

АНАЛИЗ КАЛОРИМЕТРИЧЕСКИХ ДАННЫХ ПО СВЯЗЫВАНИЮ МОНОМЕРНОГО БИСБЕНЗИМИДАЗОЛА, АНАЛОГА КРАСИТЕЛЯ ХЕХСТ 33258, С ПОЛИ(dA)·ПОЛИ(dT)

© 2017 г. Ю.Д. Нечипуренко, А.Д. Гужаев*, М.В. Ходьков, Я.В. Стирманов,
А.А. Иванов**, А.С. Крылов, А.Л. Жузе

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

**Московский физико-технический институт,*

141701, Долгопрудный Московской области, Институтский пер., 9

***НИИ Канцерогенеза Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина МЗ РФ,
115478, Москва, Каширское шоссе, 23*

E-mail: nech99@mail.ru

Поступила в редакцию 02.02.17 г.

На основании анализа калориметрических данных по обратному титрованию полимером поли(dA)-поли(dT) мономерного бисбензимидазола, аналога красителя Хехст 33258, проведена оценка энтальпии и энтропии связывания этого лиганда. Построена математическая модель, позволяющая на основании калориметрических данных определять термодинамические параметры связывания. Полученные результаты находятся в хорошем соответствии с данными по связыванию сходных соединений, полученными посредством спектrophотометрии. При помощи модели оценены параметры связывания с поли(dA)-поли(dT) димерного бисбензимидазола, состоящего из двух молекул мономерного бисбензимидазола, связанных между собой гибкой цепочкой. Сделан вывод о наличии разных типов комплекса такого лиганда с полимером.

Ключевые слова: Хехст 33258, модели связывания лигандов с ДНК, изотермическая титрационная калориметрия, математическое моделирование.

В настоящее время в молекулярной биофизике активно изучается взаимодействие различных низкомолекулярных органических соединений (лигандов) с ДНК. Эти соединения находят широкое применение в противоопухолевой и противовирусной терапии, а также в качестве ДНК-специфичных молекулярных зондов в медицинских и научных исследованиях. Перспективность развития исследований в данной области связана с возможностью данных соединений избирательно связываться с определенной последовательностью нуклеотидов. Подобные низкомолекулярные соединения, в отличие от традиционных препаратов, созданных на основе интеркаляторов и алкилирующих агентов, не повреждают ДНК, не искажают ее структуру, обычно легко выводятся из организма и не вызывают нежелательных реакций иммунного ответа. Поэтому большой интерес представляет конструирование и синтез низкомолекулярных органических соединений, которые могли бы

нековалентно и избирательно связываться с ДНК.

В цитологии в качестве ДНК-специфичной метки широко используется флуоресцентный краситель Хехст 33258 (Ht). Выбор Ht в качестве базовой молекулы для конструирования новых ДНК-специфичных лигандов обусловлен как формой молекулы, изогеометричной бороздке ДНК, так и АТ-специфичностью. Краситель Ht, являющийся мономерным бисбензимидазолом (МВ), обладает способностью нековалентно связываться с узкой бороздкой ДНК преимущественно в АТ-богатых участках. При связывании образуются две водородные связи между атомами азота N1 бензимидазольных гетероциклов Ht, с одной стороны, и атомами O2 тимина и/или N3 аденина ДНК – с другой [1–3]. Однако такое связывание является локальным и не может обладать большим сродством к ДНК.

В лаборатории ДНК-белковых взаимодействий Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН проводится изучение свойств лигандов, которые связываются с узкой

Сокращения: Ht – флуоресцентный краситель Хехст 33258, МВ – мономерный бисбензимидазол, ДВ – димерный бисбензимидазол.

