

В. Н. Зозуля, И. М. Волошин, В. Ф. Федоров, Ю. П. Благой

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АКРИХИНА С ОДНОЦЕПЕЧНЫМИ ПОЛИНУКЛЕОТИДАМИ ПО ДАННЫМ ЛАЗЕРНОЙ ПОЛЯРИЗОВАННОЙ ФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ

Методом лазерной поляризованной флюоресценции изучено взаимодействие акридинового красителя акрихина с однонитчатыми полинуклеотидами поли(А) и поли(У) в водных растворах при нейтральном значении рН. При малых отношениях молярных концентраций полимера и красителя P/D и низкой ионной силе доминирует агрегация молекул акрихина, возникающая в результате кооперативного связывания с полианионной матрицей со стэкингом хромофоров. Агрегация характеризуется гипохромизмом спектров поглощения и почти полным тушением флюоресценции. При высоких значениях P/D стопки молекул красителя распадаются и их хромофоры переключаются на стэкинг с кольцами оснований с изменением оптических свойств, характерным для интеркаляции в двойную спираль ДНК. На основе полученных данных с помощью теорий Шварца и Нечипуренко проведен количественный анализ конкуренции двух типов комплексообразования.

Введение. В технике хромосомного окрашивания часто используются акридиновые красители. Из них наиболее контрастную картину дает акрихин, однако молекулярно-физического объяснения его неравномерного свечения до сих пор не дано [1]. Для решения этого вопроса необходимо знать все особенности взаимодействия красителя с разными нуклеиновыми кислотами. Известно, что катионные красители, к которым относятся акридины, связываются с ДНК при помощи двух типов взаимодействия — интеркаляцией между парами оснований и посредством электростатического притяжения к сахарофосфатному остову. Особенности второго типа комплексообразования изучены недостаточно, в особенности для дикатионных красителей, каким является акрихин (рис. 1). Очевидно, что этот тип взаимодействия должен быть существенным при связывании с однонитчатыми структурами нуклеиновых кислот, в которых нет спаренных оснований и фосфатные группы легко доступны для молекул красителей.

В данной работе исследованы спектрально-флюоресцентные свойства комплексов акрихина с полинуклеотидами поли(А) и поли(У) в широком диапазоне отношений молярных концентраций полимера и красителя (P/D) при низкой и физиологической ионной силе. Чисто электростатическое связывание смоделировано на полианионной матрице неорганического полифосфата. Определены количественные характеристики двух типов комплексообразования и их соотношение в зависимости от P/D и ионной силы растворов.

Материалы и методы. В работе использовали дигидрохлорид акрихина фирмы «Serva» (ФРГ), натриевые соли поли(А) и поли(У) фирмы «Reanal» (Венгрия) и полифосфат натрия производства «Sigma» (США) (степень полимерности 75) без дополнительной очистки. В качестве растворителей применяли деионизованную дистиллированную воду и 1 мМ Na-какодилатный буфер, рН 7, с содержанием 0,5 мМ ЭДТА, приготовленный на деионизованной дистиллированной воде. Для создания ионной силы $\mu=0,1$ добавляли NaCl.

Концентрацию препаратов определяли спектрофотометрически, используя коэффициенты молярной экстинкции для поли(А) $\epsilon_{257}=10100$, для поли(У) $\epsilon_{260}=9600$, для акрихина $\epsilon_{424}=9750 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [2]. Концентрацию полифосфата устанавливали по массе растворенного вещества (1 %-ный раствор содержит $9,8 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ фосфатов [3]).

