

УДК 577.32

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОИЗВОДНОГО АКТИНОЦИНА С МОЛЕКУЛАМИ ДНК ПРИ РАЗНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ ОДНОВАЛЕНТНЫХ ИОНОВ ЩЕЛОЧНЫХ МЕТАЛЛОВ Na⁺ И K⁺

Е.А. Минакова, Е.Б. Круглова

*Институт Радиофизики и Электроники НАН Украины, ул. Ак. Проскуры, 12, г. Харьков, 61085
evgenia_minakova@mail.*

Поступила в редакцию 25 мая 2009 г.

Принята 22 июня 2009 г.

Методом спектрофотометрического титрования исследовалось взаимодействие производного актиноцина ActII*, аналога актиномицина D, с ДНК из тимуса теленка. Были рассмотрены модели образования нескольких типов комплексов на полинуклеотидной матрице. Для выбора оптимальной модели комплексообразования была использована программа оптимизации спектрофотометрических концентрационных зависимостей DALSMOD. Расчет показал, что в системе ActII* - ДНК присутствуют, по крайней мере, три спектрофотометрически различимых типа комплексов. Ионы Na⁺ и K⁺ учитывались как конкуренты лиганду по одному из мест связывания. Логарифмы констант связывания при образовании каждого типа комплекса линейно зависят от логарифма концентраций NaCl и KCl в рассмотренном интервале ионных сил. Наклоны этих зависимостей различаются для ионов Na⁺ и K⁺.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: спектрофотометрия, нативная тимусная ДНК, производное актиноцина, ионные силы, параметры комплексообразования.

ACTINOCIN DERIVATIVE INTERACTION WITH DNA MOLECULES AT DIFFERENT CONCENTRATIONS OF MONOVALENT ALKALINE METALS IONS Na⁺ AND K⁺

E.A. Minakova, E.B. Kruglova

Institute of Radiophysics and Electronics of NAS of Ukraine, Ak. Proskuri str., 12, Kharkov, 61085

Spectrophotometric titration method is used to study of the actinocin derivative ActII*, analogue of the actinomycin D, interaction with calf thymus DNA. Models of several types of complexes forming between ligand and polynucleotide matrix are considered. DALSMOD optimization program of spectrophotometric concentration dependences is used to choose the optimal complexation model. The results of calculation are evidence of the three different spectral types of complexes in the system Act II* -DNA. Na⁺ and K⁺ ions are considered as competitors of the ligand by the one of binding sites. Logarithms of binding constants of each type of complexes depend linearly on the logarithm of NaCl and KCl concentrations in considered interval. The slopes of these dependences are different for Na⁺ and K⁺ ions.

KEW WORDS: spectrophotometry, native thymus DNA, actinocin derivative, ionic forces, complexation parameters.

ВЗАЄМОДІЯ ПОХІДНОГО АКТИНОЦИНА З МОЛЕКУЛАМИ ДНК ПРИ РІЗНИХ КОНЦЕНТРАЦІЯХ МОНОВАЛЕНТНИХ ІОНІВ ЛУЖНИХ МЕТАЛІВ Na⁺ ТА K⁺

Є.О. Мінакова, Є.Б. Круглова

Інститут Радіофізики та Електроніки НАН України, вул. Ак. Проскури, 12, м. Харків, 61085

Методом спектрофотометричного титрування досліджувалась взаємодія між похідним актиноцина Act II*, аналога актиномицину D з ДНК з тимуса теляти. Були розглянуті моделі утворення декількох типів комплексів на полінуклеотидній матриці. Для вибору оптимальної моделі комплексоутворення була використана програма оптимізації спектрофотометричних концентраційних залежностей DALSMOD. Показано, що у системі Act II* - ДНК присутні як найменш три спектрофотометрично різних типів комплексів. Іони Na⁺ та K⁺ були розглянуті як конкуренти ліганду по одному з місць зв'язування. Логарифми констант зв'язування при утворенні кожного типу комплексу лінійно залежать від логарифму концентрацій NaCl та KCl у розглянутому інтервалі іонних сил. Наклони цих залежностей різні для іонів Na⁺ та K⁺.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: спектрофотометрія, нативна тимусна ДНК, похідне актиноцина, іонні сили, параметри комплексоутворення.

Одновалентные ионы щелочных металлов играют важную роль во взаимодействии ДНК с биологически активными молекулами в водных растворах. Их влияние на формирование комплексов между лигандом и ДНК до сих пор до конца не исследовано. Изучение взаимодействия ионов одновалентных металлов с ДНК различными методами дает разные последовательности воздействия ионов [1-9]. В данной работе методом спектрофотометрического титрования мы исследовали влияние солей натрия и калия на параметры связывания положительно заряженного производного актиноцина ActII* (рис. 1), поглощающего в видимой области спектра, с нативной тимусной ДНК. Как было показано нами ранее [10], производные актиноцина с разной длиной боковых цепей связываются с ДНК по типу интеркаляции, а также могут образовывать другие типы комплексов. Поэтому, такие лиганды могут быть удобными модельными соединениями при анализе влияния ионов на разные механизмы связывания лигандов с полинуклеотидами.

Хорошо известно, что не только производные актиноцина, но и многие другие интеркалирующие лиганды при взаимодействии с ДНК в широкой концентрационной области могут образовывать несколько различных типов комплексов, т.е. проявлять мультимодальность связывания [11-14]. Тем не менее, большинство методик оценки спектральных и термодинамических параметров связывания таких лигандов [15-17] учитывают образование только одного типа комплекса, т.е. с их помощью можно находить лишь некоторые усредненные параметры взаимодействия.

