибиотиков с ДНК в широкой области концентраций. На рис. 3 приведены спектры поглощения АсII - ДНК в видимой и УФ областях при  $C_{\text{NaCl}} = 2 \times 10^{-2}$  М. Спектры в УФ области получены путем вычитания из суммарных величин поглощения смесей значений поглощений ДНК соответствующей концентрации.



Из рис.3 видно, что в системе ActII-ДНК присутствуют более чем два по-разному поглощающих компонента. Это следует из того, что изобестическая точка, появляющаяся в области низких значений P/D ( $\lambda=470$  нм,  $\epsilon_{470}=1.2 \times 10^4$ ,  $M^{-1}cm^{-1}$   $C_{NaCl}=2 \times 10^{-2}M$ ), исчезает с ростом концентрации ДНК. Дальнейшее увеличение P/D приводит к росту поглощения полосы и ее значительному смещению в длинноволновую область ( $\lambda_{max}=465$  нм). Весьма наглядно этот факт иллюстрируют спектральные изменения в УФ области, где при низких P/D изобестическая точка отсутствует, а с дальнейшим ростом концентрации ДНК наблюдается увеличение поглощения и смещение полосы антибиотика в длинноволновую область. Можно отметить определенную синхронность спектральных изменений в видимой и УФ областях для одних и тех же смесей. Особое внимание следует обратить на появления плеча в полосе поглощения антибиотика при больших значениях P/D (рис.3,б). Наблюдаемый эффект возможно связан с незначительным длинноволновым (2-3 нм) смещением полосы поглощения ДНК в комплексе с лигандом.

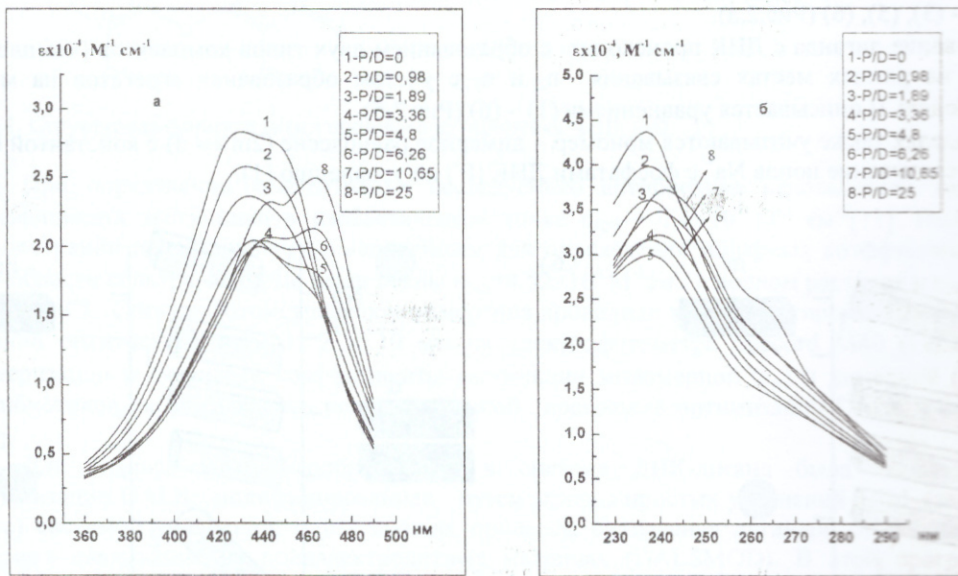


Рис.3. Спектры поглощения смесей ActII - ДНК в зависимости от концентрации ДНК в растворе  $2 \times 10^{-2} M$  NaCl в видимой (а) и ультрафиолетовой (б) областях спектра при постоянной концентрации антибиотика  $C_D = 4.4 \times 10^{-5} M$  (P/D – отношение концентрации фосфатов ДНК к концентрации лигандов).