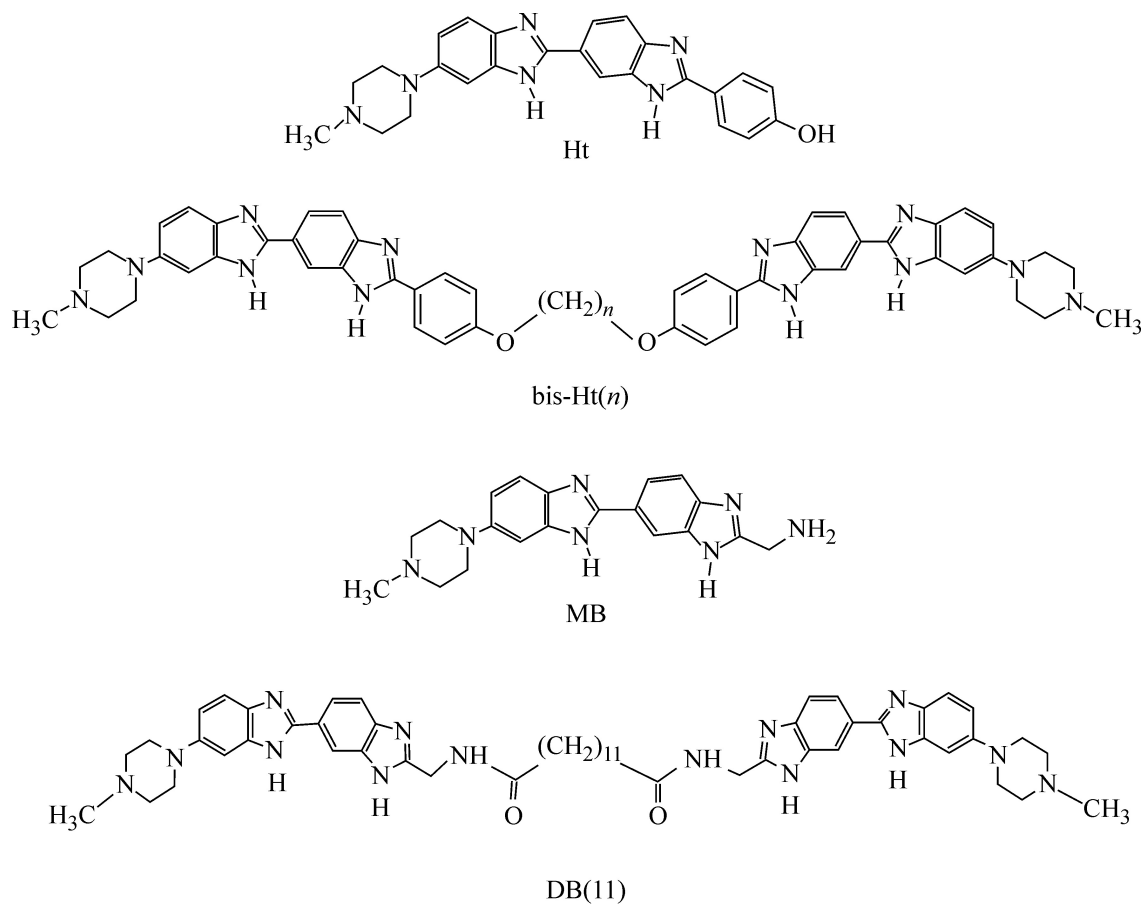


Рис. 1. Структуры мономерных и димерных бисбензимидазолов.

бороздкой ДНК. Ранее в этой же лаборатории были синтезированы молекулы бис-нетропсинов [4]. В дальнейшем был осуществлен синтез аналогов Ht – димерных бисбензимидазолов bis-Ht(*n*), где *n* – число метиленовых групп в ликере, связывающем две молекулы Ht [5,6]. Однако из-за большой склонности к образованию агрегатов эти соединения имели низкую растворимость в водных растворах. При создании новых ДНК-специфичных лигандов для увеличения растворимости гидрофобные фенильные ядра, присутствующие в молекулах bis-Ht(*n*), были заменены на гидрофильные CONH-группы. Встала задача детально изучить механизм взаимодействия и параметры комплекса ДНК с мономерным бисбензимидазолом [7], являющимся АТ-специфичным фрагментом в составе новых димерных бисбензимидазолов (DB). Такой мономер MB был использован в качестве основного структурного фрагмента для создания более сложных высокоспецифичных соединений DB(*n*) с ДНК [8] (см. рис. 1).

Изучение связывания лигандов с ДНК в растворе традиционно проводится при помощи

анализа изотерм адсорбции, полученных при помощи флуоресцентной спектроскопии или спектрофотометрии [9,10]. Однако изотермическая титрационная калориметрия позволяет получить более детальную информацию о связывании, чем спектрофотометрия. В данной работе мы провели анализ изотерм адсорбции MB с полимером поли(dA)-поли(dT), полученных при помощи такой калориметрии.

ТЕРМОДИНАМИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ АДСОРБЦИИ

Пусть молекулы лиганда MB с концентрацией *M* находится в ячейке, имеющей объем *V*. Затем в ячейку добавляют инъекцию полимера с объемом Δ*V*, причем эта инъекция вытесняет из ячейки в длинную сообщающуюся трубку соответствующий объем Δ*V*.