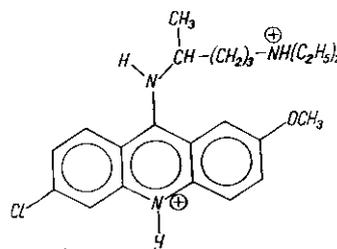


Рис. 1. Молекулярная структура акрихина

Спектры поглощения снимали на спектрофотометре Specord M-40 фирмы «Carl Zeiss» (ФРГ). Флуоресцентные измерения выполняли на спектрофлюориметре, созданном на базе двойного монохроматора ДФС-12, с регистрацией по методу счета фотонов. С помощью охлаждения темновые шумы ФЭУ уменьшали до 2 имп/с. Для возбуждения флуоресценции использовали непрерывное плоскополяризованное излучение гелий-кадмиевого лазера ЛПМ-11, $\lambda=441,6$ нм, мощность которого стабилизировали с погрешностью $\pm 0,2\%$ при помощи устройства,

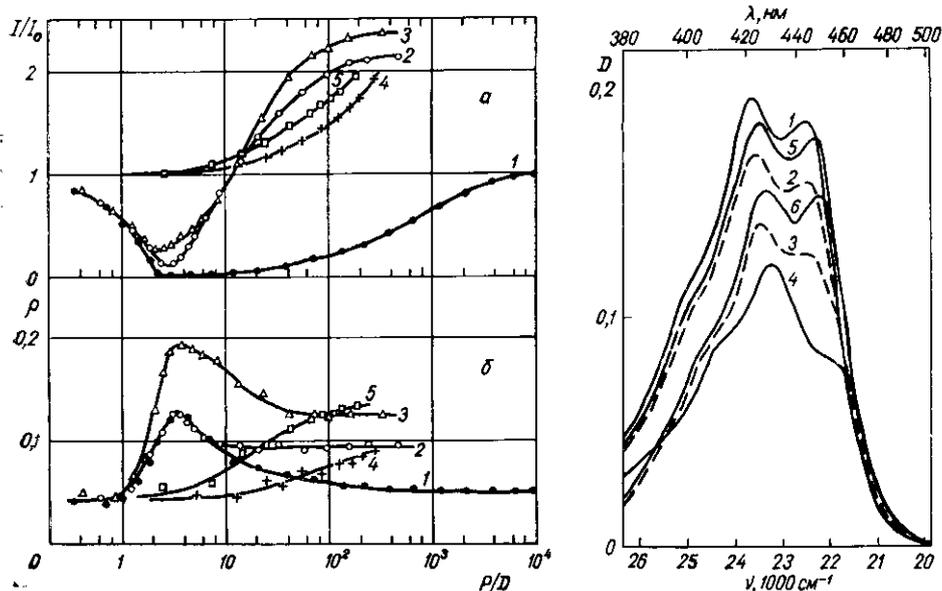


Рис. 2. Изменение интенсивности (а) и степени поляризации (б) флуоресценции акрихина при титровании полимерами (I_0 — интенсивность флуоресценции свободного красителя): 1 — полифосфатом в воде; 2 — поли(U) в воде; 3 — поли(A) в какодилатном буфере, pH 7, $\mu=0,002$; 4 — поли(U) при $\mu=0,1$; 5 — поли(A) при $\mu=0,1$. Концентрация акрихина $2 \cdot 10^{-5}$ М

Рис. 3. Изменение спектра поглощения акрихина (концентрация $2 \cdot 10^{-5}$ М) в видимой области при связывании с полифосфатом и полинуклеотидами в воде: 1 — свободный краситель; 2 — 4 — в смеси с полифосфатом при $P/D=0,7$; 1,5 и 4 соответственно; 5 — комплекс с поли(U), 6 — комплекс с поли(A) при $P/D=400$

аналогичного описанному Говором и Нестеренко [4]. Флуоресценцию регистрировали под прямым углом к направлению возбуждающего луча с вертикальным положением электрического вектора. Поляризацию флуоресценции измеряли в максимуме полос излучения при помощи призмы Аренса. Для исключения избирательности монохроматора в отношении состояния поляризации излучения перед входной щелью спектрометра поставлен деполаризующий оптический клин. Интенсивность флуоресценции измеряли в максимумах спектров при двух положениях поляризационной призмы: пропускающем излучение с электрическим вектором, параллельным вектору возбуждающего луча I_{\parallel} , и перпендикулярным ему I_{\perp} . Из измеренных интенсивностей вычитали вклады релеевского и рамановского рассеяния света, которые определяли в растворах полимеров без красителя. Кроме того, вносили поправку на поглощение возбуждающего луча в слое раствора от входной стенки до середины кюветы, из которой регистрировали флуоресценцию. Погрешность измерений интенсивности флуоресценции не превышала $\pm 0,5\%$. Общую интенсивность I и степень поляризации ρ вычисляли по формулам:

$$I = I_{\parallel} + 2I_{\perp}; \quad \rho = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + I_{\perp}).$$