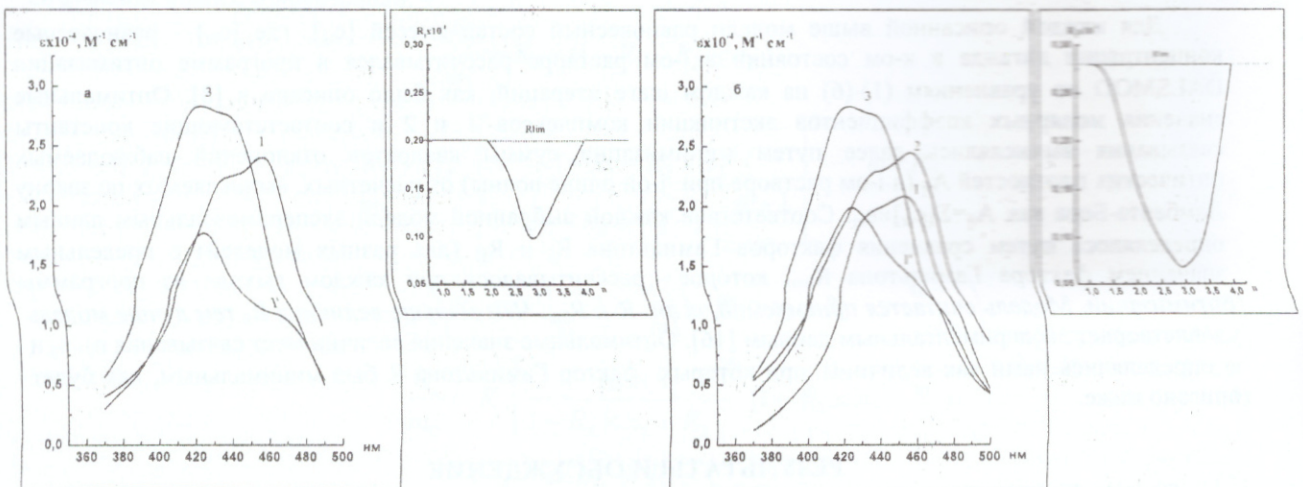


Рис.4. Оптимальные молярные коэффициенты экстинкции для различных типов комплексов ActII с ДНК, рассчитанные по модели I (а) и модели II (б) при  $C_{NaCl}=2 \times 10^{-2}M$ . На вставках: зависимости факторов Гамильтона  $R_I$  и  $R_{II}$  от величины места связывания  $n_2$ . Обозначения на рис.3 как на рис.1, а 3 – поглощение свободного лиганда при  $C_D=4.4 \times 10^{-5}M$ .



На рис.4,а,б приведены оптимальные значения молярных коэффициентов экстинкции различных типов комплексов ActII с ДНК при  $2 \times 10^{-2}$  M NaCl, вычисленных по программам оптимизации DALSMOD для моделей I и II. Полученные для обеих моделей параметры связывания приведены ниже в таблице 1. Можно отметить, что в растворе  $2 \times 10^{-2}$  M NaCl обе модели в некотором диапазоне величин  $n_2$  хорошо описывают наблюдаемые экспериментальные данные, что следует из сравнения  $R_I$  и  $R_{II}$  с  $R_{lim}$  (рис.4,а,б, вставки). Видно, что для  $R_I$  и  $R_{II}$ , рассчитываемых для каждого значения  $n_2$  в программе оптимизации, существует минимум при  $n_2 = 3 \pm 0.2$ , и  $R_I$  существенно больше  $R_{II}$ . Это позволяет нам сделать выбор в пользу модели II. Тем не менее, модель II содержит большее количество оптимизируемых параметров (величины  $\epsilon_{K2}$  и  $K_3$ ), что должно приводить к уменьшению фактора Гамильтона. Поэтому для более обоснованного выбора модели связывания мы провели серию исследований смесей ActII с ДНК при разных ионных силах и рассмотрели применимость к этим экспериментальным данным тех же моделей.

Полученные спектры поглощения антибиотика ActII в смесях с ДНК при ионной силе 0.15 M NaCl в видимой и УФ областях спектра приведены на рис.5,а,б.

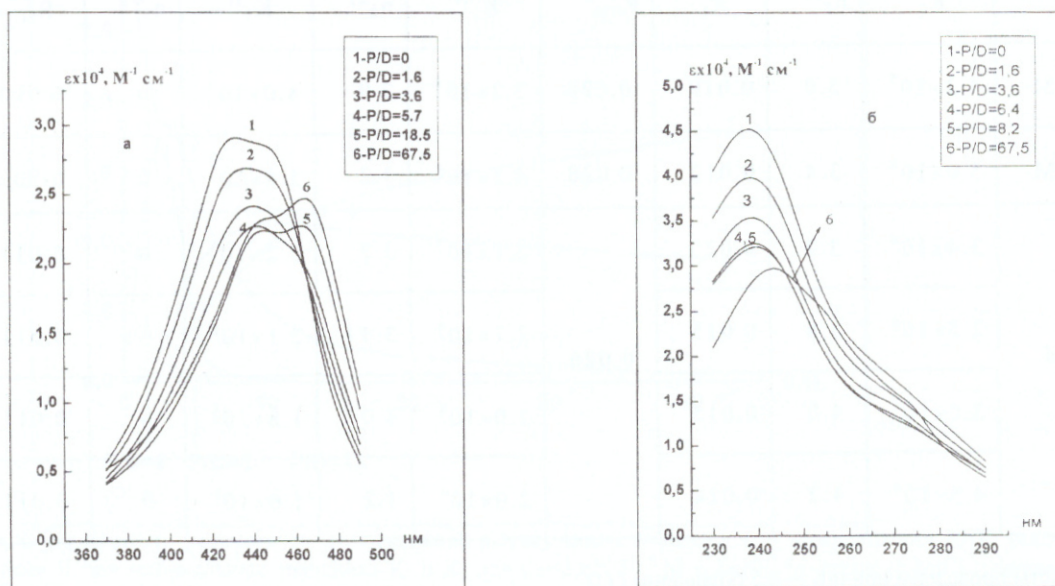


Рис.5. Спектры поглощения смесей ActII - ДНК в зависимости от концентрации ДНК в растворе 0,15 M NaCl в видимой (а) и ультрафиолетовой (б) областях спектра при постоянной концентрации антибиотика  $C_D = 2.79 \times 10^{-5}$  M.

Видно, что те же спектральные особенности (наличие изобестической точки, количество комплексов) характерны и для растворов 0.15 M NaCl. Отметим, что в УФ области, спектры поглощения ActII в 0.15 M NaCl при высоких значениях P/D существенно отличаются от спектров поглощения в растворах  $2 \times 10^{-2}$  M NaCl (см. рис.3,б, кривая 8 и рис.5,б, кривая 6).