Предположим, что после каждой инъекции в растворе устанавливается равновесие. Лиганд связывается с полимером таким образом, что занимает при связывании *L* пар оснований, не давая связываться с этими основаниями другим

лигандам. Обозначим через ΔH изменение энтальпии при связывании одной молекулы лиганда на связывающем месте полимера, а через ΔS – изменение энтропии, которое происходит при таком связывании. Тогда константа связывания определяется через значения энтальпии и энтропии:

$$K = K_0 \exp\left(-\frac{\Delta G}{RT}\right) = K_0 \exp\left(-\frac{\Delta H - T\Delta S}{RT}\right), \quad (1)$$

где ΔG – свободная энергия связывания, T – температура раствора, R – газовая постоянная, $K_0 = 1 \text{ M}^{-1}$ – размерная константа.

Чувствительность калориметра настроена на измерение выделенной теплоты ячейки (без трубки). Обозначим через M_1 концентрацию лиганда в ячейке после первой инъекции. По закону сохранения массы имеем $MV = M_1V + M_1\Delta V$. Таким образом, $M_1 = M \frac{1}{1 + \frac{\Delta V}{V}}$.

После второй инъекции концентрация МВ будет составлять M_2 . По закону сохранения массы $M_1V = M_2V + M_2\Delta V$ и $M_2 = M_1 \frac{1}{1 + \frac{\Delta V}{V}}$.

Следовательно, после i -й инъекции концентрация МВ составит

$$M_i = M \left(\frac{1}{1 + \frac{\Delta V}{V}} \right)^i. \quad (2)$$

Рассчитаем концентрацию полимера в ячейке после i -й инъекции. Обозначим концентрацию полимера в объеме инъекции X . После первой инъекции концентрация полимера в ячейке будет равна $X_1 = X \frac{\Delta V}{V}$.

После второй инъекции концентрация полимера в ячейке будет равна $X_2 = X_1 + X \frac{\Delta V}{V}$.

Следовательно, после i -й инъекции полимера его концентрация в ячейке составит

$$X_i = X \frac{i\Delta V}{V}. \quad (3)$$

В экспериментах, как правило, объем первой инъекции намного меньше объема последующих, поэтому перепишем наше уравнение следующим образом:

$$X_i = X \frac{\Delta V_{\text{нач}}}{V} + X \frac{(i-1)\Delta V}{V}. \quad (4)$$

Мы предполагаем, что в условиях эксперимента происходит равновесное связывание. В эксперименте измеряется изменение энергии между i -й и $(i+1)$ -й инъекциями с учетом поправки на замещенный объем:

$$\Delta Q_i = Q_{i+1} - Q_i + \frac{\Delta V}{V} \left(\frac{Q_{i+1} - Q_i}{2} \right). \quad (5)$$

Обозначим степень заполнения полимера лигандом (отношение концентрации связанных молекул лиганда к концентрации молекул полимера в растворе) через θ_i . Тогда выражение для теплоты, которая выделяется при связывании, можно записать так:

$$Q_i = \theta_i X_i V \Delta H. \quad (6)$$

Для сопоставления данных с получаемыми на калориметре удобно пользоваться приведенной величиной – изменением теплоты на моль инъекции:

$$\Delta Q_{\text{mol}} = \frac{\Delta Q_i}{X \Delta V}. \quad (7)$$

Равновесные величины заполнения полимера лигандом и свободной концентрации лиганда в растворе связаны при помощи известного уравнения, описывающего связывание протяженного лиганда на полимере [11–13]:

$$\left\{ \begin{aligned} & \left[\frac{1 - \theta_i(L-1)}{1 - \theta_i L} \right]^{L-1} \cdot \frac{\theta_i}{1 - \theta_i L} = KM_{\text{free}} \\ & M_i = M_{\text{free}} + X_i \theta_i, \end{aligned} \right. \quad (8)$$

где M_{free} – концентрация свободных молекул МВ.

Система уравнений (1), (4)–(8) позволяет нам построить теоретические кривые для лигандов разной длины в координатах $\Delta Q_{\text{mol}}(W_i)$, где

$$W_i = \frac{X_i}{M_i} \quad (9)$$

это молярное число, т.е. отношение концентрации полимера в ячейке к концентрации лиганда МВ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальная методика работы с использованными в работе лигандами в растворе

описана в работе [9], измерения в нашем случае были проведены на изотермическом титрационном калориметре VP-ITC (MicroCal, США). Основные параметры модели (объем сосуда, объем инъекции, концентрация полимера и лиганда) соответствуют условиям эксперимента (состав буфера – 1 мМ какодилата, 25% трифторэтанола, 0,5–2% диметилсульфоксида, pH 7,0; $\Delta V_{\text{нач}} = 3$ мкл; $\Delta V = 5$ мкл; $V = 1,345$ мл).

