

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РОДАМИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ С ДНК

Методами спектрофотометрии и сканирующей зондовой микроскопии исследовано взаимодействие родаминовых красителей с ДНК. Установлено, что родамины взаимодействуют с макромолекулами путем кооперативного связывания с внешней частью полимерной цепи. В результате на поверхности полимеров образуются органические наноструктуры (супрамолекулярные системы). Оценено количество молекул красителей в наноструктурах, исследовано распределение образующихся структур вдоль двойной спирали ДНК и их слияние в более крупные конгломераты. Сделан вывод об экранировании красителями двойной спирали и инактивации нуклеиновых кислот, приводящей к нарушению их биологических функций.

Органические красители широко используются в биологии и медицине для контрастирования биообъектов, в диагностических и терапевтических целях. Селективное поражение лазерным излучением опухолевых тканей и клеток, предварительно обработанных специфическим красителем, положено в основу современного, относительно безвредного метода фотодинамической терапии (ФДТ) [1-3]. Физические основы метода составляют фотореакции, сенсibiliзируемые органическими добавками-фотосенсибилизаторами. Фотосенсибилизаторы (ФС), проникая в ткань, под действием света генерируют промежуточные интермедиаты или без таковых, реагируя с биосубстратом, повреждают клеточные структуры опухолей. Актуальной задачей ФДТ [4] является поиск оптимального ФС, обеспечивающего эффективное применение метода и отвечающего основным требованиям по биологическим, фотофизическим и химико-технологическим критериям.

В перечень объектов, для исследования и модификации которых используются приемы окрашивания, входят нуклеиновые кислоты (НК). НК относятся также к числу основных внутриклеточных мишеней совместного деструктивного действия ФС и света. Поэтому детальное изучение селективности взаимодействия органических соединений с НК и влияния такого взаимодействия на релаксационные процессы в хромофорах составляют важное направление современной молекулярной биологии и биофизики.

Действие различных химических агентов и излучений на НК исследуется на протяжении многих лет [5, 9]. Особое внимание уделяется органическим красителям, взаимодействующим с полианионами путем связывания. Эти вещества относятся к различным химическим классам. В данной работе исследуется взаимодействие родаминовых красителей с ДНК.

Различают сильное взаимодействие или интеркалирование внутрь двойной спирали и энергетически более слабое связывание с внешней частью

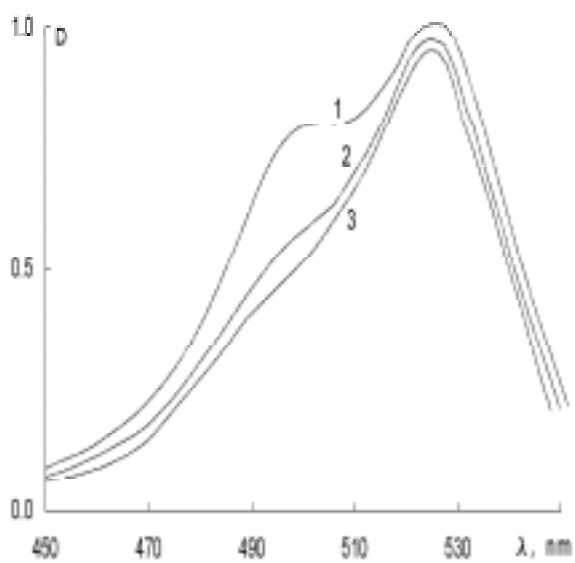
полимерной цепи [5-8]. Связанный лиганд не изменяет компонентов НК, но может приводить к нарушению их биологических функций. Причины таких нарушений кроются в изменении конфигурации полимерных цепей или стерическом экранировании при метаболических превращениях макромолекул.

Слабое взаимодействие характеризуется положительной кооперативностью [5, 9]. Это значит, что связывание одной молекулы красителя способствует связыванию следующей молекулы и т. д. В результате на внешней стороне двойной спирали образуются ассоциаты красителя. По данным рентгеноструктурного анализа, плоскости молекул хромофоров в ассоциатах преимущественно ориентированы параллельно кольцам оснований ДНК так, что одна находится над другой, т. е. перпендикулярно оси спирали, образуя стопочную структуру («стэкинг»-взаимодействие) [5]. Стэкинг-взаимодействие особенно заметно проявляется в области концентраций, при которых начинается самоагрегация молекул в растворах.