Поглощение и флуоресценцию измеряли в кварцевых кюветках (1 см) при температуре 22—24 °С. Раствор акрихина (2 мл, $2 \cdot 10^{-5}$ М)

титровали прямо в кювете раствором полимера, содержащем такую же концентрацию красителя, что обеспечивало изменение P/D без изменения концентрации лиганда.

Результаты и обсуждение. На рис. 2 приведены кривые флуоресцентного титрования акрихина полифосфатом, поли(А) и поли(У) в водных растворах, построенные в виде зависимости от P/D интенсивности I и степени поляризации ρ флуоресценции. Полифосфат использован в качестве модели полианионной матрицы полинуклеотидов с целью исследования особенностей чисто электростатического взаимодействия дикатионов акрихина с отрицательно заряженным сахарофосфатным остовом однонитчатых молекул нуклеиновых кислот. Чтобы связывание было наиболее полным, титрование проводили в деионизованной воде в отсутствие конкурирующего действия ионов металлов. Кривая изменения интенсивности флуоресценции (рис. 2, а, кривая 1) имеет вид, типичный для кооперативного связывания катионных красителей с линейными полианионами [5—7]. Сильное тушение флуоресценции свидетельствует о стэкинговом взаимодействии связанных хромофоров акрихина, очевидно, в виде стопок вдоль цепи полимера. Наименьшее остаточное свечение, наблюдаемое при $P/D=4$, составляет 0,5 % начальной интенсивности флуоресценции свободного красителя. Минимальное свечение обладает наибольшей степенью поляризации — в 3 раза большей, чем для свободных молекул (рис. 2, б, кривая 1). Это означает, что флуоресценция стэкинговых ассоциатов полностью не потушена.

Спектр поглощения агрегатов акрихина (рис. 3, спектр 4) отличается от такового свободных молекул гипохромизмом на 40 % и bathochромной сдвижкой на 7 нм. Эти изменения (особенно гипохромизм) почти такие же, как при интеркаляции в двойную спираль ДНК [2], поэтому заметить агрегацию акрихина на полианионной матрице ДНК при помощи абсорбционной спектроскопии трудно.

С увеличением P/D стопки молекул красителя распадаются на мономеры, вследствие чего наблюдается возврат спектроскопических свойств к первоначальным, т. е. присущим свободному красителю. При $P/D \geq 10^4$ спектры поглощения и флуоресценции уже не отличаются от таковых для свободного акрихина, за исключением поляризации, которая существенно больше (рис. 2, б, кривая 1). Последнее обстоятельство означает, что краситель остается связанным с полифосфатом мономерно и подвижность его хромофоров затормаживается без изменения электронной структуры.

Взаимодействие акрихина с поли(У) изучали в воде, а с поли(А) — в какодилатном буфере при pH 7, чтобы обеспечить условия существования одноцепочечной структуры [8]. Из графиков флуоресцентного титрования при низкой ионной силе растворов (и, рис. 2, а) следует, что с полинуклеотидами образуются два типа комплексов, конкурирующих между собой. До $P/D=2$ доминирует агрегация красителя (комплекс I), так как флуоресценция тушится, а спектры поглощения изменяются так же, как при связывании с полифосфатом (рис. 3, спектры 2 и 3). С дальнейшим увеличением P/D флуоресценция снова разгорается и при $P/D \geq 400$ выходит на уровень, превышающий интенсивность свободного красителя более чем в два раза. При этом степень поляризации флуоресценции остается выше, чем для мономерных комплексов с полифосфатом (рис. 2, а, б). Это, несомненно, свидетельствует о том, что при диссоциации стопок красителя на отдельные молекулы их хромофоры переключаются на взаимодействие с гетероциклическими кольцами оснований по типу интеркаляции (комплекс II). Действительно, при интеркаляции акрихина в двухцепочечную поли[d(A—T)] \times поли[d(A—T)] интенсивность флуоресценции увеличивается в 2,3 раза [9].

