

УДК 577.323

СПЕКТРОСКОПИЧЕСКОЕ И КАЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СИСТЕМЫ ФЛАВИН-МОНОНУКЛЕОТИД - ДНК

Е.Г. Березняк, Н.А. Гладковская, Е.В. Духопельников, А.С. Хребтова, А.В.Зинченко*

*Институт радиопластики и электроники НАН Украины,
ул.Ак.Проскуры, 12, г.Харьков, 61085
e-mail: berez@ire.kharkov.ua*

**Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины,
ул.Переяславская, 23, г.Харьков, 61015*

Поступила в редакцию 7 июня 2010 г.

Принята 19 июня 2010 г.

Методами дифференциальной сканирующей калориметрии, спектрофотометрии в видимой области и флюоресцентной спектроскопии проведено исследование взаимодействия флавин-моноклеотида (ФМН) с ДНК. Показано, что термодинамические параметры плавления свободной ДНК и ДНК в смеси с ФМН, практически не отличаются. Рассчитанная из спектрофотометрических данных величина константы связывания ФМН с ДНК составила приблизительно 50 M^{-1} , что на несколько порядков ниже, чем константы связывания биологически активных лигандов с ДНК и константы гетероассоциации лигандов с ФМН.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: флавин-моноклеотид, ДНК, калориметрия, спектроскопия, параметры связывания.

СПЕКТРОСКОПІЧНЕ ТА КАЛОРИМЕТРИЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ СИСТЕМИ ФЛАВІН-МОНОНУКЛЕОТИД - ДНК

К.Г. Березняк, Н.О. Гладковська, Е.В.Духопельников, Г.С. Хребтова, О.В. Зінченко¹

Институт радіофізики та електроніки НАН України, вул.Ак.Проскури, 12, Харків, 61085

*¹Институт проблем криобіології та криомедицини НАН України, вул.Переяславська, 23, Харків, 61015
e-mail: berez@ire.kharkov.ua*

Методами диференційної скануючої калориметрії, спектрофотометрії та флюоресцентної спектроскопії проведено дослідження взаємодії флавін-моноклеотида (ФМН) з ДНК. Показано, що термодинамічні параметри плавлення вільної ДНК практично не відрізняються від параметрів плавлення ДНК у суміші з ФМН. Константу зв'язування ФМН з ДНК розраховано з спектрофотометричних даних. Величина константи становить приблизно 50 M^{-1} , що на декілька порядків нижче, ніж константи зв'язування біологічно активних лігандів з ДНК та константи гетероасоціації лігандів з ФМН.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: флавін-моноклеотид, ДНК, калориметрія, спектрофотометрія, параметри зв'язування.

SPECTROSCOPIC AND CALORIMETRIS INVESTIGATION OF FLAVIN-MONONUCLEOTIDE - DNA SYSTEM

E.G. Bereznyak, N.A. Gladkovskaya, E.V. Dukhopelnikov, A.S. Khrebtova, A.V. Zinchenko¹

Institute of Radiophysics and Electronics, NAS of Ukraine, 12 Ak. Proskura Str., Kharkov, 61085, Ukraine

¹Institute of Problems of Cryobiology and Cryomedicine, NAS of Ukraine, 23 Pereyaslavskaya st., Kharkov, 61015, Ukraine

e-mail: berez@ire.kharkov.ua

The interaction of flavin – mononucleotide (FMN) with salmon testes DNA is investigated by differential scanning calorimetry, spectrophotometry and fluorescent spectroscopy. It is shown that addition of FMN to DNA doesn't change DNA melting parameters significantly. The binding constant $K = 50 \text{ M}^{-1}$ for the interaction of FMN with DNA is calculated from spectrophotometric data. Such value of the binding constant is incomparably smaller than binding constants for biologically active ligand to DNA and the constants for ligand - FMN heteroassociation.

KEY WORDS: flavin - mononucleotide, DNA, calorimetry, spectrophotometry, binding parameters.