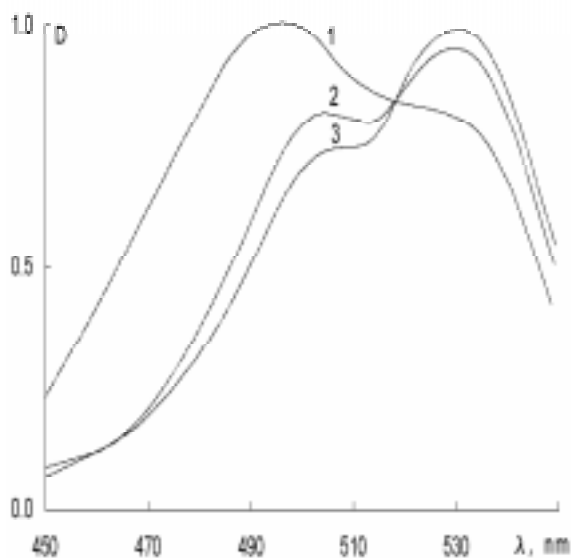
Для исследования связывания ДНК с родаминами мы использовали методы спектрофотометрии и сканирующей зондовой микроскопии (СЗМ). Большая часть экспериментов была проведена с использованием красителя родамина 6G (Р6G). Выбор красителя обоснован его спектрально-люминесцентными свойствами – большим квантовым выходом флуоресценции [10] и способностью изменять соотношение между выходом флуоресценции и интеркомбинационной конверсии при образовании ассоциатов [11]. Интенсивная флуоресценция существенно облегчает контроль над содержанием ФС в веществе, что открывает возможность для использования Р6G в диагностических целях. Фотодинамическая активность хромофора в основном определяется эффективностью генерации синглетного кислорода [1-3], т. е. выходом триплетных состояний молекул красителя. При соответствующем подборе концентрации Р6G можно получить оптимальное сочетание перечисленных свойств красителя.

Использовалась ДНК, выделенная из молок лосося или селезенки быка («Sigma»). Концентрация ДНК (по нуклеотидам) в растворах составляла $4 \cdot 10^{-4}$ М, концентрация красителей изменялась от 10^{-5} М до $5 \cdot 10^{-4}$ М.

Спектры поглощения водных растворов Р6G приведены на рис. 1 (а). Цифрами обозначены спектры, с концентрацией красителя в растворе соответственно равной 1 – $5 \cdot 10^{-4}$ М, 2 – $5 \cdot 10^{-5}$ М, 3 – 10^{-5} М. При добавлении в раствор ДНК происходит трансформация кривых поглощения (рис. 1 (б)). Смещение максимума поглощения в коротковолновую область свидетельствует об эффективном образовании ассоциатов Р6G [11-12].



а)



б)

Рис. 1. Спектры поглощения водных растворов Р6G. Концентрация красителей соответственно равна 1 – $5 \cdot 10^{-4}$ М; 2 – $5 \cdot 10^{-5}$ М; 3 – 10^{-5} М.

На вклад электростатических сил в общее взаимодействие красителя с ДНК указывает зависимость выхода ассоциатов от ионного состава растворов. При неизменном соотношении концентраций красителя и нуклеотидов ДНК степень связывания уменьшается с увеличением ионной силы. Присутствие в растворе, содержащем $4 \cdot 10^{-4}$ М ДНК и $5 \cdot 10^{-4}$ М Р6G, соли $MgCl_2$ концентрации $8 \cdot 10^{-4}$ М приводит к полному исчезновению связанных агрегатов красителя. Ионы Mg^{2+} уменьшают число мест связывания вследствие образования комплексов с фосфатными группами [13] и тем самым ингибируют кооперативное внешнее связывание. Уменьшение связывания может происходить и за счет понижения константы диссоциации. Зависимость константы диссоциации от типа иона, используемого в эквимольных концентрациях, продемонстрирована в [14].