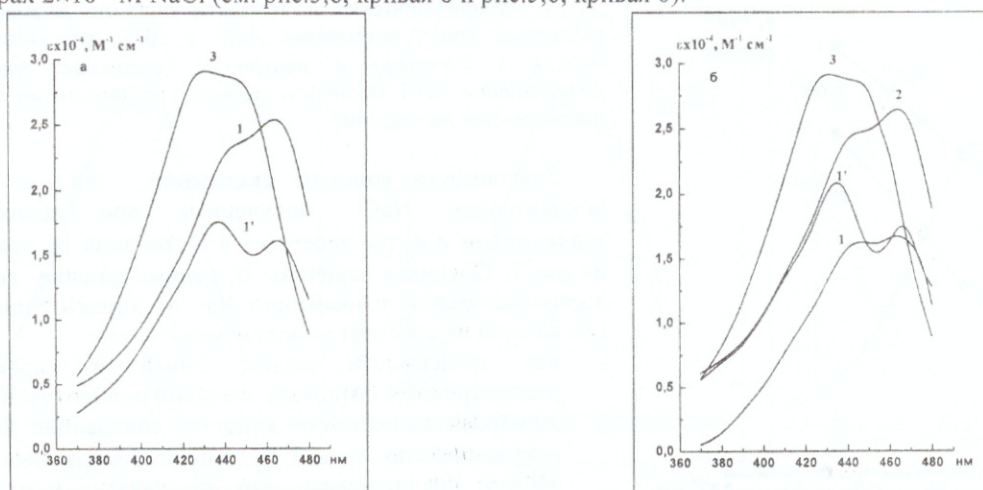


Рис.6. Оптимальные молярные коэффициенты экстинкции для различных типов связывания ActII с ДНК, рассчитанные по модели I (а) и модели II (б) при  $C_{NaCl} = 0.15$  M. Обозначения как на рис.4.



Оптимальные значения молярных коэффициентов экстинкции ActII, связанного с ДНК различными способами, полученные по программе оптимизации DALSMOD для моделей I и II в растворах 0,15 M NaCl приведены на рис.6. Спектры поглощения смесей в растворах  $8 \times 10^{-2}$  M NaCl имеют те же особенности, что и спектры при низких ионных силах (данные не приведены).

Величины параметров связывания в системах ActII - ДНК, вычисленные по моделям I и II для всех ионных сил, приведены в таблице 1.

Таблица 1. Параметры связывания ActII с ДНК для всех рассмотренных ионных сил, полученные при оптимизации спектрофотометрических концентрационных зависимостей по программе DALSMOD по моделям I и II при комнатной температуре.

	Модель I <sup>1)</sup>				Модель II <sup>1)</sup>					
	$K_2^I$	$n_2^{2)}$	$R_I$	$R_{Iim}$	$K_2^{II}$	$n_2^{2)}$	$K_3^{II}$	$n_3^{3)}$	$R_{II}$	$R_{IIim}$
$2 \times 10^{-2}$ M	$4.3 \times 10^5$	3.0	0.019	0.028	$2.2 \times 10^5$	2.9	$8.0 \times 10^5$	6	0.005	0.034
$8 \times 10^{-2}$ M	$5.0 \times 10^4$	3.4	0.012	0.028	$4.5 \times 10^4$	3.2	$2.8 \times 10^5$	6	0.007	0.034
0.15 M	$3.4 \times 10^4$	3.2	0.020	0.026	$2.1 \times 10^4$	3.2	$2.2 \times 10^5$	6	0.011	0.030
	$2.2 \times 10^4$	3.8	0.015		$2.1 \times 10^4$	3.4	$2.1 \times 10^5$	6	0.011	
	$3.0 \times 10^4$	4.0	0.015		$2.0 \times 10^4$	4.0	$1.8 \times 10^5$	6	0.011	
	$4.5 \times 10^4$	4.2	0.014		$2.0 \times 10^4$	4.2	$1.6 \times 10^5$	6	0.011	

<sup>1)</sup>Все расчеты проведены при  $\lg K_1 = -0.5$  (уравнение (1)).

<sup>2)</sup>Приведенные величины  $n_2$  для смесей ActII-ДНК в  $2 \times 10^{-2}$  M NaCl и в  $8 \times 10^{-2}$  M NaCl соответствуют минимальным значениям  $R_I$  и  $R_{II}$ .

<sup>3)</sup>Значения величин  $n_3$  в модели II были выбраны, как описано нами ранее [8].

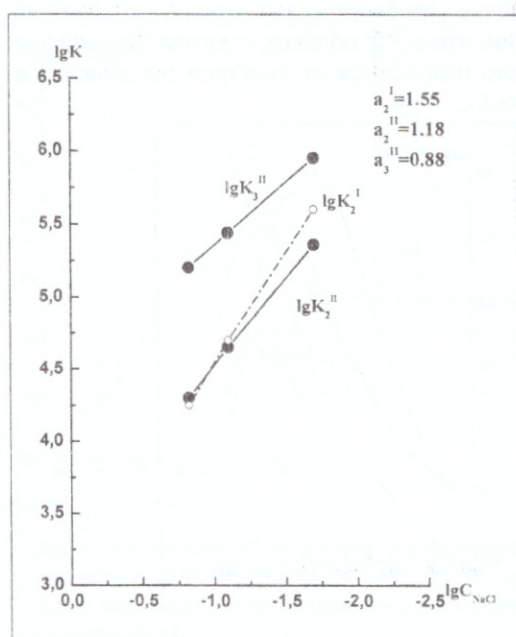


Рис.7. Логарифмические зависимости констант связывания для различных типов комплексов ActII с ДНК, рассчитанные по модели I (пунктир) и модели II (сплошные линии), от концентрации NaCl. Величины символов соответствуют величине погрешностей вычислений.