Для более детальной оценки параметров связывания в системах лиганд - ДНК нами был разработан новый метод анализа данных спектрофотометрического титрования с учетом мультимодального и кооперативного связывания лигандов с полинуклеотидами [10, 18]. Он базируется на расчете точных концентраций свободного лиганда и каждого из комплексов в исследуемых смесях по уравнениям МакГи фон Хиппела, которые необходимы для определения параметров связывания [16]. Учет влияния одновалентных ионов на комплексообразование ActII* с ДНК осуществляется с помощью модели конкурентного связывания [17], согласно которой катионы щелочных металлов рассматриваются как конкуренты лиганду за места связывания на полинуклеотидной матрице. Основываясь на многочисленных данных о том, что ионы щелочных металлов могут связываться с ДНК не только за счет электростатического взаимодействия с фосфатными группами, но также и с атомами азотистых оснований [19-21], можно предположить, что они могут быть конкурентами лиганду и при его интеркаляции в ДНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали коммерческую ДНК из тимуса теленка фирмы "Serva". Производное актиноцина ActII* (рис. 1) было синтезировано Глибиным и др. [22] и использовалось без дополнительной очистки. При определении концентраций лиганда и ДНК использовались значения молярных коэффициентов экстинкции $\epsilon_{400}=1.61 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [18] и $\epsilon_{260}=6.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [23], соответственно.

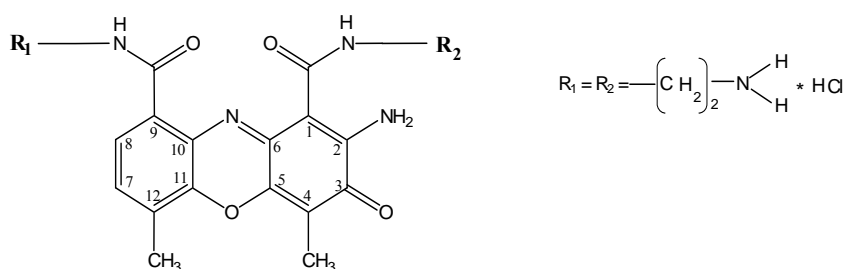


Рис. 1. Структурная формула производного актиноцина ActII*.

Спектрофотометрическое титрование проводилось путем последовательного добавления к раствору свободного лиганда точных объемов смеси ActII*-ДНК с той же концентрацией лиганда. Величины P/D рассчитывали как отношение общей концентрации ДНК, выраженной в молях фосфатов (C_p) к концентрации лиганда (C_D). Спектрофотометрические измерения в видимой и ультрафиолетовой областях проводили в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 10 мм на спектрофотометре Spcord M40 (Германия) в фосфатном буферном растворе ($2.5 \times 10^{-3} \text{M}$ KH_2PO_4 , $2.5 \times 10^{-3} \text{M}$ Na_2HPO_4), $\text{pH}=6,86$ (буфер А). Растворы с различными значениями ионных сил получали путем добавления к буферу А концентрированных растворов солей NaCl и KCl .

Для качественного сравнения связывания ActII* с ДНК в зависимости от разного содержания ионов Na^+ и K^+ в растворах, использовались изотермы Скэтчарда [15], построенные по уравнениям (1)-(3).

$$A = \varepsilon_b \times C_b + \varepsilon_f \times C_f \quad (1)$$

$$C_D = C_b + C_f \quad (2)$$

$$C_b = (A - \varepsilon_f \times C_D) / (\varepsilon_b - \varepsilon_f), \quad (3)$$

где A – поглощение смесей ДНК–лиганд при выбранной длине волны; ε_b , ε_f – молярные коэффициенты экстинкции связанного и свободного лиганда при той же длине волны; C_D – общая концентрация лиганда; C_b , C_f – концентрации связанного и свободного лиганда, соответственно. Определение параметров связывания ActII* с ДНК проводилось путем сравнения экспериментальных и расчетных спектров поглощения смесей в широкой области концентраций и длин волн, с использованием программы оптимизации DALSMOD [24]. Эта программа позволяет вычислять точные равновесные концентрации и молярные коэффициенты экстинкции свободного лиганда и каждого из его комплексов. Затем, с помощью закона Ламберта-Бэра $A_{ij} = \sum_k \varepsilon_{jk} \times C_{ki} \times l$ рассчитываются спектры смесей во всех длинах волн и. В данной

формуле ε_{jk} – молярный коэффициент экстинкции k -го компонента в j -ой длине волны, C_{ki} – равновесная концентрация соответствующей компоненты в растворе, а l – длина оптического пути. С помощью метода наименьших квадратов минимизируется отклонения между экспериментально наблюдаемыми и расчетными спектрами для всех растворов, и на каждом шаге итераций уточняются параметры взаимодействия – константы связывания и спектры комплексов. Равновесный состав смесей рассчитывается с помощью систем уравнений, соответствующих определенным моделям комплексообразования. На рис. 2 представлены рассмотренные нами модели, схематично описывающие возможные механизмы комплексообразования в системах лиганд - ДНК при мультимодальном связывании.

