



УДК 577.323

© 2010

В. А. Кашпур, О. В. Хорунжая, В. Я. Малеев

Изменения гидратации при образовании комплексов ДНК-лиганд по данным диэлектromетрии

(Представлено членом-корреспондентом НАН Украины Д. Н. Говоруном)

Для вивчення взаємодії ДНК з лігандами пропонується використовувати діелектричні вимірювання в мм діапазоні. Проведено вимірювання комплексної діелектричної проникності розчинів ДНК та розчинів комплексів ДНК з кофеїном, путресцином і профлавіном. Показано, що утворення комплексів супроводжується зміною діелектричних параметрів та гідратації.

В связи с разработкой новых лекарственных препаратов и стремлением к их направленному синтезу представляет интерес изучение молекулярных механизмов действия биологически активных соединений (БАВ). Действие многих БАВ вызвано их связыванием с ДНК. Важнейшим и в то же время малоизученным фактором, влияющим на формирование комплексов ДНК — БАВ, является гидратация. Известно, что термодинамика комплексообразования зависит от состояния воды столь же значительно, как и от ионной силы, рН и температуры [1].

Гидратация ДНК и комплексов ДНК-лиганд изучалась во многих работах. Тем не менее, пока нет достаточно полного понимания этого явления. Так, с помощью рентгеноструктурного анализа подробно описано состояние воды в кристаллах ДНК, но гидратные структуры в кристалле и в растворе могут заметно отличаться. Для оценки изменений гидратации при комплексообразовании применялись также методы волюмометрии и осмотического стресса, однако эти методы часто дают противоречивые результаты [2]. Очень сложным явлением оказывается гидратация и для молекулярного моделирования, вследствие чего результаты компьютерных расчетов зависят от методологии и используемого силового поля.

В связи с этим для выявления изменений гидратации, сопровождающих образование комплексов ДНК — БАВ, мы предлагаем использовать измерения комплексной диэлектрической проницаемости $\epsilon^* = \epsilon' + i\epsilon''$ (КДП) в области крайне высоких частот (КВЧ): 30–100 ГГц (диапазон миллиметровых длин волн). Хотя микроволновые измерения в биофизике проводятся уже довольно давно, с такой целью они ранее не применялись.

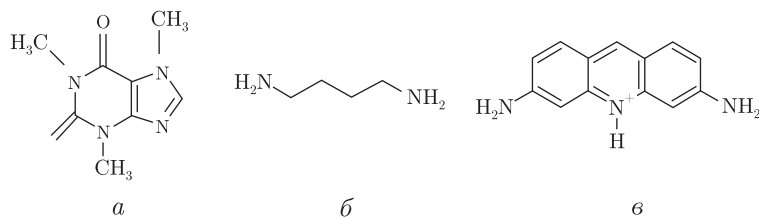


Рис. 1. Структурная формула молекул: кофеина (а); путресцина (б); профлавина гидрохлорида (в)

Диэлектрический метод основан на том факте, что вследствие взаимодействия с ДНК подвижность молекул воды в гидратной оболочке макромолекулы значительно меньше, чем подвижность молекул обычной (свободной) воды. Поэтому диполи связанной воды не могут поворачиваться в КВЧ поле — для них время релаксации τ составляет $\sim 10^{-9}$ с (пик поглощения при ~ 100 МГц). Но молекулы свободной воды еще в состоянии вращаться — для них $\tau \sim 10^{-11}$ с (пик поглощения при ~ 17 ГГц) [3]. Поэтому в мм диапазоне КДП связанной воды обусловлена только малыми величинами электронной и атомной поляризации, в то время как в КДП свободной воды дополнительный — гораздо больший — вклад вносит ориентационная составляющая. Тогда, определяя “связанную воду” как такую, у которой частоты дипольной релаксации значительно меньше аналогичных частот свободной воды, мы можем с помощью измерений в мм диапазоне разницы между КДП воды и раствора $\delta\epsilon^*$ охарактеризовать степень гидратации биомолекул [4]. Отметим, что оценка гидратации на основе измерений в более низкочастотной области затруднительна, поскольку в ней (но не в области КВЧ) находятся также зоны релаксации различных видов поляризации в биомолекулах.

В настоящей работе мы приводим результаты КВЧ диэлектromетрии комплексов ДНК из тимуса телянка с тремя БАВ: кофеином, путресцином (дигидрохлорид) и профлавином (гидрохлорид) (рис. 1, а, б, в). Все препараты получены от фирмы “Sigma”. Комплексообразование с требуемым соотношением молей фосфатных групп ДНК к молям лиганда (P/D) осуществляли многократным добавлением к раствору ДНК небольших объемов растворов лиганда. Концентрации k комплексов составляли $\sim 0,6-0,8$ %.