Зависимости констант связывания  $\lg K_2$  и  $\lg K_3$  от концентрации NaCl, полученные при оптимальных значениях  $n_2$  и  $n_3$  по моделям I и II (таблица 1), приведены на рис.7. Оценивая величины  $\alpha$ , равные наклону линейной логарифмической зависимости  $\lg K$  от концентрации NaCl для каждой из констант можно отметить, что:

- все зависимости имеют линейный характер в рассмотренном интервале значений концентраций соли;
- линейные зависимости констант связывания  $K_2$  и  $K_3$ , полученные по модели II, имеют разные значения  $\alpha$ . Можно предположить, что это связано с различной величиной и типом мест связывания  $n_2$  и  $n_3$ .
- все три значения  $\alpha < 1.8$ , что следуя теории Меннинга,

указывает на заряд катиона лиганда ActII меньше +2, но больше +1[5]. Другими словами, несмотря на



дикатионную природу ActII, его поведение в солевом растворе при связывании с ДНК схоже со свойствами монокатионного лиганда.

Полученные по моделям оптимизации величины констант и других параметров связывания (таблица 1) для рассмотренных моделей позволяют для разных начальных концентраций реагирующих компонентов рассчитывать равновесный состав любой смеси. Так на рис.8 показано как меняются равновесные концентрации разных типов комплексов в зависимости от концентрации ДНК в растворе  $2 \times 10^{-2}$  М NaCl для  $C_D = 2,65 \times 10^{-5}$  М при комнатной температуре.

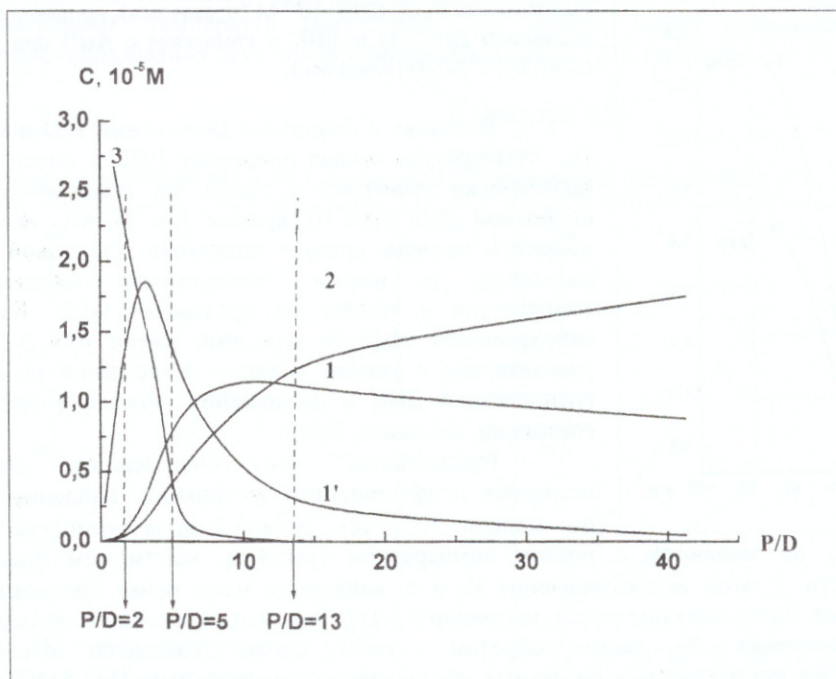


Рис.8. Зависимости равновесных концентраций разных типов комплексов от концентрации ДНК, рассчитанные по модели II при оптимальных значениях  $K_2$  и  $K_3$  для  $C_D = 2,65 \times 10^{-5}$  М в  $2 \times 10^{-2}$  М растворе NaCl (обозначения как на рис.4).

Ниже на рис.9,а,б,в приведены температурные зависимости спектров поглощения смесей в  $2 \times 10^{-2}$  М NaCl для той же концентрации  $C_D$  и различных P/D.

Хорошо видно, что температурные зависимости спектров поглощения, полученные при одной и той же концентрации лиганда и разных концентрациях ДНК в видимой области спектра, существенно различаются.