Несколько неожиданным оказалось то, что I/I_0 для обоих полинуклеотидов отличается незначительно, хотя их вторичная структура различна: поли(А) является спиралью с почти полным стэкингом основа-

ний, а поли(U) — полностью разупорядоченна [8]. По-видимому, хромофоры красителя стыкуют на себе по два соседних кольца урацила, а в случае с поли(A) — встраиваются в стэкингую последовательность оснований. Изменения спектров поглощения акрихина в комплексах этого типа характеризуются гипохромизмом, bathochromным сдвигом и сужением полос (рис. 3, спектры 5 и 6), что также характерно для интеркаляции. Однако в отличие от флюоресценции эти эффекты существенно меньше, чем при связывании с ДНК [2], особенно в случае с поли(U).

Начальные прямолинейные участки на кривых флюоресцентного титрования (рис. 4) соответствуют полному насыщению полимеров красителем. Они совпадают для всех трех исследованных систем и при экстраполяции к оси P/D отсекают отрезок, определяющий стехиометрию комплексов — одна молекула акрихина на 2,1 мономерной единицы полимера. Как указывалось выше, характер изменения спектроскопических

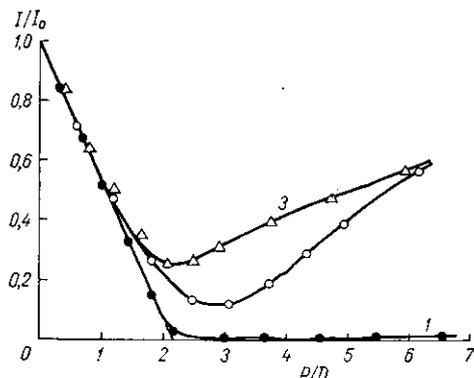


Рис. 4. Начальные участки кривых флюоресцентного титрования. Обозначения те же, что на рис. 2. Пунктиром показано определение стехиометрии комплексов

свойств свидетельствует лишь об агрегации красителя. Отсутствие комплексов II логично объяснить тем, что для их формирования, так же как и для комплексов I, необходимо наличие отрицательных зарядов на полимере, которых, однако, не остается при полном насыщении полианионной матрицы стэкингowymi ассоциатами. Очевидно, комплекс II укрепляется присоединением алифатической цепочки акрихина с положительным зарядом к фосфатной группе полинуклеотида. Исход конкуренции двух типов комплексообразования зависит от соотношения констант связывания обоих процессов.

Для определения констант связывания прежде всего необходимо знать доли красителя несвязанного и находящегося в комплексах. Их находили по флюоресцентным данным, используя систему уравнений:

$$I = I_0 f_0 + I_I f_I + I_{II} f_{II};$$

$$f_0 + f_I + f_{II} = 1,$$

где f_0 , f_I и f_{II} — доли красителя свободного, в комплексах I и II соответственно; I_0 , I_I и I_{II} — интенсивность свечения всего количества красителя, находящегося в одном из этих состояний. Для системы акрихин — полифосфат под комплексами II подразумевается мономерное связывание. Так как неизвестных три, а уравнений имеется два, мы определили с достаточной для наших целей точностью f_0 и f_I при $P/D \leq 2$, положив $f_{II} = 0$, а также f_I и f_{II} при $P/D \geq 4$, положив $f_0 = 0$.