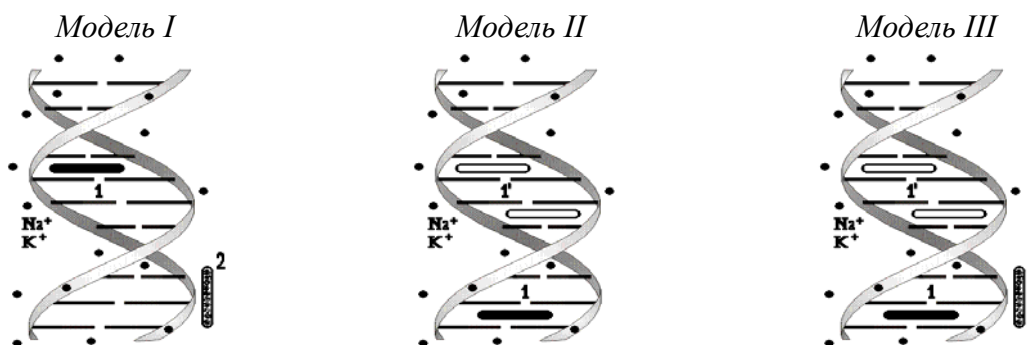


Рис. 2. Модели комплексообразования в системе Act II* - ДНК при мультимодальном связывании. комплекс 1- связанный с ДНК лиганд на месте связывания p_2 , комплекс 1' - лиганды, связанные на соседних местах связывания p_2 , комплекс 2 - связанный с ДНК лиганд на месте связывания p_3 , Na^+ , K^+ – одновалентные ионы.

Уравнения, позволяющие по представленным моделям рассчитать равновесный состав каждой смеси при заданных общих концентрациях лиганда (C_D^0), ионов Na^+ и K^+ ($C_{Na,K}$), фосфатов (C_P^0) и пар оснований (C_N^0) ДНК представлены ниже:

$$\frac{R_1}{m_1} = K_1 (1 - R_1 - R_2 n_2) \quad (4)$$

$$\frac{R_2}{m_2} = K_2 \left[\frac{1 - R_1 - R_2 n_2}{1 - R_2 n_2 + R_2 - \gamma \frac{\omega - 1}{\omega}} \right]^{n_2} \frac{\omega R_2^2}{\gamma} \quad (5)$$

$$\left(R_2 - \gamma \times \frac{\omega - 1}{\omega} \right)^2 = \frac{\gamma}{\omega} \left(1 - R_2 \times n_2 + R_2 - \gamma \times \frac{\omega - 1}{\omega} \right) \quad (6)$$

$$\frac{R_3}{m_2} = K_3 \left[\frac{1 - R_3 \times n_3}{1 - R_3 \times n_3 + R_3} \right]^{n_3} (1 - R_3 \times n_3 + R_3) \quad (7)$$

$$C_D = m_2 + 2K_D m_2^2 + R_2 C_N + R_3 C_P \quad (8)$$

$$C_{Na,K} = m_1 + R_1 \times C_N \quad (9)$$

где уравнения (4)-(6) описывают конкурентное связывание двух лигандов с ДНК [25] для случая, когда один из лигандов представляет собой одновалентный ион с местом связывания $n_1=1$ и константой K_1 . В уравнениях (4)-(9) используются следующие обозначения: K_2 – константа мономерного связывания лиганда при образовании первого типа комплекса с местом связывания n_2 пар оснований (bp); ω – фактор кооперативности, который характеризует возможность расположения лиганда рядом с уже связанным лигандом на месте n_2 ; K_3 – константа связывания лиганда при образовании второго типа комплекса с местом связывания n_3 ; R_1 , R_2 и R_3 – доли связанных с ДНК одновалентных ионов и ActII* в составе соответствующих комплексов; m_1 и m_2 – концентрации свободных одновалентных ионов и мономеров лигандов, соответственно. Во всех моделях учитывалось также образование свободных димеров лиганда по уравнению ($2m \rightarrow d$) с константой K_D . Константы димеризации и молярные коэффициенты экстинкции мономерной и димерной форм ActII* были определены в независимых экспериментах и рассчитаны при разных ионных силах растворов с помощью программы DALIS [26].

Возможность использования уравнений (4) – (9) для описания мультимодального связывания лигандов с полинуклеотидными матрицами была показана нами ранее [18, 27]. Уравнения (5), (6) описывают кооперативное связывание лиганда с полиэлектролитной матрицей [17] на месте связывания n_2 с фактором кооперативности ω . Уравнение (7) описывает некооперативное взаимодействие лиганда с фосфатами двойной спирали ДНК [16] на месте связывания n_3 . Уравнения (8), (9) отражают законы сохранения общих концентраций лиганда и одновалентных ионов. Уравнение (4) описывает связывание этих ионов с ДНК как конкурентов лиганду при образовании комплекса 1 (рис. 2).

По модели I связывание лиганда с ДНК происходит с образованием двух типов комплексов (комплекс 1 и 2) на независимых местах связывания n_2 и n_3 и описывается уравнениями (5), (7) и (8). По модели II (уравнения (5), (6), (8)) в системе образуются спектрально различные комплексы: мономерно связанный лиганд (комплекс 1) и лиганды, расположенные на соседних местах связывания (комплекс 1'). Различия в термодинамических параметрах этих комплексов характеризуются величиной фактора кооперативности. По модели III связывание лиганда с ДНК происходит с образованием

комплексов 1, 1' и 2 и описывается уравнениями (5) - (8).