При таких концентрациях отличие между КДП воды и раствора или, тем более, между проницаемостями раствора комплекса и растворов его компонентов составляет менее 1% от значения ϵ^* воды, так что $\delta\epsilon^*$ является малой разницей двух больших величин. Поэтому нами используется оригинальный дифференциальный метод [4], позволяющий в области КВЧ определять даже небольшие отличия между проницаемостями двух жидких образцов. Непосредственно находятся разности $\Delta\alpha$ и $\Delta\beta$ между известными коэффициентами затухания α и фазовой постоянной β эталона (воды) и аналогичными параметрами образцов. Из них вычисляются соответствующие разности $\Delta\epsilon'$ и $\Delta\epsilon''$. Вклад в ϵ'' (в мм диапазоне небольшой) компоненты $\delta\epsilon''$, обусловленной наличием в образцах ионов, учитывается с помощью измерения электропроводности σ : $\delta\epsilon'' = \sigma\lambda/c$, где c — скорость света. Рабочая длина волны λ составляет 7,6 мм (частота 39,5 ГГц), температура — 23 °С. Необходимые значения α , β , ϵ' и ϵ'' воды при этих условиях рассчитаны на основании известных опытных данных и интерполяционной схемы [5]: $\alpha = 2,75$; $\beta = 5,13$; $\epsilon' = 18,8$; $\epsilon'' = 28,2$. Измерения проводятся многократно, полученные данные усредняются.

Так как в области КВЧ ϵ' и ϵ'' воды зависят от частоты, то целесообразно описывать диэлектрические свойства образцов с помощью параметров теории полярных жидкостей

Дебая: ε_s (низкочастотный предел ε'), ε_∞ (высокочастотный предел ε') и λ_s (релаксационная длина, $\lambda_s = 2\pi\tau c$). В этой теории, которая с высокой точностью справедлива как для воды, так и для водных растворов биомолекул [3, 5], значения ε_s и λ_s однозначно связаны с ε' и ε'' : $\varepsilon_s = \varepsilon' + \varepsilon''^2/(\varepsilon' - \varepsilon_\infty)$ и $\lambda_s = \lambda\varepsilon''/(\varepsilon' - \varepsilon_\infty)$.

В табл. 1 показаны результаты диэлектromетрии растворов ДНК, кофеина (К), путресцина (Путр) и профлавина (Пф), а также комплексов ДНК — кофеин (интактного и подвергнутого гамма-облучению (K_p)), ДНК — путресцин и ДНК — профлавин. Декременты $\Delta\varepsilon_s$ и $\Delta\lambda_s$ являются разностями параметров ε_s и λ_s воды и образцов, а величины $\Delta\varepsilon_s^*$ — удельными декрементами: $\Delta\varepsilon_s^* = \Delta\varepsilon_s/k$. Для воды $\varepsilon_s = 79,4$ и $\lambda_s = 16,3$ (при 23 °С). Погрешность определения разностей $\Delta\alpha$, $\Delta\beta$, $\Delta\varepsilon''$, $\Delta\varepsilon''$ и $\Delta\varepsilon_s$ составляет $\pm 0,0005$ (Нп/мм), $\pm 0,0003$ (рад/мм), $\pm 0,005$, $\pm 0,01$ и $\pm 0,04$, соответственно.

В комплексах ДНК — кофеин величина P/D составляет 1,5, ионная сила — 0,08 М NaCl. Как следует из табл. 1, декремент комплекса не является аддитивной суммой декрементов компонентов. Действительно, при указанном P/D следует ожидать, что разность $\Delta\varepsilon_s^*$ комплекса будет равной 1,6. Однако экспериментальное значение составляет лишь 1,45, т. е. меньше на $\sim 10\%$. Поскольку в области КВЧ нет полос поглощения ДНК [6], то отличие должно объясняться увеличением диэлектрической проницаемости растворителя, что указывает на уменьшение количества связанной воды. Наблюдаемая дегидратация вызвана, по-видимому, частичной заменой связей ДНК — вода и кофеин — вода на связь ДНК — кофеин. Соответствующее изменение энергии должно приводить к дополнительной стабилизации комплекса.