В случае двух рассматриваемых лигандов MB и DB(11) концентрация лиганда в ячейке была одинакова: $M = 0,01$ мМ. В случае MB концентрация полимера поли(dA)-поли(dT) в объеме инъекции была $X = 0,8$ мМ, а в случае DB(11) концентрация полимера $X = 0,693$ мМ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Система уравнений (1), (4)–(8) представляет шесть уравнений для девяти неизвестных. Математическое моделирование в среде MATLAB позволяет нам решить эти уравнения для заданных параметров (размер лиганда L , т.е. число реакционных центров, которые занимает лиганд при связывании; ΔH и ΔS). Принципы решения этих уравнений изложены в работах [14,15].

Наилучшее совпадение экспериментальных данных и теоретических кривых получается при следующих значениях параметров (мы можем их определить, минимизируя при помощи метода наименьших квадратов отклонение теоретической кривой от экспериментальной): $L = 3$, $\Delta S = 0,0104$ ккал/(моль·К), $\Delta H = -4,76$ ккал/моль.

Из рис. 2 видно, что экспериментальной зависимости $\Delta Q_{\text{mol}}(W_i)$ наилучшим образом соответствует теоретическая кривая при $L = 3$. Определив, что значение $L = 3$ наилучшим образом соответствует экспериментальным данным, остается найти оптимальные значения энтропии ΔS и энтальпии ΔH .

Исходя из начальной точки кривой зависимости $\Delta Q_{\text{mol}}(W_i)$ для MB и формул (3), (6) и (7), мы можем получить оценку энтальпии связывания, полагая, что при избытке лиганда происходит полное связывание добавленного в раствор полимера.

$$\Delta H = \frac{Q_i}{\theta_i X_i V} \approx \frac{\Delta Q_{\text{mol}} X \Delta V}{\theta_i V} \frac{V}{i X \Delta V} = \frac{\Delta Q_{\text{mol}}}{\theta_i} \quad (10)$$

При $i = 1$ имеем $\Delta Q_{\text{mol}} \sim 2$ ккал, $\theta_1 \sim 1/3$ (предполагая полное связывание с лигандом длиной $L = 3$). В этих предположениях $\Delta H \sim 6$ ккал/моль. Эта оценка может быть уточнена при численном решении уравнений (1), (4)–(8)

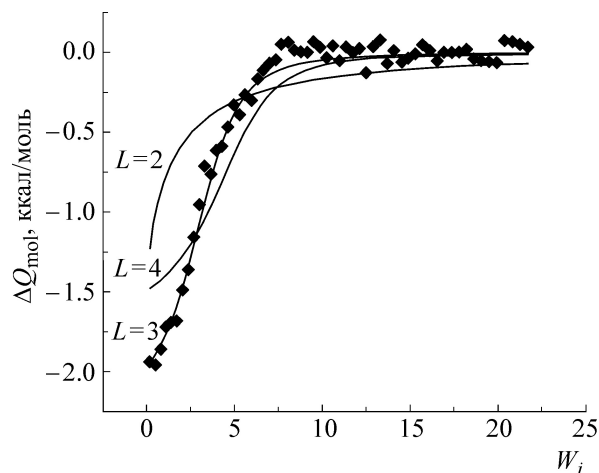


Рис. 2. Калориметрическая кривая обратного титрования для анализа связывания лиганда MB с поли(dA)-поли(dT). Представлены экспериментальные данные (черные точки) и теоретические кривые, рассчитанные при значениях длины лиганда $L = 2, 3$ и 4 ; W_i – отношение концентрации полимера к концентрации лиганда в растворе.

для разных значений константы связывания. Варьирование параметров позволяет определить значения, при которых вид теоретических кривых соответствует экспериментальным данным (см. рис. 3).

Наилучшее соответствие между теоретической кривой и экспериментальными данными достигается при значении $K = 5 \cdot 10^5$ М⁻¹ и значении энтальпии $\Delta H = -4,76$ ккал/моль. Заметим, что величина энтропии получается в этом случае положительной, что характерно для связывания узкобороздочных соединений: $\Delta S = 0,0104$ ккал/(моль·К).