Соответствие рассматриваемых моделей экспериментальным данным определялось путем сравнения факторов Гамильтона Q для каждой модели с предельными значениями факторов Гамильтона Q_{lim} , которые рассчитывались при каждом выходе из программы оптимизации с учетом ошибок в измерении оптической плотности (0,005) и общих концентраций (1%) [26]. Модель удовлетворяет экспериментальным данным, если $Q < Q_{lim}$. Процесс оптимизации констант и молярных коэффициентов экстинкции для разных моделей проводился на одной и той же базе данных при различных значениях параметров n_2 , n_3 и ω . При минимальном значении Q (Q_{min}) величины мест связывания n_2 , n_3 , фактор кооперативности ω и соответствующие им константы связывания и молярные коэффициенты экстинкции оптимальны [26].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 3 представлены спектры поглощения смесей производного актиноцина ActII* с ДНК в буфере А (рис. 3 а) и в растворах, приготовленных путем добавления к буферу А солей ионов Na^+ (рис. 3 б) и K^+ (рис. 3 в). Видно, что в спектрах поглощения смесей ActII*-ДНК как при низких, так и при достаточно высоких ионных силах наблюдаются две изобестические точки. Так, изобестическая точка в длинноволновой области, появляющаяся при низких значениях P/D ($0 < P/D < 5$), отражает переход лиганда из свободного в связанное состояние и сопровождается существенным падением поглощения. При $P/D \geq 5$ спектры поглощения ActII*-ДНК смещаются в длинноволновую область и появляется вторая изобестическая точка. Ее появление отражает наличие двух по-разному поглощающих комплексов при высоких концентрациях ДНК. Концентрация свободного лиганда становится предельно малой и практически не дает вклада в суммарное поглощение таких смесей.

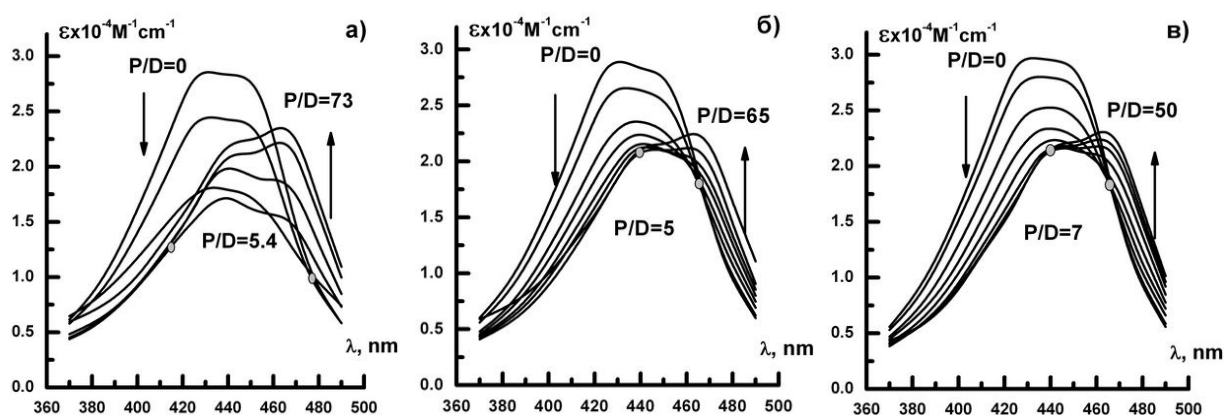


Рис. 3. Спектры поглощения смесей ActII*- ДНК в видимой области спектра в буфере А, $C_D=1,9 \times 10^{-5}$ М (а), в буфере А + 0.2 М NaCl, $C_D=2 \times 10^{-5}$ М (б) и в буфере А + 0.2 М KCl, $C_D=1,4 \times 10^{-5}$ М (в). Кружками отмечены изобестические точки.

Таким образом, в широкой области значений P/D в данной системе присутствует как минимум два разных типа комплекса ActII* с ДНК. Как было показано ранее [18], спектр поглощения с максимумом в длинноволновой области соответствует интеркаляционному типу связывания. Из рис. 3 видно также, что добавление в раствор солей одновалентных металлов (3б, 3в) изменяет вид спектров поглощения смесей. Это свидетельствует о влиянии катионов на комплексообразование ActII* - ДНК.

Для сравнения влияния катионов щелочных металлов Na^+ и K^+ на связывание ActII* с ДНК нами были построены концентрационные зависимости кажущихся молярных коэффициентов экстинкции в максимуме поглощения одного из комплексов ($\lambda=465$ нм)

при разных концентрациях добавляемых ионов (рис. 4). Видно, что ионы Na^+ и K^+ по-разному влияют на связывание лиганда с ДНК, причем различия увеличиваются с ростом концентрации добавляемых ионов.