Для количественной оценки гидратационных эффектов можно использовать тот факт, что в мм диапазоне биомолекулы вместе со своей гидратной оболочкой являются вкраплениями с низкими проницаемостями (соответственно $\varepsilon_{\infty б}$ и $\varepsilon_{\infty в}$), определяемыми только электронной и атомной поляризациями, в среде с высокой проницаемостью ε_s ($\varepsilon_s \approx 80$ для воды). Проницаемость $\varepsilon_{\infty б}$ ДНК (и лигандов) составляет 4 [7], а проницаемость $\varepsilon_{\infty в}$ связанной воды — 5,7 (то же значение, что и ε_∞ воды [5]). Полагая, как и ранее [4], что в случае используемых малых концентраций уменьшение $\Delta\varepsilon_s$ проницаемости раствора по сравнению с проницаемостью растворителя пропорционально удельному парциальному объему биомолекул v и объему связанной воды ω , мы можем записать

$$\Delta\varepsilon_s = pk[(\varepsilon_s - \varepsilon_{\infty б})v + (\varepsilon_s - \varepsilon_{\infty в})\omega], \quad (1)$$

где p — коэффициент пропорциональности. Так как для воды объем и масса численно совпадают, то ω является также числом граммов связанной воды на 1 г биомолекулы.

Таблица 1. Диэлектрические параметры и гидратация растворов ДНК, БАВ и комплексов ДНК — БАВ

Параметр	ДНК	Кофеин	ДНК — К	ДНК — K_p	Путр	ДНК — Путр	Профлавин	ДНК — Пф
k , %	0,64	0,8	0,87	0,87	3,47	0,66	1,94	0,62
$\Delta\alpha$	0,014	0,021	0,019	0,021	0,016	0,015	0,043	0,0165
$\Delta\beta$	0,0115	0,023	0,022	0,024	0,084	0,029	0,0505	0,0155
$\Delta\varepsilon'$	0,04	0,01	0,01	0,015	0,765	0,215	0,03	0,07
$\Delta\varepsilon''$	0,29	0,03	0,04	0,04	3,44	0,4	1,3	0,35
λ_s , мм	16,2	16,2	16,2	16,2	15,2	16,3	15,9	16,2
$\Delta\varepsilon_s$	1,1	1,05	1,25	1,30	5	0,95	3,1	1,3
$\Delta\varepsilon_s^*$	1,7	1,3	1,45	1,5	1,45	1,45	1,6	2
n	16	4	16	16	4–5	12–13	7–8	20

Степень гидратации n ДНК составляет, по данным рентгеноструктурного анализа, ИК спектроскопии и калориметрии, от 11 до 20 молекул воды на нуклеотид [8]. Нами принята средняя величина 16 молекул, что соответствует значению 1,58 для коэффициента p (при $k = 0,63\%$ и $\Delta\varepsilon_s = 1,09$). Отметим, что с другой стороны 1,58 является средним между значениями p , которые вычислены в теории смеси диэлектриков при рассмотрении двух предельных идеализированных случаев: вкраплений в виде сферы ($p = 1,50$) и в виде цилиндра ($p = 1,66$) [9].

В табл. 1 число n выражает количество молекул связанной воды на молекулу лиганда или на нуклеотид (для ДНК или комплекса). Точность n , вычисленная из погрешностей $\Delta\alpha$ и $\Delta\beta$, составляет одну молекулу. Объем v кофеина (как и других лигандов) определялся нами с помощью пикнометра. Расчет показывает, что на молекулу кофеина ($v = 0,74$) приходится ~ 4 молекулы воды. С этим значением согласуется число водородных связей, которые могут образовать обе группы C=O и неметилированный атом азота.

Из соотношения (1) также следует, что в системе ДНК — кофеин с каждым нуклеотидом связано ~ 16 молекул воды. Но при аддитивном сложении чисел гидратации компонентов и с учетом того, что $P/D = 1,5$, следует ожидать, что для комплекса $n \approx 19$. Таким образом, согласно диэлектрическим измерениям, комплексообразование сопровождается уменьшением степени гидратации нуклеиновой кислоты на ~ 3 молекулы на нуклеотид, т. е. на $\sim 20\%$. Обнаруженный эффект коррелирует с изменениями в ИК области, указывающими на взаимодействие кофеина с такими гидратно-активными сайтами ДНК, как группы PO_2^- и атомы оснований: N7 (аденин и гуанин) и O2 (тимин) [10].