Эти результаты находятся в хорошем соответствии с моделью, полученной на основании экспериментов по флуоресценции красителя Хехст 33258 и описанной в работах [1,16]. Наши данные также согласуются с полученными ранее при помощи спектрофотометрии значениями константы связывания [9].

На рис. 4 показана кривая связывания с поли(dA)-поли(dT) димерного бисбензимидазола DB(11), который является димером мономерного бисбензимидазола. Заметим, что здесь первые же точки соответствуют величинам выделяемого тепла на порядок больше, чем на кривой для мономерного аналога MB. Мы провели предварительный анализ данных по связыванию DB(11), аналога бис-Нт, с поли(dA)-поли(dT) и оценили энтальпию связывания. Если предположить, что DB(11) образует комплекс, занимающий 9–10 пар нуклеотидов, то первые

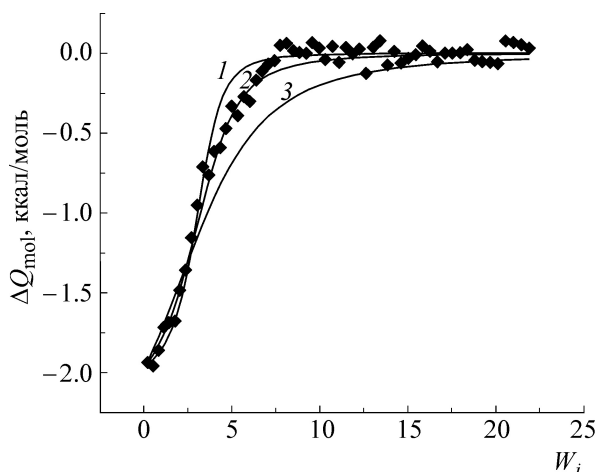


Рис. 3. Калориметрическая кривая обратного титрования для анализа связывания лиганда MB с поли(dA)-поли(dT). Кривые 1, 2 и 3 рассчитаны для значений константы связывания $K = 2 \cdot 10^6$, $5 \cdot 10^5$, $1 \cdot 10^5$ моль⁻¹ соответственно. W_i – отношение концентрации полимера к концентрации лиганда в растворе.

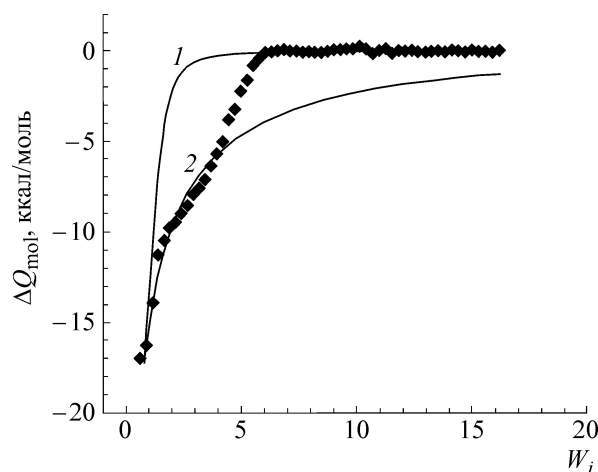


Рис. 4. Калориметрическая кривая обратного титрования для анализа связывания лиганда DB(11) с поли(dA)-поли(dT). Черные точки – экспериментальные данные, кривые 1 и 2 рассчитаны при помощи уравнений (1),(4)–(8) для значений $L = 1$ и 2 соответственно. В первом случае $\Delta H = -15$ ккал/моль, во втором $\Delta H = -66$ ккал/моль.

точки на экспериментальной кривой соответствуют величине $\Delta H \sim 100$ ккал/моль. Данный результат маловероятен, и скорее всего ошибка кроется в нашем предположении, что лиганд занимает большое место на полимере. Так, если предположить, что образующийся комплекс при избытке лиганда занимает лишь одну пару нуклеотидов, то $\Delta H \sim 17$ ккал/моль, что больше похоже на осмысленный результат. В этом случае, по-видимому, существует такой тип комплекса, который образует «стопки» вдоль ДНК. Экспериментальная кривая на рис. 4 имеет сложную форму и может быть обусловлена как существованием нескольких типов комплекса лиганда с полимером, так и кооперативными взаимодействиями между адсорбированными молекулами лиганда. Ввиду отсутствия дополнительных данных о связывании мы не построили математическую модель, которая бы точно описывала данный вид кривой.