Рибофлавин и его производные играют важную роль в многочисленных биохимических процессах [1]. Флавин-мононуклеотид представляет основную форму, в которой рибофлавин находится в живых клетках и тканях. Известно, что рибофлавин и ФМН могут влиять на биологическую активность лекарственных веществ (лигандов), снижая их токсичность. Основными молекулярными механизмами изменения токсичности антибиотиков в присутствии кофеина, витаминов и других активных соединений являются гетероассоциация (интерцепторный механизм) и конкуренция за места связывания с ДНК (протекторный механизм).

Гетероассоциация рибофлавина и ФМН с различными мутагенными и противоопухолевыми ароматическими соединениями исследована достаточно широко. Было показано, что величины констант связывания ФМН с лигандами составляют 10^2 - 10^4 M^{-1} [2-5]. Это свидетельствует об образовании энергетически прочных гетерокомплексов, т.е. о интерцепторном механизме влияния рибофлавина и ФМН на эффективность действия биологически активных веществ.

С другой стороны, рибофлавин [6] и ФМН [7] могут взаимодействовать непосредственно с нуклеиновыми кислотами (НК) и, как следствие, конкурировать с биологически активными лигандами за места связывания на НК, т.е. проявлять протекторные свойства. Так, в работе [7] с помощью метода ЯМР спектроскопии было определено, что величина константы связывания ФМН с коротким фрагментом ДНК составляет $\sim 8 \times 10^3$ M^{-1} . В тоже время авторы работы [8], не смогли оценить константу связывания рибофлавина с ДНК из данных флюоресценции, вследствие его очень слабого связывания. Вывод о слабом связывании рибофлавина с ДНК также сделан в работе [9]. Таким образом, имеющиеся в литературе данные о механизмах взаимодействия рибофлавина и ФМН с нуклеиновыми кислотами противоречивы.

В настоящей работе нами проведены спектроскопические и калориметрические исследования взаимодействий в системе высокополимерная ДНК - ФМН для того, чтобы оценить возможность проявления флавин-мононуклеотидом протекторных свойств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы коммерческая ДНК из спермы лосося фирмы "Serva" и флавин-мононуклеотид (ФМН) фирмы "Fluka" без дополнительной очистки. Структурная формула ФМН приведена на рис. 1. Все исследования смесей ФМН- ДНК проведены в 0,1М фосфатном буферном растворе ($2,5 \times 10^{-3}$ М KH_2PO_4 , $2,5 \times 10^{-3}$ М Na_2HPO_4 , рН=6,86) при двух значениях ионной силы $I \approx 0,023$ М и $I \approx 0,19$ М.

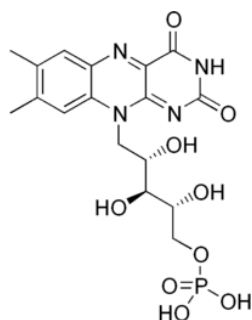


Рис.1. Структурная формула флавин-мононуклеотида (ФМН).

Измерения теплопоглощения свободной ДНК и ДНК в смеси с ФМН при различных соотношениях молярных концентраций ФМН и ДНК (D/P) проведены на дифференциальном сканирующем микрокалориметре DASM-4 при скорости прогрева растворов 1 град/мин. Концентрация ДНК в растворах составляла 3×10^{-3} М.

Зависимости избыточной молярной теплоемкости от температуры получены с учетом базовой линии, проведенной между точками, соответствующими температурам начала и конца перехода. Расчет термодинамических параметров связывания ΔH , ΔG , ΔS из данных ДСК калориметрии для смесей ФМН-ДНК был проведен по стандартным уравнениям [10].

Измерения спектров поглощения смесей ДНК-ФМН в широком интервале соотношений молярных концентраций ДНК и ФМН (P/D) проведены на спектрофотометре "Specord M40" (Германия) в видимой и УФ областях спектра. При определении концентрации компонентов использовали значения молярного коэффициента экстинкции для ДНК $\varepsilon_{260}=6.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [11] и ФМН $\varepsilon_{445}=1.25 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [12].