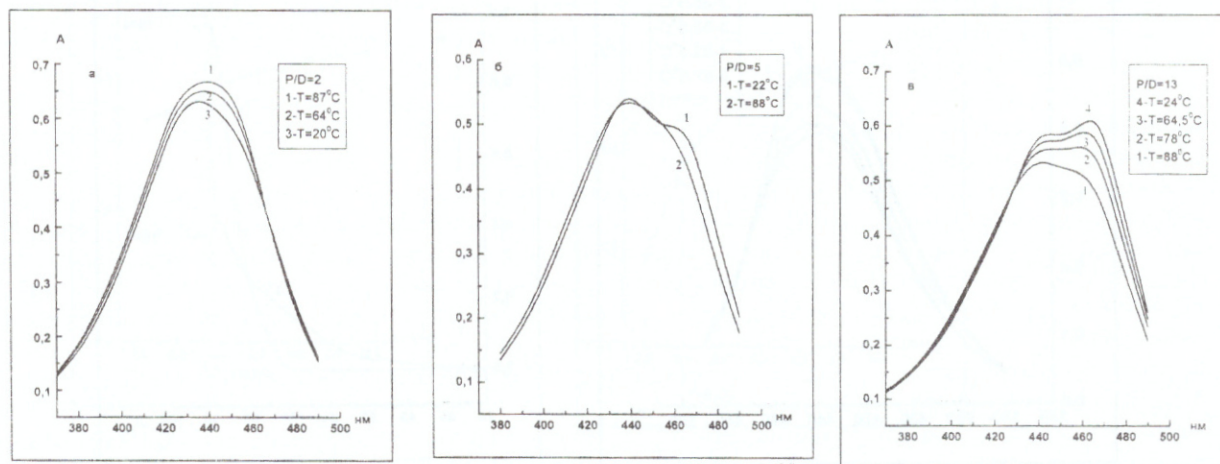


Рис.9. Спектры поглощения смесей ActII - ДНК при  $C_D = 2,65 \times 10^{-5}$  М при разных температурах: P/D=2 (а), P/D=5 (б), P/D=13 (в).



В УФ области спектра для ActII - ДНК с  $P/D=13$ ,  $P/D=5$ ,  $P/D=2$  при тех же температурах еще не фиксируется увеличение поглощений в  $\lambda=260$  нм (рис.10,а,б,в), что свидетельствует об отсутствии процесса денатурации ДНК в этих смесях в рассмотренном температурном интервале  $20^\circ\text{C}-85^\circ\text{C}$ . (Некоторое увеличение поглощений в УФ области для смеси с  $P/D=2$  (рис.10, зависимость в) с ростом температуры связано с появлением свободного красителя при разрушении комплексов).

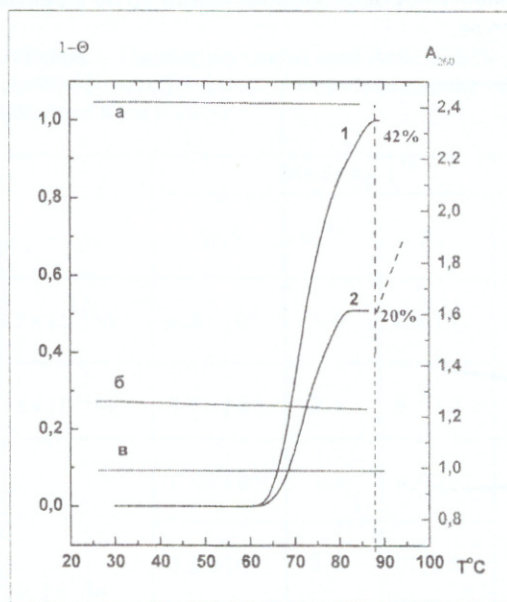


Рис.10. Температурная зависимость поглощения при  $\lambda=260$  нм смесей с  $P/D=13$  (зависимость а),  $P/D=5$  (зависимость б),  $P/D=2$  (зависимость в)  $C_D=2,65 \times 10^{-5}$  М (правая ось); кривые плавления свободной ДНК (1) и ДНК в комплексе с ActII при  $P/D=17$ ,  $C_D=7,7 \times 10^{-6}$  М (2) (левая ось).

В смесях с большими значениями  $P/D$  и малыми  $C_D$  температура начала плавления ДНК в смеси с ActII практически совпадает с такой же температурой для свободной ДНК (рис.10, кривые 1 и 2). Мы не смогли получить полную кривую плавления для такой смеси, поскольку в нашем эксперименте максимальная температура в кювете не превышает  $90^\circ\text{C}$ . Величина гипохромного эффекта для этой смеси при  $T=85,5^\circ\text{C}$ , рассчитанная с учетом величин поглощений полностью расплетенной ДНК и поглощения лиганда в свободном состоянии, составила 20%.

Предполагая, что оптимальные значения молярных коэффициентов экстинкции, найденные нами по модели II для разных типов комплексов при комнатных температурах, не меняются с ростом температуры (рис.4,б), мы можем рассчитать температурные зависимости. С этой целью, значение  $K_3$  и  $\epsilon$ , найденные нами ранее при комнатных температурах, фиксируются. Затем спектры смеси, например с  $P/D=2$  (рис.9,а), при разных температурах подгоняются путем изменения  $K_2$  таким образом, чтобы сумма квадратов отклонений экспериментальных спектров поглощения от расчетных, вычисляемых по программе DALSMOD, была минимальной. Строим полученную зависимость  $\lg K_2$  от абсолютной обратной температуры и соответствующие значения  $K_2$  используем для подгонки спектров поглощения смеси с большими значениями  $P/D$ , например с  $P/D=13$  (рис.9,в) путем изменения  $K_3$ . Такие итерации проводятся несколько раз до полного согласования полученных температурных зависимостей. Подобные расчеты можно проводить также, используя температурную зависимость спектров поглощения только для одной смеси, но тогда ошибка при определении двух констант возрастает из-за их корреляции.