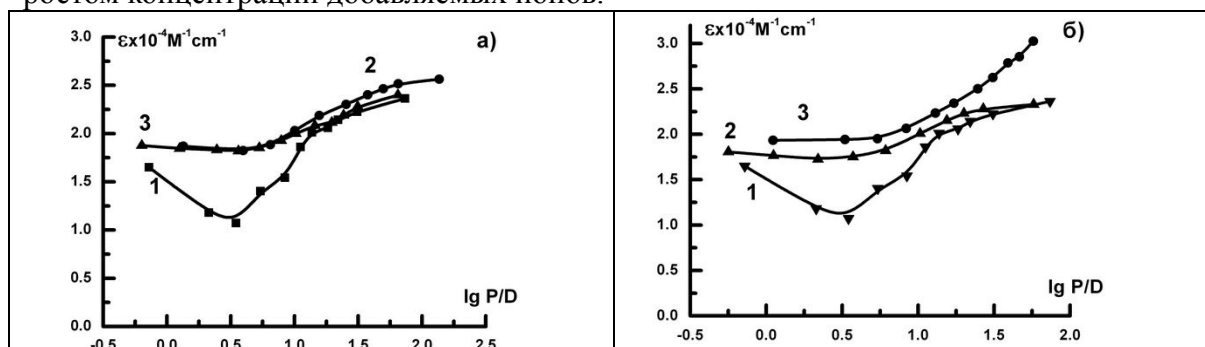


Рис. 4. Зависимости поглощения смесей ActII* - ДНК в $\lambda = 465$ нм от концентрации ДНК в буфере А, $C_D = 1,9 \times 10^{-5} \text{M}$ (1); (а) - в буфере А + 0.1 М NaCl, $C_D = 1,04 \times 10^{-5} \text{M}$ (2); в буфере А + 0.2 М NaCl, $C_D = 2 \times 10^{-5} \text{M}$ (3); (б) - в буфере А + 0.1 М KCl, $C_D = 2,4 \times 10^{-5} \text{M}$ (2); в буфере А + 0.2 М KCl, $C_D = 1,4 \times 10^{-5} \text{M}$ (3).

Обычно, при определении параметров связывания в системах лиганд - ДНК во многих работах используются изотермы Скэтчарда [28-30]. На рис. 5 приведены изотермы Скэтчарда для смесей ActII* - ДНК, построенные по уравнениям (1) - (3) при разных концентрациях добавляемых ионов Na^+ в $\lambda = 400$ нм, которая соответствует изобестической точке мономер-димерного равновесия свободного лиганда. Форма построенных нами изотерм (рис. 5) указывает на образование в смесях ActII* - ДНК нескольких типов комплексов. Поскольку уравнения (1)–(3) описывают взаимодействие лиганда с ДНК с образованием только одного типа комплекса, то изотермы Скэтчарда не могут быть использованы для точного описания процессов связывания [31].

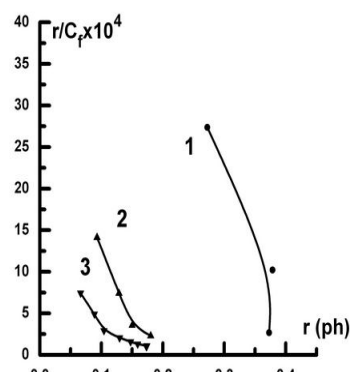


Рис.5. Изотермы Скэтчарда построенные при $\lambda = 400$ нм для смесей ActII* - ДНК, в буфере А, $C_D = 1,91 \times 10^{-5} \text{M}$ (1), при добавлении к буферу А 0.1 М Na^+ , $C_D = 1 \times 10^{-5} \text{M}$ (2) и 0.2 М Na^+ $C_D = 2 \times 10^{-5} \text{M}$ (3)

Точные значения констант и величин мест связывания для каждого типа комплексов, образующихся в смеси ActII* - ДНК при различных концентрациях ионов Na^+ и K^+ были получены с помощью программы оптимизации DALSMOD. Для выбора модели, наиболее корректно описывающей механизмы связывания ActII* с ДНК, нами было проведено сравнение минимальных значений факторов Гамильтона Q_{\min} . Поскольку в моделях 1 и 2 фактор Гамильтона Q представляется функцией двух переменных, для наглядности нахождения минимума мы использовали трехмерные диаграммы зависимости

Q от варьируемых параметров комплексообразования. Для модели I переменными были n_2 и n_3 , для модели II – n_2 и ω . Поскольку в модели III варьируемых параметров три (n_2 , n_3 и ω), то вначале мы находили оптимальные значения фактора кооперативности ω , для которого затем строили диаграмму зависимости Q от величин мест связывания n_2 и n_3 .

На рис. 6 показаны полученные трехмерные зависимости факторов Гамильтона Q , построенные для каждой модели, и соответствующие минимальным значениям Q_{\min} , спектры каждого из типов комплексов, образующихся в системе ActII* - ДНК в буфере А. Форма спектра комплекса 2, полученная по модели I свидетельствует о том, что эта модель не удовлетворяет экспериментальным данным. Модели II и III достаточно хорошо описывают наблюдаемые экспериментальные данные, что следует из сравнения Q_{II} и Q_{III} с Q_{lim} . Из этих моделей видно, что спектральные и термодинамические

параметры ActII*, связанного с ДНК в комплексах 1 и 1', отличаются. Отметим, что комплекс 1 с местом связывания $n_2=2-3$ bp может соответствовать комплексу по типу интеркаляции. Возможность кооперативного связывания ароматических лигандов по интеркаляционному типу (комплекс 1') была показана ранее [32].