Полученные нами данные и предварительный анализ экспериментов указывают на наличие по меньшей мере двух типов комплекса димерного бисбензимидазола DB(11) с поли(dA)-поли(dT) в данных условиях. Первый тип комплекса возникает при большом избытке лиганда, и лиганд скорее всего располагается вдоль поли(dA)-поли(dT) в виде стопок. Аналогичные два типа комплекса существуют у многих лигандов, скажем у акридинов. Скорее всего, следует изменить условия эксперимента, чтобы избавиться от тех типов комплекса, ко-

торые образуются при больших соотношениях концентраций лиганд : полимер.

Авторы считают своим приятным долгом поблагодарить Ф.О. Цветкова за предоставленные экспериментальные данные, С.А. Стрельцова, М.П. Евстигнеева и Н.Г. Есипову за плодотворное обсуждение.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-04-00388) и Программы Президиума РАН по молекулярной и клеточной биологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. М. В. Михайлов, А. С. Заседателев, А. С. Крылов и Г. В. Гурский, Молекуляр. биология **15**, 690 (1981)
2. M.-K. Teng, N. Usman, C. A. Frederick, and A. H.-J. Wang, Nucl. Acids Res. **16**, 2671 (1988)
3. M. C. Vega, I. G. Saez, J. Aymami, et al., Eur. J. Biochem. **222**, 721 (1994).
4. А. С. Крылов, А. А. Хорлин, С. Л. Гроховский и др., Докл. АН СССР **254**, 238 (1980).
5. А. В. Громыко, К. В. Попов, А. П. Мозолева и др., Биоорг. химия **31**, 385 (2005).
6. А. В. Громыко, В. И. Сялянов, С. А. Стрельцов и др., Биоорг. химия **33**, 613 (2007).
7. А. А. Иванов, С. А. Стрельцов, Т. А. Приказчикова и др., Биоорг. химия **34**, 285 (2008).
8. А. А. Иванов, В. И. Сялянов, С. А. Стрельцов и др., Биоорг. химия **37**, 530 (2011).
9. Е. С. Лисицина, Н. А. Дурандин, А. А. Иванов и др., Молекуляр. биология **46**, 922 (2012).

10. А. А. Иванов, В. И. Саянов и А. Л. Жузе, Биорган. химия **42**, 205 (2016).
11. А. С. Заседателев, Г. В. Гурский и М. В. Волькенштейн, Молекуляр. биология **5**, 245 (1971).
12. Ю. Д. Нечипуренко и Г. В. Гурский, Биофизика **48**, 773 (2003).
13. Ю. Д. Нечипуренко, *Анализ связывания биологически активных соединений с нуклеиновыми кислотами* (Институт компьютерных исследований, Москва-Ижевск, 2015).
14. A. Velázquez-Campoy, Anal. Biochem. **348**, 94 (2006).
15. O. V. Tsodikov, J. A. Holbrook, I. A. Shkel, and M. T. Record, Jr, Biophys. J. **81**, 1960 (2001).
16. G. V. Gursky, A. S. Zasedatelev, A. L. Zhuze, et al., Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. **47** (1), 367 (1983).

Analysis of Calorimetric Data for Binding of Monomeric Bisbenzimidazole, an Analogue of the Dye Hoechst 33258, to Poly(dA)·Poly(dT)

Yu.D. Nechipurenko*, A.D. Guzaev**, M.V. Khodykov*, Ya.V. Stirmanov*,
A.A. Ivanov***, A.S. Krylov*, and A.L. Zhuze*

**Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia*

***Moscow Institute of Physics and Technology, Institutskii per. 9, Dolgoprudny, Moscow Region, 141701 Russia*

****Institute of Carcinogenesis, Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of the Russian Federation, Kashirskoe shosse 23, Moscow 115478 Russia*

The enthalpy and entropy of the monomeric bisbenzimidazole, an analogue of the dye Hoechst 33258, binding was evaluated based on the analysis of calorimetric data for reverse titration of this ligand with poly(dA)·poly(dT). A mathematical model enabling measurement of thermodynamic parameters of binding with calorimetric data was described. The results obtained were in a good agreement with data for binding of analogous compounds identified spectrophotometrically. Binding parameters of dimeric bisbenzimidazole composed of two monomeric bisbenzimidazole molecules linked via flexible chain were evaluated using this model. A conclusion was made that there exist different types of the complex between this ligand and a polymer.

Key words: Hoechst 33258, DNA-ligand binding model, isothermal titration calorimetry, mathematical modeling