Используя полученные данные, определили параметры кооперативного связывания акрихина с полифосфатом по методике Шварца [10]: $K_I = 4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ — константа кооперативного взаимодействия и $q = 100 \pm 10$ — параметр кооперативности. Соотношение констант двух типов связывания акрихина с полинуклеотидами оценили по формуле, которая выводится из системы уравнений (35), полученных Нечипуренко в работе [11]:

$$\frac{K_I}{K_{II}} = \frac{(1-r)(1-r-\gamma) \cdot \gamma}{(1-2r^2)r_I \cdot r_{II}},$$

где $r_I = f_I D/P$, $r_{II} = f_{II} D/P$, $r = r_I + r_{II}$ и γ — число контактов лигандов в стопках, определяется из уравнения $(r_I - \gamma)^2 = \gamma(I - r - \gamma)/q$. При этом принимают, что в комплексах I лиганд занимает два звена решетки, а в комплексах II — одно звено, и константа кооперативности для агрегации такая же, как на полифосфате.

Величина K_I/K_{II} для обоих полинуклеотидов изменяется от значения 50 при $P/D=6$ до 10 при $P/D=400$. Это уменьшение связано с увеличением μ за счет внесения ионов натрия самим полимером, которые сильно конкурируют с электростатической фиксацией молекул акрихина. Это подтверждается титрованием при $\mu=0,1$ (рис. 2, кривые 4 и 5): агрегация красителя исчезает, а взаимодействие с основаниями остается. Эффектом ионной силы также объясняется различная глубина минимумов на кривых флуоресцентного титрования для поли(A) и поли(U) (рис. 4).

Полученный результат для K_I/K_{II} объясняет поведение соотношения двух типов комплексообразования в зависимости от P/D при низкой μ . Согласно теории кооперативного связывания [10, 11], так как $K_I > K_{II}$, при насыщении решетки лигандом полимер заполняется только стопками красителя. При больших значениях P/D электростатическая фиксация лиганда осуществляется мономерно с константой связывания K_I/q , которая в нашем случае на порядок меньше, чем для комплексов II, и поэтому последние доминируют.

Резюме. Методом лазерной поляризованной флуоресценции вивчено взаємодію акридинового забарвника акрихіну з одностривковими полінуклеотидами полі(A) та полі(U) у водних розчинах з нейтральним значенням рН. При малих співвідношеннях молярних концентрацій полімеру і забарвника (P/D) та низькій іонній силі домінує агрегація молекул акрихіну, що виникає в результаті кооперативного зв'язування з поліаніонною матрицею із стекінгом хромофорів. Агрегація характеризується гіпохромізмом спектрів поглинання і майже повним гасінням флуоресценції. При високих значеннях P/D купки молекул забарвника розпадаються і їх хромофори переключаються на стекінг з кільцями основ із зміною оптичних властивостей, характерною для інтеркаляції у подвійну спіраль ДНК. На основі одержаних даних за допомогою теорії Шварца та Нечипуренка проведено кількісний аналіз конкуренції двох типів комплексоутворення.

Summary. The interaction of quinacrine with single-stranded polynucleotides poly(A) and poly(U) in aqueous solutions at neutral pH is studied by the laser polarized fluorescence method. At small polymer-dye ratios, P/D , and low ionic strength quinacrine molecule aggregation, due to cooperative binding to the polyanionic matrix, followed by chromophore stacking, predominates. Aggregation is characterized by hypochromism of the absorption spectra and by almost complete fluorescence quenching. At high P/D values the stacks of dye molecules dissociate, and its chromophores stack with base rings and change its optical properties which is characteristic of intercalation into double-stranded DNA. The quantity analysis of competition of two complex formation types was made using the obtained data and the theories proposed by Schwarz and Nechipurenko.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Molecular and spectroscopic aspects of chromosome binding* / G. Löber, V. Kleinwächter, J. Koudelka et al. // *Biol. Zbl.*— 1976.— 95, N 2.— P. 169—191.
2. *Wilson W. D., Lopp J. G.* Analysis of cooperativity and ion effects in the interaction of quinacrine with DNA // *Biopolymers.*— 1979.— 18, N 12.— P. 3025—3041.
3. *Strauss U. P., Smith E. H., Wineman P. L.* Polyphosphates as polyelectrolytes. I Light scattering and viscosity of sodium polyphosphates in electrolyte solutions // *J. Amer. Chem. Soc.*— 1953.— 75, N 16.— P. 3935—3940.
4. *Говор И. Н., Нестеренко В. М.* Стабилизатор мощности ОКГ // *Приборы и техника эксперимента.*— 1974.— № 3.— С. 168—169.