В ассоциатах многоатомных молекул может содержаться от нескольких десятков до нескольких тысяч молекул красителя [11-12] (в «полимерах Шайбе», в которых плоскости отдельных молекул располагаются параллельно друг другу, содержится до 10^6 молекул). Принимая во внимание размеры молекул и характерные расстояния между ними при стопочной укладке в ассоциатах [11-12, 17], следовало ожидать, что такие крупные объекты (соизмеримые или многократно превосходящие диаметр (~ 20 Å) линейных макромолекул ДНК) будут обнаружены при визуализации двойной спирали методами СЗМ [15]. На рис. 2 представлены характерные изображения неокрашенной (а) и окрашенной (б) Р6G ($C=5 \cdot 10^{-4}$ М) ДНК, иммобилизованной на поверхности слюды, полученные с помощью атомно-силового микроскопа (СММ-2000, ЗАО КПД, г. Зеленоград). Сканирование производилось в воздушной среде в контактном режиме с использованием заостренных пирамидальных зондов фирмы Park Scientific Instruments.

Методика приготовления образцов для сканирования аналогична [15]. Латеральные размеры объектов определялись с поправкой на эффект уширения, обусловленный конечностью радиуса кривизны зонда (от 10 нм до 15 нм). Ширина профиля d объекта, имеющего в сечении окружность радиуса R' , при визуализации методом АСМ, зависит от радиуса R зонда [15-16]:

$$d = \frac{4(R + R')\sqrt{R'(R + R')}}{R}, \quad R > R',$$

что существенно облегчило идентификацию молекул. Экспериментально измеренная ширина мо-

лекул ДНК, для режима контакта на воздухе, составляла 15-18 нм (рис. 2 (а)), при том, что согласно модели двойной спирали диаметр молекулы лишь 2 нм.

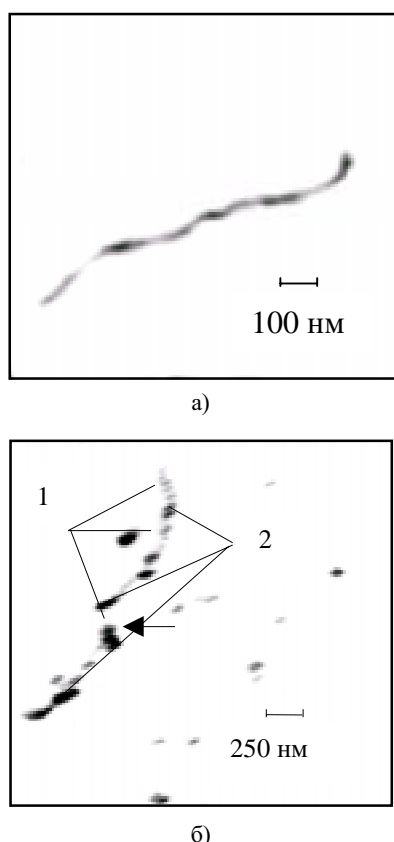


Рис. 2. АСМ-изображения ДНК на поверхности слюды. а) неокрашенная ДНК; б) ДНК, окрашенная Р6G.

На АСМ-изображениях (сканах) окрашенных макромолекул (рис. 2 (б)) отчетливо видны наноструктуры преимущественно овальной формы. Средняя длина продольной оси наименьших («первичных») структур (на рисунке обозначены цифрой 1) около 150 нм, длина поперечной оси – 50 нм, высота – 5 нм (включая диаметр двойной спирали ДНК). Продольная ось таких агрегатов составляет с осью спирали ДНК угол, близкий к 90° (наиболее отчетливо это видно в верхнем участке окрашенной спирали на рис. 2 (б)). Размеры крупных структур достигают 220 нм в длину и 90 нм в ширину, а их средняя высота – 20 нм (на рисунке обозначены цифрой 2). Такие агрегаты преимущественно вытянуты вдоль спирали. По-видимому, они образованы слиянием малых первичных наноструктур в более крупные и поэтому выглядят ориентированными вдоль цепи ДНК.