Спектры флуоресценции получены на спектрофлуориметре «Hitachi F-4010» при длине волны возбуждающего света 430 нм. Квантовый выход ФМН в смеси ФМН-ДНК рассчитывался как отношение интегральной интенсивности спектра флуоресценции к интенсивности поглощения при 430 нм. Спектры флуоресценции нормированы на величину относительного квантового выхода флуоресценции ФМН, равную 0,26 [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2а представлены результаты микрокалориметрической регистрации процесса теплопоглощения свободной ДНК и ДНК в смеси с ФМН в растворе с ионной силой $I \sim 0,023 \text{ M}$. Добавление ФМН приводит к небольшому увеличению энтальпии плавления и сдвигу кривой теплопоглощения ДНК в высокотемпературную область. Зависимость энтальпии, энтропии, свободной энергии и температуры плавления от D/P представлена на рис. 2б. Видно, что с ростом относительной концентрации ФМН происходит увеличение всех термодинамических параметров плавления ДНК, и при D/P = 5 зависимости выходят на насыщение. Наблюдаемые изменения термодинамических параметров плавления ДНК могут быть вызваны как непосредственным взаимодействием ФМН с полинуклеотидной матрицей, так и увеличением общей концентрации ионов Na^+ в растворе вследствие диссоциации натриевой соли ФМН. Так, при условии полной диссоциации ФМН, добавление лиганда до D/P = 5 приводит к увеличению ионной силы раствора на 60%. Согласно эмпирической формуле для расчета температуры плавления ДНК в зависимости от ионной силы раствора и нуклеотидного состава $T_m = 176 - (2,6 - X_{GC})(36 - 7,04 \lg \text{Na}^+)$ [14, 15], такое увеличение ионной силы должно приводить к росту температуры плавления на 4°C, а полученное нами экспериментальное изменение температуры плавления составляет 3°C. Для других значений D/P рассчитанные и экспериментальные изменения температуры плавления ДНК также хорошо согласуются. Следовательно, в растворах с ионной силой $I = 0,023 \text{ M}$ изменения термодинамических параметров плавления ДНК в смеси с ФМН по сравнению со свободной ДНК могут быть вызваны увеличением концентрации ионов Na^+ .

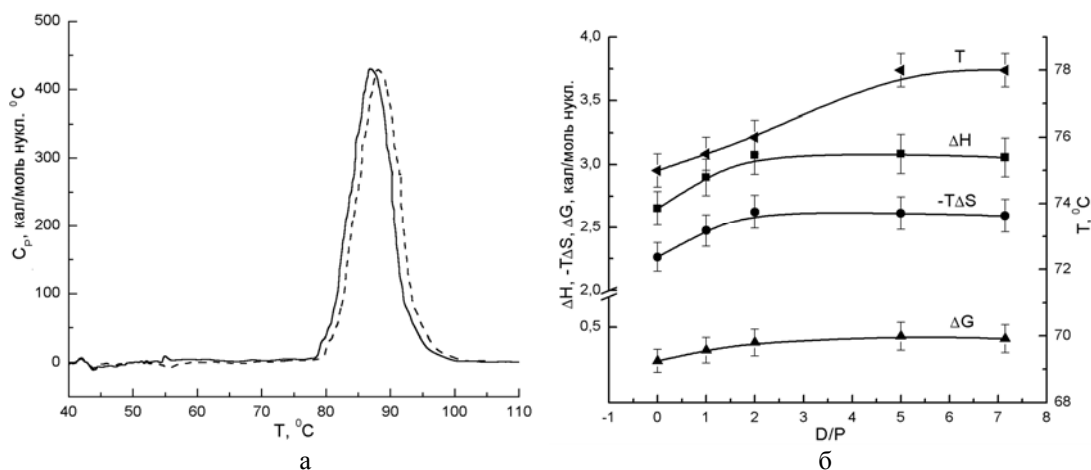


Рис. 2. Кривые теплопоглощения свободной ДНК (—) и ДНК в смеси с ФМН (---) при $D/P = 5$ в растворах с ионной силой 0,023 М (а) и зависимость термодинамических параметров и температуры плавления ДНК от D/P (б) в растворах с ионной силой 0,023 М.