Поскольку кофеин обладает антимуtagenной и антиоксидантной способностями [11], нами исследовано также влияние на комплекс гамма-излучения. Ранее, при изучении раствора чистой ДНК, мы обнаружили заметную послерадиационную дегидратацию [12]. Облучение раствора комплекса, а также контрольного раствора нуклеиновой кислоты проводили гамма-квантами ^{60}Co ; поглощенная доза составила 800 Гр. Видно (четвертая колонка табл. 1), что облучение практически не влияет на декремент. Из этого следует, что уменьшения количества связанной воды, т. е. разрушения водной оболочки, также не происходит. В условиях настоящей работы отсутствуют возможности для действия механизма репарации. Поэтому полученный результат согласуется с представлением, согласно которому протекторные свойства кофеина обусловлены его взаимодействием с послерадиационными свободными радикалами, приводящим к образованию из кофеина 1,3,7-триметилмочевой кислоты [11]. Наблюдаемая в работе слабая тенденция к послерадиационному возрастанию декремента вызвана, возможно, наличием в составе указанной кислоты дополнительной, по сравнению с кофеином, ОН группы.

Другим исследованным лигандом являлся путресцин — один из важнейших биологических полиаминов. В изучавшихся комплексах $P/D = 5$, ионная сила — 0,025 М NaCl. Из табл. 1 следует, что, как и в случае кофеина, декремент $\Delta\varepsilon_s$ комплекса путресцина не является аддитивной суммой декрементов компонентов. Так как взаимодействие с полиаминами не влияет на основные элементы структуры ДНК [13], то уменьшение декремента является свидетельством происходящей дегидратации.

При оценке гидратации нами принято во внимание, что препарат путресцина является гидрохлоридом, и кислота HCl не только обуславливает электропроводность растворов, но и понижает их проницаемость. Поэтому из измеренной разницы $\Delta\varepsilon_s^{\text{эксп}}$ вычтен вклад HCl (с учетом известной КДП водных растворов кислоты).

Согласно расчету ($v = 0,848$), гидратация путресцина составляет 4–5 молекул воды, что соответствует количеству возможных водородных связей, в которых благодаря двум группам NH_2 способен участвовать путресцин. В комплексе ДНК – путресцин каждый нуклеотид связывает 12–13 молекул воды. Поскольку одна молекула лиганда приходится на пять нуклеотидов, то в случае аддитивности суммарная гидратация одного нуклеотида должна быть ~ 17 молекул воды. Таким образом, при комплексообразовании $\sim 25\%$ воды, ранее связанной с компонентами, становится свободной.

В настоящее время имеются разные взгляды на характер взаимодействия ДНК с полиаминами. Согласно одному подходу, существует лишь электростатическое взаимодействие между группами NH_3^+ лиганда и группами PO_2^- ДНК. По другому представлению, лиганд взаимодействует не только с фосфатными группами, но и с основаниями [13].

Уменьшение декремента при комплексообразовании (и аналогичное уменьшение степени гидратации) говорит о том, что между ДНК и поликатионом путресцином действуют не только кулоновские силы. Действительно, катион Na^+ , например, при электростатическом взаимодействии с фосфатными и другими сайтами ДНК притягивает и координирует молекулы воды, формируя гидратную структуру, аналогичную той, которая существует вокруг этого иона в чистой воде [14]. Более того, образуются дополнительные, мостиковые, молекулы воды. Поэтому наблюдаемая дегидратация обусловлена, по-видимому, тем, что в комплексе происходит не только электростатическое взаимодействие, но и вместо части связей путресцин – вода и ДНК – вода формируются связи ДНК – путресцин.

Однако с основаниями связано не более одной-двух молекул воды. Фактором, способствующим значительной величине дегидратации, может быть гидрофобное взаимодействие. Поэтому диэлектрическим измерениям более соответствуют те модели, в которых углеводородные группы полиаминов вытесняют растворитель из малого желобка, делая молекулы воды более подвижными [14].

Диэлектрические измерения изменения гидратации при образовании комплекса между профлавином и ДНК представляют интерес вследствие противоречивости сведений об этом эффекте. Основным способом взаимодействия профлавина с ДНК является интеркаляция – внедрение хромофора между парами оснований. Согласно распространенной точке зрения, интеркаляция сопровождается освобождением части молекул воды, связанных с макромолекулой [15]. Однако при использовании осмометрического метода было обнаружено, что система ДНК – профлавин более гидратирована, чем ДНК и лиганд в свободном состоянии [1].

В изучавшихся нами комплексах ДНК – профлавин $P/D = 8$, ионная сила – 0,025 М NaCl. Из табл. 1 видно, что декремент $\Delta\epsilon_s^*$ комплекса не является аддитивной суммой декрементов компонентов: он больше на $\sim 15\%$ (при $P/D = 8$ следует ожидать, что $\Delta\epsilon_s^*$ комплекса составляет $\sim 1,7$, а не 2). Так как взаимодействие с интеркаляторами не приводит к уменьшению объема ДНК (наблюдается лишь частичное раскручивание цепей макромолекулы и удлинение цепей [15]), то обнаруженный диэлектрический эффект может указывать на образование вокруг ДНК дополнительных связанных молекул воды.