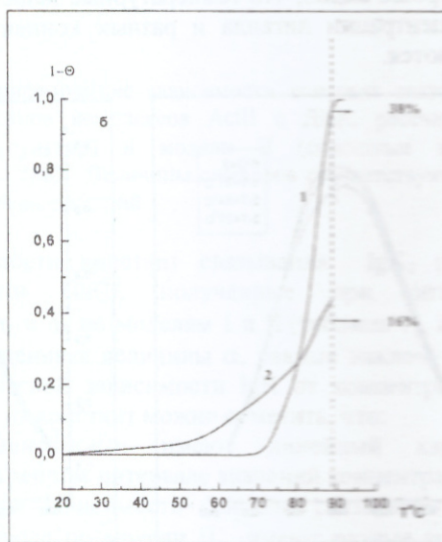
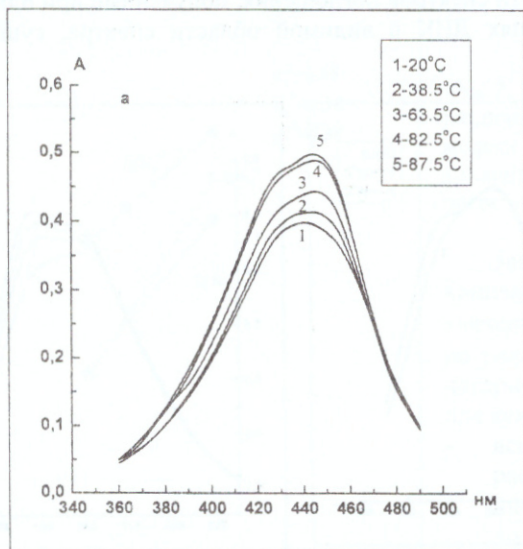


Рис.11. Спектры поглощения смеси ActII - ДНК с ( $C_D=1,62 \times 10^{-5}$  М,  $P/D=3$ ) в 0,15 М NaCl при разных температурах (а); кривые плавления ДНК в отсутствие антибиотика (1) и ДНК - ActII при  $P/D=3$  (2), построенные по изменению поглощения растворов в  $\lambda=260$  нм, при той же ионной силе (б).



Подобный расчет был проведен нами при анализе температурных зависимостей для смесей ДНК-лиганд в 0,15 М NaCl (рис.11,а). На рис.11,б приведены кривые плавления этого же раствора и свободной ДНК, построенные в  $\lambda=260$  нм в УФ области спектра. Видно, что уже при  $P/D=3$  в растворах 0,15 М NaCl, в отличие от растворов в  $2 \times 10^{-2}$  М NaCl, мы фиксируем начало плавления ДНК в рассмотренной температурной области.

Зависимости  $\lg K_2$  и  $\lg K_3$  от абсолютной обратной температуры при низкой и высокой ионной силах, полученные по методике описанной выше для моделей I и II, приведены на рис.12,а,б и рис.13,а,б, соответственно. Поскольку зависимости констант для модели II линейны практически во всем интервале рассмотренных температур (рис.12,а,б), мы можем найти изменения энтальпии и энтропии комплексообразования двух типов комплексов ActII на ДНК (комплекс 1 и 2) по закону Вант Гоффа:

$$-RT \ln K = \Delta H - T \Delta S \quad (7)$$

Полученные значения  $\Delta H$  и  $\Delta S$  (для модели II) приведены ниже в таблице 2.

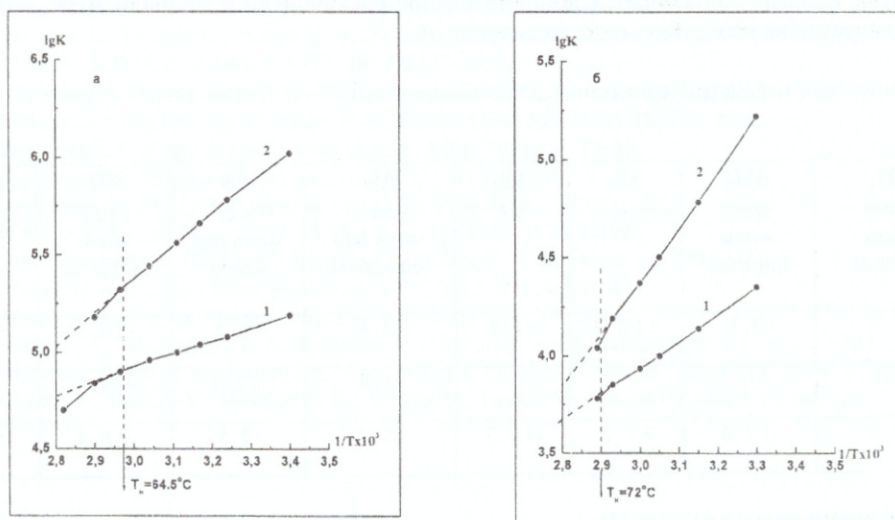


Рис.12. Зависимости логарифмов констант связывания  $K_2$ (1) и  $K_3$ (2) от абсолютной обратной температуры в растворе с концентрацией соли  $C_{NaCl} = 2 \times 10^{-2}$  М (а) и  $C_{NaCl} = 0.15$  М (б), рассчитанных по программе DALSMOD для модели II как описано выше.  $T_m$ - температура начала плавления нативной ДНК при тех же ионных силах.