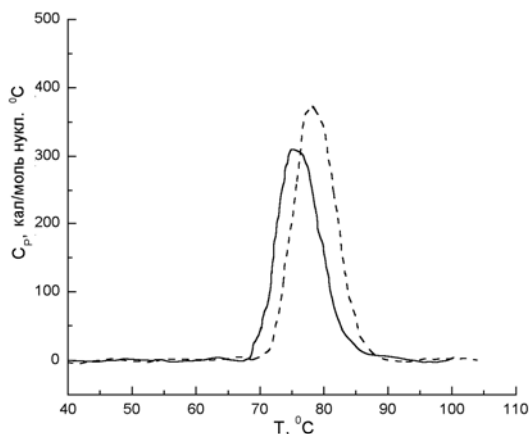


Рис. 3. Кривые теплопоглощения свободной ДНК (—) и ДНК в смеси с ФМН (---) в растворах с ионной силой 0,19 М.

Для проверки этого предположения нами получены кривые теплопоглощения свободной ДНК и ДНК в смеси с ФМН при ионной силе $I \sim 0,19$ М (рис.3). В этом случае добавление ФМН до $D/P = 5$ увеличивает ионную силу только на 8%. Из рис. 3 видно, что термодинамические параметры плавления свободной ДНК и ДНК при $D/P = 5$ практически не отличаются. Рассчитанный по эмпирической формуле и экспериментально наблюдаемый рост температуры плавления ДНК при $D/P = 5$ составляет менее 1°C .

Таким образом, основным фактором, вызывающим изменение термодинамических параметров плавления ДНК в смеси с ФМН, является увеличение ионной силы раствора вследствие диссоциации натриевой соли ФМН.

В отличие от калориметрии, которая регистрирует изменения, происходящие с полинуклеотидной матрицей при взаимодействии с лигандом, спектрофотометрия в видимой области спектра отражает изменения, происходящие с лигандом при связывании с ДНК. На рис. 4а приведены спектры поглощения и спектры люминесценции свободного ФМН и смеси ДНК — ФМН в интервале значений P/D от 0 до 75. Видно, что добавление ДНК приводит к небольшому увеличению поглощения ФМН без изменения положения максимума полосы. Также наблюдается незначительное тушение флуоресценции ФМН в смеси с ДНК по сравнению со свободным ФМН. Зависимости значений молярного коэффициента экстинкции и величины относительного квантового выхода смесей ДНК - ФМН при увеличении концентрации ДНК представлены на рис. 4б.