На рис. 3 показан профиль пяти первичных наноструктур верхнего участка окрашенной спирали (рис. 2 (б)). По вертикали измеряется высота объектов, по горизонтали – ширина их попереч-

ной оси. В качестве примера между двумя вертикальными линиями указана ширина (57 нм) поперечной оси одного из агрегатов (четвертого сверху, рис. 2 (б)). Анализ размеров и формы наблюдаемых объектов приводит к выводу о том, что при образовании ассоциатов на поверхности полимерной цепи, наряду со стэкинг-регулярностью, имеет место регулярность соединения молекул красителя «в стык». Следовательно, можно получить стэкинг-структуры со стопочной укладкой не только одиночных хромофоров, но и слоев молекул.

В условиях наших экспериментов в один слой укладывались 1-3 цепи (расстояние между молекулами, образующими ассоциаты, ~ 8-10 Å [12, 17], измеренная высота агрегатов ~ 10-50 Å), содержащие до 150 звеньев каждая. Количество слоев достигало 50. Оценка сделана с учетом принципа наибольшей плотности упаковки и размеров молекул красителей [17].

Таким образом, за счет самоорганизации молекул красителя на поверхности ДНК образуются органические наноструктуры или супрамолекулярные системы [19]. Устойчивость таких супрамолекулярных систем сохраняется за счет слабых межмолекулярных взаимодействий.

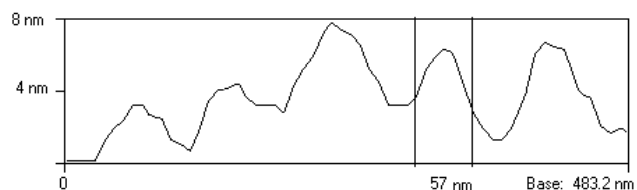
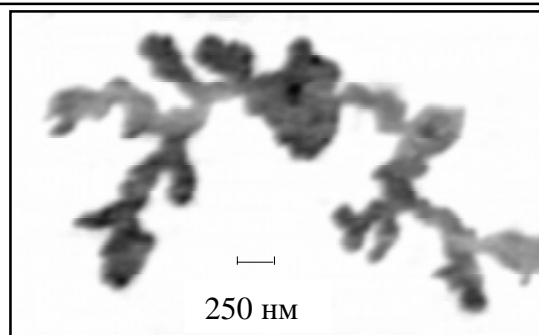
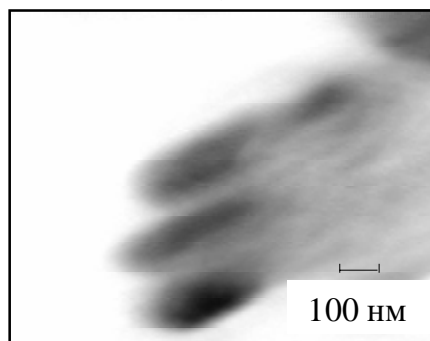


Рис. 3. Профиль пяти первичных наноструктур верхнего участка окрашенной спирали, изображенной на рис. 2 (б).

Если концентрация красителя в растворе меньше $5 \cdot 10^{-5}$ М, то АСМ-изображения окрашенной и неокрашенной ДНК становятся неразличимы. Из данных АСМ и оптических измерений (рис. 1) следует, что при низких концентрациях краситель присутствует в растворе преимущественно в виде свободных и (или) связанных макромолекулами мономеров. Приближение к концентрации, при которой начинается самоагрегация молекул Р6G в растворе, в присутствии ДНК, сопровождается эффективным образованием наноструктур на поверхности двойной спирали. Сравнивая размеры полученных агрегатов с размерами молекулы красителя и расстоянием между молекулярными слоями [17], можно оценить количество молекул в них. В условиях экспериментов, результаты которых представлены на рис. 1 и рис. 2, в первичных наноструктурах содержится примерно $1,5 \cdot 10^4$ молекул.



а)



б)

Рис. 4. а) микрокристаллы родамина 6G, сформированные на поверхности ДНК; б) увеличенное изображение одной из ветвей микрокристалла.