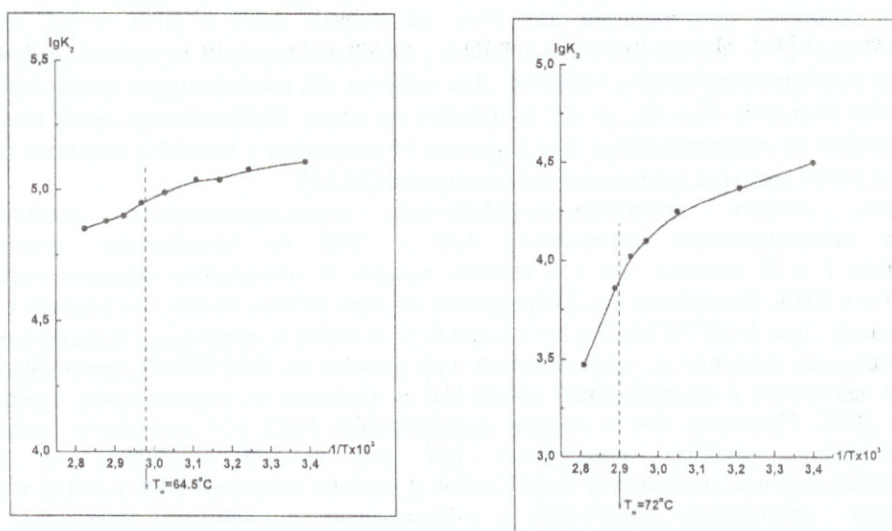


Рис.13. Зависимости логарифмов константы связывания  $K_2$  от абсолютной обратной температуры в растворе с концентрацией соли  $C_{NaCl} = 2 \times 10^{-2}$  М (а) и  $C_{NaCl} = 0.15$  М (б), рассчитанных по программе DALSMOD для модели I как описано выше.  $T_m$  как на рис. 12



Видно, что зависимости логарифмов констант связывания, полученных по модели I, не линейны в рассмотренном интервале температур и при низкой, и при высокой ионной силе (рис.13,а,б). Нелинейный характер зависимостей не позволяет нам воспользоваться методом Вант Гоффа для определения значений  $\Delta H$  и  $\Delta S$ . Это еще раз подтверждает сделанные нами ранее выводы, что использование модели I приводит к неадекватному описанию взаимодействия в системе ActII – ДНК.

Сравнивая полученные температурные зависимости констант  $K_2$  и  $K_3$  для комплексов 1 и 2 при разных ионных силах (рис.12,а,б), можно отметить, что комплекс 2 разрушается более интенсивно с ростом температуры, что существенно отражается на величинах энтальпии  $\Delta H_2$  (таблица 2). Наблюдаемый эффект можно объяснить изменениями свойств мест связывания  $n_3$ , которые предположительно зависят не только от вторичной, но и от третичной структуры молекулы ДНК. Следуя теориям, которые объясняют конформационные изменения в молекулах ДНК изменением степени гидратации низкомолекулярных противоионов при возрастании ионной силы и температуры [17], можно предположить, что третичная структура ДНК меняется за счет уменьшения экранирования фосфатных групп этими ионами. Наблюдается дополнительное раскручивание спирали ДНК, которое в большей степени сказывается на свойствах мест связывания  $n_3$ .

Таблица 2. Термодинамические параметры связывания для комплексов ДНК-ActII при низкой и высокой ионной силе (модель II).

Ионные силы (в М NaCl)	$\Delta H_1$ ккал/ моль лиганда	$\Delta H_2$ ккал/ моль лиганда	$\Delta S_1$ э.е	$\Delta S_2$ э.е	$\Delta H$ ккал/ моль пар основан.	$\Delta S$ э.е, моль пар основ.	$\delta H$ ккал/ моль лиганда	$\delta S$ э.е, моль лиганда
0,02	-3.3	-7,1	+12.0	+3.2	-3.4	+8.5	-10.3	+15.2
0,1 <sup>*)</sup>					-4.8	-12.1	-14.5	-36.6
0,15	-5.2	-13.2	+1.1	-19.3	-5.7	-2.5	-18.4	-18.2

<sup>\*)</sup> Данные получены калориметрически в работе [18].

Используя найденные значения  $\Delta H_1$ ,  $\Delta H_2$ ,  $\Delta S_1$ ,  $\Delta S_2$ , мы рассчитали суммарные значения  $\Delta H$  и  $\Delta S$  в пересчете на пару оснований, как  $\Delta H = (2\Delta H_1/n_2) + (\Delta H_2/n_3)$  и  $\Delta S = (2\Delta S_1/n_2) + (\Delta S_2/n_3)$ , и на моль лиганда, как  $\delta H = \Delta H_1 + \Delta H_2$  и  $\delta S = \Delta S_1 + \Delta S_2$  [19]. Эти величины  $\Delta H$  и  $\Delta S$ ,  $\delta H$  и  $\delta S$  в растворах 0.15 М NaCl сравнивались нами с данными полученными для этих же смесей ActII с ДНК в 0.1 М NaCl калориметрическим методом [18]. Можно отметить хорошее совпадение величин энтальпий, полученных по методу Вант Гоффа и калориметрическим методом. Для величин  $\Delta S$ , определенных этими методами, различия по абсолютной величине больше, но  $\Delta S$  совпадают по знаку. Наблюдаемые нами изменения знака  $\Delta S$  с положительного на отрицательному при переходе от растворов с низкой к высоким ионным силам фиксировалось и ранее для ряда лекарственных препаратов [20,21].