5. Löber G., Koudelka J., Smekal E. Stacking interactions of ethidium bromide bound to a polyphosphate and phage DNA *in situ* // Biophys. Chem.—1974.—2, N 1.—P. 158—163.
6. Interaction of phenosafranin with nucleic acids and model polyphosphates / Z. Balkarova, V. Kleinwachter, J. Koudelka et al. // Ibid.—1978.—8, N 1.—P. 17—25.
7. Löber G. The fluorescence of dye-nucleic acid complexes // J. Luminescence.—1981.—22, N 2.—P. 221—265.
8. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот.—М.: Мир, 1987.—584 с.
9. Fluorescence analysis of G—C versus A—T binding of quinacrine to DNA / G. Baldini, S. Doglia, G. Sassi, G. Lucchini // Int. J. Biol. Macromol.—1981.—3, N 8.—P. 248—252.
10. Schwarz G. Cooperative binding to linear biopolymers // Eur. J. Biochem.—1970.—12, N 3.—P. 442—453.
11. Нечипуренко Ю. Д. Кооперативные эффекты при связывании протяженных лигандов с ДНК. II. Контактные взаимодействия между адсорбированными лигандами // Молекуляр. биология.—1984.—18, № 4.—С. 1066—1080.

Физ.-техн. ин-т низких температур АН Украины,
Харьков

Получено 03.07.91

УДК 577.112

В. И. Древаль

ВЛИЯНИЕ АТФ И ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА СТРУКТУРУ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН

Исследовали влияние АТФ и ионизирующего излучения на структуру плазматических мембран тимоцитов с помощью определения анизотропии флюоресценции и тушения флюоресценции остатков триптофана мембранных белков. Данные анизотропии флюоресценции триптофана позволили установить наличие двух участков связывания АТФ на мембранных белках, определены константы связывания, число мест и энергия связывания. Показано изменение структуры белков плазматических мембран тимоцитов при воздействии ионизирующего излучения.

В проводимых ранее исследованиях было установлено влияние ионизирующего излучения на структуру биологических мембран [1, 2]. Однако в литературе отсутствуют данные о динамике конформационных перестроек мембранных белков при воздействии радиации. В настоящее время для исследования динамических аспектов структурных перестроек белков широко используется флюоресцентная спектроскопия [3, 4]. Цель настоящей работы заключалась в исследовании влияния ионизирующего излучения на структуру мембранных белков плазматических мембран тимоцитов методом тушения триптофановой флюоресценции белков с применением АТФ.

Материалы и методы. В работе использовали плазматические мембраны тимуса крупного рогатого скота [5].

Флюоресценцию измеряли на спектрофлюориметре «Hitachi MPF-2A» (Япония) при 25 °С в термостатируемых кюветах 10 × 10 мм. Среда инкубации содержала 50 мМ трис-НСl, рН 7,6, 10 мМ ЭДТА и 0,4 мг белка/мл. Гидролиз АТФ в эксперименте не наблюдался. Флюоресценцию остатков триптофана мембранных белков ($\lambda_{возб} = 280$ нм, $\lambda_{фл} = 340$ нм) определяли по методу [6].

Суспензию плазматических мембран тимоцитов облучали на импульсном линейном ускорителе электронов энергией 5 МэВ в дозах 10, 10², 10³ и 10⁴ Гр.

Результаты и обсуждение. Для исследования структурной динамики белков в качестве тушителя собственной флюоресценции белков использовали АТФ. Поэтому на первоначальном этапе работы было проведено изучение характера взаимодействия АТФ с мембранными