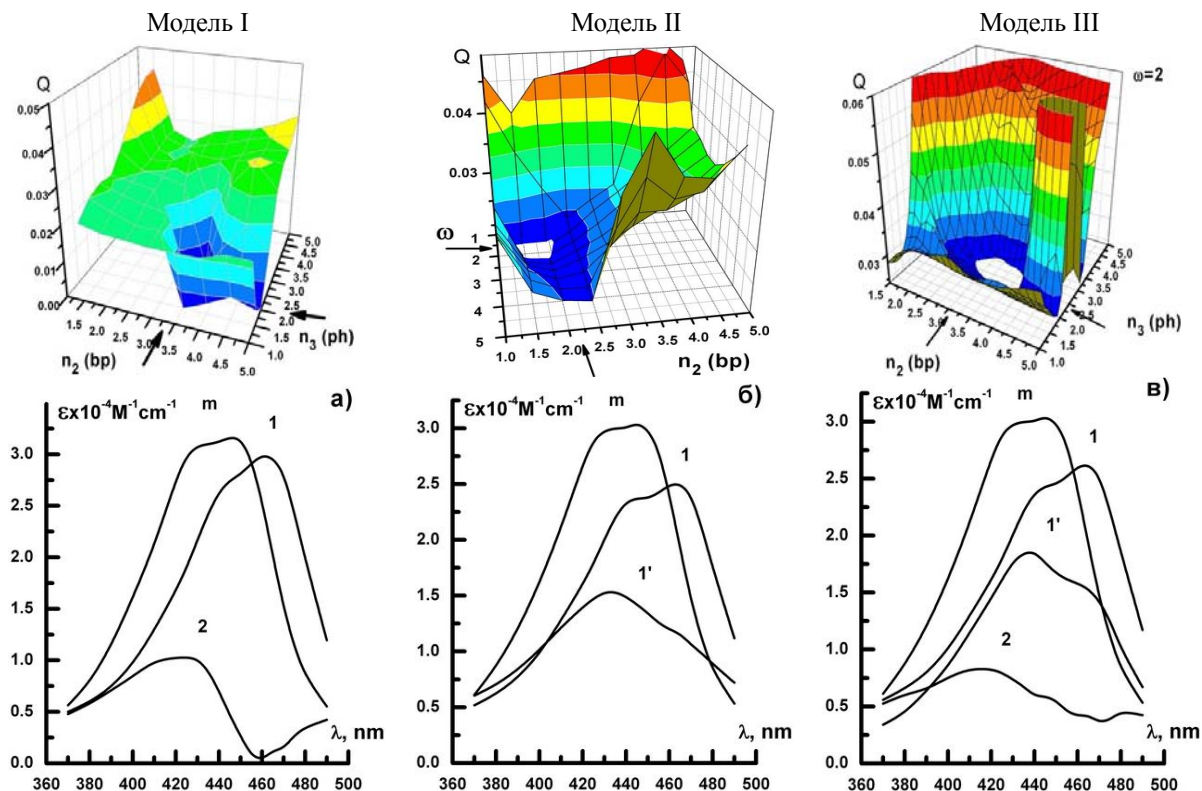


Рис. 6. Зависимость фактора Гамильтона Q от двух параметров связывания (n_2 и n_3 (модель I), n_2 и ω (модель II), и n_2 и n_3 при $\omega=2$ (модель III)) и оптимальные молярные коэффициенты экстинкции для различных типов комплексов ActII* с ДНК в буфере А, $C_D=1.91 \times 10^{-5} M$, рассчитанные по модели I (а), модели II (б) и модели III (в) при оптимальных параметрах связывания, определенных в минимумах зависимостей Q . 1-первый тип комплекса лиганда с ДНК, 1'-лиганды, связанные на соседних местах связывания по первому типу комплекса, 2-второй тип комплекса, m – мономерный свободный лиганд.

Полученная по модели III для комплекса 2 оптимальная величина места связывания $n_3 = 2.4$ фосфата, как и в случае других актиноциновых производных [18], характерна для комплексов по внешнему электростатическому типу. Поскольку в исследуемых нами системах кроме положительно заряженного лиганда присутствуют и катионы, мы считаем, что для анализа влияния на связывание по разным типам комплексов в системе Na^+ , K^+ - ActII* - ДНК более корректно использовать модель III.

По модели III нами были получены спектры комплексов и параметры связывания в системе ДНК - ActII* с разными концентрациями добавляемых ионов Na^+ и K^+ . На рис. 7 а, б представлены оптимальные спектры поглощения для смесей ActII* - ДНК с добавлением к буферу А растворов KCl. Найденные оптимальные величины констант и мест связывания позволяют для любых начальных концентраций реагирующих компонентов рассчитать равновесный состав смеси ActII* - ДНК. Зависимости относительных равновесных концентраций лиганда в составе комплексов по типу интеркаляции (1 и 1') и по типу внешнего связывания (2) от P/D представлены на рис.7 в, г. Видно, что во всем интервале P/D в растворе существуют три типа комплексов.