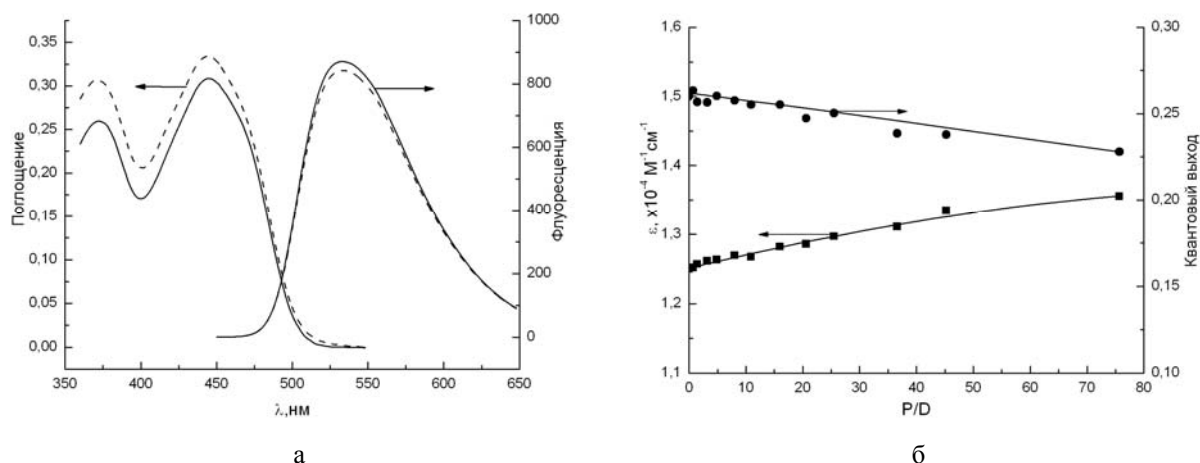


Рис.4. Спектры поглощения и спектры люминесценции смесей ДНК-ФМН при $P/D = 0$ (—) и $P/D = 75$ (---) (а); зависимость молярного коэффициента экстинкции смесей ФМН-ДНК ($\lambda = 445$ нм) и квантового выхода ФМН от P/D (б).

Аппроксимируя спектрофотометрические экспериментальные данные с помощью уравнения Мак-Ги [16], мы получили величины молярных коэффициентов экстинкции и константы связывания для смесей ФМН-ДНК. Полученная зависимость молярного коэффициента экстинкции от соотношения концентраций P/D в $\lambda = 445$ нм представлена на рис.5.

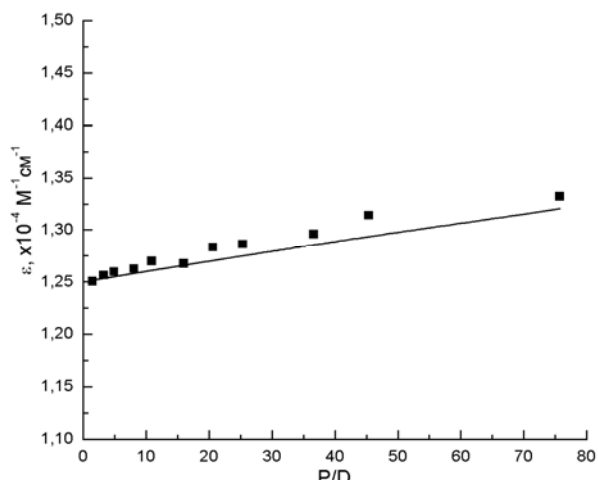


Рис. 5. Экспериментальная и расчетная зависимость молярного коэффициента экстинкции смесей ФМН-ДНК ($\lambda = 445$ нм) от P/D .

Рассчитанная величина константы связывания составила приблизительно 50 M^{-1} , в то время как величины констант связывания биологически активных лигандов с ДНК находятся в пределах $10^4 - 10^7 \text{ M}^{-1}$ [17,18]. Такое невысокое значение константы связывания ФМН с ДНК позволяет предположить, что молекулы ФМН не могут конкурировать с биологически активными лигандами за места связывания на ДНК.

в данной работе с имеющимися вывод о том, что ФМН влияет на биологическую активность лигандов, проявляя именно интерцепторные свойства путем образования гетероассоциатов лиганд - ФМН. Протекторными свойствами ФМН можно пренебречь, поскольку измеренная нами константа связывания ФМН с ДНК оказалась на несколько порядков ниже констант связывания ФМН с большинством известных лекарственных препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. L. Vergani, M. Barile, C. Angelini, A.B. Burlina, L. Nijtmans, M.P. Freda, C. Brizio, E. Zerbetto, F. Dabbeni -Sala. Riboflavin therapy. Biochemical heterogeneity in two adult lipid storage myopathies// Brain. - 1999. - Vol. 122. - №. 12. - P. 2401-2411.
2. M.P. Evstigneev, Yu.V. Mykhina, D.B. Davies. Complexation of daunomycin with a DNA oligomer in the presence of an aromatic vitamin (B2) determined by NMR spectroscopy// Biophys. Chemist. - 2005. - V. 118. - P. 118-127.