С ростом концентрации красителя (до $C_{кр} > 10^{-3}$ М) происходит слияние близко расположенных друг к другу наноструктур в более крупные агрегаты. Предположительно эти агрегаты представляют собой микрокристаллы красителя. С течением времени микрокристаллы сливаются в поликристаллы, вырастающие вдоль спирали макромолекулы. Изображение поликристалла, сформировавшегося вдоль спирали ДНК, приведено на рис. 4 (а). Образованный кристалл имеет ветвистую структуру. На рис. 2 (б) стрелкой показана начальная стадия роста ветви такого поликристалла. Структурными

элементами ветви являются крупные агрегаты красителя. Центрами образования таких агрегатов могут служить короткие фрагменты ДНК или свободные нуклеотиды, которые всегда присутствуют в растворе [18]. Увеличенный фрагмент одной из ветвей поликристалла, иллюстрирующий ее формирование из отдельных агрегатов красителя, приведен на рис. 4 (б). Форма и размеры (профили) структурных элементов, отмеченных стрелкой на рис. 2 (б), и структурных элементов, представленных на рис. 4 (б), – совпадают.

Подытоживая представленные экспериментальные результаты, можно сделать следующие выводы. Связывание родаминовых красителей с внешней частью двойной спирали ДНК происходит за счет электростатического притяжения и характеризуется положительной кооперативностью. В результате кооперативного взаимодействия на поверхности макромолекул формируются наноструктуры с упорядоченным расположением хромофоров в них супрамолекулярные системы [19]. Средние размеры структур, полученных в условиях наших экспериментов, – $150 \times 50 \times 3$ нм. Из отдельных наноструктур при высокой концентрации красителей формируются микроструктуры и более крупные конгломераты, экранирующие полимерную цепь ДНК. По этой причине связывание красителей высокой концентрации, даже в темновых реакциях, будет инактивировать нуклеиновые кислоты и приводить к нарушению их биологических функций.

Важным биологическим критерием использования красящих веществ для диагностики или нужд терапии является быстрое выведение препарата из организма. Приведенные результаты указывают, что родамины этим требованиям не удовлетворяют.

Список использованной литературы:

1. А. А. Красновский мл. Итоги науки и техники. Сер. Современные проблемы лазерной физики. М., ВИНТИ, 3, 63, 1990.
2. С. Д. Захаров, А. В. Иванов. Квантовая электроника, 29, №3, 192, 1999.
3. F. Stewart, P. Baas, W. Star. Radiotherapy and Oncology, 48, 233, 1998.
4. А. В. Иванов. Лазер – информ., № 23-24 (206-207), 2000.
5. Физико-химические свойства нуклеиновых кислот. Под. ред. Н. М. Эмануэля. М., «Мир», 1976.
6. G. Schwarz. Eur. J. Biochem., 12, 442, 1970.
7. G. Schwarz, W. Balthasar. Eur. J. Biochem., 12, 461, 1970.
8. Е. Б. Морозкина, М. Г. Сафьянникова. Биофизика, 44, №3, 425-429, 1999.
9. Ю. П. Благой. Соросовский образовательный журнал, №10, 24, 1998.
10. А. Н. Теренин. Фотоника молекул красителей. Л.: «Наука», 1967.
11. А. К. Чибисов, Г. А. Кецле, Л. В. Левшин, Т. Д. Славнова. Оптика и спектр., 38, №1, 831, 1975.
12. Л. В. Левшин, А. М. Салецкий. Люминесценция и ее измерения. М.: Изд-во МГУ, 1989.
13. M. Semmel, M. Daune. Biochim. biophys. Acta, 145, 561, 1967.
14. E. W. Chan, J. K. Ball. Biochim. biophys. Acta, 238, 663, 1971.
15. М. О. Галлямов, И. В. Яминский. Сканирующая зондовая микроскопия биополимеров, 1, 25, 1997.
16. C. Bustamante, J. Vesenka, C. L. Tang, W. Rees, M. Guthold, R. Keller. Biochemistry, 31, 22-26, 1992.
17. Н. Д. Жевандров. Оптическая анизотропия и миграция энергии в молекулярных кристаллах. М.: «Наука», 1987.
18. А. Б. Рубин. Биофизика. М.: «Высшая школа», 1987.
19. М. В. Алфимов. УФН, 171, 1072, 2001.