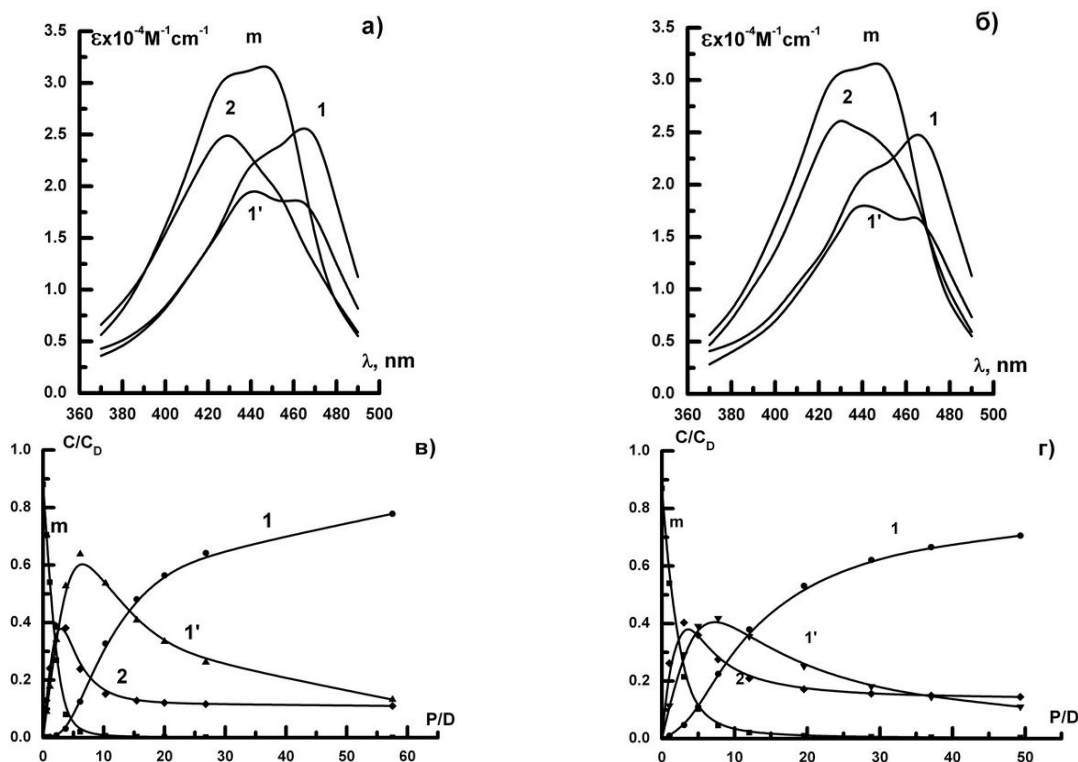


Рис. 7. Оптимальные величины молярных коэффициентов экстинкции для различных типов связывания ActII* с ДНК, рассчитанные по модели III при оптимальных значениях K_2 и K_3 в растворах с добавлением к буферу А 0.1 М KCl (а), $C_D=2.4 \times 10^{-5}$ М и 0.2 М KCl (б), $C_D=1.4 \times 10^{-5}$ М и соответствующие им зависимости равновесных концентраций разных типов комплексов от концентрации ДНК (в, г). Обозначения как на рис. 6.

Различия оптимальных спектров комплекса 2 при низкой (рис. 6 в) и более высоких концентрациях добавляемой соли (рис. 7 а, б) могут быть вызваны возможностью образования лигандом агрегатов по внешнему типу связывания [33], что не учитывается в рассмотренных моделях. Изменение концентрации добавляемой соли от 0.1 М до 0.2 М несущественно влияет на форму спектров комплексов (рис. 7 а, б).

Оптимальные величины параметров связывания, определенные по модели III для нескольких типов комплексов, образующихся в системах Act II* - ДНК при разных значениях ионных сил, представлены в таблице 1.

Табл. 1 Параметры связывания ActII* с ДНК, полученные при оптимизации спектрофотометрических концентрационных зависимостей по программе DALSMOD по модели III при различных ионных силах.

	ω	K_2	$n_2, \text{b.p.}$	K_3	N_3, ph
0.0075 М Na ⁺ , K ⁺	2	$8.9 \pm 1.6 \times 10^6$	3	$3.2 \pm 0.4 \times 10^5$	2.4
0.1 М Na ⁺	3	$4.7 \pm 0.3 \times 10^5$	3.5	$1.4 \pm 0.7 \times 10^4$	2.4
0.2 М Na ⁺	3	$1.7 \pm 0.6 \times 10^5$	4	$2 \pm 0.5 \times 10^4$	2.4
0.1 М K ⁺	2.5	$2.1 \pm 0.4 \times 10^6$	3	$1.1 \pm 0.7 \times 10^5$	2.2
0.2 М K ⁺	2	$1.2 \pm 0.6 \times 10^6$	3.5	$7.1 \pm 3.4 \times 10^4$	2

Увеличение концентрации ионов натрия и калия в растворе приводит к увеличению величин мест связывания n_2 и уменьшению константы связывания K_2 . Это свидетельствует о том, что ионы являются конкурентами лиганду по интеркаляционному типу связывания. Уменьшение константы K_3 может быть связано и с уменьшением образования агрегатов по внешнему типу связывания.

На рис. 8 представлены логарифмические зависимости констант связывания по типу интеркаляции от концентрации солей NaCl и KCl для систем ActII* с ДНК. Видно, что полученные зависимости линейны в рассмотренном интервале ионных сил и их наклоны отличаются для разных типов конкурирующих ионов. Большой наклон

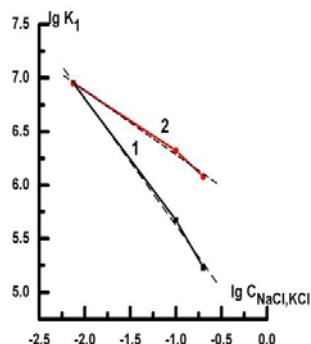


Рис. 8. Логарифмические зависимости констант связывания по типу интеркаляции лиганда ActII* с ДНК, от концентрации NaCl (1) и KCl (2), рассчитанные по модели III.