3. M.P. Evstigneev, Yu.V. Mukhina, D.B. Davies. ¹H NMR study of the hetero-association of flavin-monomonucleotide with mutagenic dyes: ethidium bromide and proflavine// *Mol. Phys.* – 2006. – V. 104. – P. 647–654.
4. A.N. Veselkov, M.P. Evstigneev, A.O. Rozvadovska, Yu.V. Mukhina, D.B. Davies. A structural and thermodynamic analysis of novatrone and flavin mononucleotide heteroassociation in aqueous solution by ¹H NMR spectroscopy// *Russ. J. Bioorgan. Chem.* – 2005.-V. 31.- P. 453–459.
5. A.N. Veselkov, M.P. Evstigneev, A.O. Rozvadovskaya, Yu.V. Mukhina, K.A. Rybakova, D.B. Davies, ¹H NMR analysis of the complex formation of aromatic molecules of antibiotic and vitamin in aqueous solution: Heteroassociation of actinomycin D and flavin mononucleotide// *Biophysics.* -2005.-V. 50. - P. 20–27.
6. D.J. Patel, A.K. Suri. Structure, recognition and discrimination in RNA aptamer complexes with cofactors, amino acids, drugs and aminoglycoside antibiotics // *J. Biotechnol.* - 2000. - V. 74(1). - P. 39-60.
7. M.P. Evstigneev, Yu.V. Mukhina, D.B. Davies. Complexation of daunomycin with a DNA oligomer in the presence of an aromatic vitamin (B2) determined by NMR spectroscopy// *Biophys. Chemist.* -2005.-V. 118.- P. 118–127.
8. N. Dardare, M.S. Platz. Binding Affinities of Commonly Employed Sensitizers of Viral Inactivation// *Photochemistry and Photobiology.* – 2002. - V. 75(6). - P. 561–564.
9. K. Kuratomi, Y. Kobayashi. Studies on the interactions between DNA and flavins// *Biochem. Biophys. Acta.*- 1977. -V. 476.- P. 207–217.
10. Е.Г. Березняк, Н.А. Гладковская, Е.В. Духопельников, А.С. Хребтова, А.В. Зинченко. Особенности взаимодействия профлавина с ДНК при различных соотношениях их концентраций// *Биофизика.* - 2009. – Т. 54. - В.5. - С. 805-812.
11. F. Barcelo, D. Capo, J. Portugal. Thermodynamic characterization of the multivalent binding of chartreusin to DNA// *Nucleic Acids Research.* – 2002. - Vol. 30. - №. 20. - P. 4567-4573.
12. H. Grajek, I. Gryczynski, P. Wojarski, Z. Gryczynski, Sh. Bharill, L. Kulak. Flavin mononucleotide fluorescence intensity decay in concentrated aqueous solutions// *Chemical Physics Letters.* – 2007. – V. 439. - P. 151–156.
13. J. T. M. Kennis, S. Crosson, M. Gauden, I. H. M. van Stokkum, K. Moffat, R. van Grondelle Primary Reactions of the LOV2 Domain of Phototropin, a Plant Blue-Light Photoreceptor// *Biochemistry.* - 2003. - V. 42 (12). – P. 3385-3392.
14. А.Т. Карапетян, П.О. Вардеванян, М.Д. Франк-Каменецкий. Влияние концентрации ионов на теплоту перехода спираль-клубок ДНК// *Биополимеры и клетка.*- 1989. - Т.5. - № 5. - С. 31-37.
15. А.Т. Karapetian, P.O. Vardevanian, M.D. Frank-Kamenskii. Enthalpy of Helix-Coil Transition of DNA Dependence on Na⁺ Concentration and GC Content// *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 1990. - V. 8(1). - P. 131-138.
16. J.D. McGhee, P.H. von Hippel. Theoretical aspects of DNA-Protein interactions: Cooperative and non-cooperative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice// *J. Mol. Biol.* - 1974. – V. 86. - P. 469-489.
17. J.B. Chaires. Energetics of drug-DNA interactions// *Biopolymers.*- 1997. – V. 44(3). - P. 201-15.
18. L.-P. Lin, L.-S. Huang, C.-W. Lin, C.-K. Lee, J.-L. Chen, S.-. Hsu, Sh. Lin. Determination of Binding Constant of DNA-binding Drug to Target DNA by Surface Plasmon Resonance Biosensor Technology// *Current Drug Targets - Immune, Endocrine & Metabolic Disorders.* - 2005. - V. 5. - P. 61-72.