Расчет (при $v = 0,857$) по соотношению (1) показывает, что с молекулой профлавина связано 7–8 молекул воды. Такая величина близка к числу водородных связей, которые способны образовать две NH_2 группы и группу NH^+ лиганда. Гидратация комплекса ДНК – профлавин оказывается равной ~ 20 молекулам воды на нуклеотид. Но при аддитивном сложении и учете того, что одна молекула лиганда приходится на 10 нуклеотидов, для комплекса должно быть $n \approx 17$. Следовательно, можно полагать, что при

комплексобразовании гидратация ДНК увеличивается на ~ 3 молекулы на нуклеотид (на $\sim 15\text{--}20\%$).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что формирование комплекса ДНК — БАВ в водной среде определяется не только взаимодействием между компонентами, но и взаимодействием с окружающей связанной водой.

1. Qu X., Chaires J. B. Hydration Changes for DNA Intercalation Reactions // J. Am. Chem. Soc. – 2001. – **123**. – P. 1–7.
2. Shimizu S. Estimating hydration changes upon biomolecular reactions from osmotic stress, high pressure, and preferential hydration experiments // PNAS. – 2004. – **101**. – P. 1195–1199.
3. Umezahara T., Kuwabara S., Mashimo S. et al. Study on Hydration of B-, A-, and Z-DNA // Biopolymers. – 1990. – **30**. – P. 649–656.
4. Кашпур В. А., Малеев В. Я., Щеголева Т. Ю. Исследование гидратации глобулярных белков дифференциальным диэлектromетрическим методом // Мол. биология. – 1976. – **10**. – С. 568–575.
5. Ellison W. J., Lamkaouchi K., Moreau J.-M. Water: A dielectric reference // J. Mol. Liquids. – 1996. – **68**. – P. 171–279.
6. Maleev V. Ya., Kashpur V. A., Glibitsky G. M. Does DNA Absorb Microwave Energy? // Biopolymers. – 1987. – **26**. – P. 1965. – 1970.
7. Globus T. R., Woolard D. L., Khromova T. et al. THz-Spectroscopy of Biological Molecules // J. Biol. Physics. – 2003. – **29**. – P. 89–100.
8. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. – Москва: Мир. 1987. – 584 с.
9. Buchanan T. J., Haggis G. H., Hasted J. B. The dielectric estimation of protein hydration // Proc. Roy. Soc. – 1952. – **A213**. – P. 379–391.
10. Nafisi S., Manouchehri F., Tajmir-Riahi H.-A. Structural features of DNA interaction with caffeine and theophylline // J. Mol. Structure. – 2008. – **875**. – P. 392–399.
11. Telo J. P., Vieira Abel J. S. C. Mechanism of free radical oxidation of caffeine in aqueous solution // J. Chem. Soc. Perkin. Trans. – 1997. – **2**. – P. 1755–1757.
12. Кашпур В. А., Дубовицкая О. В., Красницкая А. А., Малеев В. Я. Влияние γ -облучения на состояние ион-гидратной оболочки ДНК // Вісн. Харк. ун-ту. Біофіз. вісник. – 1998. – **1**. – С. 111–115.
13. Ruiz-Chica J., Medina M. Fourier Transform Raman Study of the Structural Specificities on the Interaction between DNA and Polyamines // Bioph. J. – 2001. – **80**. – P. 449–454.
14. Korolev N., Lyubartsev A. P., Laaksonen A. On the Competition between Water, Sodium Ions, and Spermine in Binding to DNA // Ibid. – 2002. – **82**. – P. 2860–2875.
15. Костюков В. В., Хомутова Н. М., Лантушенко А. О., Евстигнеев М. П. Гидрофобный вклад в свободную энергию // Биополимеры и клетка. – 2009. – **25**, № 2. – С. 133–141.

Институт радиофизики и электроники
им. А. Я. Усикова НАН Украины, Харьков

Поступило в редакцию 13.11.2009

V. A. Kashpur, O. V. Khorunzhaya, V. Ya. Maleev

Hydration changes in complexation of DNA with ligands as revealed by dielectrometry

The dielectric method in the millimeter range is proposed to study the interaction of nucleic acids with ligands. The measurements of complex dielectric permittivity for solutions of DNA and complexes of DNA with caffeine, putrescine, and proflavine have been carried out. It is shown that the process of complex formation is accompanied by changes of dielectric parameters, as well as by changes of a hydration level.