Таким образом, анализ спектрофотометрических концентрационных зависимостей комплексообразования актиноцинового антибиотика ActII с ДНК по программам оптимизации DALSMOD по моделям I и II показал, что (1) именно модель II наилучшим образом описывает связывание антибиотика с ДНК. Комплексы 1 и 2 образуются на двух разных местах связывания с  $n_2=2.9$  (внешний тип связывания) при  $2 \times 10^{-2}$  М NaCl и  $n_2=3.8$  при 0.15 М NaCl, и оптимальной величиной  $n_3=6$  пар оснований. Оптимальные значения  $n_2$ , определяемые при расчете по DALSMOD, увеличиваются с ростом  $C_{NaCl}$ . Это мы связываем с конкуренцией ионов  $Na^+$  и лигандов за отрицательно заряженные фосфаты на матрице ДНК. Показано, что с ростом концентрации NaCl обе константы связывания уменьшаются. Наблюдается линейная зависимость  $\lg K$  для каждой константы от  $\lg C_{NaCl}$ . Соответствующие наклоны прямых отличаются между собой и меньше величины 1.88, которая в теории Меннинга соответствует связыванию дикатионов с отрицательно заряженными матрицами ДНК. Используя вычисленные по программе DALSMOD при комнатных температурах значения параметров связывания и оптимальные значения  $\epsilon$  для разных типов комплексов, мы, зафиксировав эти значения, определили зависимости констант связывания  $K_2$  и  $K_3$  от температуры в растворах с  $2 \times 10^{-2}$  и 0.15 М NaCl. Из полученных линейных зависимостей  $\lg K$  от обратной абсолютной температуры по закону Вант Гоффа были вычислены термодинамические параметры комплексообразования  $\Delta H$  и  $\Delta S$  для двух разных типов комплексов. Было показано, что энтропийный фактор вносит существенный вклад в



комплексообразования, причем для второго типа комплексов величина  $\Delta S$  меняет знак с "+" на "-" при переходе от низких к высоким ионным силам.

Авторы выражают благодарность Глибину Е.Н. и Овчинникову Д.В. (Санкт - Петербургский государственный технический университет) за предоставленные препараты актиноциновых производных.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chaires J.B.//Curr.Opin.Struct.Biol., Drug-DNA interactions. 1998. 8. P. 314-320.
2. Intercalative binding of small molecules to nucleic acids. Graves D. E., Velea L. M. 2002. 27 p.
3. Excerpts from the annual research report for 1997 auckland cancer society research centre. Drug development programme.
4. Karapetian A.T. et //J.Biomol.Struct.Dyn. 1990. V.8. № 1. P. 123-130.
5. Peyratout C., Donath E., Daehne L.//J. Photochem. Photobiol. 2001. V.142. P.51-57.
6. Nyrgen J., Svanvik N., Kubista M.//Biopolymers. 1998. V.46. P.39-51.
7. Tuite E., Norden B.//J.Am.Chem.Soc.1994.116. P 7548-7556.
8. Antonov L., Gergov G., Petrov V., Kubista M., Nygren J.//Talanta. 1999. V.49. P.99-106.
9. Manning C.S.//Biopolymers. 1979. 18. P 2357-2358.
10. Глибин Е.Н, Овчинников Д.В., Плеханова Н.Г.// ЖОр.Х., Т.33. В.10. С 1573-1576.
11. Anticancer Drug Desing. Veselkov A.N., Davies D.B.: SEVNTU PRESS. 2002.
12. Круглова Е.Б. и др.//Біофізичний вісник. 2002. 1(10). С. 12-20.
13. Круглова Е.Б.//Біофізичний вісник. 2001. 1(8). С. 27-41.
14. Нечипуренко Ю.Д.// Молекуляр.биология.1984.Т.18.С.1066-1080.
15. McGhee J.D., von Hippel P.H.// J.Mol.Biol. 1974. 86. P. 469-489.
16. Solution equilibria. Hartley F., Burgess C., Alcock R.: Ellis Horwood. 1980. 360 p.
17. Шелкина А.К. и др.//Мол. Биология. 1977. Т.11. В.2. С.466-471.
18. Семенов М.А. и др.//Біофізичний вісник. 2001. 2(9). С. 40-44.
19. Marky L.A., Blumenfeld K.S., Breslauer K.J. //Nucleic Acids Research. V. 11. № 9. 1983. P. 2857-2870.
20. Sauer B.B., Flint R.A., Justice J.B., Trowbridge C.G.//Arch. Biochem. Biophys. 1984. V. 234. № 2. P. 580-584.
21. Kubota Y., Eguchi Y., Hashimoto K., Wakita M., Honda Y., Fujisaki Y.//Bull. Chem. Soc. Japan. 1976. V.49. № 9. P. 2424-2426.