зависимости 1 (рис. 8) свидетельствует о более сильном влиянии ионов Na^+ на образование комплексов ActII* с ДНК, что согласуется с выводами работ [4, 5]. Однако, в ряде работ была получена другая последовательность активности ионов: $\text{Cs}^+ > \text{Li}^+ > \text{K}^+ > \approx \text{Na}^+$ [6-9]. В данном случае, более сильное влияние ионов Na^+ на комплексообразование с ДНК может быть связано с известной

GS специфичностью интеркаляционного связывания аналогов актиномина D [18] и разным предпочтительным связыванием с ДНК ионов Na^+ и K^+ [20].

ВЫВОДЫ

Таким образом, показано, что в широкой области соотношений P/D в растворах ActII* - ДНК при всех рассмотренных значениях ионных сил образуется более одного типа комплекса. Анализ концентрационных зависимостей спектров поглощения производного актиномина ActII* с ДНК по моделям I, II и III показал, что модель III наилучшим образом описывает связывание лиганда с ДНК. При увеличении концентраций ионов Na^+ и K^+ оптимальные значения n_2 увеличиваются, что связано с конкуренцией ионов за места связывания при образовании первого типа комплекса, а константы связывания для обоих типов комплексов, образующихся в системе Act II* - ДНК, уменьшаются. Наклон зависимостей констант связывания ActII* с ДНК от концентрации солей NaCl и KCl больше для смесей, содержащих ионы Na^+ , что свидетельствует о том, что ионы Na^+ больше влияют на связывание лиганда с ДНК, чем ионы K^+ .

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Korolev N., Lyubartsev A. P. et. al. // *Biophys. J.*, Vol. 77, 1999, P. 2736-2749.
2. Denisov V.P. and Halle B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, Vol. 97, 2000, P. 629-633.
3. Zinchenko A.A. and Kenichi Yoshikawa // *Biophys. J.*, Vol.88, 2005, P. 4116-4123.
4. Ross P.D., Scuggs R.L. // *Biopolymers*, Vol. 2, 1964, P. 79-89.
5. Strauss U.P., Helfgott C., Pink H. // *J.Phys.Chem.*, Vol. 71, 1967, P. 2550-2556.
6. Hanlon S. et. al. // *Biochemistry*, Vol. 14, 1975, P. 1648-1660.
7. Anderson P., Bauer W. // *Biochemistry*, Vol. 17, 1978, P. 594-601.
8. Bleam M.L., Anderson C.F., Record M.T. // *Proc.Natl.Acad.Sci USA*, Vol. 77, 1980, P.3085-3089.
9. Kuznetsov I.A. et al // *Reactive Polymers*, Vol. 3, 1984, P. 37.
10. Круглова Е.Б. и др. // *Биофизичний вісник*. 1(10), 2002, с. 12-20.
11. Karapetian A.T. et. al. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* Vol. 8. № 1, 1990, P. 123-130.
12. Tuite E., Norden B. // *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 116, 1994, P. 7548-7556.
13. Kubota Y. // *Bull. Chem. Soc. Japan.*, vol. 46, 1973, P. 2630-2633.
14. Sovenhasy K.M. // *Nucleic Acids Research*, Vol. 31, 2003, P. 2561-2569.
15. Scatchard G. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, Vol. 51, 1949, P. 660-672.
16. McGhee J.D., von Hippel P.H. // *J. Mol. Biol.*, Vol. 86, 1974, P. 469-489.
17. Нечипуренко Ю.Д. // *Мол. Биология*, 18, 1984, с.1066-1080.
18. *Anticancer Drug Desing.* // By eds. Veselkov A.N., Davies D.B.: SEVNTU PRESS. 2002. 259 p.
19. Tereshko et. al. // *Nucleic Acids Research*, Vol.29, 2001, P. 1208-1215.
20. Varnai P., Zakrzewska K. // *Nucleic Acids Research*, Vol. 32, 2004, P. 4269-4280.
21. Cheng Yu., Korolev N. and Nordenskiold L. // *Nucleic Acids Research*, Vol. 34, 2006, P. 686-696.

22. Кривцова М.А., Морошкина Е.Б. и др. // Мол.Биология, 16(1), 1982, с.149-155.
23. Muller W., Crothers D.M.// Eur.J.Biochem, V.54, 1975, P. 267-277.
24. Круглова Е.Б. // Біофізичний вісник. 1(8), 2001, с. 27 - 41.
25. Нечипуренко Ю.Д., Гурский Г.В. // Биофизика 48, 2003, с. 773-796.
26. Solution equilibria. Hartley F., Burgess C., Alcock R. // Ellis Horwood. 1980. 360 p.
27. Круглова Е.Б. и др. // Биофизика 50 (2), 2005, с. 243-254.
28. Shigeori Takenaka, et. al. // Analytical Sciences Vol.13, supplement 1997, P. 303-305.
29. Vardevanyan P. O. et. al. // Experimental and Molecular medicine, Vol. 35, 2003, P. 527-533.
30. Toshihiro Ihara et. al. // Nucleic Acids Research Supplement № 3, 2003, P. 85-86.
31. Sanders K. J., Wiles H., and Rodger A. // The Analyst, Vol. 126, 2001, P. 852-854.
32. Trieb M. et. al. // Nucleic Acids Research, Vol. 32, 2004, P. 4696–4703.
33. Круглова Е.Б. и др. // Биополимеры и клетка 21 (4) , 2005, с. 358-364.